



**HAL**  
open science

# Étude de la myopathie héréditaire par surcharge en polysaccharides chez les chevaux Cob normand

Bérénice Herszberg

► **To cite this version:**

Bérénice Herszberg. Étude de la myopathie héréditaire par surcharge en polysaccharides chez les chevaux Cob normand. Biochimie [q-bio.BM]. Université de Versailles-Saint Quentin en Yvelines, 2008. Français. NNT: . tel-00411522

**HAL Id: tel-00411522**

**<https://theses.hal.science/tel-00411522>**

Submitted on 27 Aug 2009

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines  
Ecole doctorale « Des génomes aux organismes »

# Etude de la myopathie héréditaire par surcharge en polysaccharides chez les chevaux Cob normand

Thèse pour le

Doctorat de biochimie et biologie moléculaire

Présentée et soutenue publiquement

par Bérénice Herszberg

le 11 décembre 2008

Jury :

Bernadette Limbourg-Bouchon, présidente du jury

Abderrahman Maftah, rapporteur

Hubert de Rochambeau, rapporteur

Edmond Criuiu, examinateur

Gérard Guérin, directeur de thèse

## Remerciements

Je remercie les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer cette thèse.

Je reste particulièrement reconnaissante à Gérard Guérin et Stéphane Chaffaux pour leur encadrement et l'aide apportée au cours de cette recherche. Je remercie Edmond Crihiu de m'avoir accueillie dans les meilleures conditions au Laboratoire de Génétique biochimique et de Cytogénétique, à l'Inra de Jouy-en-Josas. J'exprime ma gratitude à Xavier Mata, Jean Luc Vilotte et Fabienne LeProvost pour le suivi de ce travail, leurs nombreux conseils et suggestions pertinentes.

Je remercie Thibaut Larcher, Yan Chérel, Eric Barrey et Elodie Mucher pour nos fructueuses collaborations. Je sais gré à Bertrand Langlois et Anne Ricard de leur contribution. Je témoigne ma reconnaissance à Stéphanie Valberg, Molly McCue et Jim Mickelson pour nos échanges et leur concours.

Je suis reconnaissante à Aude Giraudet, qui a réalisé les premiers diagnostics cliniques à l'origine de notre étude, de l'avoir initiée. Par l'intérêt qu'ils ont témoigné pour cette recherche et leur participation, Jean-Loup Danvy, Henri Albert et les éleveurs de chevaux Cob normand ont été des acteurs essentiels dans la réalisation de ce projet. J'associe à mes remerciements les Haras nationaux qui l'ont financé.

Je remercie Pauline Decaunes, Carine Vias et Anne Vaiman pour leur soutien scientifique et technique. Je témoigne ma reconnaissance à Maëlle Perrocheau, Pascal Laurent et Valérie Boutreux qui m'ont transmis leur savoir-faire dans le domaine de la biologie moléculaire. Je remercie Carine Genet, Cédric Cabau, Mathieu Diribarne, Mathieu Gauthier et Nicolas Verzelen pour leurs analyses et leur expertise en bio-informatique.

Merci à Pascal Laforêt, Norma Roméro, Irène Mère, Christiane Baussan et Marie-Odile Rolland qui, grâce à leur curiosité scientifique et leurs compétences, ont enrichi nos connaissances et possibilités d'investigation.

Je remercie enfin l'ensemble des membres du LGBC pour leur enthousiasme.



# Plan

<b>Introduction</b>	<b>8</b>
<b>1. Le syndrome « coup de sang » chez le Cheval</b>	<b>8</b>
1.1. La clinique	8
1.1.1. La rhabdomyolyse d'effort récidivante (RER)	9
1.1.2. L'hyperkaliémie périodique paralysante (HYPP)	10
1.1.3. Myopathie d'origine mitochondriale	11
1.1.4. Myopathie par surcharge en polysaccharides (PSSM)	11
1.2. Le diagnostic différentiel de ces myopathies équine d'effort	12
1.2.1. Biochimie sanguine	12
1.2.2. Histologie musculaire et cellulaire	12
1.2.3. Test moléculaire	13
<b>2. Les différentes formes de surcharges glyco(géno)lytiques héréditaires ou glyco(géno)lytiques, observées chez les mammifères.</b>	<b>13</b>
2.1. Les différentes formes de glyco(géno)lytiques	13
2.2. Les glyco(géno)lytiques équine	15
<b>3. Les apports de la pathologie comparée à l'étude de la myopathie équine par surcharge en polysaccharides</b>	<b>18</b>
<b>4. Stratégies d'identification de gènes d'intérêt</b>	<b>20</b>
4.1. Le clonage positionnel	20
4.2. L'approche gène candidat	21
<b>Travaux expérimentaux</b>	<b>22</b>
<b>1. Précision du phénotype</b>	<b>22</b>
<b>1.1. Matériel et méthodes</b>	<b>23</b>
1.1.1. Animaux et prélèvements	23
1.1.2. Colorations histologiques et analyses	24
<b>1.2. Résultats</b>	<b>24</b>
<b>1.3. Interprétation des résultats</b>	<b>30</b>
1.3.1. Prévalence et mode de transmission de l'affection	30
1.3.2. Méthode et critères du diagnostic	32
1.3.3. Gravité des lésions et leur évolution dans le temps	32
1.3.4. Nature et localisation des polysaccharides accumulés	33
<b>2. Etude de la pathogénie de l'affection</b>	<b>34</b>
<b>2.1. Etude physiologique</b>	<b>34</b>
2.1.1. Matériel et méthodes	34
2.1.1.1. Tests d'effort	34
2.1.1.2. Mesure de l'activité des enzymes glyco(géno)lytiques	35
2.1.1.3. Test de tolérance au glucose	36
2.1.2. Résultats	36
2.1.2.1. Tests d'effort	36
2.1.2.2. Evaluation de l'activité des enzymes glyco(géno)lytiques	37
2.1.2.3. Test de tolérance au glucose	38
2.1.3. Interprétation des résultats	40

<b>2.2.</b>	<b>Etude par des techniques de génétique fonctionnelle</b>	<b>41</b>
2.2.1.	Matériel et méthodes	41
2.2.2.	Résultats	42
2.2.2.1.	Gènes différentiellement exprimés	42
2.2.2.2.	Fonctions cellulaires activées ou réprimées et perturbations métaboliques chez les chevaux présentant une glycoséose musculaire	44
2.2.3.	Interprétation des résultats	46
<b>3.</b>	<b><i>Caractérisation structurale et fonctionnelle d'un gène candidat intervenant dans le métabolisme du glycogène</i></b>	<b>48</b>
<b>3.1.</b>	<b>Choix du gène candidat</b>	<b>48</b>
<b>3.2.</b>	<b>Etude d'AGL</b>	<b>50</b>
3.2.1.	Le gène AGL	50
3.2.2.	Matériel et méthodes	51
3.2.2.1.	Localisation du gène AGL	51
3.2.2.2.	Echantillons biologiques	51
3.2.2.3.	Clonage de l'ADNc du gène équin	52
3.2.2.4.	Recherche de polymorphismes	54
3.2.2.5.	Structure du gène	54
3.2.2.6.	Séquençage et analyse des séquences	54
3.2.2.7.	Etude in silico du promoteur équin	55
3.2.3.	Résultats	56
3.2.3.1.	Localisation du gène	56
3.2.3.2.	Séquence d'ADNc	56
3.2.3.3.	Structure du gène	56
3.2.3.4.	Expression tissulaire d'AGL	57
3.2.3.5.	Epissage alternatif des premiers exons	57
3.2.3.6.	Séquence protéique prédite	60
3.2.3.7.	Polymorphismes du gène AGL	60
3.2.3.8.	Etude du promoteur	61
3.2.4.	Interprétation des résultats	62
3.2.4.1.	Localisation d'AGL	62
3.2.4.2.	Analyse des séquences génomiques et protéiques : comparaison / conservation entre espèces	62
3.2.4.3.	Analyse des différents variants d'épissage alternatif et de leur expression tissulaire spécifique	63
3.2.4.4.	Etude du promoteur	63
<b>4.</b>	<b><i>Recherche d'une association entre génotypes et phénotypes au sein d'une famille de chevaux dans laquelle ségrègue la maladie</i></b>	<b>66</b>
<b>4.1.</b>	<b>Matériel et méthodes</b>	<b>66</b>
4.1.1.	Définition et détermination du phénotype	66
4.1.2.	Choix des gènes candidats	66
4.1.3.	Recherche de polymorphismes et détermination des génotypes	67
<b>4.2.</b>	<b>Résultats</b>	<b>68</b>
<b>4.3.</b>	<b>Interprétation des résultats</b>	<b>69</b>
<b>5.</b>	<b><i>Discussion générale</i></b>	<b>72</b>
<b>5.1.</b>	<b>Apports et limites des différentes méthodes employées</b>	<b>72</b>

5.1.1.	L'approche « gène candidat »	72
5.1.2.	Études histologique et enzymologique	73
5.1.3.	Étude physiologique	74
5.1.4.	Génétique moléculaire	75
5.1.5.	Approche transcriptionnelle et perspectives	76
<b>5.2.</b>	<b>Pathologie comparée et origine de la myopathie par surcharge en polysaccharides chez les chevaux Cob normand</b>	<b>76</b>
5.2.1.	Glycogénose de type 0 musculaire chez l'Homme	76
5.2.2.	Modèles murins	77
5.2.3.	Mutation « gain de fonction » de <i>GYS1</i> : une nouvelle forme de glycogénose	78
5.2.4.	Mutation de <i>GYS1</i> dans différentes races de chevaux	79
<b>5.3.</b>	<b>Conclusion</b>	<b>80</b>
	<b><i>Bibliographie</i></b>	<b>81</b>



## Introduction

C'est la mort spectaculaire, à la suite d'un « coup de sang », dans des conditions similaires, de deux juments Cob normand, sœurs, puis du diagnostic de myopathie par surcharge glycogénique établi lors de l'autopsie de l'une d'elle par le vétérinaire praticien, que nous avons orienté notre recherche vers la compréhension de la pathogénie et du déterminisme génétique et moléculaire de cette pathologie musculaire.

Nous aborderons tout d'abord la **clinique du syndrome « coup de sang »** chez le Cheval, qui se définit comme une myopathie aiguë récidivante à l'effort, afin de préciser la place et le **diagnostic différentiel** de la myopathie par surcharge glycogénique dans ce syndrome. Puis nous nous intéresserons aux **différentes surcharges glycogéniques héréditaires observées chez les mammifères** afin de tirer, de la pathologie, la physiologie et la pathogénie comparées, tous les enseignements nécessaires à notre étude génétique.

### 1. Le syndrome « coup de sang » chez le Cheval

#### 1.1. La clinique

Ce syndrome est encore appelé : « Maladie du lundi matin », myoglobinurie paroxystique, rhabdomyolyse ou encore, de façon impropre, myosite. Il s'agit d'une crise de myopathie aiguë, récidivante, induite par l'exercice. Ces crises se manifestent sous forme de douleurs musculaires subites, de tremblements (ou myoclonies qui sont le tressaillement localisé de certains faisceaux musculaires), de crampes, pendant ou tout de suite après l'effort. Le cheval a alors de très grandes difficultés à se mouvoir, il reste comme figé sur place. Lors de crises graves, de l'hyperthermie et de la tachycardie sont constatées. Dans ces cas, de la myoglobinurie est observée, l'urine a alors une coloration marron, voire noirâtre. L'insuffisance rénale, parfois mortelle, peut être la conséquence de cette myoglobinurie. Ces crises sont, chez un même animal, récurrentes. Des formes moins graves sont également possibles. Elles se manifestent par des douleurs musculaires à l'exercice qui, selon leur localisation et leur étendue, se traduiront par de la boiterie à chaud, un mal de dos, un décubitus prolongé, des raideurs passagères ou des tremblements intermittents.

Ce syndrome est dû à des lésions musculaires de rhabdomyolyse. Ces lésions sont la conséquence de causes multiples et variées. La réponse clinique du muscle lésé est limitée, d'où cette symptomatologie fruste et ces manifestations stéréotypées lors de myopathies : contractures et spasmes, suivies de leurs répercussions sur la locomotion et les mouvements de l'animal.

Dans l'espèce équine, ces myopathies sont fréquentes. On estime que 5 à 7% des Pur-sang présentent, au moins une fois, une crise au cours d'une saison de course (MacLeay *et al.* 1999a), (McGowan *et al.* 2002a). Parmi les chevaux de trait, 36% en ont les séquelles musculaires spécifiques (Firshman *et al.* 2005).

Les facteurs favorisant la survenue des crises sont multiples. Parmi ceux-ci l'alimentation trop riche en énergie (céréales principalement), par rapport aux besoins de l'animal, semble être importante. N'a-t-on pas appelé, jadis du temps de la traction animale, ces affections « maladie du lundi matin » pour cette raison ? Le cheval au repos le dimanche recevait la même ration que les autres jours de la semaine, cette suralimentation dominicale déclenchait la crise lors de la reprise du travail le lundi !

Mais outre ce déséquilibre énergétique, c'est l'ensemble des facteurs qui perturbent l'intégrité et l'équilibre de la cellule musculaire qui favorise le déclenchement de ces crises. Ainsi, un surentraînement produit un épuisement musculaire, cet épuisement libère des radicaux libres oxydatifs ce qui lèse les fibres musculaires (Piercy & Rivero 2004). Par ailleurs, les contractions musculaires excentriques (celles se produisant sur un muscle en extension) lèsent également les fibres. Ainsi, que le stress soit oxydatif ou mécanique, la membrane cellulaire est fragilisée et la cellule musculaire lésée.

Des déséquilibres électrolytiques consécutifs à une déshydratation, une carence vitaminique, des séquelles d'une maladie infectieuse sont également causes de perturbation de l'homéostasie de la cellule musculaire. Son osmolarité est déstabilisée, son taux de calcium interne augmente de façon importante, ce qui provoque sa mort. Car, normalement, dans la cellule musculaire au repos, la concentration en calcium intracellulaire est cent fois plus faible que dans le milieu extra-cellulaire. Lorsque la membrane cellulaire est lésée ou quand l'équilibre osmotique et les flux ioniques sont perturbés, le calcium passe du milieu extra-cellulaire au milieu intracellulaire. Cet afflux de calcium active des protéases cellulaires destructrices, prive la cellule d'énergie et déclenche un processus de nécrose auquel est souvent associée une inflammation. Cette destruction de la fibre musculaire striée est appelée rhabdomyolyse.

Ainsi, toute cause de bouleversement de l'homéostasie intracellulaire de la fibre musculaire est un facteur favorisant la crise de myopathie liée à l'effort (Piercy & Rivero 2004). Dans tous les cas, l'exercice est le facteur déclenchant.

Cependant ces crises ne surviennent que chez des animaux prédisposés. Cette prédisposition semble être d'origine génétique. C'est ce que nous envisagerons dans cette thèse.

Les connaissances actuelles, physiologiques et histologiques, permettent de distinguer dans ce syndrome « coup de sang » trois entités pathologiques principales. Chacune de ces entités a sa prédisposition génétique propre. Ces trois entités sont nommées : Rhabdomyolyse d'effort récidivante (RER), Hyperkaliémie périodique paralysante (HYPP) et Myopathie par surcharge en polysaccharides (PSSM). Dernièrement une myopathie beaucoup plus rare, d'origine mitochondriale, a été décrite chez le Cheval.

### **1.1.1. La rhabdomyolyse d'effort récidivante (RER)**

Elle s'observe, principalement chez les chevaux de sport. Elle est due à une modification de l'homéostasie du calcium intracellulaire. Un afflux de calcium active des protéases cellulaires qui privent les fibres d'énergie, lysent les cellules et déclenchent un processus de nécrose auquel est souvent associée une inflammation. Cette myolyse se manifeste par des difficultés à se déplacer, allant d'une légère raideur à l'immobilité, associées à de l'anxiété, une sudation importante et la contracture des principaux groupes musculaires. Une myoglobulinurie paroxystique est facilement observée lors de crise aiguë. Les crises surviennent généralement à l'entraînement. La forme subclinique de cette myopathie est supposée être à l'origine de baisses de performances en compétition. Cette rhabdomyolyse d'effort est principalement observée chez de jeunes juments nerveuses (Harris 1991). Des changements dans les méthodes ou le rythme d'entraînement, de même que des modifications dans l'environnement du cheval sont des facteurs perturbateurs pouvant-déclencher les crises.

Les chevaux qui présentent ces crises sont des chevaux prédisposés génétiquement. Chez eux le relargage du calcium à partir des citernes intra cellulaires est exacerbé, ce qui les rend particulièrement sensibles à cette forme de rhabdomyolyse (Lentz *et al.* 1999). Ainsi, chez le Pur Sang, il semble que cette sensibilité soit un caractère héréditaire se transmettant suivant un mode autosomique dominant (Dranchak *et al.* 2005), (MacLeay *et al.* 1999b). Trois gènes intervenant dans la régulation calcique de la cellule musculaire (RYR1, CACNA1S, et ATP2A1), qui pouvaient être candidats à cette prédisposition, ont été exclus par une étude de liaison génétique (Dranchak *et al.* 2006). Le gène dont la mutation serait à l'origine de cette sensibilité à l'affection chez le Pur-sang n'a donc pas encore été identifié.

Chez le Trotteur suédois, le caractère héréditaire de cette prédisposition a également été démontré et des marqueurs moléculaires lui ont été associés (Collinder *et al.* 1997).

### **1.1.2. L'hyperkaliémie périodique paralysante (HYPP)**

L'hyperkaliémie périodique paralysante se manifeste principalement par une faiblesse musculaire, associée à des spasmes et myoclonies. Cette persistance involontaire des contractions musculaires est généralement brève et/ou inapparente. La myotonie peut être dans tous les cas, perçue par l'observation du prolapsus de la troisième paupière ou celle de spasmes de certains muscles faciaux. Les chevaux de race Quarter Horse ou apparentés à cette race sont prédisposés à cette forme de myopathie d'effort. L'atteinte ne se présente pas toujours sous cette forme bénigne, elle peut provoquer la mort par arythmie cardiaque (secondaire à l'hyperkaliémie) ou par asphyxie due à un laryngospasme. Les premiers signes cliniques peuvent apparaître tardivement dans la vie du cheval (Spier *et al.* 1990). Les crises se manifestent avec une fréquence variable selon les individus. Entre les crises les chevaux apparaissent cliniquement normaux.

La transmission du message nerveux à l'origine de la contraction des fibres musculaires est liée aux mouvements des ions sodium et potassium de part et d'autre de la membrane de la cellule musculaire. Ces mouvements sont responsables de la propagation du potentiel d'action. Une ouverture excessive des canaux sodiques a pour conséquence une entrée de sodium dans la cellule accompagnée d'une sortie de potassium à l'origine de l'hyperkaliémie. Ces mouvements anormaux d'ions, dans le sens de leurs gradients de concentration, diminuent la polarité de la membrane de la fibre musculaire. Le potentiel de repos de la membrane de cette fibre est alors plus proche du seuil de dépolarisation, la fibre musculaire devient donc plus facilement excitable. L'hyperkaliémie est, de ce fait, à la fois la cause (diminution de la polarité membranaire) et la conséquence (sortie du potassium accompagnant l'entrée de sodium dans la cellule musculaire) des crises paralytiques. Par ailleurs, le froid élève le potentiel de repos des cellules musculaires et accroît leur sensibilité à la dépolarisation, ce qui explique une plus grande sensibilité des chevaux prédisposés lorsqu'ils sont exposés au froid.

L'hyperkaliémie périodique paralysante est une affection héréditaire dont la transmission est autosomique dominante (Rudolph *et al.* 1992b). Les individus homozygotes sont plus sévèrement atteints que les hétérozygotes (Naylor *et al.* 1999). Une mutation dans le gène codant pour la sous-unité alpha d'un canal sodique musculaire a été découverte, elle est la cause de cette affection (Rudolph *et al.* 1992a). Elle est présente à l'état hétérozygote chez 4,4% des chevaux Quarter Horses américains (Bowling *et al.* 1996). L'allèle morbide est également retrouvé chez des chevaux de races Appaloosa et Paint Horses, races apparentées aux Quarter Horses.

### 1.1.3. Myopathie d'origine mitochondriale

Lorsque l'activité des enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale est réduite, la cellule musculaire ne dispose plus suffisamment d'énergie mobilisable par voie aérobie. Elle produit alors cette énergie par voie anaérobie. Ce qui entraîne, même lors d'un exercice léger, l'accumulation d'acide lactique. Cette acidose lactique est responsable de myalgie et de crampes musculaires. Cette forme de myopathie d'origine mitochondriale a été mise en évidence chez un cheval Arabe (Valberg *et al.* 1994). Elle se caractérise par une sévère intolérance à l'effort.

L'origine génétique de cette intolérance est certainement une mutation dans le génome de la mitochondrie. Ce génome est transmis par la voie maternelle. La mutation causale n'a pas encore été identifiée. Cependant, le séquençage du génome mitochondrial du Cheval et la disponibilité prochaine d'une puce permettant d'étudier l'expression des gènes de la mitochondrie offriront les outils pour cette recherche.

### 1.1.4. Myopathie par surcharge en polysaccharides (PSSM)

Elle est caractérisée par l'accumulation de glycogène et la présence de polysaccharides résistant à la digestion par l'amylase dans les fibres musculaires. Pour les chevaux lourds, c'est la forme PSSM qui semble la plus fréquente des myopathies d'effort. Aux Etats Unis, une étude rétrospective a mis en évidence des lésions caractéristiques d'une myopathie par surcharge en polysaccharides chez 36% des chevaux de Trait Belge autopsiés (Firshman *et al.* 2005). Cette myopathie a été décrite chez de nombreuses races de chevaux, de poneys et même chez une mule (Valentine *et al.* 2001). Les chevaux prédisposés qui reçoivent une ration riche en concentrés et qui ne sont pas entraînés régulièrement seront particulièrement sujets aux « coups de sang ». En dehors des épisodes aigus, des crampes et douleurs musculaires pouvant causer des baisses de performances, une boiterie postérieure idiopathique, une posture anormale liée à une raideur de l'arrière train, une flexion exagérée des jarrets associée à des tressaillements, une amyotrophie (pouvant aller jusqu'à la cachexie) ou un décubitus soudain constituent des signes d'appel pour cette myopathie par surcharge en polysaccharides. La maladie est d'autant plus difficile à diagnostiquer que chez la majorité des chevaux, elle demeure sub-clinique.

Les chevaux atteints stockent des quantités excessives de glycogène. Le glycogène constitue normalement une réserve énergétique mobilisable en condition anaérobie. Ainsi, après un exercice de longue durée ou lors d'un effort intense, le glycogène est dégradé en lactate par la glycogénolyse.

Les enzymes intervenant dans la synthèse du glycogène, comme celles intervenant dans sa dégradation, sont normalement fonctionnelles chez les chevaux Quarter Horse prédisposés à cette forme de myopathie (Valberg *et al.* 1998). Cependant, un déséquilibre d'activité entre les différentes enzymes du métabolisme du glycogène pourrait être responsable de la synthèse du polysaccharide anormalement branché, résistant à l'amylase, retrouvé dans les fibres musculaires, lors de l'affection.

Cette affection est héréditaire ; son mode de transmission semble dominant. Les gènes codant pour les différentes sous-unités des protéines kinases activées par l'AMP ont été étudiés sans que leur implication puisse encore être confirmée (Park *et al.* 2003). En 2008, une mutation ponctuelle responsable d'un surcroît d'activité de la glycogène synthase, pouvant entraîner la présence de polysaccharides résistant à la digestion par l'amylase dans le

muscle des chevaux atteints, a été identifiée chez les chevaux Quarter Horse américains (McCue *et al.* 2008).

C'est de ce dernier type de myopathie, la myopathie par surcharge en polysaccharides, dont souffraient les juments Cob normand mortes soudainement lors d'exercice, à l'origine de ce travail débuté fin 2004 et sur lequel nous allons centrer notre étude.

## **1.2. Le diagnostic différentiel de ces myopathies équine d'effort**

### **1.2.1. Biochimie sanguine**

L'importance de la lyse des fibres musculaires s'évalue grâce au dosage sérique des enzymes musculaires. L'élévation des concentrations sanguines de la créatine kinase (CK) et de l'aspartate amino-transférase (ASAT) est mesurée lors de rhabdomyolyse d'effort récidivante et de myopathie par surcharge en polysaccharides. La créatine kinase est un indicateur sensible de la souffrance musculaire. Mais seules une augmentation marquée ou la persistance d'une élévation modérée de la CK sérique sont cliniquement significatives. Le dosage de l'ASAT, bien que moins spécifique de la souffrance du muscle, peut être utilisé associé à celui de la CK, car sa demi-vie plasmatique est longue chez le Cheval (persistance de taux sériques d'ASAT élevés plusieurs semaines après la crise). Une activité CK élevée indique donc une rhabdomyolyse active ou récente (moins de 24h); une persistance de concentrations élevées de la CK indique que le processus lésionnel est toujours actif; alors qu'une activité de l'ASAT élevée associée à une activité normale de la CK indique que la lésion n'est plus active.

Une hyperkaliémie est mesurable lors de crises liées à une **paralysie périodique hyperkaliémique**, mais elle n'est pas systématiquement observée et n'est pas toujours spécifique de cette affection.

Une acidose lactique importante accompagne les intolérances à l'effort manifestées dans le cas de **myopathie mitochondriale** même après un exercice léger.

### **1.2.2. Histologie musculaire et cellulaire**

La biopsie musculaire du fessier moyen autorise un diagnostic de certitude des **myopathies par surcharge en polysaccharides**. Ce diagnostic est fondé sur l'observation de l'accumulation du glycogène dans les fibres musculaires et sur la présence de polysaccharides résistant à la digestion par l'amylase (Valberg *et al.* 1992).

Dans les cas de **rhabdomyolyse d'effort récidivante**, l'examen histologique montre des lésions inflammatoires lorsque le prélèvement musculaire est réalisé peu de temps après la crise. De plus, les cellules musculaires ainsi prélevées peuvent être mises en culture afin d'évaluer la régulation de leurs flux calciques grâce à des techniques d'imagerie par fluorescence (Lentz *et al.* 2002). Ce test *in vitro* est le diagnostic de certitude de la forme RER car il est le seul à mettre en évidence la dérégulation du transport intracellulaire du calcium. Malheureusement, il demeure actuellement expérimental.

Une **myopathie mitochondriale** peut être suspectée lors de coloration histologique anormale de la NADH-déshydrogénase, de la succinate déshydrogénase et de la cytochrome oxydase, suggérant un dysfonctionnement enzymatique de la chaîne respiratoire. L'observation ultrastructurale d'une disposition caractéristique des crêtes mitochondriales confirme l'origine de la myopathie (Valberg *et al.* 1994).

### 1.2.3. Test moléculaire

La forme HYPP, grâce à la découverte de la mutation causale, dispose d'un diagnostic fondé sur un test moléculaire (Rudolph *et al.* 1992b). Le test est réalisable à partir de l'ADN extrait des globules sanguins, des follicules des crins ou de cellules buccales. Ce test, en révélant les individus porteurs de la mutation délétère, confirme le diagnostic de l'affection chez les chevaux homozygotes et repère les individus porteurs hétérozygotes.

En 2008, un test moléculaire a également été développé pour diagnostiquer la mutation ponctuelle dans le gène codant pour la glycogène synthase musculaire à l'origine de la myopathie par surcharge de polysaccharides chez les chevaux Quarter Horse et apparentés (McCue *et al.* 2008). L'affection étant transmise suivant un mode autosomique dominant, tous les individus porteurs de la mutation, à l'état homozygote ou hétérozygote, sont des sujets à risque.

	Prise de sang				Biopsie musculaire
	CK et ASAT	K+	lactate	Test moléculaire	
RER	↗	-	-/+	-	Rhabdomyolyse Imagerie par fluorescence
PSSM	↗	-	-/+	+	Polysaccharide résistant à l'amylase
HYPP	-	+	-/+	+	-
Myopathie mitochondriale	-	-	+++	-	Coloration anormale (NADH, succinate dehydrogénases, Cyt. oxydase) Crêtes mitochondriales

Tableau 1 : Synthèse du diagnostic différentiel des myopathies d'effort du Cheval adulte.

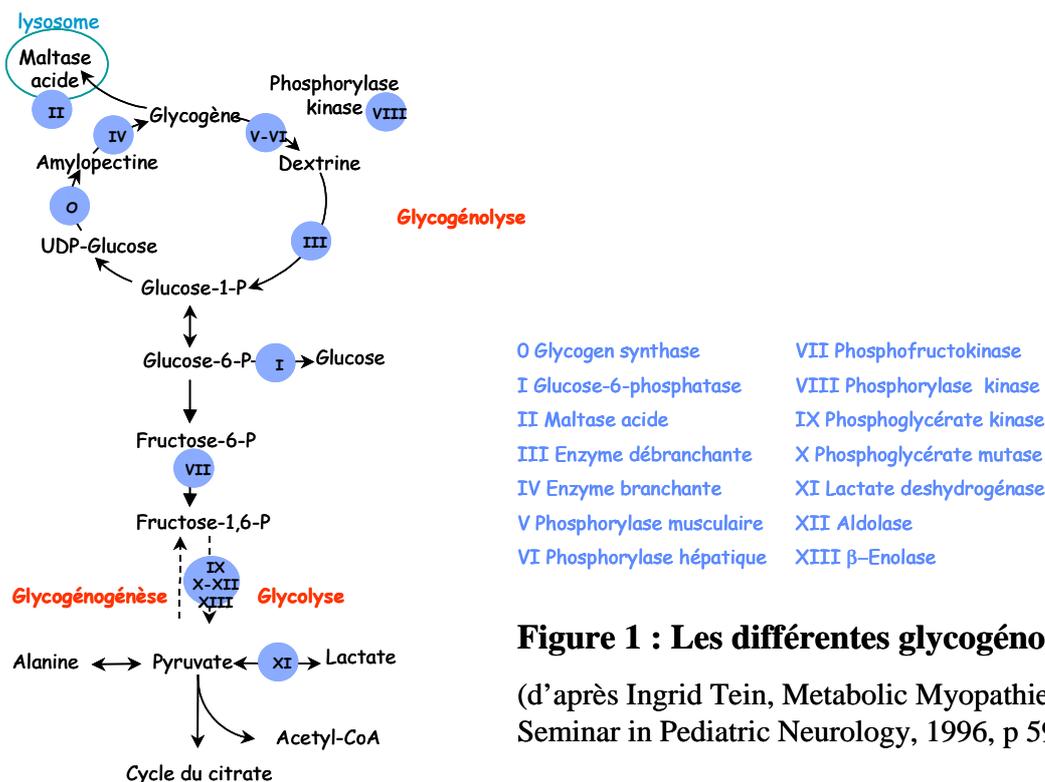
## 2. Les différentes formes de surcharges glycogéniques héréditaires ou glycogénoses, observées chez les mammifères.

### 2.1. Les différentes formes de glycogénoses

Les glycogénoses sont des affections congénitales dues à des anomalies d'une des enzymes impliquées dans le métabolisme du glycogène (Tein 1996). Ainsi, en fonction de l'enzyme en cause, quatorze glycogénoses sont décrites en 2008 chez l'Homme (**figure 1**). Chez au moins cinq espèces domestiques l'enzyme responsable de l'affection a été identifiée (Walvoort 1983; de Barys & Pellissier 1991; Wolfsdorf & Weinstein 2003). Certaines glycogénoses sont uniquement musculaires ou hépatiques, d'autres touchent ces deux organes simultanément et provoquent une maladie multisystémique.

Les mutations causales ont été identifiées pour la grande majorité des formes humaines de ces maladies (Vladutiu 2000), ainsi que pour certaines glycogénoses animales. Dans tous les cas, il s'agit de mutations dans des gènes codant pour des enzymes impliquées dans les cycles de la glycogénogenèse ou de la glycogénolyse. Toutes les formes de glycogénose connues jusqu'en 2007 sont dues à l'inactivation, à l'état homozygote, d'un gène impliqué dans le métabolisme du glycogène. Leur mode de transmission est donc récessif.

Suivant l'enzyme mutée, le tableau clinique, les organes cibles et la nature histologique des lésions diffèrent (DiMauro & Lamperti 2001). Chez l'Homme douze types cliniques de glycogénoses d'origine enzymatique se traduisent par des atteintes musculaires, auxquelles s'ajoutent des formes lysosomiales récemment découvertes. Les maladies lysosomiales sont dues à des surcharges de glycogène dans ces organites cellulaires : les lysosomes.



**Figure 1 : Les différentes glycogénoses**

(d'après Ingrid Tein, Metabolic Myopathies, Seminar in Pediatric Neurology, 1996, p 59-98)

Certaines formes de glycogénoses ne sont actuellement décrites que dans l'espèce humaine, d'autres le sont chez l'Homme et l'animal. (Walvoort 1983).

Dans la première catégorie nous trouvons :

- la glycogénose de type 0 (déficit d'activité de la glycogène synthase), qui est la seule à ne pas induire d'accumulation mais un déficit en glycogène. Un défaut d'activité de la glycogène synthase musculaire GYS1 n'a, jusqu'à présent, été décrit que chez trois enfants apparentés, victimes d'intolérance à l'effort, de cardiomyopathies et d'une atteinte musculaire généralisée. (Kollberg *et al.* 2007).
- les glycogénoses de type VI (déficience en phosphorylase hépatique),
- IX (déficience en phosphoglycérate kinase),
- X (déficience en phosphoglycérate mutase),
- XI (déficience en lactate deshydrogénase),
- XII (déficience en aldolase)
- et XIII (déficience en β-énolase).

Pour les autres types de glycogénoses, des formes touchant des animaux domestiques sont connues.

- La mutation causale d'une glycogénose de type I (déficience en glucose 6 phosphatase) est connue chez le Chien (Kishnani *et al.* 1997).
- Des glycogénoses de type II (déficience en maltase acide) ont été décrites chez le Chien (Walvoort *et al.* 1985), le Chat (Sandstrom *et al.* 1969), la Vache (Jolly *et al.* 1977), le Mouton (Manktelow & Hartley 1975) et la Caille (Murakami *et al.* 1980).
- Une glycogénose de type III (déficience en enzyme débranchante) a été mise en évidence chez le Chien (Ceh *et al.* 1976).
- Des glycogénoses type IV (déficience en enzyme branchante) ont été observées chez le Chien (Jolly *et al.* 2002), le Chat (Fyfe *et al.* 1992) et le Cheval (Ward *et al.* 2004).
- Les mutations causales d'une glycogénose de type V (déficience en myophosphorylase) affectant le Mouton (Tan *et al.* 1997) et la Vache (Tsujino *et al.* 1996) ont été identifiées.
- Une glycogénose de type VII (déficience en phosphofructokinase) est décrite chez le Chien (Vora *et al.* 1985).
- Une glycogénose de type VIII a été décrite chez le Rat (Malthus *et al.* 1980).

Pour la glycogénose liée à un gain d'activité de la glycogène synthase musculaire, découverte en 2008 chez les chevaux Quarter Horse, il n'a pas encore été décrit de mutation humaine de l'enzyme responsable d'un phénotype comparable chez l'Homme. Il s'agit de la première glycogénose décrite dont le mode de transmission soit dominant.

Ces différents types de glycogénoses sont non seulement liés à des mutations d'enzymes dont la fonction est spécifique mais ils sont aussi associés à des syndromes et des lésions spécifiques et parfois pathognomoniques.

Nous allons illustrer cette spécificité par la distinction des deux types de glycogénoses équinnes, dont la myopathie par surcharge en polysaccharides qui touche nos chevaux de trait.

## **2.2. Les glycogénoses équinnes**

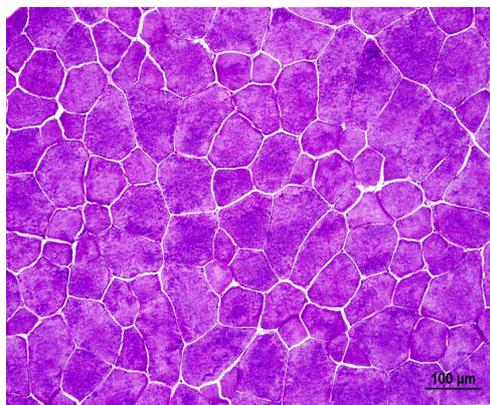
Deux formes de glycogénoses musculaires étaient observées et caractérisées, chez le Cheval en 2005 :

**2.2.1.** L'une est liée à un **déficit d'activité de l'enzyme branchante**, qui provoque une accumulation d'amylopectine (polysaccharide moins branché que le glycogène) dans le cœur, le foie, les muscles striés et le système nerveux. Cette affection multisystémique est rapidement fatale. Elle n'est donc diagnostiquée que chez le poulain nouveau-né. Elle n'est actuellement décrite que chez les chevaux Quarter Horse américains (Sponseller *et al.* 2003).

Son diagnostic consiste en l'examen histologique de biopsies de muscles striés colorés par l'acide périodique ou réactif de Schiff. Cette réaction révèle une importante diminution de l'intensité de la coloration chez les poulains affectés (absence de glycogène normal) et des amas globulaires amorphes de polysaccharides (de 1 à 20  $\mu\text{m}$ ) résistant à la digestion par l' $\alpha$ -amylase (Valberg *et al.* 2001) (**figure2**).

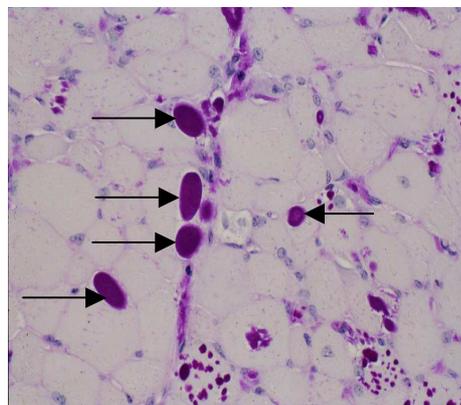
## Coloration à l'acide Périodique, réactif de Schiff (PAS)

Muscle strié d'un poulain sain



Présence de glycogène, en abondance, réparti uniformément.

Muscle strié d'un poulain atteint de glycogénose musculaire de type IV



Absence de glycogène normal et accumulation d'un polysaccharide anormal (flèches : amas globulaires amorphes amylose résistant).

Photos de S. Valberg, Université du Minnesota.

### Figure 2 : Caractéristiques histologiques d'un déficit en enzyme branchante chez le poulain

La mutation responsable de ce déficit a été récemment identifiée. Il s'agit d'une délétion d'un nucléotide dans le premier exon du gène de l'enzyme branchante, délétion à l'origine de l'apparition d'un codon stop prématuré. L'enzyme tronquée est inactive (Ward *et al.* 2003).

Cette glycogénose de type IV se transmet suivant un mode autosomique récessif.

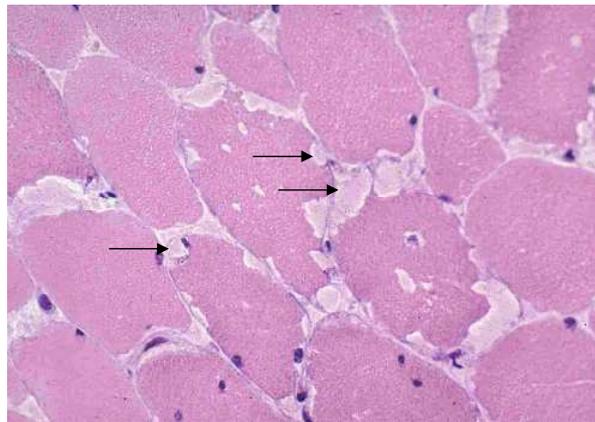
**2.2.2. Une myopathie du cheval adulte caractérisée par une accumulation, sous forme d'agrégats, de glycogène anormal intramusculaire (Valentine *et al.* 1997): la myopathie par surcharge en polysaccharides (PSSM).**

Cette seconde forme de myopathie équine due à l'accumulation de polysaccharides, provoque chez les chevaux des symptômes variables : myosite récidivante, cardiomyopathie, atrophie musculaire plus ou moins importante, incapacité soudaine au relever après un décubitus volontaire ou à la suite d'une anesthésie. Les douleurs musculaires se manifestent sous la forme de crampes ou de raideurs plus ou moins marquées. L'atteinte cardiaque peut conduire à une mort subite.

Cette forme de myopathie a été décrite chez de nombreuses races, principalement celles de chevaux lourds. Ainsi en est-il pour les races Percheronne, Trait Belge, Clydesdale, Shire (les plus grands chevaux au monde) et Cob normand. Elle est également observée chez des chevaux issus de croisements de l'une de ces races. Plus rarement, elle se rencontre chez les Quarter Horse, les poneys Fjords et Haflingers (Valentine 1999).

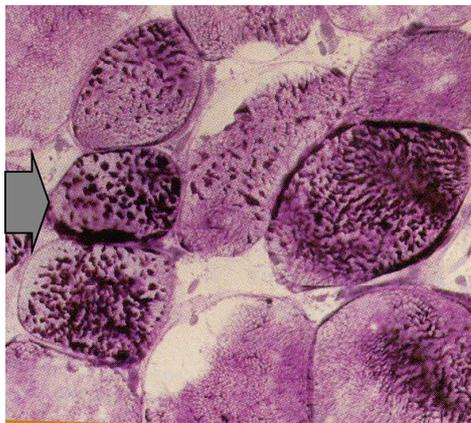
De nombreux cas sont répertoriés mais la prévalence de cette affection est certainement sous-estimée, ces manifestations pouvant rester latentes ou sub-cliniques. Ses symptômes ne s'expriment qu'après ou durant un effort (Defline & Benamou-Smith 2002).

Le diagnostic histologique est établi à partir d'une biopsie musculaire. Les muscles striés des chevaux atteints présentent des inclusions d'un complexe de polysaccharides, résistant à la digestion par l' $\alpha$ -amylase, observées préférentiellement dans les fibres de type 2, à proximité de zones périvasculaires. Sont associées à ces agrégats, des vacuoles généralement localisées sous le sarcolesme (Valberg *et al.* 1992) (**figure 3**).

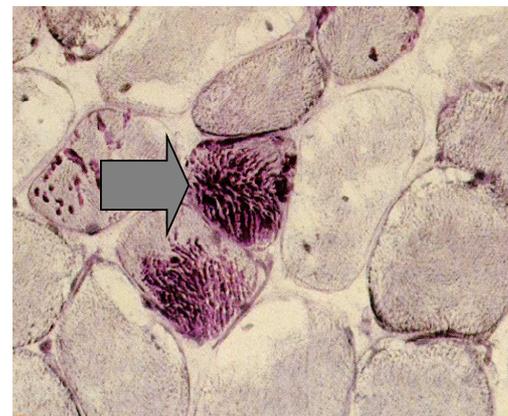


Coloration HES

Présence de vacuoles sous-sarcolesmales



PAS



PAS-Amylase

Inclusions de polysaccharides, résistant à la digestion par l' $\alpha$ -amylase.

Photos de S. Valberg, Université du Minnesota.

### Figure 3 : Lésions histologiques observées lors de myopathie par surcharge en polysaccharides

Lors d'une étude entreprise sur des chevaux Quarter Horse malades, aucun déficit enzymatique n'a pu être mis en évidence. Les chevaux atteints semblent manifester des troubles de régulation de la glycémie liés à l'insuline (Valberg *et al.* 1998). Très récemment, une mutation « gain de fonction » dans le gène codant pour la glycogène synthase musculaire a été associée au phénotype morbide chez les chevaux Quarter Horse (McCue *et al.* 2008).

Le tableau clinique et les lésions qu'elle engendre permettent facilement de distinguer la myopathie par surcharge en polysaccharides de la glycogénose de type IV, précédemment décrite.

### 3. Les apports de la pathologie comparée à l'étude de la myopathie équine par surcharge en polysaccharides

Nous avons confronté les modifications moléculaires, cellulaires et cliniques observées dans différentes maladies humaines et animales qui se rapprochent de la myopathie équine par surcharge en polysaccharides afin de formuler des hypothèses sur son étiologie.

Nous ne nous intéresserons *a priori* pas à la glycogénose de type I (déficit d'activité de glucose-6-phosphatase) ni à la glycogénose de type VI (déficit d'activité de la phosphorylase hépatique) qui ne provoquent pas de lésions musculaires.

La lésion permettant de définir la myopathie par surcharge en polysaccharides du Cheval est l'accumulation, dans les fibres musculaires, d'un polysaccharide proche du glycogène mais résistant à la digestion enzymatique par l' $\alpha$ -amylase. Cette particularité n'est retrouvée que dans un nombre restreint de glycogénoses :

- Lors de déficiences de l'enzyme branchante du glycogène, soit phosphofructokinase, soit laforine (une tyrosine phosphatase). Chez l'Homme, c'est une accumulation d'**amylopectine** (molécule moins branchée que du glycogène normal) qui est détectée.
- Lors d'un déficit d'activité de l'enzyme débranchante du glycogène, c'est le dépôt d'une **molécule de type dextrine-limite** (molécule plus branchée que du glycogène normal) qui est constaté.

Ces deux types de molécules proches du glycogène résistent, au moins partiellement, à la digestion par l' $\alpha$ -amylase.

Un déficit d'activité de l'enzyme branchante du glycogène (GBE) provoque, chez l'Homme et les animaux, différentes formes cliniques de **glycogénoses de type IV**. Ces glycogénoses se traduisent par des atteintes hépatique et/ou neuromusculaire. L'anomalie enzymatique est causée par différentes mutations du gène codant pour l'enzyme (Bao *et al.* 1996b). Un polysaccharide insuffisamment branché s'agrège dans le cytoplasme des cellules musculaires (muscles squelettique et muscle cardiaque) et hépatiques. Des dépôts sont également parfois observés dans le tissu nerveux, la peau et l'intestin (Sahoo *et al.* 2002). Chez le Cheval, la mutation ponctuelle identifiée au niveau du codon 34 (exon 1) du gène *GBE* (de l'enzyme branchante du glycogène ou GBE) provoque chez les chevaux de race Quarter Horse, la maladie multisystémique néonatale, mortelle, précédemment décrite (Ward *et al.* 2004).

La **glycogénose de type VII** (déficit d'activité de la phosphofructokinase musculaire, PFKM) est une myopathie caractérisée par une faiblesse musculaire, des myalgies, une intolérance à l'effort et une amyotrophie (Vorgerd *et al.* 1996). Le défaut d'activité de la phosphofructokinase provoque l'accumulation de glucose-6-phosphate, ce qui a pour conséquence de stimuler l'activité de la glycogène synthase. L'activité de cette enzyme devenant plus importante que celle de l'enzyme branchante du glycogène, un polysaccharide moins branché que le glycogène normal, de type amylopectine et résistant à la digestion par l' $\alpha$ -amylase, s'accumule dans le cytoplasme des myocytes. Des agrégats de polysaccharides comparables à ceux observés chez les chevaux atteints de myopathie par surcharge en

polysaccharides sont alors observés dans les fibres musculaires des humains et des chiens atteints de glycogénose de type VII (Harvey *et al.* 1990).

De nombreuses mutations ont été trouvées dans le gène codant pour la phosphofructokinase chez les individus atteints de glycogénose de type VII. Parmi celles-ci, des défauts d'épissage, des décalages du cadre de lecture et des mutations non sens ont été décrits chez l'Homme (Raben & Sherman 1995).

Le gène codant pour la phosphofructokinase musculaire équine a été cloné et séquencé (Sato *et al.* 2003).

Un déficit d'activité de l'enzyme débranchante du glycogène (AGL) est responsable d'une **glycogénose de type III** caractérisée, chez l'Homme, par une hépatomégalie, une hypoglycémie, des retards de croissance et des myopathies de symptomatologie variable et d'évolution progressive (Howell & Williams 1983). Cette diversité des manifestations cliniques due au déficit enzymatique a contraint le clinicien à distinguer des sous-types de glycogénoses de type III. Ces sous-types sont caractérisés par : (a) soit une faiblesse musculaire associée à une atteinte hépatique, (b) soit des symptômes hépatiques seuls. De plus, l'enzyme débranchante du glycogène a une dualité d'activité. Ce qui peut entraîner, dans de rares cas, une perte spécifique de l'activité soit glucosidase (c), soit transférase (d) de l'enzyme débranchante du glycogène.

Ces différentes formes de glycogénoses de type III sont associées à des mutations spécifiques du gène codant pour l'enzyme débranchante du glycogène. Chez l'Homme, des mutations dans l'exon 3 du gène provoquent une glycogénose de type III (b), type qui n'affecte que le foie (Shen & Chen 2002). Chez le Chien, une délétion ponctuelle est responsable de la synthèse d'une protéine tronquée et de la survenue d'une glycogénose de type III (a) (Gregory *et al.* 2007). Chez les chiens atteints de cette glycogénose, l'examen histologique des muscles striés, lisses et cardiaque présente des vacuoles (coloration par l'hémalum-éosine-safran) et une quantité élevée de glycogène, présent sous forme de dépôts granuleux sous le sarcolemme (coloration par le PAS) (Rafiquzzaman *et al.* 1976). Ces polysaccharides accumulés, pouvant avoir une structure de type dextrine-limite, sont partiellement résistant à la digestion par l' $\alpha$ -amylase (Amato 2000). L'alimentation peut influencer l'aspect des lésions (Iwamasa *et al.* 1983).

Des mutations d'autres gènes que ceux des enzymes directement impliquées dans la voie de la glycogénogénèse ou de la glycogénolyse peuvent également être à l'origine de surcharges en glycogène.

Ainsi, des mutations de certaines isoformes de **l'adénosine monophosphate-activated protéine kinase (AMPK)** provoquent des lésions comparables à celles observées dans les cas de glycogénoses. Chez le Porc, une mutation dans le gène PRKAG3 (codant pour l'isoforme spécifiquement musculaire d'une sous-unité régulatrice de l'AMPK) a pour conséquence une diminution de la dégradation du glycogène et d'une augmentation du transport du glucose et/ou de la synthèse du glycogène (Milan *et al.* 2000). Chez l'Homme, des mutations dans le gène PRKAG2 induisent des cardiomyopathies hypertrophiques caractérisées par la présence dans les cardiomyocytes, de vacuoles remplies de polysaccharides résistant à la digestion par l'amylase (Arad *et al.* 2002). Le gène PRKAG3 équin a été caractérisé (Park *et al.* 2003) et l'implication potentielle des AMPK dans la myopathie par surcharge en polysaccharide chez les chevaux de race Quarter Horse étudiée (Dranchak *et al.* 2007).

Lors d'atteinte par la **maladie de Lafora**, des corps de Lafora, composés de polysaccharides à plus courtes branches que celles du glycogène normal, insolubles, de type amylopectine et résistants à la digestion par les amylases, sont observés dans le tissu nerveux. Ces corps de Lafora, entourés par une membrane, sont également retrouvés dans le foie et les muscles. La maladie se manifeste par un syndrome épileptique et myoclonique. Des mutations dans le gène de la laforine, une tyrosine phosphatase associée à la membrane plasmique, ont été identifiées comme étant à l'origine de la maladie (Minassian 2001). La maladie de Lafora a été étudiée chez l'Homme et décrite chez la Vache (Simmons 1994).

Les **maladies de surcharge lysosomales** sont des anomalies héréditaires du métabolisme. Différents sous groupes ont été définis en fonction de la voie métabolique touchée et du substrat accumulé, parmi lesquels le glycogène (Germain 2002). Ainsi, le déficit en protéine LAMP2 (lysosome associated membrane protéine 2) est responsable de la maladie de Danon caractérisée par une cardiomyopathie, une myopathie et un retard mental. Le marqueur histopathologique de la maladie est l'existence de vacuoles intracytoplasmiques contenant un matériel autophagique et du glycogène dans les cellules des muscles squelettiques et cardiaques (Saftig *et al.* 2001). Ces vacuoles sont alors délimitées par la membrane du lysosome. Les souris déficitaires en protéine LAMP2 ont une maladie vacuolaire proche de la maladie humaine.

Il persiste encore bien des cas de myopathie par surcharge en polysaccharides dont on ne connaît pas, comme chez le Cheval Cob normand, l'étiologie.

Ainsi, une maladie à surcharge en glycogène, de cause inconnue, a été décrite chez un chat abyssin. Il présentait des accumulations de polysaccharides résistant à la digestion par l'amylase, de type amylopectine, dans le cytoplasme de ses cellules des musculaires squelettiques, cardiaque et dans son système nerveux central (Langohr & Tanabe 2005).

Un cas humain de myopathie par surcharge polysaccharidique vacuolaire, responsable d'un déficit des ceintures, sans cardiomyopathie a été décrit. Le matériel accumulé dans le cytoplasme des cellules musculaires était résistant à la digestion par l'amylase, de type amylopectine ; de nombreuses mitochondries anormales s'accumulant autour de la surcharge. Dans ce cas, aucun déficit enzymatique connu n'a pu être mis en évidence (Calore *et al.* 1992).

## **4. Stratégies d'identification de gènes d'intérêt**

Les études génétiques peuvent permettre d'identifier l'origine moléculaire de ces myopathies héréditaires. Afin d'identifier un gène majeur qui gouverne une part importante de la variabilité d'un caractère, deux types d'approches sont possibles.

### **4.1. Le clonage positionnel**

Une approche repose sur la technique de clonage positionnel. Le développement de cartes génétiques et génomiques de différentes espèces, dont le Cheval (Chowdhary *et al.* 2002; Penedo *et al.* 2005; Perrocheau *et al.* 2006), permet de disposer de marqueurs génétiques très polymorphes répartis de façon homogène sur l'ensemble du génome. Ces marqueurs sont utilisés pour cartographier, par analyse de liaison conventionnelle, des phénotypes d'intérêt. Pour des gènes ayant un effet majeur, il est possible d'entreprendre une cartographie fine du gène afin de déterminer le plus précisément possible la position du gène.

Cette approche a été entreprise par l'équipe américaine de Stéphanie Valberg et Jim Mickelson en 2007 pour étudier la myopathie développée par les chevaux de race Quarter Horse qui, comme les chevaux Cob normand, accumulent un polysaccharide résistant à la digestion par l'amylase dans le cytoplasme de leurs fibres musculaires. Avec Molly Mc Cue, ils ont choisi de réaliser une analyse de type « génome scan » en utilisant 105 marqueurs de type microsatellite répartis sur 31 autosomes, étudiés sur 48 chevaux Quarter Horses atteints et 48 témoins. Leur approche a permis de localiser le segment chromosomique entourant la mutation causale sur le bras court du chromosome ECA10.

Afin de réduire l'intervalle de localisation, 8 autres marqueurs de type microsatellites, localisés sur ECA10p, ont été étudiés sur 52 chevaux atteints supplémentaires et 44 nouveaux chevaux contrôles de race Quarter Horse, choisis de telle sorte qu'ils n'aient pas d'ancêtre commun proche (augmentant ainsi les chances de recombinaison) et génotypés. Les tests de chi2 ont alors permis de réduire la région à 3 Mb, l'encadrant par deux marqueurs (COR015 et SCGV030). La carte comparée de l'Homme et du Cheval dans la région comprise entre ces deux marqueurs a mis en évidence un gène candidat positionnel, le gène codant pour la glycogène synthase musculaire, *GYS1*. Le séquençage de l'ADNc du gène *GYS1* équin chez des chevaux sains et atteints a permis de mettre en évidence un polymorphisme unique : une substitution G/A qui entraîne un changement d'acide aminé Arginine – Histidine. Cette mutation s'est révélée présente à l'état hétérozygote (génotype GA) ou homozygote (génotype AA) chez la majorité des chevaux Quarter Horses atteints de myopathie par surcharge en polysaccharides. Cette mutation a ensuite été recherchée chez 750 chevaux atteints de myopathie par surcharge en polysaccharides de différentes races et a été retrouvée à l'état hétérozygote ou homozygote chez 356 chevaux de 15 races différentes dont 5 races de chevaux de trait (McCue *et al.* 2008).

#### **4.2. L'approche gène candidat**

L'étude de gènes candidats physiologiques ou fonctionnels, choisis parmi des gènes connus dont une altération de la fonction pourrait expliquer le phénotype morbide observé, est l'approche que nous avons choisie. On cherche alors une mutation dans ou au voisinage d'un gène candidat puis on teste une liaison et/ou une association entre l'un ou l'autre allèle du candidat et les différents phénotypes observés. Le choix de cette approche était lié à nos contraintes matérielles (échantillon limité à 52 chevaux dont 19 atteints) et au fait que nous ne disposions pas, au laboratoire, d'un panel de marqueurs génétiques couvrant l'ensemble du génome du Cheval. L'approche « gène candidat » suppose de bien connaître le phénotype considéré, c'est pourquoi nous nous sommes attachés à préciser ce phénotype dans le cas de la myopathie par surcharge en polysaccharides chez les chevaux Cob normand par des études histologiques et physiologiques. Nous avons cherché à caractériser les lésions musculaires et la nature des sucres accumulés et à comprendre les mécanismes provoquant ces dépôts anormaux, dans le but de choisir un ou des gène(s) candidat(s). Des gènes ayant un effet démontré dans une autre espèce pouvant fournir des candidats précieux, nous avons comparé la pathogénie de l'affection équine aux maladies de surcharge glycogénique décrites dans d'autres espèces. Cette étude de candidats a été réalisée sur une population dans laquelle la ségrégation d'un gène majeur a été mise en évidence et nécessite donc la constitution de familles d'individus sains et atteints.

*Cette thèse a pour objectif de caractériser la myopathie due à une surcharge en polysaccharides observée chez les chevaux Cob Normand français et d'identifier son déterminisme moléculaire.*

### 1. Précision du phénotype

*Les lésions permettant de considérer un animal comme atteint de myopathie par surcharge en polysaccharides demandaient à être précisées. L'étude histologique approfondie qui a permis d'affiner ces critères et de définir le phénotype est présentée dans cette première partie de la thèse. Ce travail a été réalisé en collaboration avec le laboratoire d'Anatomie pathologique vétérinaire de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes (Dr. Thibaut Larcher et Pr. Yan Chérel).*

*Nous avons caractérisé les bases génétiques de la myopathie par surcharge de polysaccharides chez les chevaux de trait Cob normand. Cette race a été fondée au début du 20e siècle, par des croisements entre des étalons pur-sang anglais ou arabe et des juments normandes. Depuis 1945, 10 étalons fondateurs se retrouvent au sein de toutes les lignées paternelles. Nos investigations nous ont conduites à nous intéresser à des animaux d'une même lignée au sein de laquelle ségrégue l'affection, ce qui garantit le fait que nous étudions une entité pathologique unique.*

*L'étendue de cette étude à l'ensemble des étalons Cob normand des Haras Nationaux a permis de déterminer la prévalence de l'affection dans cette population. Le phénotype d'individus appartenant à une même famille a été étudié dans le but de déterminer le mode de transmission de l'affection.*



**Figure 4 : photo d'un attelage d'étalons Cob normand**

## 1.1. Matériel et méthodes

### 1.1.1. Animaux et prélèvements

Des **biopsies musculaires** ont été réalisées sur l'ensemble des étalons Cob normand des Haras nationaux (43 chevaux prélevés dont 39 inclus dans l'étude histologique et morphométrique). L'étude du phénotype sur les étalons nationaux a permis de déterminer la prévalence de l'affection dans cette population.

De plus, nous avons réalisé des biopsies musculaires sur des chevaux (3 hongres et 11 juments poulinières, dont une jument Percheronne, appartenant à des éleveurs privés) suspectés d'être atteints de myopathie par surcharge en polysaccharides, d'après leur filiation. Nous avons cherché à analyser la ségrégation du caractère phénotypique au sein d'une famille de chevaux Cob normand. Pour ce faire, nous avons recherché tous les parents et descendants d'individus présentant des lésions caractéristiques afin de déterminer leur phénotype et suivre la transmission du caractère morbide de génération en génération.

Nous avons également suivi l'évolution des lésions au cours du temps. Un prélèvement musculaire a ainsi été renouvelé 6 mois après le premier examen chez 4 étalons atteints de myopathie par surcharge en polysaccharides. Ce sont donc 57 biopsies musculaires (53 chevaux) qui ont été étudiées (étude histologique et morphométrique).

Les échantillons de muscle ont été prélevés par biopsies musculaires sur des chevaux tranquilisés (détomidine 0,1 mL/ 100 kg), sous anesthésie locale (**figure 5**). Les biopsies (de 1 cm<sup>3</sup>) ont été pratiquées par un vétérinaire, dans le muscle fessier moyen (*gluteus medius*), sur la croupe des chevaux. Tous les échantillons ont été immédiatement immergés dans de l'isopentane refroidi et congelés dans l'azote liquide puis conservés à -80°C. Cinq biopsies de 1 mm<sup>3</sup> ont été conservées dans une solution de glyceraldéhyde 2,5 % en vue de l'étude ultrastructurale (microscopie électronique).



**Figure 5 : anesthésie locale (injection de lidocaïne) avant une biopsie musculaire**

Nous avons également réalisé un bilan d'extension lésionnelle. Une **autopsie** a été pratiquée sur un étalon Cob normand des Haras nationaux de 8 ans, euthanasié en raison d'une boiterie sévère persistante. Des échantillons ont été prélevés à partir de 55 tissus et 68 muscles striés. Les prélèvements musculaires ont été plongés dans de l'isopentane refroidi dans l'azote liquide puis conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Les prélèvements tissulaires ont été immédiatement fixés dans une solution de formol à 4 %.

### 1.1.2. Colorations histologiques et analyses

Tous les échantillons musculaires ont été colorés par le Trichrome de Gomori (coloration du muscle strié permettant la visualisation des réarrangements des filaments et des mitochondries), le HES (coloration des acides nucléiques en bleu par l'Hémalun, des protéines en rouge par l'Eosine et du collagène en jaune par le Safran) et l'Acide Périodique, réactif de Schiff (PAS, coloration des polysaccharides en fuchsia) après incubation à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 20 minutes en présence d' $\alpha$ -amylase. La **sensibilité à l'amylase** a également été explorée dans diverses conditions : en présence d' $\alpha$ -amylase (digestion des liaisons glucosidiques  $\alpha$ -1,4 à l'intérieur des chaînes polysaccharidiques), de diastase ( $\alpha$  et  $\beta$ -amylase, digestion des liaisons glucosidiques  $\alpha$ -1,4 à partir de l'extrémité non réductrice des chaînes externes des polysaccharides branchés) ou de salive humaine pendant 20 minutes, une heure, 4h ou toute la nuit à  $4^{\circ}\text{C}$ .

Des **colorations histochimiques** complémentaires ont été réalisées afin de caractériser la nature des agrégats de polysaccharides observés chez les chevaux atteints : Carmin de Best (coloration du glycogène), Lugol (coloration différentielle selon la longueur des chaînes polysaccharidiques), Bleu alcian (mucopolysaccharides acides sulfatés), coloration de Hale (mucopolysaccharides acides), Bleu de toluidine (radicaux électronégatifs), rouge Congo (chaînes protéiques  $\beta$  plissées qui forment les dépôts d'amylose).

Les **colorations histoenzymologiques** réalisées marquent la NADH-TR (Nicotinamide Adénine Dinucléotide- Tétrazolium Réductase) permettant de détecter les NADH déshydrogénases mitochondriales et l'ATPase myofibrillaire et de distinguer les types de fibres musculaires (type I : riches en enzymes oxydatives, type II : pauvres en enzymes oxydatives).

Une **étude morphométrique** a été réalisée afin de préciser le pourcentage de fibres présentant des agrégats résistants à la digestion par l' $\alpha$ -amylase et/ou des vacuoles optiquement vides après coloration par l'HES. Plus de 300 fibres musculaires ont été observées par échantillon et les résultats analysés par ANOVA (ANalysis Of Variance).

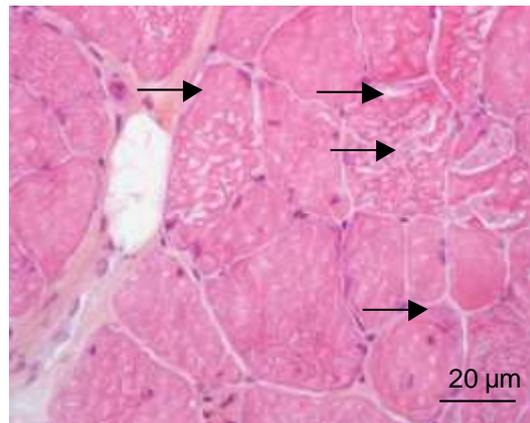
Les biopsies musculaires conservées dans la solution de glyceraldéhyde ont été contre fixées par le tétr oxyde d'osmium puis incluses dans une résine Epoxy. Les coupes semi-fines ont été colorées par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb, puis analysées au **microscope électronique à transmission**.

## 1.2. Résultats

19 chevaux Cob normand, parmi les 52 Cob qui ont subi une biopsie musculaire, présentaient des lésions caractérisées par la présence d'agrégats intra-cytoplasmiques colorés par le PAS et le carmin de Best et résistants à la digestion par l' $\alpha$ -amylase dans les fibres musculaires striées non-oxydatives (**figure 6**). Les dépôts de polysaccharides intracellulaires

étaient associés à un cytoplasme pâle (coloration au PAS). Parmi les 19 chevaux Cob normand atteints, il y a 15 mâles et 4 femelles (moyenne d'âge 9,2 ans +/- 5,2 ans) ; parmi les 33 chevaux sains, il y a 27 mâles et 6 femelles (moyenne d'âge 8,3 ans +/- 4,6 ans).

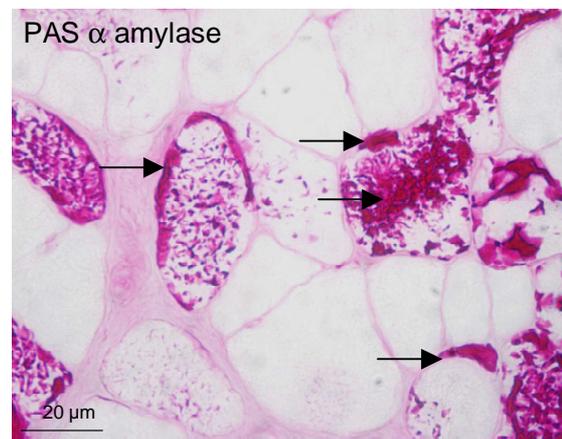
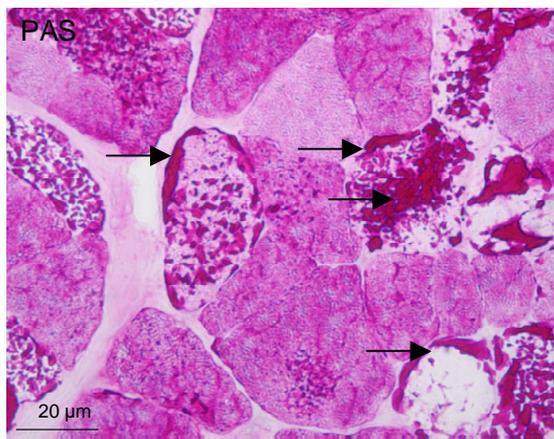
Ce sont au total 20 chevaux (19 Cob normand et une Percheronne) pour lesquels un diagnostic de myopathie par surcharge en polysaccharides a été établi. 4 biopsies ont été réalisées sur les mêmes chevaux à 6 mois d'intervalle. Nous disposons donc de 24 biopsies sur lesquelles des lésions caractéristiques sont visibles, parmi les 57 biopsies étudiées.



**Muscle d'un cheval atteint de myopathie par surcharge en polysaccharides  
(coloration à l'hémalum – éosine – safran)**

Présence de dépôts amorphes sous le sarcolemme et au centre des fibres musculaires.

Coupes sériées



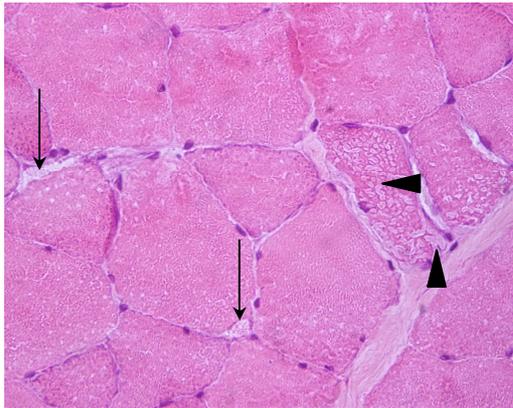
**Agrégats de polysaccharides intra cytoplasmiques (flèches), résistants à la digestion par l'α-amylase, dans une région périvasculaire.**

Photos Thibaut Larcher, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes.

**Figure 6 : Caractéristiques histologiques de myopathie par surcharge en polysaccharides chez le cheval adulte**

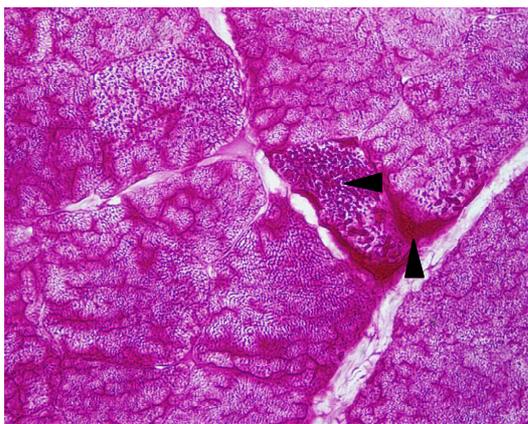
Si l'on considère les 43 étalons Cob normand des Haras nationaux prélevés, 15 sont atteints de myopathie par surcharge en polysaccharides, soit **35 % des étalons nationaux**.

Les agrégats, mis en évidence par les colorations au PAS et au carmin de Best, présentaient une couleur brune après coloration par le Lugol et bleue intense après coloration de Hale (en présence et absence d'acide hyaluronique) (**figure 7**). Ils n'ont pas été colorés par le Bleu Alcian, le bleu de Toluidine et le rouge Congo. Les agrégats polysaccharidiques étaient résistants à la digestion par l' $\alpha$ -amylase quelle que soit la durée d'incubation, résistants à une digestion courte par la diastase mais sensibles à une digestion longue (4 heures ou plus) par la diastase.

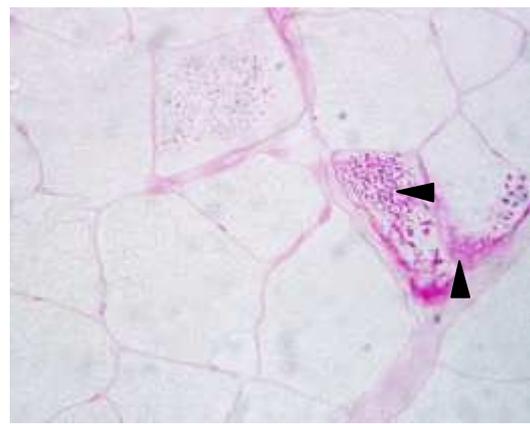


Coloration Hémalum-Eosine-Safran, x40 (flèches longues) vacuoles sous sarcolemmales contenant un matériel hypocolorable granuleux, PAS positif, non résistant à l'amylase

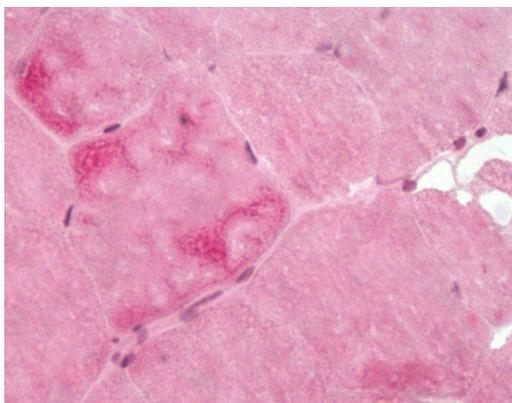
Stockage de polysaccharides (PAS positifs, amylase résistants) sous forme :  
 - (flèches horizontales) de lacs centraux plus ou moins confluent,  
 - (flèches verticales) et d'agrégats périphériques dissociant les myofibrilles



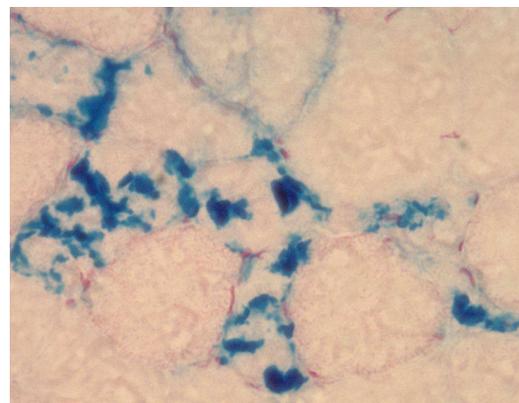
Coloration PAS



Coloration PAS +  $\alpha$ -amylase



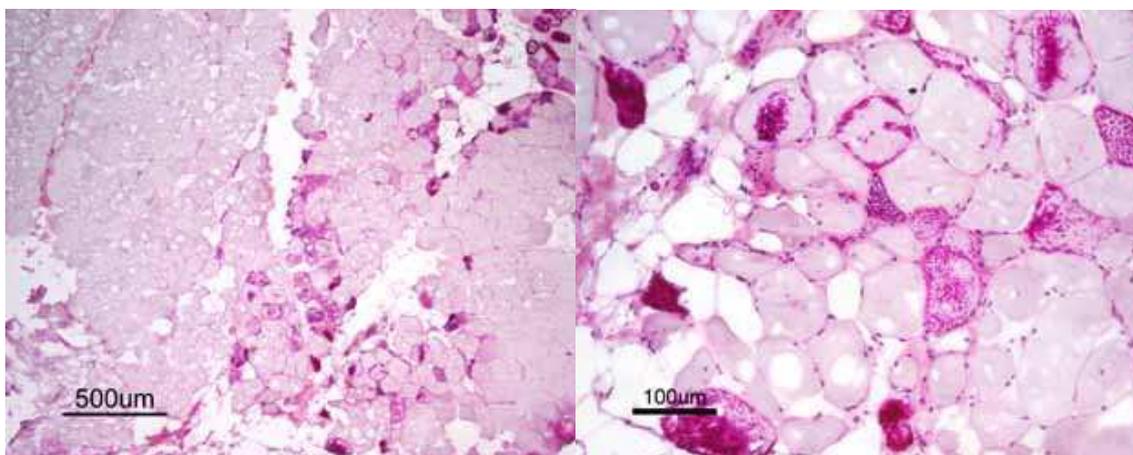
Coloration de Best



Coloration de Hale

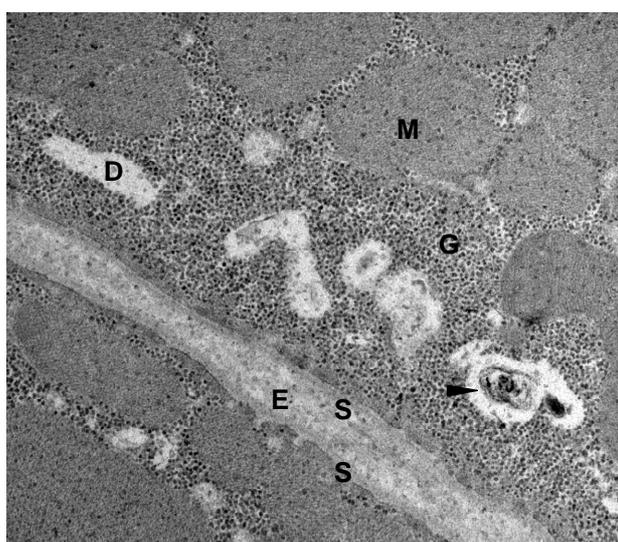
**Figure 7 : colorations histologiques du muscle d'un cheval atteint**

Dans la majorité des cas (22 sur 28), les agrégats polysaccharidiques étaient associés à des vacuoles optiquement vides (**figure 8**) bien que le nombre de vacuoles et d'agrégats ne soient pas corrélés. Quelques chevaux (5) présentaient uniquement de rares vacuoles sous-sarcolesmales. Une jeune jument de un an a révélé la présence de vacuoles sous-sarcolesmales associée à une infiltration mononucléaire modérée.



**Figure 8 : Agrégats de polysaccharides résistant à la digestion par l' $\alpha$ -amylase associés à la présence de nombreuses vacuoles**

L'examen des fibres musculaires par **microscopie électronique à transmission** a montré que la majorité des fibres contenaient un matériel granuleux, libre dans le cytoplasme (non délimité par une membrane), ressemblant à du glycogène malgré une densité hétérogène inhabituelle (**figure 9**). Ce matériel n'était pas réparti uniformément dans l'ensemble du cytoplasme myocytaire : des granules éparpillés ou de denses agrégats correspondant respectivement aux vacuoles et aux agrégats observés en microscopie optique. Des mitochondries en voie de dégénérescence ont également été observées, ainsi que des myofibrilles dégradées (absence de striation et ondulation).

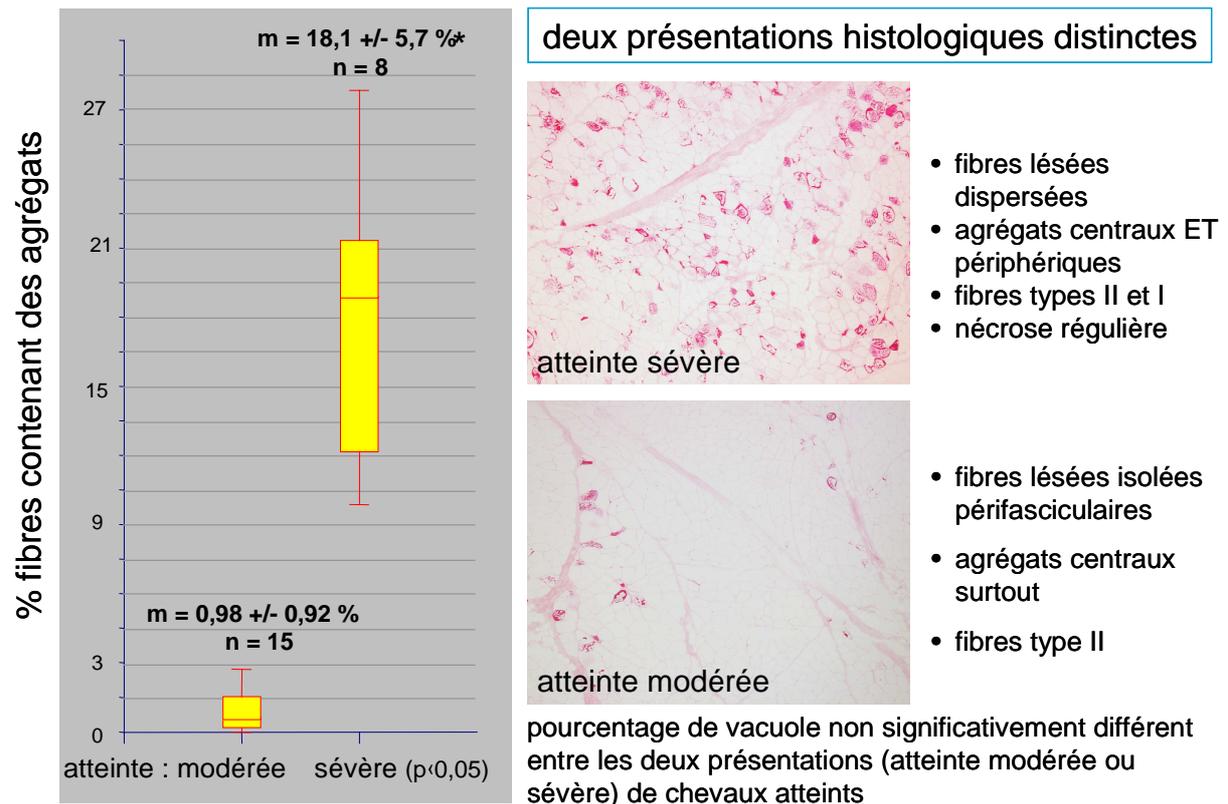


Microscopie Electronique à Transmission,  
x18000

myofibrilles (M), endomysium (E),  
sarcolème (S), glycogène (G),  
dégénérescence mitochondriale (D),  
enroulement membranaire (flèche)

**Figure 9 : Examen d'une fibre musculaire en microscopie électronique à transmission**

L'**étude morphométrique** a permis de classer les 24 biopsies présentant des agrégats polysaccharidiques en deux groupes : un premier groupe (16 biopsies) dans lequel le pourcentage de fibres lésées ne dépassait pas 3 % des fibres examinées et un seconde groupe (8 biopsies) dans lequel 9 à 30 % des fibres musculaires présentaient des agrégats (**figure 10**). Alors que dans le premier groupe, les fibres atteintes étaient généralement spécifiquement de type II (fibres non oxydatives), isolées ou regroupées dans une région périvasculaire, présentant des agrégats intermyofibrillaires, dans le deuxième groupe, l'atteinte concernait les fibres de type I et II, uniformément réparties dans l'échantillon, dévoilant la présence d'agrégats sous-sarcolesmaux ou intermyofibrillaires, souvent associés à une nécrose segmentaire.



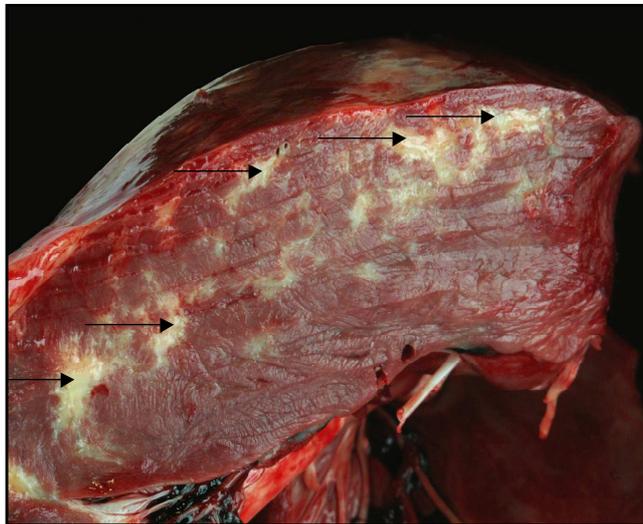
**Figure 10 : Caractérisation histomorphométrique**

La **réitération du prélèvement musculaire** sur 4 chevaux a permis de mettre en évidence une augmentation du nombre de fibres présentant des agrégats polysaccharidiques au cours du temps (biopsies prélevées à 6 mois d'intervalle) pour les deux chevaux qui faisaient partie du premier groupe (augmentation de 0,4 % des fibres lésées, pour un cheval, 0,8 % pour le second). Il n'y a par contre pas été observé d'augmentation significative du nombre de fibres atteintes pour les deux autres chevaux qui faisaient partie du deuxième groupe (atteinte plus sévère dès la première biopsie).

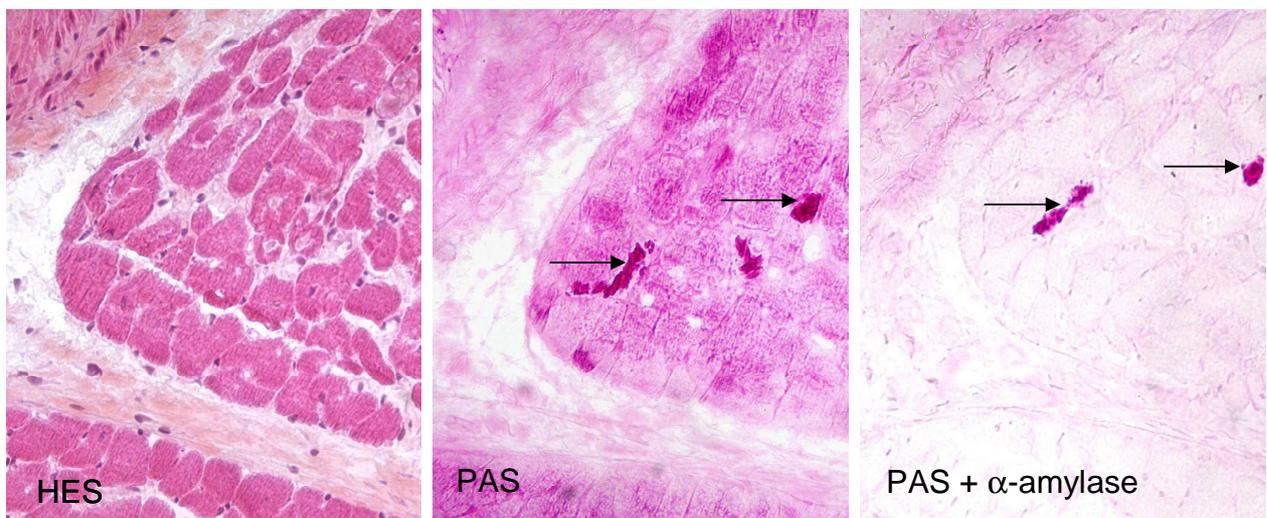
Le cheval atteint euthanasié présentait une atrophie musculaire bilatérale des fessiers associée à une sévère boiterie du postérieur droit et de l'antérieur gauche, boiterie atténuée à « chaud » et sur terrain mou. La déformation du pied du cheval révélait l'ancienneté des lésions sous-jacentes. L'examen radiographique du pied postérieur droit avait montré une diminution des espaces inter-phalangiens distaux et des lésions articulaires dégénératives (articulations P1-P2 et P2-P3). La dissymétrie des aplombs du cheval, accentuée par une absence de parage approprié et de ferrure, contribuait à l'irrégularité des allures du cheval.

Cet examen locomoteur avait donc permis de mettre en évidence des lésions ostéo-articulaires anciennes pouvant expliquer sa boiterie sans présumer de ses capacités musculaires.

L'examen **post-mortem** de ce cheval a révélé la présence d'agrégats colorés par le PAS et résistant à l' $\alpha$ -amylase dans la plupart des muscles striés squelettiques à l'exception de la langue, des masséters, des muscles splenius, long de la tête, extenseur ulnaire du carpe et fléchisseur superficiel du doigt. Toutefois, des vacuoles ont été observées dans les échantillons de ces deux derniers muscles. De sévères lésions du muscle cardiaque, macro et microscopiques (plusieurs foyers de fibrose myxoïde), ont été observées, associées à la présence d'agrégats circulaires présentant les mêmes caractéristiques histochimiques que ceux observés dans les muscles striés squelettiques (**figure 11**). Ces agrégats polysaccharidiques, résistant à la digestion par l' $\alpha$ -amylase, ont également été observés dans plusieurs muscles lisses : muscle érecteur du poil, muscle caverneux du pénis, muscle lisse de la vessie et uretère. Le nœud lymphatique inguinal présentait des cellules mononucléaires contenant des vacuoles intra-cytoplasmiques de tailles variables (5 à 15  $\mu$ m) contenant un matériel coloré par le PAS.



Lésions macroscopiques du myocarde (cheval Cob normand atteint, âgé de 10 ans)  
Flèches : multiples nodules de fibrose myxoïde



Muscle cardiaque : Présence d'agrégats PAS positifs, résistant à l'amylase.

**Figure 11 : Lésions du myocarde**

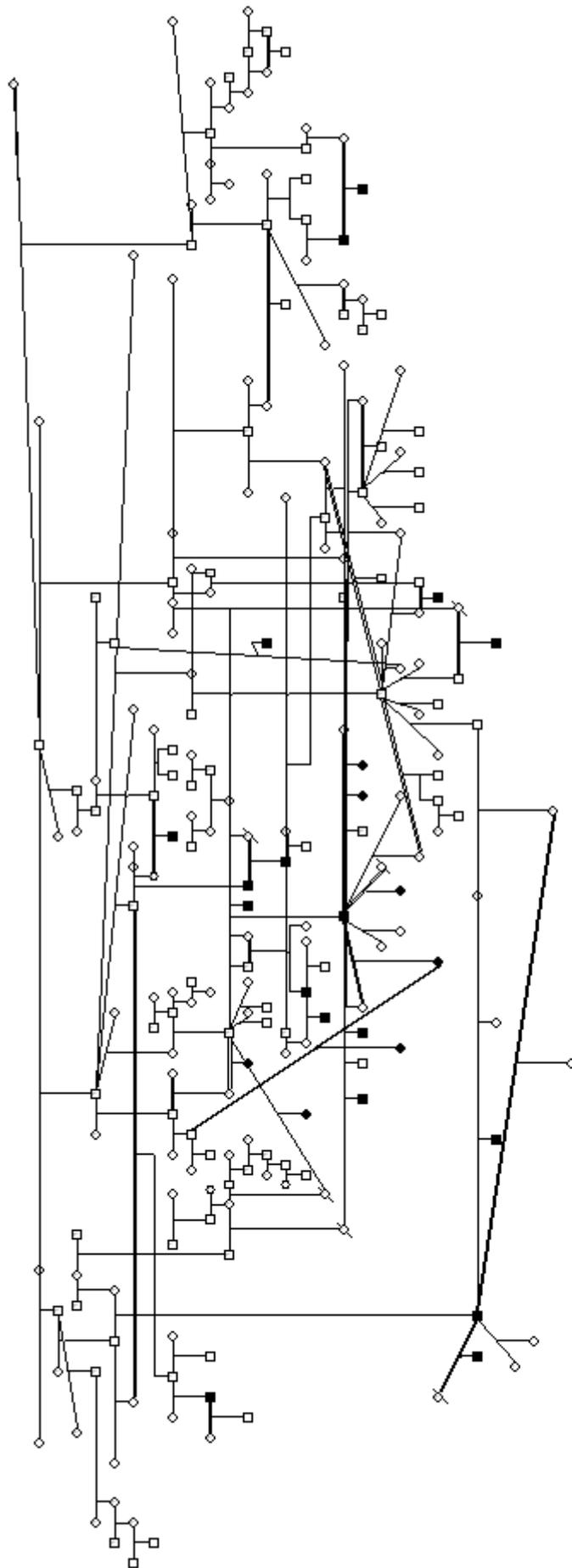
### **1.3. Interprétation des résultats**

#### **1.3.1. Prévalence et mode de transmission de l'affection**

L'étude a porté sur 59 chevaux de race Cob normand pouvant être rattachés à l'un des étalons fondateurs de la race, dont ils sont descendants sur 7 générations au plus. Parmi eux, il y a 43 étalons des Haras nationaux. **La prévalence de l'affection, 35% au sein de la population des étalons nationaux**, se révèle comparable à celle observée chez les chevaux de trait Belge américains (36%) (Firshman *et al.* 2005) mais supérieure au taux de diagnostic post-mortem à l'abattoir chez les chevaux de trait anglais (8%) (McGowan *et al.* 2008). La prévalence de la myopathie par surcharge en polysaccharides est donc plus élevée dans des échantillons de chevaux apparentés et/ou de même race que parmi une population hétérogène de chevaux de trait.

Les animaux Cob normand affectés ont tous un ancêtre commun. Lorsque l'on regarde la généalogie des individus atteints (**figure 12**), tous les animaux atteints ont au moins un parent atteint. De plus, le croisement d'un étalon Cob normand affecté avec une jument de race Trotteur français (race dans laquelle cette forme de myopathie n'a pas été décrite) a produit une jument de phénotype sain et un cheval de phénotype atteint. Suspectant que l'allèle morbide soit absent ou extrêmement rare chez les Trotteurs français, la naissance de ce cheval croisé, Cob x Trotteur français, atteint de myopathie par surcharge en polysaccharide, permet de faire l'hypothèse d'une transmission de type dominant de cette affection. De plus, mâles et femelles sont sensiblement autant atteints les uns que les autres, la transmission serait autosomique.

La myopathie par surcharge en polysaccharides est donc vraisemblablement une **maladie qui se transmet de façon autosomique dominante**. L'identification de la mutation causale et le génotypage des chevaux de notre échantillon permettront de confirmer cette hypothèse.



- Rond : femelle
- Carré : mâle
- Plein : phénotype atteint
- Vide : phénotype sain
- ? : phénotype inconnu
- Barré : individu mort

**Figure 12 : Famille de chevaux Cob normand**

### 1.3.2. Méthode et critères du diagnostic

Sur l'ensemble du cheptel de cette étude, un seul animal a présenté des symptômes cliniques (boiterie et amyotrophie), or ceux-ci n'ont rien de pathognomoniques, ils sont communs à toutes les myopathies. Pour tous les autres cas, seule la biopsie musculaire et l'étude histologique de celle-ci a détecté les animaux atteints, cette affection étant alors subclinique ou asymptomatique. La rareté des symptômes a également été relevée chez les chevaux de trait Belge atteints de myopathie par surcharge en polysaccharides. Parmi 37 chevaux de trait Belge atteints, 22 n'avait jamais présenté de signe clinique de myopathie (Firshman *et al.* 2005). La **biopsie musculaire** est donc la seule méthode diagnostique permettant de déterminer le phénotype des chevaux avec certitude.

Des lésions sévères ont été observées dans la plupart des muscles striés squelettiques mais les muscles fessiers ont montré une atteinte plus sévère (Valentine *et al.* 1997). Les muscles fessiers constituent donc un site de choix à privilégier pour les biopsies musculaires. **Le prélèvement du *gluteus medius*, techniquement aisé, est donc le muscle de choix approprié pour établir un diagnostic de myopathie par surcharge en polysaccharides.** Une biopsie des muscles semi-tendineux et semi-membraneux peut également être pratiquée pour le diagnostic de la myopathie par surcharge en polysaccharides (Valentine 2005).

**L'accumulation cytoplasmique diffuse et en quantité anormalement élevée d'un polysaccharide de structure différente de celle du glycogène (résistant à la digestion par l' $\alpha$ -amylase) dans les fibres musculaires** avait été observée et retenue comme critère de diagnostic dans d'autres races de chevaux (Valberg *et al.* 1992; Valentine *et al.* 1997). Nous avons retenu ce même critère d'inclusion. La détermination du statut des jeunes chevaux qui présentent seulement des vacuoles sous-sarcolemmales optiquement vides sans agrégats de polysaccharides résistants à l' $\alpha$ -amylase, reste controversée (De La Corte *et al.* 2002). Dans notre étude, une jument d'un an présentait ce phénotype. Elle a été considérée comme saine.

### 1.3.3. Gravité des lésions et leur évolution dans le temps

Nous avons pu distinguer deux catégories parmi les chevaux atteints. Des chevaux modérément atteints présentant jusqu'à 3% de fibres lésées et des chevaux gravement atteints présentant 9 à 30% de fibres avec des lésions. Les chevaux de ce deuxième groupe (nombreuses lésions) apparaissent plus âgés que ceux dont l'atteinte était modérée (test de Mann Whitney,  $p < 0,1$ ). De plus, dans notre échantillon de chevaux Cob normand, trois jeunes chevaux de 3 ans présentent des agrégats peu nombreux, dont la répartition n'est pas uniforme parmi les fibres. Pour deux des quatre chevaux pour lesquels il a été possible de réaliser des biopsies successives à six mois d'intervalle, chevaux modérément atteints lors de la première biopsie, le nombre d'agrégats a augmenté dans les suivantes. L'ensemble de ces observations converge vers une **augmentation du nombre des agrégats de polysaccharides résistants à la digestion par l' $\alpha$ -amylase avec le vieillissement des chevaux**, observation qui avait déjà été faite (Valentine *et al.* 1997; Valentine *et al.* 1998) mais n'avait jusqu'alors pas été quantifiée. L'affection semble donc s'aggraver avec l'âge de l'animal.

L'autopsie d'un cheval atteint a permis de caractériser la spécificité musculaire de la myopathie par surcharge en polysaccharides qui touche la plupart des muscles striés, squelettiques et cardiaque, ainsi que les muscles lisses. La présence de lésions dans le muscle diaphragmatique telles qu'observées sur le cheval autopsié, avait déjà été rapportée chez un poney Haflinger affecté (Valentine 1999). De plus, le cœur du cheval présentait de sévères

lésions de fibrose et une accumulation de polysaccharides présentant les mêmes caractéristiques que celles observées dans les autres muscles striés. Ainsi les morts subites de chevaux Cob normand, survenues au cours de l'effort, à l'origine de ce travail de thèse, pourraient être dues à des défaillances cardiaques et respiratoires.

#### 1.3.4. Nature et localisation des polysaccharides accumulés

L'accumulation de polysaccharides résistant à la digestion par l' $\alpha$ -amylase a été observée dans les muscles lisses et striés, squelettiques et cardiaque. Les agrégats observés dans des macrophages du nœud lymphatique inguinal profond sont probablement dus à la phagocytose de débris polysaccharidiques de fibres musculaires nécrotiques. Il n'a été observé de lésion dans aucun autre tissu examiné. Nous étudions donc une **maladie spécifiquement musculaire** qui touche tous les muscles, y compris le cœur, le diaphragme et muscles lisses.

**Les fibres glycolytiques de type II sont préférentiellement atteintes.**

La coloration des agrégats par le PAS et le Carmin de Best indique qu'ils contiennent des polysaccharides. Leur résistance à la digestion par l' $\alpha$ -amylase différencie ces polysaccharides du glycogène. Leur coloration en brun par l'iode et leur sensibilité à une digestion longue par la diastase distingue la molécule accumulée des agrégats d'amylopectine décrits chez les poulains Quarters Horses atteints de glycogénose de type IV (molécule colorée par l'iode du bleu pâle au noir, résistante à la diastase) (Render *et al.* 1999). La résistance partielle des agrégats polysaccharidiques aux enzymes glycolytiques ainsi que leur aspect granuleux hétérogène observé en microscopie électronique nous orientent vers l'accumulation de **polysaccharides présentant des anomalies de branchement par rapport à la structure du glycogène normal**. Leur coloration par le bleu de Hale et la présence de matériel filamenteux indique qu'une autre molécule, de type mucopolysaccharide acide, pourrait y être associée ou qu'il s'agit d'un mélange de différents polysaccharides.

L'absence de membrane délimitant les agrégats polysaccharidiques observés en microscopie électronique dans le cytoplasme des fibres musculaires nous permet **d'exclure une affection lysosomiale**.

Article 1 : Larcher T, **Herszberg B**, Molon-Noblot S, Guigand L, Chaffaux S, Guerin G, Chérel Y. *Polysaccharide Storage Myopathy in Cob Normand Draft Horses*. Veterinary pathology, 2008, Vol. 45, 154-158.

## 2. Etude de la pathogénie de l'affection

*Afin de comprendre l'étiologie de l'affection et de choisir des gènes candidats, nous avons cherché à définir sa pathogénie par une approche physiologique et fonctionnelle. Une étude intégrative, menée en collaboration, nous a permis de réaliser des tests d'effort, tests enzymatiques et des tests de tolérance au glucose. Puis une approche transcriptomique (hybridation compétitive de transcrits musculaires de chevaux sains et atteints ) a été conduite afin d'identifier les voies métaboliques impliquées.*

### 2.1. Etude physiologique

#### 2.1.1. Matériel et méthodes

##### 2.1.1.1. Tests d'effort

Deux étalons Cob normand des Haras nationaux atteints de myopathie par surcharge en polysaccharides et deux étalons témoins ont effectué un parcours d'attelage comparable à celui de l'épreuve du marathon. Un couple de chevaux âgés de 11 ans, un malade et un témoin, ont été attelés en paire à un attelage de 600 kg dans lequel ont pris place 4 passagers. Pendant 2h30, à une vitesse moyenne de 7,3 km/h (vitesse maximale 23,6 km/h), ils ont marché, trotté et achevé le parcours par une phase d'effort intense au galop, avec franchissement d'obstacles (épreuve type E du marathon). Deux jeunes chevaux, un étalon atteint et un témoin, de respectivement 4 et 3 ans, ont été attelés individuellement, effectuant un parcours de 1h15 et 2h à une vitesse moyenne de 7,0 km/h (vitesse maximale 17,2 km/h).



**Figure 13 : Photo d'un étalon Cob normand attelé réalisant le test d'effort (au trot)**

Un cinquième étalon Cob normand de 10 ans, atteint de myopathie par surcharge en polysaccharides, a réalisé un test d'effort sur tapis roulant, à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, avec la collaboration d'Aude Giraudet (**figure 14**). Il a trotté et galopé pendant 3

minutes, sur 3 paliers d'effort croissant, de 7 à 21 km/h avec une pente de 0 à 3,8%. Des bilans hématologique et biochimique (activité de la créatine kinase, de l'aspartate aminotransférase, glutathion peroxydase, superoxyde dismutase, quantités de fibrinogène, triglycérides, glucose et calcium) ont été réalisés pour tous les chevaux, avant et après l'effort, des mesures de lactatémie ont été réalisés aux différents paliers du test sur tapis roulant.



**Figure 14 : test d'effort sur tapis roulant**

#### **2.1.1.2. Mesure de l'activité des enzymes glyco(géno)lytiques**

La **quantité de glycogène intramusculaire** a été évaluée dans des homogénats de muscles d'un cheval étalon atteint de 17 ans et d'un étalon témoin de 12 ans par une méthode colorimétrique (Hers 1964). L'activité de la myophosphorylase a été déterminée par le dosage colorimétrique du phosphate inorganique libéré lors de la réaction réversible suivante :  
 $\text{glycogène (n)} + \text{glucose-1-P} \leftrightarrow \text{glycogène (n+1)} + \text{Pi}$ . La mesure de l'activité de la phosphorylase se fait donc dans le sens glyco(géno)synthétique. L'activité de la myophosphorylase a été mesurée en présence (phosphorylase totale) et absence (phosphorylase active) d'adénosine mono phosphate. L'activité de l'enzyme débranchante du glycogène (AGL) a été mesurée dans les biopsies musculaires par la quantification de la dégradation d'un substrat de type dextrine limite (Maire *et al.* 1991). Une mesure indirecte de l'effet stimulateur de l'enzyme branchante du glycogène (GBE) sur l'activité de polymérisation du glucose à partir de glucose-1-P, par la myophosphorylase, a permis d'estimer l'activité de l'enzyme branchante chez nos deux individus (Brown & Brown 1966). La glycolyse anaérobie a été étudiée *in vitro* par la mesure du lactate formé à partir de différents substrats : le glycogène et des hexoses phosphates, produits intermédiaires de la glycolyse. Cette étude a permis d'évaluer le potentiel glycolytique des animaux atteints.

### 2.1.1.3. Test de tolérance au glucose

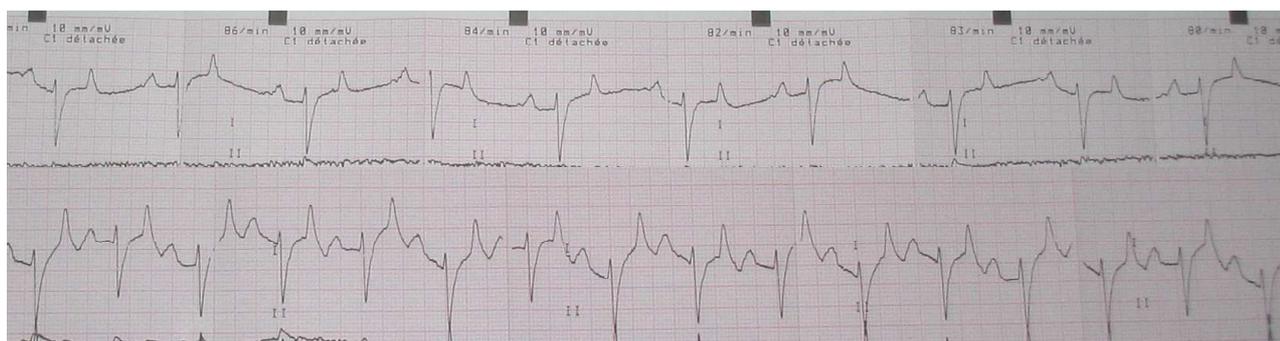
La tolérance au glucose de quatre étalons Cob normands dont deux chevaux atteints de 5 et 10 ans pesant chacun 750 kg et deux étalons témoins de 4 et 10 ans, pesant respectivement 700 et 800 kg, a été étudiée. L'expérience a été menée en juillet. Les chevaux venaient du même Haras, avaient le même type d'entraînement et recevaient la même alimentation (foin et avoine). Ils ont été placés à jeun, au box, la nuit précédent le test, avec toutefois un libre accès à l'eau. Un cathéter a été placé dans leur veine jugulaire gauche et a permis d'administrer une solution de glucose 50% en bolus (0,5 g de glucose / kg). L'expérience a débuté à la même heure pour les quatre chevaux. Des prélèvements de sang ont été faits à l'aide du cathéter, dans des tubes héparinés 2, 4, 8, 16, 30, 60, 90, 120, 180 et 240 minutes après l'injection intraveineuse du glucose. La glycémie a été mesurée par une méthode électrochimique immédiatement après la collecte du sang. La quantité d'insuline dans le plasma a été dosée par radio-immunologie.

## 2.1.2. Résultats

### 2.1.2.1. Tests d'effort

Tous les chevaux ont terminé les tests d'effort sans présenter les symptômes d'un « coup de sang ». Un cheval atteint (étalon de 4 ans) a cependant présenté une boiterie qui n'a pas pu être imputée à une lésion articulaire ou tendineuse.

L'électrocardiogramme du cheval de 10 ans atteint enregistré après un test d'effort sur tapis roulant était normal (**figure 15**).



**Figure 15 : Electrocardiogramme normal d'un cheval atteint au cours du test d'effort sur tapis roulant**

Les bilans hématologiques de tous les chevaux furent normaux. Cependant, deux chevaux atteints ont montré une élévation de l'activité de leur créatine kinase (> 300 U/L) et/ou de leur aspartate amino transférase (> 350 U/L), ce qui témoigne d'une rhabdomyolyse modérée, sans autre signe de perturbation métabolique (**tableau 2**).

Cheval	Statut	Age (années)	Poids (kg)	Durée de l'épreuve (heures)	Temps	Créatine kinase	Aspartate amino transférase
1	atteint	10	750	0,3	T0	183	348
1	atteint	10	750	0,3	T1	181	368*
2	sain	11	748	2,5	T0	101	184
2	sain	11	748	2,5	T1	115	191
3	atteint	11	768	2,5	T0	630*	630*
3	atteint	11	768	2,5	T1	2307*	771*
4	sain	4	700	2	T0	149	226
4	sain	4	700	2	T1	279	236
5	atteint	3	685	1,5	T0	121	183
5	atteint	3	685	1,5	T1	166	185

Taux sériques de créatine kinase et d'aspartate aminotransférase avant (T0) et après (T1) les tests de tolérance à l'effort, sur tapis roulant pour le cheval 1 et à l'occasion d'une épreuve attelée de type marathon pour les chevaux 2, 3, 4 et 5. Deux chevaux atteints de myopathie par surcharge en polysaccharides (chevaux 1 et 3) présentent un taux élevé de créatine kinase (>300 U/L\*) et/ou d'aspartate aminotransférase (>350 U/L\*), signes d'une rhabdomyolyse modérée.

### Tableau 2 : bilan biochimique des tests d'effort

Le test sur tapis roulant a permis de mesurer une élévation de la lactatémie avec l'accroissement de l'intensité de l'effort chez le cheval atteint de 10 ans (6,5 g/L à 19 km/h avec une pente de 1,6%, fréquence cardiaque = 120 pulsations / min, 11,3 g/L à 21 km/h avec une pente de 3,8 %, fréquence cardiaque = 148 pulsations / min).

#### 2.1.2.2. Evaluation de l'activité des enzymes glyco(géno)lytiques

Les résultats des mesures d'activité des enzymes glyco(géno)lytiques sont présentés dans le **tableau 3**. Le test de glycolyse anaérobie a montré que l'équipement enzymatique du muscle du cheval atteint réduit le glycogène, le glucose1P, le glucose6P, le fructose6P, et le fructose 1,6BP en lactate. **Il n'y a donc pas de déficit enzymatique glyco(géno)lytique complet dans le muscle de ce cheval présentant une myopathie par surcharge en polysaccharides.** Cependant, la glycolyse anaérobie semble 30% moins efficace dans le muscle de ce cheval atteint que dans celui d'un témoin sain.

La myophosphorylase active et l'enzyme branchante du glycogène (GBE) ont une activité doublée chez le cheval malade. L'enzyme débranchante du glycogène est 20% moins active dans le muscle de l'animal atteint.

	Unité	Cheval sain	Cheval atteint
glycogène	g%	2,2	4,9
myophosphorylase			
active (- AMP)	U/g	12 <sup>A</sup>	28 <sup>A</sup>
totale (+ AMP)	U/g	94	103
enzyme débranchante	U/g	1,58 <sup>C</sup>	1,31 <sup>C</sup>
enzyme branchante	U/g	20,9 <sup>B</sup>	38,8 <sup>B</sup>

substrat	µmol de lactate formé / g de muscle / 30 min	
	Cheval sain	Cheval atteint
glycogène	160	132
glucose-1P	392	256
glucose-6P	448	290
Fructose-6P	476	268
Fructose-1,6BP	138	94

#### Évaluation de la glyco(géno)lyse anaérobie

Les activités de la myophosphorylase active<sup>A</sup> et de l'enzyme branchante du glycogène<sup>B</sup> sont doublées dans le muscle du cheval atteint. L'enzyme débranchante du glycogène<sup>C</sup> est 20% moins active dans le muscle du cheval affecté. L'évaluation de la glyco(géno)lyse anaérobie montre que l'équipement enzymatique du cheval atteint de myopathie par surcharge en polysaccharides permet de dégrader le glycogène en lactate. Il n'y a pas de déficit total d'activité d'une enzyme intervenant dans le métabolisme du glycogène dans le muscle du cheval atteint.

Résultats du laboratoire de biochimie de l'hôpital Debrousse, à Lyon

**Tableau 3 : Évaluation des capacités glyco(géno)lytiques et des activités des enzymes branchante et débranchante du glycogène**

#### 2.1.2.3. Test de tolérance au glucose

L'évolution de la glycémie des quatre chevaux qui ont subi le test de tolérance au glucose est semblable (**figure 16**).

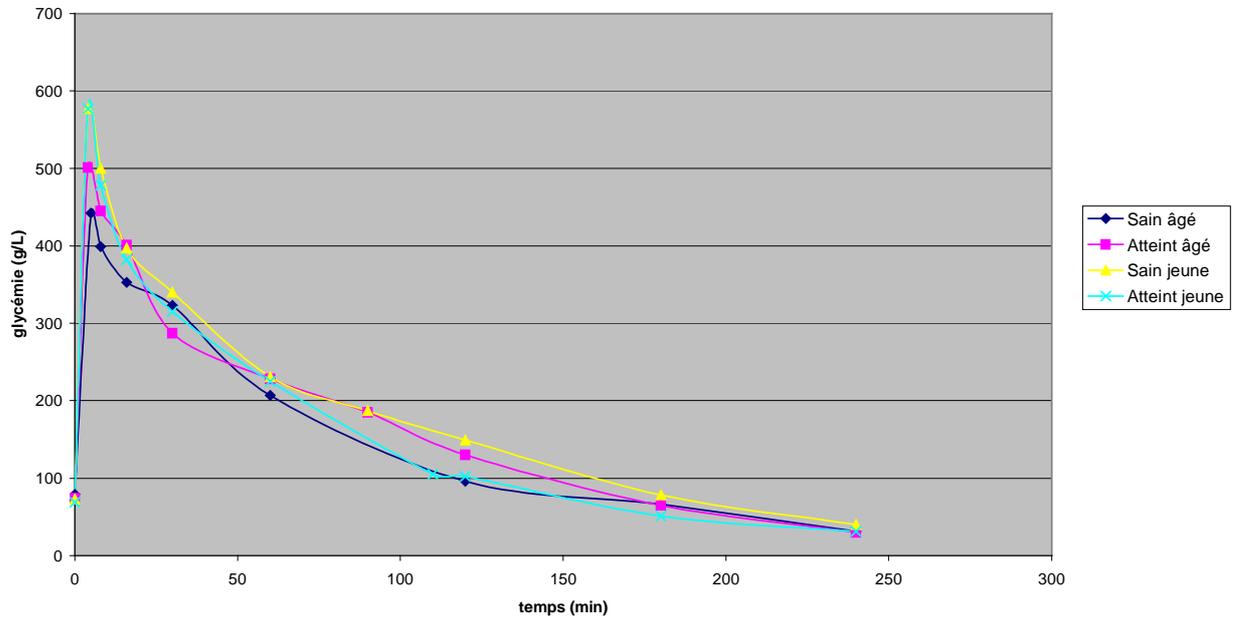
	Cheval sain 10 ans	Cheval atteint 10 ans	Cheval sain 4 ans	Cheval atteint 5 ans
Aire sous les courbes d'insulinémie (en µU.min <sup>-1</sup> .mL <sup>-1</sup> )	17314	14714	10606	8417
Pic tardif d'insulino-sécrétion (en µU.min <sup>-1</sup> .mL <sup>-1</sup> )	115	76	54	45

**Tableau 4 : Analyse de l'évolution de l'insulinémie lors du test de tolérance au glucose**

Les deux chevaux les plus âgés (sain et atteint) libèrent plus d'insuline que les deux chevaux plus jeunes (**tableau 4**). L'âge a un effet statistiquement significatif ( $p = 0,02$ ) sur la tolérance au glucose de ces animaux (chevaux âgés résistant à l'insuline). Lorsque l'on analyse l'effet de l'atteinte par la myopathie par surcharge en polysaccharides chez les chevaux de même âge, on observe un effet statistiquement significatif au seuil de 10% (test

ANOVA,  $p = 0,0545$ ). Les chevaux atteints sont plus sensibles à l'insuline que les chevaux témoins.

Evolution de la glycémie



Evolution de l'insulinémie

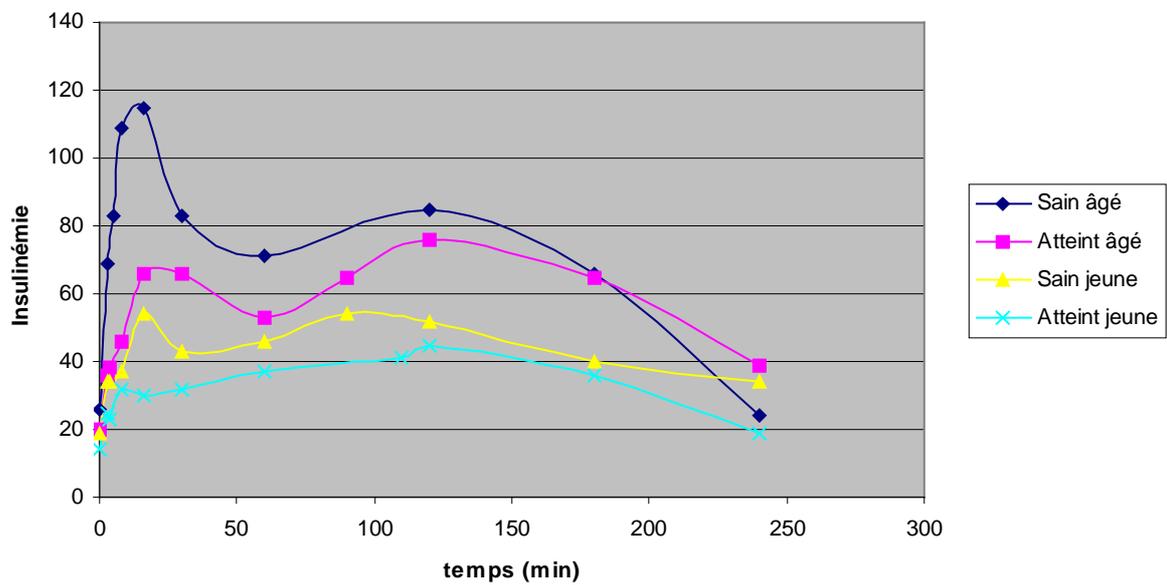


Figure 16 : tests de tolérance au glucose

### 2.1.3. Interprétation des résultats

Les tests d'effort n'ont pas permis de reconstituer les circonstances déclenchant la crise ou « coup de sang ». Cependant, un cheval atteint a présenté, au cours de l'effort, une boiterie probablement liée à une douleur musculaire.

L'électrocardiogramme du cheval atteint de 10 ans à la suite du test sur tapis roulant, est resté normal. Il s'agit pourtant de l'individu euthanasié par la suite sur lequel des lésions cardiaques importantes, macro et microscopiques, ont été constatées (fibrose myxoïde et accumulation d'agrégats de polysaccharides résistant à l' $\alpha$ -amylase dans les cardiomyocytes). Les lésions cardiaques observées post-mortem n'ont pas entraîné de troubles fonctionnels dans les conditions de l'effort demandé.

Deux des trois chevaux Cob normand atteints de myopathie par surcharge en polysaccharides ont présenté une élévation de leurs taux de créatine kinase et d'aspartate amino-transférases sériques, après l'effort. Cette augmentation des taux enzymatiques s'explique par la rhabdomyolyse. Une telle lyse musculaire a été observée chez d'autres races chevaux de traits (Valentine 1999) ainsi que chez des chevaux Quarter Horses présentant cette affection (Valberg *et al.* 1999). La lactatémie des chevaux Cob normand et Quarter Horses atteints de myopathie par surcharge en polysaccharides s'élève après un exercice d'intensité submaximale (Valberg *et al.* 1999). Les tests *in vitro* ont confirmé que le muscle d'un animal atteint disposait de l'équipement enzymatique permettant de produire du lactate à partir de différents substrats (glycogène et produits intermédiaires de la glycolyse). Cependant, la quantité de lactate produite par le muscle des chevaux Cob normand et Quarter Horses (Valberg *et al.* 1992) atteints de myopathie par surcharge en polysaccharides reste moins importante que celle des chevaux témoins. Aucun déficit enzymatique complet parmi les enzymes intervenant dans le métabolisme du glycogène, de la glycogénogénèse et de la glycogénolyse, n'a pu être détecté comme cela a pu être le cas pour différentes glycogénoses décrites chez l'Homme et les autres animaux (Walvoort 1983; Tsujino *et al.* 2000).

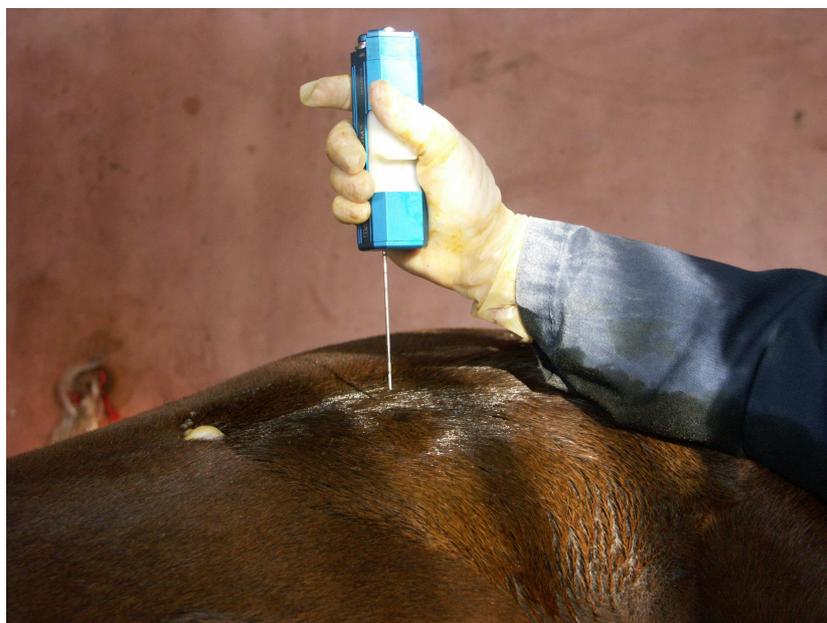
Les tests de tolérance au glucose ont montré une sensibilité à l'insuline liée à l'âge. Pour une régulation de la glycémie comparable, les chevaux plus âgés requièrent une élévation de l'insulinémie plus importante (Malinowski *et al.* 2002). Le deuxième facteur influençant la réponse au test de tolérance au glucose est le statut sain ou atteint de myopathie par surcharge en polysaccharides. Les chevaux Cob normand affectés témoignent d'une sensibilité à l'insuline accrue par rapport aux chevaux témoins de même âge. Les chevaux Quarter Horses atteints de myopathie par surcharge en polysaccharides présentent également une sensibilité accrue à l'insuline (De La Corte *et al.* 1999). Cette augmentation de la sensibilité à l'insuline, qui semble liée à une entrée et une incorporation plus importante du glucose dans les cellules musculaires, n'est pourtant pas corrélée à une augmentation du nombre de transporteurs du glucose GLUT4 ou des récepteurs à l'insuline (Annandale *et al.* 2004).

## **2.2. Etude par des techniques de génétique fonctionnelle**

### **2.2.1. Matériel et méthodes**

L'expression des gènes a été étudiée à l'aide d'une puce équine à oligonucléotides qui comprend 384 transcrits (334 sondes nucléaires et 50 sondes mitochondriales), conçue par le Réseau National des Génopoles. Les gènes présents sur la biopuce ont été choisis pour leur rôle important dans l'organisation du muscle et la fonction musculaire (contraction, métabolisme énergétique, inflammation). Les 334 gènes nucléaires ont été annotés en recherchant les gènes orthologues humains avec lesquels ils présentaient des homologies de séquence. Parmi les 50 gènes mitochondriaux, 13 codent pour des sous-unités protéiques de la chaîne respiratoire, 22 pour les ARNs de transfert et 2 pour les ARNs ribosomiaux. Les sondes ont été amplifiées et déposées sur une lame de verre recouverte d'un hydrogel (Schott Nexterion) par un robot (Microgrid). Il s'agit de la première puce à oligonucléotides consacrée à l'étude de l'expression des gènes dans le muscle du Cheval. Elle a été validée pour différentes races par le Laboratoire de Génomique Fonctionnelle, en septembre 2006.

Le niveau d'expression des gènes de 7 chevaux atteints comparés à 6 chevaux sains a été étudié (4 femelles et 9 mâles, âgés de 4 à 17 ans). Le phénotype sain / atteint des chevaux a été déterminé par l'étude histologique de leur biopsie musculaire (prélèvement chirurgical du glutéus médius), c'est à dire grâce à la mise en évidence d'agrégats de polysaccharides résistant à la digestion par l'amylase chez les individus atteints. L'étude transcriptomique a été réalisée à partir d'échantillons du même muscle prélevés avec un trocart, permettant la standardisation du prélèvement (site, profondeur et quantité de muscle prélevé) (**figure 17**).



**Figure 17 : Photo du trocart pour prélèvement musculaire**

Les ARNs totaux ont été extraits à partir des biopsies musculaires (extraction au phénol-chloroforme). Leur concentration a été déduite de l'absorbance mesurée à 260 nm avec un spectrophotomètre (Nanodrop), leur pureté a été vérifiée par mesure du ratio d'absorbance 260 nm / 280 nm (ratio proche de 2) et leur intégrité évaluée par électrophorèse capillaire (RNA 6000 Nano Labchip). Les ARNs (1 µg) ont ensuite été amplifiés par

l'incorporation de nucléotides portant un groupement amino-allyl UTP. Après purification, les ARNs amino-modifiés ont été liés à des marqueurs fluorescents bicolores par fixation sur les groupements allyl, de groupements ester liés au fluorochrome (méthode indirecte). Les deux fluorochromes utilisés, la Cyanine 3 (Cy3) et la Cyanine 5 (Cy5), ont été respectivement associés aux ARNs « poolés » des chevaux sains et aux ARNs d'un cheval atteint. Les ARNs marqués ont ensuite été mélangés et hybridés de façon compétitive sur une même puce. Afin d'atténuer le déséquilibre d'incorporation et d'émission du signal entre les deux fluorochromes ainsi que leur différence de stabilité, un marquage et une hybridation en flip/flop (dye-swap) a été réalisé pour chaque échantillon (dupliquat technique). L'intensité de la fluorescence de chacun des deux marqueurs (Cy3 523 nm et Cy5 635 nm) a été détectée par un scanner (GenePix 4000B laser scanner). Les images ont été analysées avec le logiciel GenePix Pro 6.0, puis les mesures de l'intensité de la fluorescence des spots ont été normalisées et filtrées avec le logiciel Gene Spring. Les données ont été normalisées par une méthode de régression (LOWESS) qui permet de prendre en compte l'absence de relation linéaire entre les intensités. Pour chaque échantillon et pour chaque gène, un ratio d'expression a été obtenu (Mucher *et al.* 2006). Ce ratio correspond au rapport du niveau d'expression du gène considéré dans le muscle du cheval atteint par rapport au niveau d'expression de ce même gène dans le « pool » des muscles de chevaux sains témoins.

La distribution des ratios a été normalisée en utilisant une transformation logarithmique. Le test t de Student a été utilisé pour l'analyse statistique des résultats. Les valeurs avec  $p < 0,05$  ont été considérées comme étant significatives.

## **2.2.2. Résultats**

### **2.2.2.1. Gènes différentiellement exprimés**

Trente trois pour cent des 384 gènes présents sur la puce se sont hybridés avec les transcrits musculaires de nos chevaux. Parmi ces 129 gènes dont le niveau d'expression peut être comparé entre individus sains et atteints, 16 gènes sont significativement plus exprimés chez les chevaux atteints (ratio  $> 1,5$ ) et 32 sont moins exprimés chez les malades comparés aux témoins (ratio  $< 0,66$ ). Parmi les gènes surexprimés chez les chevaux atteints, l'interleukine 18 l'est massivement (6 fois plus); les gènes CTSS (cathepsine S, protéase lysosomiale), LUM (protéoglycane extracellulaire), CD44 (récepteur membranaire), FN1 (fibronectine 1) et GST01 (glutathion S transférase) sont deux fois plus exprimés chez les chevaux atteints de myopathie par surcharge en polysaccharides. Les gènes dont l'expression est réprimée chez les malades (ratio  $< 0,66$ ) sont essentiellement des ARN de transfert mitochondriaux ainsi que SLC2A2 (transporteur du glucose GLUT2), PRKCA (protéine kinase impliquée dans la mobilité cellulaire) et VEGFA (facteur de croissance impliqué dans l'angiogénèse et la prolifération cellulaire).

Nom du gène	Entrez gene ID	Ratio normalisé des gènes modulés	P-value <0.05
IL18	3606	6,20	0,00
CTSS	1520	3,17	0,00
LUM	4060	3,15	0,00
CD44	960	2,42	0,00
FN1	2335	2,17	0,01
GSTO1	9446	2,03	0,00
VCAM1	7412	1,98	0,03
ITGB1	3688	1,87	0,00
CXCR4	7852	1,81	0,03
HIF1A	3091	1,73	0,00
ITGB2	3689	1,70	0,00
HSPA5	3309	1,69	0,01
GNAS	2778	1,63	0,00
CD69	969	1,62	0,03
LTF	4057	1,58	0,02
GSK3B	2932	1,50	0,00
TNFRSF4	7293	0,66	0,00
IGHE	3497	0,66	0,00
ATP5I	10632	0,66	0,00
UCP2	7351	0,66	0,01
Lys-ARNt_TRNK	4566	0,65	0,00
ND3	4537	0,64	0,00
ND6	4541	0,63	0,00
ATP2A1	487	0,62	0,00
TNFSF13B	10673	0,62	0,00
Gly-ARNt_TRNG	4563	0,62	0,00
NFKBIB	4793	0,59	0,00
PLCG2	5336	0,58	0,00
ND5	4540	0,57	0,00
ND3	4537	0,57	0,00
SLC25a17	10478	0,57	0,00
SRI	6717	0,57	0,00
Val-ARNt_TRNV	4577	0,56	0,00
Asp-ARNt_TRND	4555	0,55	0,00
ND5	4540	0,54	0,00
PDE4D	5144	0,54	0,00
Ser-ARNt_TRNS2	4575	0,50	0,01
Ile-ARNt_TRNI	4565	0,49	0,00
SLC25a15	10166	0,48	0,05
Leu-ARNt_TRNL2	4568	0,44	0,00
Trp-ARNt_TRNW	4578	0,40	0,00
Thr-ARNt_TRNT	4576	0,40	0,00
Pro-ARNt_TRNP	4571	0,39	0,00
VEGF	7422	0,37	0,00
PRKCA	5578	0,37	0,00
SLC2A2	6514	0,35	0,00
Ala-ARNt_TRNA	4553	0,35	0,00
Tyr-ARNt_TRNY	4579	0,35	0,00
Asn-ARNt_TRNN	4570	0,33	0,00
Cys-ARNt_TRNC	4511	0,28	0,00
Gln-ARNt_TRNQ	4572	0,21	0,00

gènes induits  
 gènes réprimés

**Tableau 5 : gènes dont l'expression est modulée chez les chevaux atteints de myopathie par surcharge en polysaccharides**

### 2.2.2.2. Fonctions cellulaires activées ou réprimées et perturbations métaboliques chez les chevaux présentant une glycogénose musculaire

Les gènes dont l'expression est significativement modulée ont été classés, à l'aide du logiciel Ingenuity, suivant les fonctions cellulaires ou voies métaboliques dans lesquels ils interviennent. La synthèse protéique, l'apoptose, le mouvement, la croissance et la prolifération cellulaires sont les fonctions dans lesquelles sont le plus impliqués les gènes différentiellement exprimés. La phosphorylation oxydative, la synthèse d'ubiquinone (coenzyme Q10), le métabolisme des aminosucre et le métabolisme des purines sont les principales voies métaboliques mises en exergue par l'analyse des gènes modulés. Les voies de signalisation associées aux récepteurs couplés aux protéines G, NF-kappaB, VEGF et IL6 sont également touchées. Ainsi, les chevaux atteints de myopathie par surcharge en polysaccharides semblent subir des perturbations métaboliques liées à l'hypoxie, la voie NF-kappaB, la fonction mitochondriale et le stress oxydatif.

Une analyse avec le programme Predictsearch, a fait ressortir des liens fonctionnels entre les gènes différentiellement exprimés. Ceux-ci sont impliqués dans la glycolyse, la chaîne respiratoire, l'hypoxie, la synthèse du glycogène et l'inflammation musculaire.

#### ➤ Inhibition du métabolisme oxydatif :

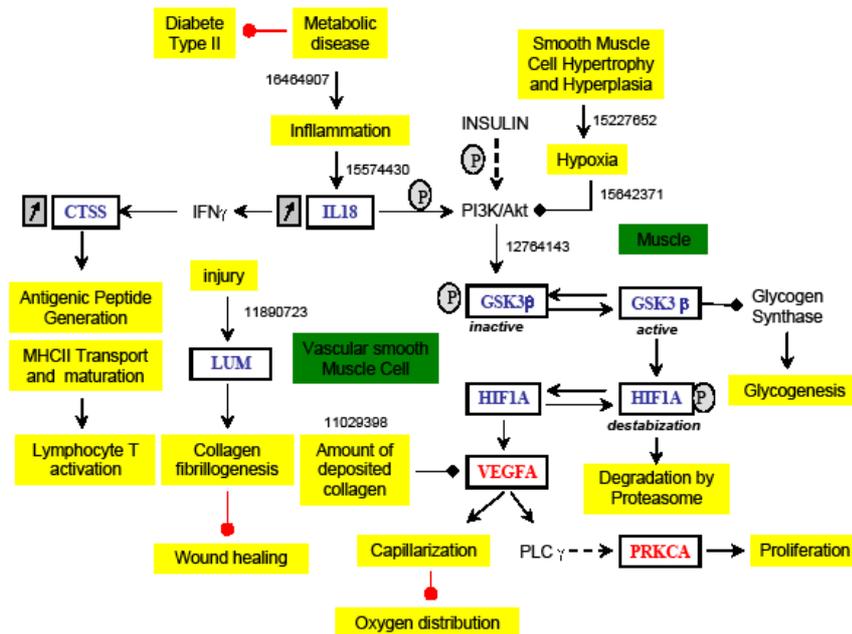
Un nombre important de gènes mitochondriaux (ARN de transfert, ND2, ND3, ND5, ND6, COX2 et COX3) sont sous-exprimés dans le muscle des individus atteints. Des gènes nucléaires impliqués dans le métabolisme aérobie sont également sous exprimés (UCP2, GNAS, SLC25a17, SLC2A2, ATP5L, ATP5J, ATP5D et ATP5H).

#### ➤ Exacerbation de processus inflammatoires :

La surexpression de gènes tels que l'interleukine 18 (IL18), CD44, CD69, CTSS, FN1, HSPA5, ITGB2, VCAM, CXCR4, LTF, GSTO1 et LUM révèle un processus inflammatoire chronique.

#### ➤ Liens entre les différentes voies modulées et le métabolisme du glycogène :

La **figure 18** illustre les interactions entre l'IL18, également impliquée dans le processus inflammatoire, et le métabolisme du glycogène. L'IL 18 réprime l'activité de la glycogène synthase kinase GSK3beta (inhibitrice de la glycogène synthase), elle-même surexprimée. L'augmentation de l'activité de l'IL 18 induit également la levée d'inhibition du facteur de transcription lié à l'hypoxie H1F1A, lui aussi surexprimé. La sous-expression de VEGFA limite la néovascularisation et l'oxygénation des fibres musculaires.



Legends of figures

XX	Induced gene (Ratio $\geq 1.5$ )
XX	Repressed gene (Ratio $\leq 0.5$ )
XX	Repressed gene ( $0.5 < \text{Ratio} < 0.7$ )

↑ increase   ↓ decrease   ● associated concept   Ⓟ phosphorylation

→	activation	
→	transcriptional activation	biological activity
—●	binding	
—●—	interaction	cellular/tissue/organ context
→	inhibition	
⋯	undirect signalling	

**Figure 18 : interactions entre l'IL18, également impliquée dans le processus inflammatoire, et le métabolisme du glycogène.**

➤ Le niveau d'expression d'autres gènes dont la fonction semble pertinente, en lien avec l'affection étudiée, est modifié. Ainsi les gènes codant pour ENO1, énoïase impliquée à la fin des réactions de la glycolyse (dans la formation de phosphoénolpyruvate) et l'érythropoïétine (EPO) sont surexprimés. Les gènes codant pour PYGL, impliquée la glycogénogenèse (phosphorylase hépatique), l'IL6ST et l'IL7 impliquées dans la voie de signalisation des lignées cellulaires hématopoïétiques, MIF, impliqué dans la régulation de l'inflammation cellulaire, sont sous-exprimés.

GSK3Beta, PYGL et GLUT2 sont les seuls gènes reliés directement au métabolisme du glycogène dont l'expression est modifiée.

### 2.2.3. Interprétation des résultats

L'analyse de l'expression des gènes dans le muscle des chevaux atteints de myopathie par surcharge en polysaccharide révèle les perturbations métaboliques liées à cette glycogénose équine. Elle ne permet cependant pas de mettre en évidence un ou plusieurs gènes dont nous suspectons qu'ils soient à l'origine de la maladie. On observe une inflammation musculaire chronique et les conséquences d'une hypoxie sévère associée à une nette diminution du métabolisme énergétique oxydatif.

Parmi les gènes impliqués dans le processus inflammatoire, l'IL 18 est celui dont le niveau d'expression est le plus intensément augmenté ; suivent, par leur ratio d'expression entre chevaux atteints et témoins, CTSS, LUM, CD 44 et FN1. Le gène LUM code pour une petite molécule de type protéoglycane sulfaté qui participe à la fibrillogenèse du collagène dans le processus cicatriciel. D'autres gènes dont l'expression est stimulée dans ce contexte pathologique avaient déjà été impliqués dans des processus inflammatoires et cicatriciels comparables : l'IGF2 participe à la différenciation des myoblastes (Erbay *et al.* 2003), le gène CXCR4, qui code pour un récepteur des chémokines, est impliqué dans l'inflammation et la cicatrisation lors de myopathies idiopathiques chez l'Homme (De Paepe *et al.* 2007).

L'expression de l'IL18, facteur d'induction de l'interféron gamma, jouant un rôle dans l'activation du système immunitaire, la prolifération, l'infiltration, l'apoptose et la cytotoxicité, est augmentée de façon très importante (ratio = 6,2) chez les chevaux atteints. Chez l'homme, la concentration plasmatique d'IL18 est un indicateur de risque d'infarctus du myocarde (Zirlik *et al.* 2007). Le taux circulant d'IL 18 pourrait être un marqueur plasmatique potentiel permettant de dépister les chevaux prédisposés à la glycogénose musculaire. L'augmentation de l'expression de l'IL 18 chez nos chevaux atteints, à mettre en relation avec le processus inflammatoire, induit, *via* des phosphorylations / déphosphorylations en cascade, une augmentation de l'activité de la glycogène synthase (GYS). *A contrario*, l'accroissement de la transcription de GSK3-Beta induit une augmentation de son activité phosphorylase et l'inhibition, sous sa forme phosphorylée, de la glycogène synthase. Le faible niveau d'expression de PYGL indique une faible activité glycolytique. GSK3beta inhibe le facteur inductible lié à l'hypoxie (HIF1A) qui inhibe à son tour VEGFA dont l'expression est atténuée chez les chevaux affectés alors qu'il joue un rôle central dans la néovascularisation et l'oxygénation des fibres musculaires en voie de régénération. Le faible niveau d'expression de l'IL6ST et de l'IL7 va également dans le sens d'une aggravation de l'hypoxie. Mais l'expression du gène de l'EPO, facteur trophique de la lignée érythropoïétique et initiateur la synthèse d'hémoglobine, est augmentée. Pour son activité anti-apoptotique et protecteur vis-à-vis de l'hypoxie, l'EPO est notamment utilisée dans la prévention et le traitement des maladies cardiovasculaire et de l'insuffisance cardiaque (Manolis *et al.* 2005). L'augmentation de son expression pourrait atténuer les effets délétères de l'inflammation.

L'hypoxie peut également être mise en relation avec l'altération du métabolisme oxydatif mitochondrial. La perturbation de l'activité mitochondriale est révélée par la diminution de l'expression des ARNs de transfert mitochondriaux et par la régulation négative de l'expression des sous unités des enzymes de la chaîne respiratoire (ND2, ND3, ND6, COX2 et COX3). Des gènes nucléaires associés au métabolisme oxydatif des mitochondries sont également sous-exprimés (GNAS, SLC25A15, SLC2A2, ATP5L, ATP5J, ATP5D et ATP5H). La diminution du niveau d'expression de GLUT2, qui facilite le transport passif du glucose à travers la membrane, a pour conséquence la moindre disponibilité du glucose pour la synthèse de glycogène ou la glycolyse.

La protéine kinase C alpha (PRKCA) joue un rôle pléiotropique dans des voies métaboliques telles que la voie des MAP kinases, la voie de signalisation VEGF ou celle du calcium. La diminution de son expression peut affecter ces différentes voies de signalisation.

Parmi les fonctions activées, l'inflammation musculaire est la plus significative, avec notamment une importante augmentation de la transcription du gène de l'IL18. Cette inflammation chronique stimule les processus cicatriciels. Cependant, la néovascularisation et l'oxygénation des fibres musculaires en régénération sont limitées par l'hypoxie. Le métabolisme énergétique des cellules semble limité par la stimulation de la glycogénogénèse (inactivation de la GS kinase3 beta par l'IL18, activation de GYS et mise en réserve du glucose), la diminution de la glycogénolyse (inhibition de l'expression de PYGL), la limitation de la biodisponibilité du glucose (diminution de l'expression de GLUT 2) et surtout la diminution des phosphorylations oxydatives mitochondriales.

Dans ce contexte de diminution de la biodisponibilité du glycogène, nous allons étudier plus précisément le gène équien codant pour l'enzyme débranchante du glycogène.

#### Article 2 :

Barrey E, Mucher E, Jeansoule N, Larcher T, Guigand L, **Herszberg B**, Chaffaux S, Guerin G, Mata X, Benech P, Canale M, Alibert O, Maltere P, Gidrol X. Gene expression profiling in equine polysaccharide storage myopathy revealed inflammation, glycogenesis inhibition, hypoxia and mitochondrial dysfunctions. BMC Veterinary research, 2009. Vol. 5, (29).

### 3. Caractérisation structurale et fonctionnelle d'un gène candidat intervenant dans le métabolisme du glycogène

*Un important travail de génétique moléculaire a conduit à la caractérisation d'un gène candidat, le gène de l'enzyme débranchante du glycogène (ou amylo-1,6 glucosidase) du Cheval. L'étude détaillée de ce gène et de ses différents transcrits (structure du gène, localisation, polymorphismes et expression) apporte des connaissances fondamentales utiles à l'étude d'association génétique qui fera l'objet de la dernière partie.*

#### 3.1. Choix du gène candidat

Les éléments dont nous disposions au moment du choix d'un gène candidat étaient les suivants :

✓ L'étude histologique a précisé le phénotype des individus atteints, ce qui détermine, *a contrario*, celui des individus sains. Ce phénotype est défini par les inclusions cytoplasmiques, dans les fibres musculaires, de polysaccharide anormal, colorées par le PAS, résistantes à la digestion par l'amylase mais sensibles à une digestion longue par la diastase et de vacuoles sous-sarcolemmales dans ces fibres musculaires d. Ces amas de glycogène anormal ne sont pas entourés d'une membrane, ce qui permet d'écarter l'implication d'une maladie lysosomiale.

✓ Cette étude histologique plaide pour l'accumulation de polysaccharides de structure anormale par rapport à celle du glycogène normal, structure consécutive à des branchements anormaux. Chez l'Homme, comme chez d'autres espèces animales, l'accumulation de polysaccharides ayant des anomalies de branchement est observée lors de modification de l'activité des enzymes branchante et débranchante du glycogène, de déficit d'activité de la phosphofructokinase ou de mutations de la glycogène synthase (Harvey *et al.* 1990; Amato 2000; Raben *et al.* 2001). Ici, l'aspect vacuolaire des lésions nous oriente vers une glycogénose de type III (déficit d'activité de l'enzyme débranchante) (DiMauro *et al.* 1979).

✓ L'accumulation de glycogène dans le muscle est confirmée par les résultats de l'étude enzymatique. Cette étude a permis d'écarter plusieurs enzymes dont une diminution de l'activité ne peut être mise en cause dans l'apparition du phénotype morbide, notamment la myophosphorylase et l'enzyme branchante du glycogène. Les premiers résultats de dosages ne nous ont pas clairement orientés vers un gène particulier. Nous avons cependant constaté que l'activité de l'enzyme débranchante du glycogène était de 20% inférieure chez un cheval atteint à celle mesurée chez un cheval sain.

✓ Cette myopathie des chevaux Cobs normands adultes n'a donc pas la même origine que celle décrite chez les poulains Quarter Horse, car ces derniers présentent un déficit en enzyme branchante (Valberg *et al.* 2001). Part ailleurs, la sensibilité à la digestion par la diastase et la coloration différente par l'iode distingue le polysaccharide accumulé chez les chevaux Cob normand de la molécule de type amylopectine retrouvée chez les poulains Quarter horse porteurs d'une mutation de l'enzyme branchante du glycogène. L'origine distincte de ces deux glycogénoses équines était prévisible du fait de manifestations cliniques très différentes : le déficit en enzyme branchante provoque des symptômes généraux chez de jeunes poulains qui meurent dans les premières semaines de vie alors que les chevaux Cobs normand présentent des symptômes plus discrets et uniquement musculaires (tremblements,

myosite, intolérance à l'effort) et lorsque la mort survient, elle est brutale et consécutive à un exercice physique. La myopathie observée chez les chevaux de trait ne semble donc pas due à un déficit d'activité de l'enzyme branchante du glycogène.

✓ L'étude histologique a également montré l'étendue tissulaire de l'affection : les lésions sont spécifiquement musculaires. Les muscles striés, squelettiques et cardiaques, sont atteints, ainsi que les muscles lisses. Nous nous intéresserons donc plus particulièrement aux enzymes qui présentent des isoformes musculaires. Parmi les « gènes candidats » pouvant expliquer l'accumulation d'une molécule polysaccharidique présentant des anomalies de branchement et des transcrits spécifiques du muscle, nous trouvons : les gènes de l'enzyme débranchante du glycogène, de la phosphofruktokinase et de la glycogène synthase.

✓ Le cheval autopsié présentait une cardiomyopathie importante ainsi qu'une atteinte des muscles respiratoires. Cette apparition tardive des symptômes musculaires (intolérance à l'effort, faiblesse des ceintures) associée à une atteinte des muscles cardiaques et respiratoires est également observée lors de glycogénoses de type III chez l'Homme (déficit en enzyme débranchante du glycogène) (Coleman *et al.* 1992; Lucchiari *et al.* 2006; Ogimoto *et al.* 2007).

✓ La dérégulation des effets de l'insuline, comme le diabète secondaire observé associé à certains types de glycogénose, sont expliqués par l'inactivité de l'enzyme incriminée, par les effets rétro-régulateurs de certains substrats anormalement accumulés ou par les effets indirects sur d'autres enzymes. Par exemple, dans les cas de maladie de McArdle (déficit en myophosphorylase), la glycogène synthase est moins active et les malades présentent une résistance à l'insuline indépendante de leur taux de glucose intramusculaire (Nielsen *et al.* 2002). Dans le cas de déficit en enzyme débranchante, la phosphorylase et la glucose-6-phosphatase sont également inhibées (Rosenfield *et al.* 1976). Lors de déficit en phosphofruktokinase, une résistance à l'insuline est aussi constatée (Ristow *et al.* 1999). Cependant, à l'opposé de ces observations faites lors de glycogénoses humaines, chez les chevaux Cob normand présentant ces lésions de myopathie par surcharge en polysaccharides, nous observons une sensibilité accrue à l'insuline.

✓ L'étude transcriptomique ne révèle que des effets contrastés concernant les modifications de l'expression des gènes du métabolisme du glycogène. En effet, l'augmentation de l'expression de l'IL18 et l'inhibition des gènes mitochondriaux iraient dans le sens d'une stimulation de la glycogénogénèse, d'une diminution de la glycogénolyse et des phosphorylations oxydatives. En revanche, la surexpression de la glycogène synthase kinase GSK3beta induit une diminution de l'activité de la glycogène synthase.

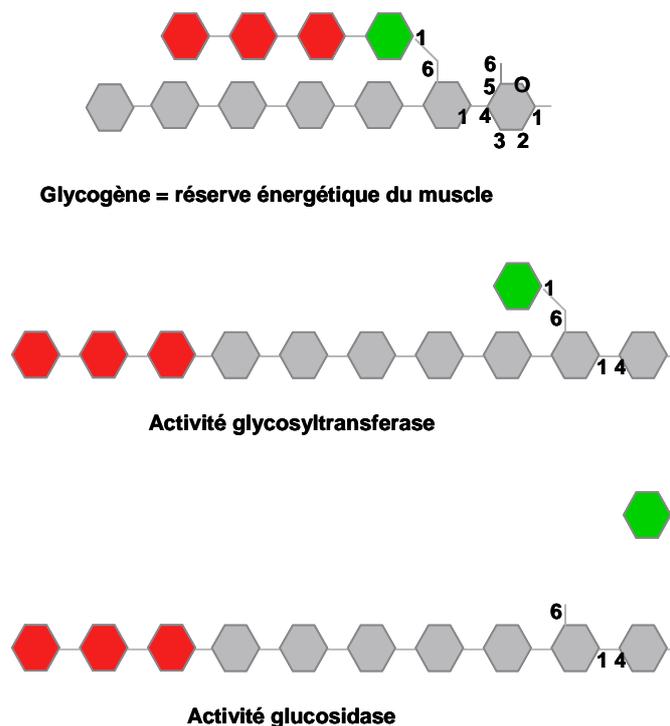
Forts de l'ensemble de ces considérations, nous avons choisi d'étudier le gène équin de l'enzyme débranchante du glycogène ou AGL (amylo-1,6-glucosidase) dont un déficit ou un gain d'activité peuvent expliquer l'accumulation d'un polysaccharide proche du glycogène, présentant des anomalies de branchement. Par ailleurs, les manifestations cliniques et lésionnelles observées chez les autres espèces (chez l'Homme et le Chien), chez lesquelles cette anomalie enzymatique a été décrite, se rapprochent de nos observations chez les Chevaux de trait.

Cependant, les gènes de l'enzyme branchante du glycogène, la phosphofruktokinase et la glycogène synthase demeurent de « bons candidats ». Leur polymorphisme et leur association avec le phénotype morbide seront abordés dans la quatrième partie de la thèse.

## 3.2. Etude d'AGL

### 3.2.1. Le gène AGL

L'enzyme débranchante du glycogène (AGL) présente une dualité d'activités : elle transfère les 3 résidus glucose terminaux d'une chaîne courte non réduite (tétrasaccharide) vers une chaîne adjacente (activité glycosyltransferase EC 2.4.1.25) et hydrolyse les liaisons  $\alpha$ 1-6 (activité amylo-1,6-glucosidase EC 3.2.1.33) lors de la dégradation du glycogène (Gordon *et al.* 1972; White & Nelson 1974; Taylor *et al.* 1975) (**figure 19**).



**Figure 19 : Activité enzymatique de l'enzyme débranchante du glycogène (AGL)**

L'ARN messager du gène AGL humain comprend une région codante de 4599 nucléotides, une région 3' non traduite de 2371 nucléotides (Yang *et al.*, 1992). Le gène a une longueur totale de 85 kb et est composé de 35 exons. L'ARN messager de 7.0 kb est traduit en une protéine de 1532 acides aminés (Bao *et al.* 1996a). Une caractérisation des ARNm présentant une spécificité d'expression tissulaire a permis d'identifier 6 transcrits différents qui se distinguent par leur extrémité 5'.

- Le variant 1 est préférentiellement exprimé dans le muscle, le foie, les reins et la lignée lymphoblastique.
- Alors que les variants 2, 3 et 4 sont exprimés uniquement dans le muscle (Bao *et al.* 1997). Ces 4 variants codent pour une même protéine.
- Dans le muscle et le foie un cinquième variant est exprimé (le variant 5). Il présente un cadre ouvert de lecture plus court de 82 nucléotides par rapport à celui du variant 1 prédominant et code pour une deuxième isoforme protéique.
- Le variant 6, exprimé dans les mêmes tissus, présente un exon 3a dans lequel est inclus un site initiateur de la traduction spécifique d'une troisième isoforme protéique (Bao *et al.* 1997).

Le gène AGL du Lapin a un cadre ouvert de lecture de 4668 pb et code pour une protéine qui comprend 23 acides aminés de plus que la protéine humaine (isoforme 1) à son extrémité amino-terminale. Ces résidus supplémentaires ne présentent pas d'analogie avec les séquences du gène d'autres espèces (Liu *et al.* 1993).

Des mutations délétères du gène AGL sont responsables de glycogénoses de type III (maladie de Cori ou Forbes) qui se manifestent chez l'Homme, suivant les individus et les mutations causales, par une hépatomégalie, une hypoglycémie, un retard de croissance et/ou une myopathie (Howell & Williams 1983). Les défauts d'activité de l'enzyme débranchante du glycogène se traduisent par des déficits cliniques et enzymatiques variables. Ainsi, quatre sous-types de glycogénose de type III ont été distingués par leurs manifestations cliniques et leur origine génétique. Les mutations dans l'exon 3 du gène sont spécifiquement associées avec la manifestation d'une glycogénose de type IIIb (affection hépatique) (Shen & Chen 2002). Chez le Chien, une délétion ponctuelle dans l'exon 32 induit un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'une protéine tronquée responsable d'une glycogénose de type IIIa (atteinte musculaire et hépatique) chez les Curly-Coated Retrievers (Gregory *et al.* 2007). Deux promoteurs pouvant expliquer la spécificité d'expression tissulaire des différents variants ont été mis en évidence : l'un permettant la transcription du variant 1 dans le foie, le muscle et les ovaires, l'autre pouvant induire l'expression des variants 2, 3 et 4 dans le muscle (Bao *et al.* 1996b).

La spécificité d'expression tissulaire du gène AGL et son association avec des glycogénoses hépatiques et/ou musculaires ont motivé l'étude de son expression chez le Cheval. Nous avons déterminé la séquence de différents ARNm équins issus d'un épissage alternatif. Nous avons étudié la structure du gène en lien avec cet épissage. L'expression du gène a été étudiée dans différents tissus chez un cheval sain et nous avons notamment cherché à mettre en évidence l'expression de certains variants dans le foie et /ou le muscle. La région promotrice (promoteur proximal) du gène a été étudiée *in silico*.

### **3.2.2. Matériel et méthodes**

#### **3.2.2.1. Localisation du gène AGL**

La banque de BAC équine de l'INRA (<http://www.jouy.inra.fr/unites/lreg/CRB/bacyac.htm>) qui comporte environ 110 000 clones (Milenkovic *et al.* 2002) a été criblée avec des amorces spécifiques du gène AGL. Les BACs contenant le gène AGL ont été localisés par FISH sur les chromosomes équins par la méthode décrite dans l'article de Carbone (Carbone *et al.* 2006). Le gène a également été localisé sur le panel international d'hybrides irradiés équins (5000 rad) décrit par Chowdhary (Chowdhary *et al.* 2002). Les groupes de liaison, l'ordre des gènes ainsi que les distances génétiques sur le chromosome équin ECA 5 ont été obtenus avec le logiciel CARTHAGENE (<http://www.inra.fr/bia/TcarthaGene>) (de Givry *et al.* 2005).

#### **3.2.2.2. Echantillons biologiques**

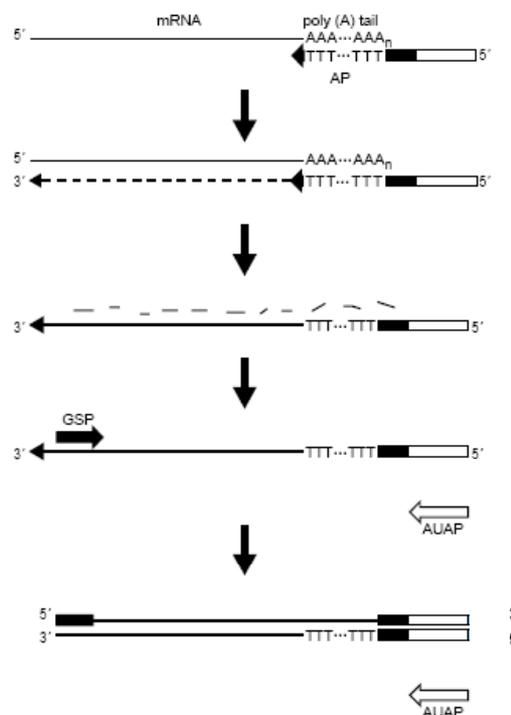
Des échantillons de différents tissus ont été prélevés sur un cheval Percheron mâle de 3 ans, euthanasié suite à un accident (rupture des ligaments croisés). Un échantillon de muscle de ce cheval a été examiné par le service d'anatomie pathologique de l'École Nationale Vétérinaire de Nantes (ENVN) ; cet examen n'a révélé aucune lésion musculaire.

Des biopsies musculaires ont été réalisées dans le muscle fessier moyen de 16 chevaux Cob normand, sous sédation et anesthésie locale. Les échantillons ont été immédiatement congelés dans de l'isopentane refroidi et conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Le statut sain ou atteint de myopathie par surcharge en polysaccharides de ces chevaux a été établi à l'ENVN.

### 3.2.2.3. Clonage de l'ADNc du gène équin

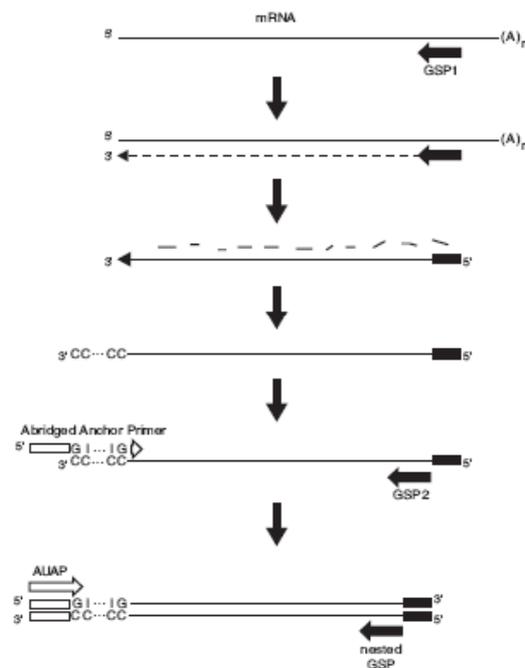
Les ARNs totaux ont été extraits à partir des échantillons musculaires en utilisant une méthode d'extraction au phénol-chloroforme (RNA-Now, Biogentex). Les ADNc ont été synthétisés par rétro-transcription (RT) en utilisant le kit SuperScript II RT kit (Invitrogen) et une amorce de type oligo(dT). Des amorces consensus, permettant d'amplifier par PCR des fragments chevauchant de la séquence d'ADNc équine, ont été choisies parmi les séquences conservées du gène entre l'Homme, la Souris et le Lapin. L'obtention d'une première séquence équine a ensuite permis d'amplifier le gène équin avec des amorces spécifiques.

Les techniques de 3' et 5' RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends), permettant une amplification à partir d'un unique point d'ancrage d'une amorce spécifique vers l'extrémité 3' ou 5', ont permis d'obtenir ces séquences terminales sur les échantillons de muscle et de foie. Le kit "3' RACE for rapid amplification of cDNA ends" du laboratoire Invitrogen a été employé dans les conditions standard d'utilisation. L'ADNc étudié a été amplifié par PCR en utilisant une amorce exonique spécifique du gène (amorce GSP) et une amorce complémentaire de la séquence adaptatrice qui s'ancre dans la région de la queue polyA (amorce AUAP) (**figure 20**).



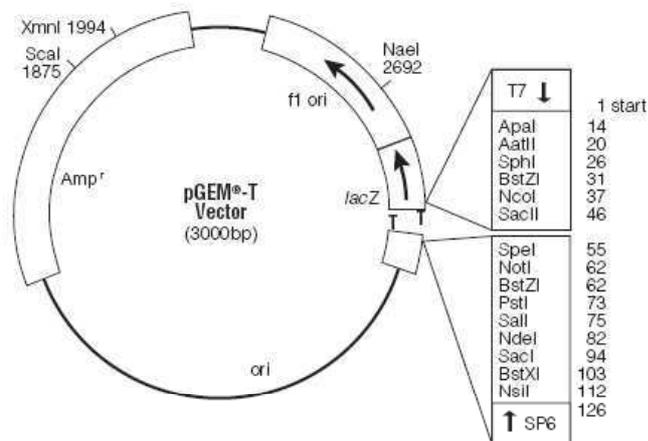
**Figure 20** : Schéma de la technique de 3' RACE

Afin d'obtenir la séquence de l'extrémité 5' du gène équin, vraisemblablement soumise à un épissage alternatif des premiers exons, deux amorces spécifiques de l'exon 4 équin ont été utilisées successivement, la première (GSP1) servant de point d'ancrage pour le début de la rétro-transcription, la seconde (GSP 2) étant couplée avec l'amorce AAP fournie dans le kit et permettant une amplification de l'ADNc. Dans une seconde étape, une amorce spécifique de l'exon 3 (nested GSP), couplée avec l'amorce AUAP, a permis d'amplifier à nouveau des fragments d'ADNc (**figure 21**).



**Figure 21** : Schéma de la technique de 5' RACE.

Les amplicons obtenus ont été clonés dans le vecteur pGEM-T (Promega) avant d'être séquencés (**figure 22**).



**Figure 22** : Carte circulaire du vecteur pGEM-T.

La distribution tissulaire du gène équin a également été étudiée par RT-PCR. Pour ce faire, les ARNs totaux ont été extraits à partir de différents tissus (muscle squelettique, cœur, foie, rate, poumon, rein, moelle épinière, testicule et peau) sur un cheval de trait sain puis amplifiés avec des amorces inter-exoniques spécifiques du gène AGL.

#### **3.2.2.4. Recherche de polymorphismes**

Douze couples d'amorces spécifiques de la séquence transcrite du gène équin ont été choisis pour amplifier des fragments chevauchants d'environ 400 pb couvrant la séquence codante du gène. Les douze fragments correspondant ont été amplifiés et séquencés chez 16 chevaux Cob normand, 8 chevaux sains et 8 chevaux atteints de myopathie par surcharge en polysaccharides, afin d'identifier des polymorphismes dans leur séquence.

#### **3.2.2.5. Structure du gène**

Des PCR inter-exoniques ont été réalisées sur l'un des BACs isolé (le clone 301D10). Les produits de PCR ont été séquencés et les jonctions intron-exon ont été déduites en comparant les séquences génomiques ainsi obtenues et les séquences d'ADNc. La séquence des introns équins qui n'ont pas pu être amplifiée par PCR inter-exonique a été extraite de la base de données du Broad Institute qui a séquencé le génome du Cheval en 2007 (<http://www.broad.mit.edu/mammals/horse/>).

*Les amorces et conditions de PCR sont détaillées dans l'article "Characterization of the equine Glycogen Debranching Enzyme gene (AGL): genomic and cDNA structure, localization, polymorphism, regulation and expression."*

#### **3.2.2.6. Séquençage et analyse des séquences**

Le séquençage a été réalisé par un séquenceur capillaire ABI utilisant la technique du Dye terminator. Les séquences nucléotidiques générées par le séquenceur ont été améliorées par le logiciel Phred (Ewing *et al.* 1998) qui a fourni une note de qualité. Le programme CrossMatch (swat/cross\_match/phrap package, Green P. 1999) a été utilisé pour retirer les séquences spécifiques du vecteur de clonage. Les séquences ont ensuite été assemblées à l'aide du logiciel d'assemblage CAP3 (Huang & Madan 1999) en tenant compte des informations de la qualité de séquences, ainsi que de leur longueur. Des polymorphismes pour un nucléotide (SNP) ont été détectés en utilisant le logiciel NovoSNP (Weckx *et al.* 2005).

La séquence équine d'ADNc codant pour le gène AGL, ainsi obtenue, a été comparée, à l'aide du logiciel MultAlin (Corpet 1988), à celle des mammifères dont le génome a été séquencé.

### 3.2.2.7. Etude in silico du promoteur équin

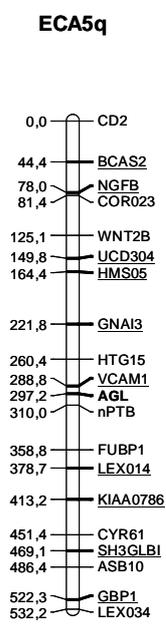
Les séquences génomiques remontant jusqu'à 3 kb en amont du site initiateur de la transcription de l'exon 3 ont été extraites des bases de données : pour le Cheval, 1<sup>er</sup> assemblage du génome équin du Broad Institute, pour l'Homme, séquence de référence NCBI Build 36.1 produite par le consortium international en mars 2006, pour le Chien, assemblage du Broad Institute de mai 2005 et pour la Souris, séquence de référence NCBI Mouse built 36, d'avril 2006. Les séquences répétées de type LINEs, SINEs et MER ont été masquées à l'aide du programme repeatmasker <http://www.repeatmasker.org/>. Les promoteurs ainsi masqués ont été alignés à l'aide du logiciel MultAlin (Corpet 1988). Au niveau des zones de mésappariement entre les séquences des différentes espèces, les trous dans la séquence (gaps) ont été remplacés par des N afin que ces trous ne soient pas source de décalage dans l'alignement des séquences adjacentes. Enfin, le logiciel Match (Kel *et al.* 2003) a permis d'identifier toutes les séquences permettant la fixation de facteurs de transcription référencés dans la base de données Transfac® 6.0, en choisissant les matrices pour les facteurs de transcription spécifiques du muscle et du foie. Les sites de fixation de facteurs de transcription communs et situés dans la même région promotrice pour les espèces équine, humaine, canine et/ou murine ont été considérés comme potentiellement fonctionnels.

### 3.2.3. Résultats

#### 3.2.3.1. Localisation du gène

Le criblage de la banque de BAC équine a permis d'identifier 3 clones contenant le gène AGL. Le pourcentage d'identité entre les séquences des BACs amplifiés par PCR et la séquence du gène humain (GenBank accession no. NM\_000028), proche de 83% (sur 158 pb séquencées), confirme la présence du gène AGL dans ces 3 BACs.

Les 3 BACs contenant le gène AGL ont été localisés par FISH sur le chromosome équin ECA5, au niveau du bras long, en région q14-q15. La localisation du gène sur le panel d'hybrides irradiés a montré une liaison significative entre AGL et le groupe contenant les marqueurs VCAM1, nPTB, HTG15 et UCD304 (Perrocheau *et al.* 2006) avec des valeurs de LOD scores (Z) 2 points respectivement de 12.4, 11.4, 8.1 et 6.9. L'ordre des locus le plus probable est HTG15-VCAM1-AGL-nPTB, les marqueurs étant respectivement séparés par des distances de 28.4 cR, 8.4 cR et 12.8 cR (**figure 23**).



**Figure 23 : Carte d'hybride d'irradiation du chromosome ECA 5q. Les distances sont en cR<sub>5000</sub>. Les marqueurs inclus dans le canevas (framework) qui a permis de déterminer l'ordre des marqueurs sont soulignés. Les flèches verticales représentent les groupes de gènes présents dans le même ordre sur le chromosome humain HSA1p.**

#### 3.2.3.2. Séquence d'ADNc

Nous avons obtenu la séquence complète de l'ADNc du gène équin. Cette séquence de 7,5 kb est homologue aux 35 exons humains, avec un cadre ouvert de lecture de 4602 pb à partir du site initiateur de la traduction présent dans l'exon 3, une région 3' non traduite de 2580 pb et une région 5' non traduite de 482 pb (n° d'accension GenBank. EF660739).

#### 3.2.3.3. Structure du gène

La structure du gène équin a été établie en comparant l'ADNc du gène et les séquences génomiques obtenues à partir du BAC contenant le gène AGL (n° d'accension GenBank EF660736). La nomenclature retenue pour nommer les exons et les introns est celle proposée par Bao (Bao *et al.* 1996a). Le gène équin comprend 35 exons. Tous les exons homologues dans le gène humain ont été retrouvés dans la séquence équine, à l'exception de l'exon 3a,

spécifique du variant 6 humain. Aucune homologie de séquence n'a pu être repérée entre la séquence de l'intron 3 équin et celle de l'exon 3a humain. La longueur des exons 3 à 35 est conservée entre le Cheval et l'Homme, à l'exception de l'exon 9 qui est plus long de 3 nucléotides chez le Cheval, codant pour un acide aminé supplémentaire localisé à la position 325 de la séquence protéique équine. Quatre nucléotides excédentaires sont également présents dans la région non traduite de l'exon 2 et l'exon 1 équin est plus long de 51 pb, à l'extrémité 5', par rapport à l'exon 1 humain.

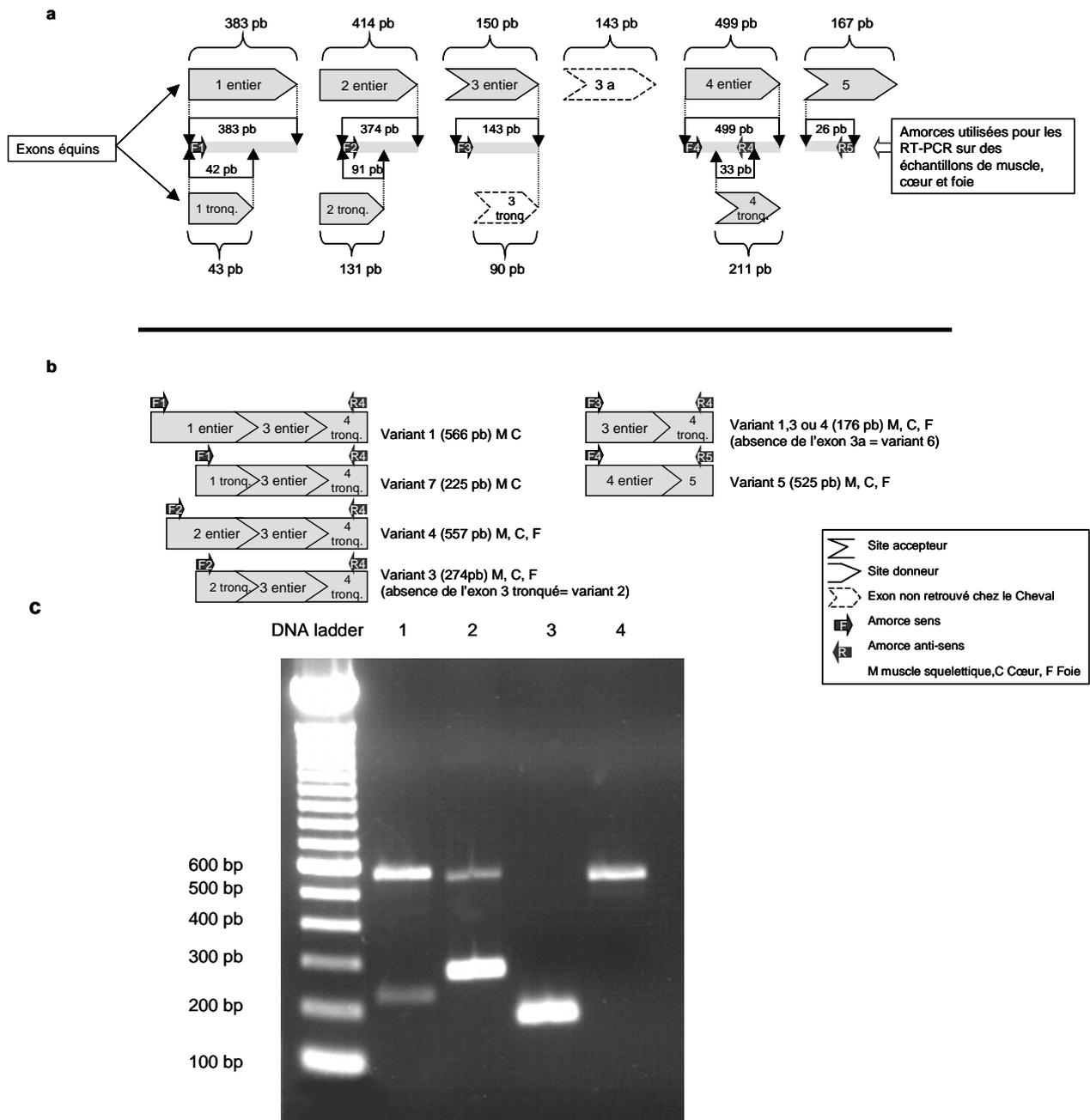
La taille des introns équins a été comparée à celle des introns humains. La taille de 4 introns (parmi 34) est parfaitement conservée entre les deux espèces (introns 1, 2, 9 et 10). 12 introns présentent une différence de taille inférieure à 10% alors que 18 ont une différence supérieure ou égale à 10%. Les différences les plus importantes sont observées pour les 10 derniers introns. Tous les sites donneurs d'épissage sont de type GT à l'exception de celui de l'intron 17 qui est de type GC. Les sites accepteurs d'épissage se terminent par une séquence AG.

#### **3.2.3.4. Expression tissulaire d'AGL**

L'expression d'AGL a été analysée par amplification par RT-PCR d'ARN messagers de différents tissus. Une amplification du gène de la Cycline B1 (NM\_031966) a permis de réaliser un contrôle positif. L'expression du gène AGL a été observée dans le muscle strié squelettique, le cœur, le foie, la rate, la peau, la moelle épinière, le poumon, les reins et les testicules. L'expression d'AGL a été retrouvée dans tous les tissus.

#### **3.2.3.5. Epissage alternatif des premiers exons**

Des couples d'amorces ont été choisis afin d'analyser l'épissage alternatif des premiers exons du gène : 3 amorces sens localisées sur les trois premiers exons (F1, F2 et F3), associées à une amorce anti-sens placée sur la séquence non tronquée de l'exon 4 (R4). De plus, une amorce sens placée dans la séquence prédite de l'exon 4 non tronqué (F4) associée à une amorce anti-sens située dans l'exon 5 (R5), a été utilisée pour identifier le variant 5 équin.



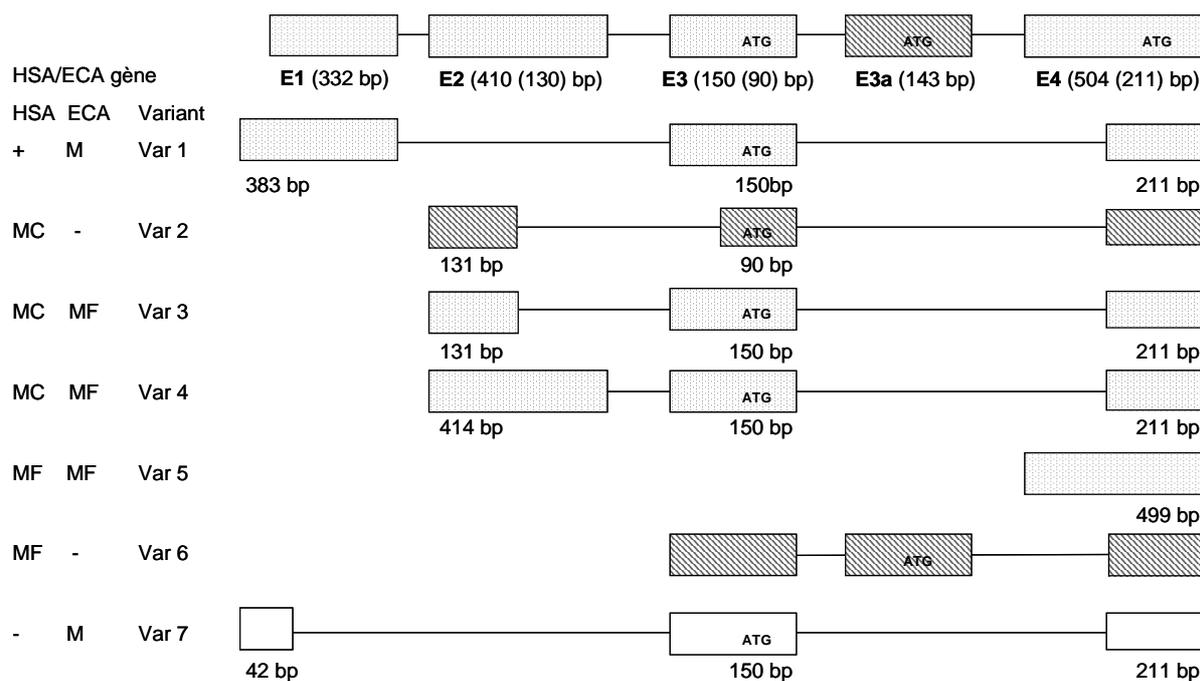
ligne 1 : amorces F1-R4, variant 1 (en haut) et 7 (en bas).  
 ligne 2 : amorces F2-R4, variant 4 (en haut) et 3 (en bas).  
 ligne 3 : amorces F3-R4, variant 1, 3 ou 4.  
 ligne 4 : amorces F4-R5, variant 5.

a: séquence génomique et ARNm des exons équins d'AGL.

b: variants observés chez le Cheval.

c: Électrophorèse des différents variants d'épissage alternatif obtenus par RT-PCR sur un échantillon d'ARN musculaire (coloration au bromure d'éthidium).

**Figure 24 : Détection des différents variants issus d'un épissage alternatif des premiers exons du gène AGL**



Chaque rectangle représente un exon. Les variants communs à l'Homme et au Cheval sont représentés avec un fond pointillé. Les variants rayés sont spécifiques à l'espèce humaine alors que celui dont le fond est blanc n'a été décrit que chez le Cheval. (HSA) Homo sapiens, (ECA) Equus caballus, (M) Muscle squelettique, (C) Coeur, (F) Foie, (Var) variant d'ARNm. (+) : foie, muscle squelettique, cœur, reins, cellules lymphoblastoïdes. (-) :non observé. L'exon 3a humain est absent chez le Cheval (voir texte). La taille des exons figurant entre parenthèses se réfère à l'espèce humaine. En l'absence de parenthèses, la référence est l'espèce équine.

### Figure 25 : Distribution des variants d'AGL chez l'Homme et le Cheval.

Comme chez l'Homme, les 4 premiers exons du gène AGL équin sont sujets à un épissage alternatif. Cet épissage induit la transcription de différents variants d'ARNm dont la longueur dépend du site d'initiation de la transcription et du type d'épissage alternatif. Nous avons pu identifier chez le Cheval 4 des 6 variants décrits pour le gène humain par Bao (Bao *et al.* 1996a). Chez le Cheval, un nouveau variant, le variant 7, a été identifié (Figures 24 et 25). De plus, les variants 3 et 4, décrits chez l'Homme comme spécifiques du muscle, ont été retrouvés dans le muscle mais aussi le foie du Cheval. *A contrario*, le variant 1, ubiquiste chez l'Homme, n'a été observé que dans le muscle du Cheval. Les variants humains 2 et 6 n'ont pas été retrouvés chez le Cheval, que ce soit par amplification des ADNc ou par recherche d'homologie dans la séquence génomique équine à l'aide du programme BLAST.

Le variant 1 (n° accession GenBank EF660737) a été identifié dans les muscles squelettique et cardiaque du Cheval par 5'RACE et RT-PCR. Les exons 1 et 2 n'ont jamais été observés associés dans un même transcrit, observation cohérente avec l'absence d'un site accepteur d'épissage à l'extrémité 5' de l'exon 2. Les variants 3 et 4 (n° accession GenBank EF660738 and EF660739) ont été observés dans le muscle, le cœur et le foie par RT-PCR. La présence du variant 4 a été confirmée par les résultats de 5' RACE. Ces deux variants se distinguent par la longueur de l'exon 2, 131 pb pour le variant 3 et 414 pb pour le variant 4. Cette différence n'a pas de conséquence sur la séquence protéique d'AGL, le site initiateur de la traduction se trouvant, pour les deux variants, dans l'exon 3.

L'expression du variant 5 (n° accession GenBank EF660740) a été détectée dans le muscle, le cœur et le foie du Cheval par RT-PCR et 5' RACE. Le site initiateur de la traduction se trouve alors dans l'exon 6.

Un nouveau variant, le variant 7 (n° accession GenBank EF660741) a été mis en évidence dans le muscle squelettique et le coeur du Cheval par RT-PCR. Il comprend un exon 1 tronqué de 42 pb (alors que l'exon 1 non tronqué comprend 383 pb), l'exon 3 non tronqué et l'exon 4 tronqué (211 pb). Ce variant n'avait pas encore été décrit chez l'Homme. Les exons équins 5 à 35 ne semblent pas subir de remaniements chez le Cheval. Des fragments de longueur stable et unique ont été obtenus par amplification par RT-PCR de différents ARNm extraits à partir de muscle, avec des amorces inter-exoniques, confirmant l'absence d'épissage alternatif au-delà de l'exon 4.

### 3.2.3.6. Séquence protéique prédite

La plupart des événements d'épissage alternatif se déroulent en amont du premier codon codant situé dans l'exon 3. Seul le variant 5 dans lequel les trois premiers exons sont absents présente un site initiateur de la traduction différent, localisé dans l'exon 6. Ainsi, considérant tous les variants équins, seules deux isoformes protéiques peuvent être traduites, les isoformes 1 et 2. L'isoforme 1 comprend 1533 acides aminés. L'isoforme 2 correspondrait à une protéine dont la séquence est identique à celle de l'isoforme 1 mais tronquée de 156 acides aminés, à son extrémité amino-terminale. La séquence de l'isoforme 1 équin présente 93% d'identité avec la protéine humaine.

### 3.2.3.7. Polymorphismes du gène AGL

Le criblage des séquences d'ARNm du gène AGL de 16 chevaux Cob normand a permis d'identifier quatre polymorphismes de type SNP, dont trois se situent dans la région codante du gène. A partir du premier codon ATG situé dans le cadre ouvert de lecture débutant dans l'exon 3, le SNP1 (A/T) se situe à la position 976 dans l'exon 9 et change une sérine en thréonine (S326T); le SNP2 (A/C) est dans l'exon 10, à la position 1102 et change une isoleucine en leucine (I368L); le SNP3 (C/T) qui est dans l'exon 31, à la position 4050, n'induit pas de changement dans la séquence protéique et le SNP4 (A/T) est situé dans la région 3' non traduite, à la position 5186 (**Figure 26**).

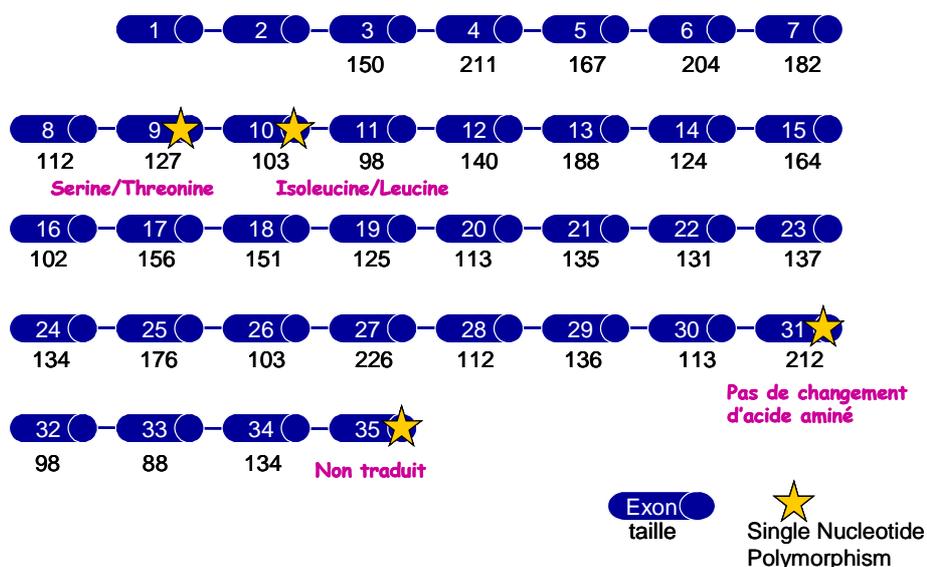


Figure 26 : Polymorphismes du gène AGL

### 3.2.3.8. Etude du promoteur

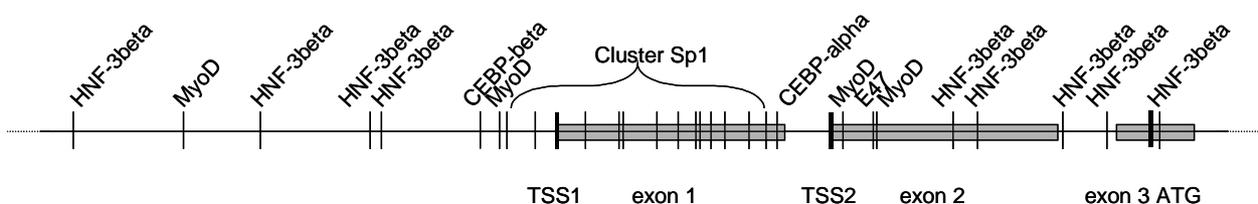
De 1 à 2 kb en amont du site d'initiation de la transcription de l'exon 1, des séquences répétées de type LINEs, SINEs et MIRs sont présentes dans les séquences des espèces équine et humaine. Nous avons analysé la région promotrice proximale qui commence 1 kb en amont du site d'initiation de la transcription de l'exon 1 équin jusqu'au site initiateur de la traduction (ATG de l'exon 3), la région allant de l'exon 1 à l'exon 3 pouvant notamment être impliquée dans l'activation de la transcription des variants 3 et 4 (dont la transcription est initiée à partir de l'exon 2).

Chez le Cheval, la région promotrice considérée, allant de 1 kb de part et d'autre du site initiateur de la transcription de l'exon 1, contient 50% de bases GC alors que le reste de la séquence du gène en contient 35%. Soixante sites potentiels de fixation pour les facteurs de transcription sont communs à au moins trois des quatre espèces comparées (le Cheval, l'Homme, le Chien et la Souris) alors que 125 motifs ont été identifiés dans le promoteur équin. La région génomique promotrice située en amont de l'exon 1 présente seulement 71% d'homologie de séquence entre les deux espèces mais de nombreux motifs permettant la fixation de facteur de transcription leur sont communs (30 motifs /1 kb).

Il n'y a pas de TATA-box dans les séquences situées 30 pb en amont des différents sites initiateurs de la transcription (pour les espèces équine et humaine et les différents variants). Cependant, des CCAAT-box sont présentes respectivement 98 et 111 pb en amont des sites initiateurs de la transcription des exons 1 et 2 équins : un site de fixation de la protéine C/EBP beta (expression ubiquiste, activée par l'insuline) en amont de l'exon 1, un site de fixation de la protéine C/EBP alpha (expression hépatique et musculaire) en amont de l'exon 2.

Des motifs permettant la fixation de facteurs de transcription pouvant induire une expression du gène dans le muscle sont présents dans le promoteur (illustration **figure 27**) : deux motifs permettant la fixation de la protéine MyoD (expression musculaire) sont présents en amont du site initiateur de la transcription 1, deux autres motifs MyoD et un motif E47 sont situés dans l'exon 2. Des sites de fixation de facteurs Sp1 (expression musculaire) sont organisés en cluster légèrement en amont (2 sites) et dans l'exon 1 (11 sites), dans une région riche en bases GC (71 %).

Des motifs associés à des facteurs de transcription spécifiquement hépatiques sont également présents : 9 motifs HNF-3 beta (hepatocyte nuclear factor), présents dans la séquence promotrice d'AGL, sont communs au Cheval et à l'Homme et présents chez le Chien et/ou la Souris. 4 d'entre eux sont situés en amont de l'exon 1, 5 d'entre eux sont situés en aval de l'intron 1 et pourraient contribuer à induire la transcription des variants 3, 4 et 5 dans le foie. La séquence promotrice de la Souris présente une région contenant des sites de fixation pour les facteurs de transcription HNF-3beta et HNF-1, organisés en cluster, dans l'intron 2.



Les motifs permettant la fixation de facteurs de transcription communs aux espèces équine, humaine, canine et/ou murine sont représentés sur la séquence génomique équine.

**Figure 27 : Motifs homologues permettant la fixation de facteurs de transcription présents dans une séquence génomique promotrice équine de 2kb.** (figure à l'échelle)

### 3.2.4. Interprétation des résultats

#### 3.2.4.1. Localisation d'AGL

AGL est localisé entre les marqueurs VCAM1 et nPTB sur le bras long du chromosome 5 équin. Les distances entre les *loci* sont respectivement de 1 Mb et 3,2 Mb chez l'Homme ; 8,5 cR<sub>5000</sub> et 12,8 cR<sub>5000</sub> chez le Cheval. L'assemblage du génome équin disponible depuis septembre 2007 (version EquCab2), a permis de confirmer l'ordre et la position de ces 3 gènes sur le chromosome ECA5 et de préciser leur éloignement respectif (670 kb et 2,6 Mb).

La carte d'hybrides irradiés du chromosome ECA5 antérieurement publiée comprenait 5 groupes de liaison (Perrocheau *et al.* 2006). AGL est lié ( $Z > 4$ ) à des gènes inclus dans le quatrième groupe de liaison, délimité par les marqueurs BCAS2 et WNT2B ainsi qu'à des gènes du cinquième groupe de liaison délimité par les marqueurs GNAI3 et LEX034. Nos résultats permettent de fusionner les quatrième et cinquième groupes de liaison du chromosome ECA5 (Perrocheau *et al.* 2006). Les résultats de localisation du gène AGL par FISH et RH sont concordants. L'étude comparative des cartes équine et humaine confirme la correspondance entre HSA1p et ECA5q (Chowdhary *et al.* 2002; Milenkovic *et al.* 2002; Perrocheau *et al.* 2006).

#### 3.2.4.2. Analyse des séquences génomiques et protéiques : comparaison / conservation entre espèces

Le gène AGL couvre 69 kb chez le Cheval, 85 kb chez l'Homme. Cette différence de taille du gène n'est pas liée à des variations inter-spécifiques dans la séquence codante du gène (seul trois nucléotides excédentaires sont présents dans l'ORF d'AGL équin) mais à des variations de taille des introns, les introns les plus grands étant soumis à des variations plus importantes.

Le haut niveau de conservation de la séquence nucléotidique codante (ORF du gène) se retrouve parmi les espèces d'animaux domestiques dont la séquence est disponible : l'ORF du gène équin présente 92% d'homologie avec les séquences humaine et du chimpanzé, 93% d'homologie avec les séquences bovine et canine, 91% avec le Lapin, 85% avec la Souris et 78% avec la Poule. Le pourcentage d'identité entre les séquences protéiques du Cheval et des différentes espèces est supérieur : 94% avec le Chien, 93 % avec la Vache, le Lapin, l'Homme et le Chimpanzé, 92% avec la Souris, 83 % avec la Poule. Cependant, l'homologie entre les introns est moindre (de 16 à 91% entre les séquences équine et humaine), la taille des introns n'étant pas corrélée au degré de conservation de leur séquence nucléotidique.

Cette forte homologie structurale entre les protéines AGL de différentes espèces est liée au maintien des deux fonctions catalytique de l'enzyme : les exons 6, 13, 14 et 15 sont impliqués dans la fonction transférase de l'enzyme, les exons 26, 27, 31, 32, 33 et 34 sont impliqués dans la fonction glucosidase, les exons 31, 32, 33 et 34 délimitant le domaine de liaison au glycogène (Shen & Chen 2002). D'après des essais de mutagenèse dirigée chez la levure, les acides aminés D527 (exon 13), E556 (exon 14) et D627 (exon 15) (positions sur l'isoforme 1 équine) sont essentiels au maintien de l'activité transférase, les acides aminés D1103 (exon 26) et D1164 (exon 27) étant liés à l'activité glucosidase (Nakayama *et al.* 2001). Ces acides aminés essentiels aux deux activités enzymatiques d'AGL sont conservés au niveau des deux domaines fonctionnels de l'enzyme chez tous les mammifères étudiés, y compris le Cheval.

### 3.2.4.3. Analyse des différents variants d'épissage alternatif et de leur expression tissulaire spécifique

Nous avons identifié 4 des 6 variants résultant de l'épissage alternatif des premiers exons, qui avaient été identifiés chez l'Homme. Cependant, les variants 3 et 4, jusqu'alors décrits comme spécifiquement musculaires chez l'Homme (Bao *et al.* 1996a), sont exprimés, chez le Cheval, dans le foie. A l'inverse, le variant 1, mis en évidence dans de nombreux tissus humains (muscle, foie, cœur, rein, lymphoblastes), n'a été retrouvé que dans les muscles squelettique et cardiaque chez le Cheval. Il n'a pas pu être mis en évidence dans le foie de cette espèce.

Pour les deux espèces, équine et humaine, aucun variant contenant simultanément les exons 1 et 2 n'a été observé.

L'épissage de l'intron 2 est complexe. Il y a en effet, chez l'Homme et le Cheval, quatre sites potentiels d'épissage alternatif (2 sites accepteurs et 2 sites donneurs) qui peuvent générer les exons 2 et 3 entiers ou tronqués. Dans les variants humains 2, 3 et 4, toutes les combinaisons sont présentes à l'exception de l'association de l'exon 2 entier (410 pb) avec l'exon 3 tronqué (90 bp). Parmi les différents variants équins mis en évidence, tous comprenaient un exon 3 entier (non tronqué, 150 pb).

Le variant 6 humain, comportant les exons 3, 3a et 4 tronqué, n'a pas été retrouvé chez le Cheval. Ce résultat est conforté par l'absence d'homologie de séquence entre l'exon 3a humain et l'intron 3 équin. En comparant par BLAST la séquence de l'exon 3a humain avec les séquences génomiques du gène AGL chez la Vache, le Lapin, la Souris et la Poule, seule la séquence du gène du Chimpanzé présentait des homologies avec l'exon 3a humain. L'exon 3a, spécifique du variant 6, pourrait n'être présent que chez les hominidés (Homme et Chimpanzé).

L'exon 1 équin (383 pb) est plus long que l'exon 1 humain (332 pb). L'exon 1 équin présente une extension de 51 pb par rapport à l'exon 1 humain, du côté 5' du gène. Cette différence de taille du premier exon peut être liée à une initiation de la transcription débutant plus précocement dans le gène équin. Elle peut également s'expliquer par la technique mise en œuvre pour repérer le site d'initiation de la transcription (5' RACE), technique qui nous a permis de remonter plus efficacement jusqu'à l'extrémité 5' de l'ARNm d'AGL.

Nous avons mis en évidence, chez le Cheval, un nouveau variant, le variant 7. Il résulte de la présence d'un transcrit comprenant l'exon 1 tronqué à son extrémité 3', l'exon 3, l'exon 4 tronqué puis les exons 5 à 35. Les 42 pb de l'exon 1 tronqué, spécifique du variant 7 équin, correspondent à l'extrémité 5' du gène équin, séquence génomique considérée comme non transcrite chez l'Homme. Cette séquence équine de 42 pb ne présente pas d'identité de séquence avec son homologue humaine.

### 3.2.4.4. Etude du promoteur

Cette première étude *in silico* d'un promoteur équin met en évidence des éléments régulateurs conservés entre différentes espèces de mammifères. La richesse en bases GC de la séquence située en amont du site d'initiation de la transcription et l'organisation conservée des motifs permettant la fixation de facteurs de transcription hépatiques et musculaires suggère une structuration "en blocs". L'absence de boîte TATA et la présence d'îlots CpG dans l'exon 1 peuvent être mises en relation avec l'expression ubiquiste du gène, la présence

de deux sites d'initiation de la transcription et la présence de différents transcrits (se référer à (Sandelin *et al.* 2007). La conservation globale de l'organisation des régions promotrices avait été décrite dans une étude comparant les séquences de promoteurs proximaux humains et murins dans laquelle la présence de motifs permettant la fixation de facteurs de transcription, leur position relative et la conservation de leur distance par rapport aux sites d'initiation de la transcription étaient analysées (Suzuki *et al.* 2004).

Dans cette étude, une plus faible conservation des régions promotrices proximales semblait concerner les gènes qui codent pour des facteurs de transcription ou des gènes exprimés dans le cerveau. Un catalogue systématique des motifs régulateurs retrouvés dans les séquences promotrices et communs aux génomes de l'Homme, du Chien, du Rat et de la Souris a été proposé par Xie (Xie *et al.* 2005). 89% des motifs de la base de données Transfac® database et 69% des nouveaux motifs décrits dans cet article, présentent une spécificité d'expression tissulaire, des contraintes relatives à leur éloignement par rapport site d'initiation de la transcription ou les deux. Le promoteur proximal équin d'AGL, présentant des homologies de séquences inter-spécifiques et une organisation conservée des motifs permettant la fixation de facteurs de transcription hépatiques et musculaires, peut être considéré comme faisant partie des promoteurs conservés.

Notre étude met en exergue la conservation de motifs permettant la fixation de facteurs de transcription hépatiques et musculaires. Les différents variants résultant de l'épissage alternatif des premiers exons du gène sont exprimés spécifiquement dans le foie et/ou le muscle du Cheval. Cependant, l'organisation des motifs et leur distance respective par rapport aux deux sites d'initiation de la transcription ne permettent pas de mettre en évidence une relation claire entre la spécificité d'expression tissulaire des variants et la présence d'éléments cis-régulateurs dans le promoteur. Ceci peut s'expliquer par notre compréhension encore limitée des phénomènes régulateurs de l'expression des gènes révélée par les récentes recherches du projet pilote ENCODE (ENCODE 2007).

Article 3 : **Herszberg B**, Mata X, Giulotto E, Decaunes P, Piras FM, Chowdhary BP, Chaffaux S, Guérin G. Characterization of the equine Glycogen Debranching Enzyme gene (AGL): genomic and cDNA structure, localization, polymorphism, regulation and expression. *Gene*, 2007, Vol. 404, (1-2), 1-9.



## **4. Recherche d'une association entre génotypes et phénotypes au sein d'une famille de chevaux dans laquelle ségrègue la maladie**

*L'identification de polymorphismes dans quatre gènes candidats (dont celui de l'enzyme débranchante du glycogène), le génotypage de 52 chevaux Cob normand et la recherche d'une association entre ces polymorphismes génétiques et le phénotype morbide chez les chevaux sains et atteints, sont présentés dans cette quatrième partie de la thèse. Cette recherche a permis de déterminer l'origine génétique et moléculaire de la myopathie par surcharge glycogénique des chevaux Cob normand.*

### **4.1. Matériel et méthodes**

#### **4.1.1. Définition et détermination du phénotype**

L'étude histologique et ultrastructurale de biopsies musculaires de chevaux Cob normand a permis de caractériser leur atteinte par la myopathie par surcharge en polysaccharides. Le phénotype a été défini par la présence dans les fibres musculaires striées squelettiques de polysaccharides proches du glycogène, colorés par l'acide périodique de Schiff et résistants à la digestion par l'amylase, agrégés dans le cytoplasme des fibres (Firshman *et al.* 2006; Larcher *et al.* 2008).

L'étude a porté sur 52 chevaux de race Cob normand pouvant être rattachés à l'un des étalons fondateurs de la race, dont ils sont descendants sur 7 générations au plus. Le phénotype des animaux a été déterminé après examen de biopsies musculaires, au service d'Anatomie Pathologique de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, suivant les critères histologiques sus-mentionnés. Deux présentations histologiques (atteinte sévère ou modérée) ont été distinguées en fonction du nombre de fibres musculaires présentant des lésions.

#### **4.1.2. Choix des gènes candidats**

Les résultats des analyses histochimiques laissaient suspecter un défaut de branchement du glycogène à l'origine de l'accumulation du polysaccharide amylase-résistant. Les tests d'activité enzymatique et tests de tolérance à l'effort n'ont pas permis de mettre en évidence un défaut total d'activité de l'une des enzymes intervenant dans le métabolisme du glycogène. Ils ont cependant révélé une activité de l'enzyme branchante du glycogène doublée chez un cheval atteint comparé à un témoin et un léger déficit d'activité de l'enzyme débranchante du glycogène (Herszberg *et al.* 2007). Un déséquilibre de la balance d'activité de la glycogène synthase et des enzymes branchante et débranchante du glycogène pourrait expliquer l'accumulation de polysaccharides anormalement branchés. Or, la glycogène synthase est activée par le glucose-6-phosphate (Kochan *et al.* 1979). En cas de déficit d'activité de la phosphofructokinase, l'accumulation de glucose 6-phosphate pourrait élever le ratio d'activité glycogène synthase / enzyme branchante en stimulant l'activité de la glycogène synthase (Hays *et al.* 1981).

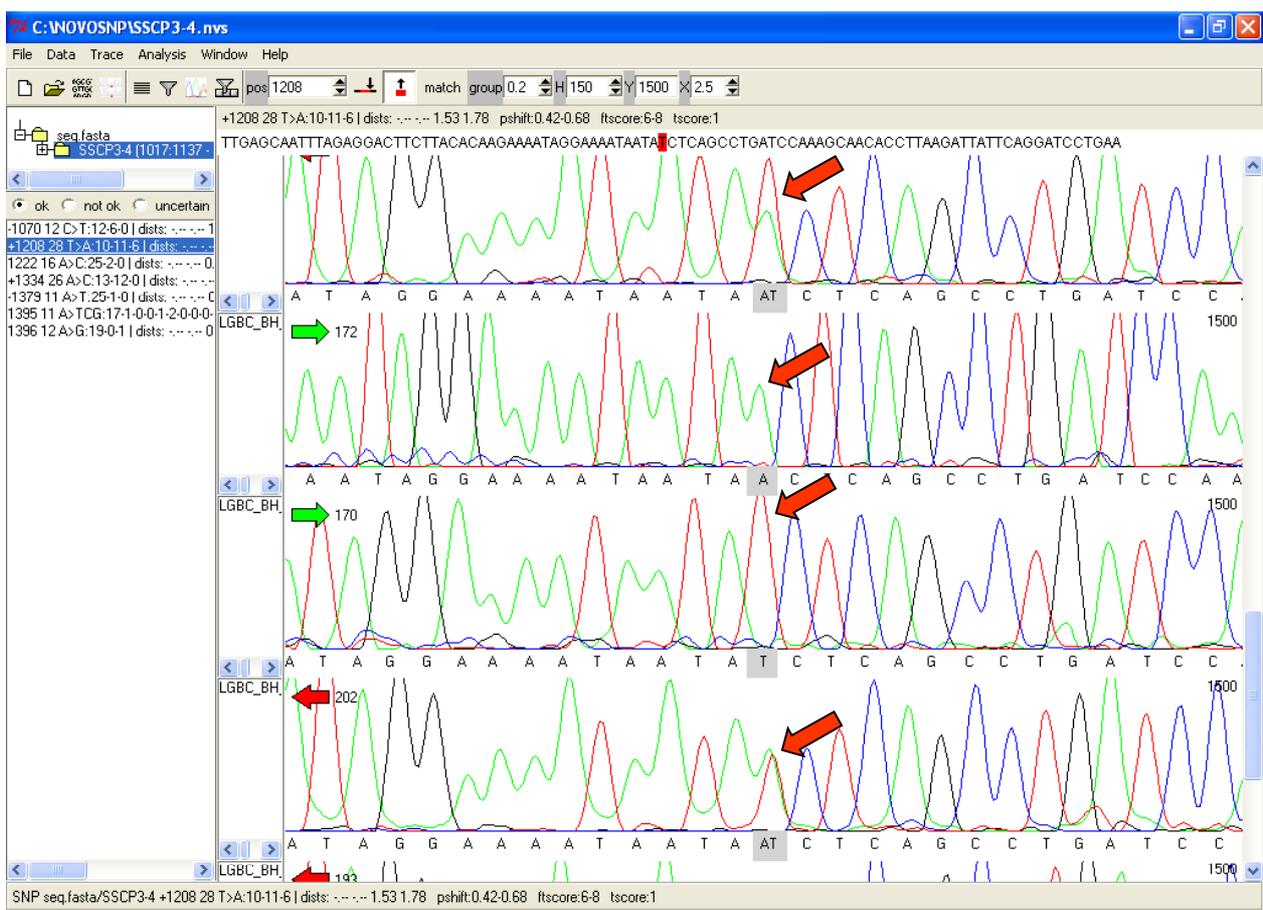
Très récemment, une mutation dans le gène de la glycogène synthase musculaire (*GYS1*), a été trouvée fortement associée à une glycogénose équine entraînant la manifestation de myopathie par surcharge de polysaccharides chez les chevaux de race Quarter Horse et les chevaux de trait Belge américains (McCue *et al.* 2008). La mutation ponctuelle identifiée dans

le gène de la glycogène synthase *GYS1*, transmise suivant un mode dominant, entraîne un gain de fonction de l'enzyme et l'accumulation en quantité excessive d'un polysaccharide proche du glycogène mais insuffisamment branché (McCue *et al.* 2008).

Les gènes des enzymes branchante et débranchante du glycogène, de la phosphofructokinase musculaire et la glycogène synthase, responsables de différentes glycogénoses (respectivement GSDIV, GSDIII, GSD VII et GSD0), ont donc été testés en tant que gènes candidats.

#### 4.1.3. Recherche de polymorphismes et détermination des génotypes

Nous avons recherché une association entre des polymorphismes de type SNP dans chacun les gènes candidats (enzymes branchante *GBE* et débranchante *AGL* du glycogène, phosphofructokinase *PFKM* et glycogène synthase *GYS*) et le phénotype morbide. Pour identifier des polymorphismes dans les gènes *AGL*, *GBE* et *PFKM*, nous avons séquencé les produits d'amplification géniques de 16 chevaux Cob normand, 8 chevaux atteints et 8 chevaux sains. Les séquences ont été analysées et les polymorphismes détectés en utilisant le logiciel NovoSNP (Weckx *et al.* 2005) (**figure 28**). Une description détaillée des méthodes d'identification et de validation des SNP est disponible dans la base de données dbSNP <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>.



**Figure 28 : Identification d'un polymorphisme de type SNP (AGL SNP1) à l'aide du logiciel NovoSNP**

Parmi les SNP identifiés, 4 SNP sont présents dans la séquence transcrite d'AGL (rs55617653, rs55617654, rs55617655, rs55617656), dont deux induisent des changements dans la séquence protéique du gène, 6 SNP sont dans une séquence intronique (intron 15) de GBE (rs55617663, rs55617664, rs55617665, rs55617666, rs55617667, rs55617668) et 6 SNP sont répartis dans 3 introns du gène PFKM (rs55617657, rs55617658, rs55617659, rs55617660, rs55617661, rs55617662). Nous avons ensuite génotypé par séquençage d'ADN génomique ces différents SNP sur l'ensemble de notre population. La mutation ponctuelle de *GYS1* responsable d'une myopathie par surcharge en polysaccharides chez les chevaux de trait Belge et Quarter Horses a été génotypée en utilisant la technique de polymorphismes de longueur de fragments de restriction (RFLP) (McCue *et al.* 2008).

## 4.2. Résultats

Parmi les 52 chevaux étudiés, 19 sont atteints et 33 sont sains. Parmi les chevaux atteints, il y a 15 mâles et 4 femelles (moyenne d'âge 9,2 ans +/- 5,2 ans) ; parmi les 33 chevaux sains, il y a 27 mâles et 6 femelles (moyenne d'âge 8,3 ans +/- 4,6 ans).

Les fréquences alléliques des polymorphismes étudiés, suivant le phénotype des chevaux, sont présentées dans le tableau 6.

Marqueur	Allèle	chevaux atteints	Chevaux sains	Fisher test p value
AGL_SNP1	T	0,47	0,64	0,274
AGL_SNP2	A	0,79	0,82	0,771
AGL_SNP3	C	0,87	0,97	0,085
AGL_SNP4	A	0,87	0,83	0,758
PFKM_SNP1	T	0,82	0,94	0,074
PFKM_SNP2	G	0,76	0,79	0,387
PFKM_SNP3	G	0,92	0,88	0,726
PFKM_SNP4	T	0,5	0,67	0,142
PFKM_SNP5	C	0,89	0,85	1
PFKM_SNP6	C	0,82	0,92	0,095
GBE1_SNP1	T	0,74	0,71	0,891
GBE1_SNP2	G	0,82	0,85	0,494
GBE1_SNP3	G	0,84	0,82	0,772
GBE1_SNP4	C	0,87	0,85	1
GBE1_SNP5	A	0,68	0,71	0,542
GBE1_SNP6	G	0,74	0,71	0,891
GYS_mut	G	0,5	0,94	3,699E-08 *

\* p value < 0.05

**Tableau 6 : Fréquences alléliques des SNP aux loci des 4 gènes candidats en fonction du statut physiologique**

Le test d'association (test exact de Fisher) donne des p-values non significatives pour les 16 SNP des gènes *AGL*, *GBE1* et *PFKM* ( $p > 0.05$ ). En revanche, il y a une différence importante dans la fréquence des allèles entre chevaux sains et atteints (au seuil significatif de  $3,699E-08$ ) pour la mutation ponctuelle de *GYS1*.

Le **tableau 7** précise la sévérité de l'atteinte lésionnelle des chevaux et leur âge en fonction de leur génotype pour la mutation ponctuelle de *GYS1*.

Génotype	Présentation histologique					
	Absence de lésion		Atteinte modérée		Atteinte sévère	
	<i>n</i>	age	<i>n</i>	age	<i>n</i>	age
GG	29	8.9 ± 4.5	2	12.0 ± 5.7	0	-
GA	4	3.7 ± 3.0	12	8.4 ± 5.8	3	10.7 ± 5.7
AA	0	-	0	-	2	9.0 ± 1.4

*n* = nombre total.

**Tableau 7 : Phénotype et âge des chevaux suivant leur génotype pour la mutation de *GYS1***

A l'exception de deux chevaux (faux positifs, individus de génotype GG présentant des lésions), tous les individus atteints sont porteurs de l'allèle A (mutation délétère de *GYS1*) à l'état homozygote (2 chevaux) ou hétérozygote (19 chevaux). Inversement, les animaux sains sont de génotype GG sauf quatre chevaux (12% des phénotypes sains) qui sont faux négatifs (hétérozygotes GA, ne présentant pas de lésions).

### 4.3. Interprétation des résultats

La mutation ponctuelle G/A du gène *GYS1*, identifiée comme responsable de myopathie par surcharge en polysaccharides chez les chevaux de Trait Belge américains et les Quarter Horses aux Etats Unis, est donc également associée à cette nouvelle forme de glycogénose chez les chevaux Cob normand. Nous avons également pu génotyper une jument de race Percheron, porteuse de l'allèle morbide à l'état homozygote (AA) et présentant des lésions sévères. L'affection décrite dans ces races pourtant éloignées a une origine génétique commune. L'étude de 45 polymorphismes de type SNP localisés dans une région de 2 Mb autour la mutation de *GYS1* dans différentes races a montré qu'un haplotype unique de 350 kb est conservé entre les chevaux de trait Belge et les Quarter Horses. Cette étude d'identité par descendance indique une origine commune de la mutation causale qui remonterait au-delà de 150 générations, soit il y a 1200 à 1500 ans, avant la sélection des races actuelles de chevaux (McCue *et al.* 2008). Dans la race Cob normand, la prévalence élevée de la maladie est vraisemblablement liée à la présence de la mutation causale chez l'un des 10 étalons fondateurs.

L'expression du phénotype morbide chez les chevaux porteurs de la mutation de *GYS1* à l'état hétérozygote confirme notre hypothèse sur le mode de transmission dominant de l'affection et est cohérente avec les observations de McCue et al (2008) chez les chevaux Quarter Horse et de Trait belge. Dans le cas présent, l'observation de cas discordants peut être expliquée par des erreurs de diagnostic histologique ou par la pénétrance incomplète de

l'allèle délétère (Firshman *et al.* 2006). Des artefacts techniques lors de la réalisation de biopsie et de l'histoenzymologie peuvent expliquer les deux cas "faux positifs" (chevaux de génotype G/G) qui présentaient de rares fibres suspectes (atteinte modérée), contenant un matériel PAS-amylose-résistant, retrouvées sur une unique coupe de la biopsie. De plus, trois des quatre cas de chevaux "faux négatifs" (individus de génotype G/A déclarés sains) étaient des animaux jeunes (de moins de 3 ans) présentant de nombreuses vacuoles mais pas de polysaccharides résistant à la digestion par l'amylose. Chez les jeunes chevaux, l'observation de ces lésions pathognomoniques est en effet particulièrement rare (De La Corte *et al.* 2002). Les trois chevaux portant la mutation de *GYS1* à l'état homozygote (double mutants AA) présentaient de sévères lésions à l'histologie. La variation de la sévérité de l'atteinte pourrait également être liée à des facteurs génétiques et environnementaux, tel que le régime alimentaire ou l'exercice, qui restent à explorer (Ribeiro *et al.* 2004). L'origine de cette variation nécessite des travaux supplémentaires.

La mutation ponctuelle de *GYS1* induit une substitution Arg309His dans une région de la protéine fortement conservée entre espèces, entraînant une augmentation de l'activité enzymatique de la glycogène synthase *in vitro* (McCue *et al.* 2008). L'augmentation de l'activité de la glycogène synthase n'est probablement pas totalement compensée par l'accroissement de l'activité de l'enzyme branchante du glycogène, entraînant l'accumulation, dans le cytoplasme des fibres musculaires, d'un polysaccharide de type amylopectine, présentant de longues chaînes glucidiques mais relativement peu de points de branchement de ramifications (Annandale *et al.* 2004). L'augmentation de la synthèse du glycogène peut stimuler l'entrée du glucose dans les cellules musculaires et expliquer la sensibilité accrue à l'insuline des chevaux atteints de myopathie par surcharge en polysaccharides (Annandale *et al.* 2004). L'étude du niveau d'expression et du niveau d'activité enzymatique de *GYS1*, *GBE1*, *AGL*, *PFKM* et d'autres gènes régulant le métabolisme énergétique, de même que la recherche de polymorphismes dans les gènes susceptibles de moduler l'expression du phénotype, devraient conduire à une meilleure compréhension de l'expression du phénotype chez les chevaux atteints.

Article 4 : **Herszberg B**, McCue M, Larcher T, Mata X, Vaiman A, Chaffaux S, Chérel Y, Valberg S, Mickelson J, Guérin G. *A GYS1 gene mutation is highly associated with PSSM in Cob Normand draft horses*, *Animal Genetics*, 2009. Vol. 40, (1), 94-96.



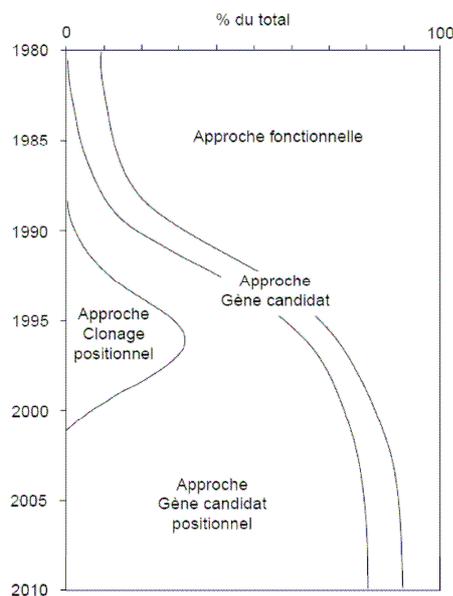
## 5. Discussion générale

*Par leurs approches pluridisciplinaires, nos investigations ont confirmé l'origine génétique de la myopathie par surcharge en polysaccharides chez les chevaux Cob normand et elles ont également permis de préciser la nature des lésions et la pathogénie de l'affection. Nous avons ainsi approfondi nos connaissances sur cette nouvelle forme de glycogénose. Nous discuterons des apports et des limites des différentes méthodes employées puis replacerons nos résultats parmi les différentes glycogénoses humaines et animales qui s'y apparentent.*

### 5.1. Apports et limites des différentes méthodes employées

#### 5.1.1. L'approche « gène candidat »

En raison des contraintes matérielles et techniques qui s'imposaient à nous au début de cette thèse, nous avons choisi une approche « gène candidat ». Dans le cas de la myopathie équine par surcharge en polysaccharide, nous avons un nombre restreint de gènes pouvant être impliqués, ce qui confortait le choix de l'approche « gène candidat fonctionnel ». Cependant, avec la connaissance de la cartographie des génomes et la découverte de nouveaux gènes et de leurs fonctions, ce type d'étude est progressivement supplanté par l'approche de « clonage positionnel ». Depuis le séquençage et l'assemblage du génome humain, achevé en 2003, le succès des identifications de gènes par l'approche physiologique fonctionnelle semble suivre les prévisions de Francis Collins (voir **figure 29**) ; les découvertes par l'étude de candidats positionnels prenant une importance croissante.



**Figure 29** : Succès comparé des différentes approches pour cloner un gène dans une maladie génétique chez l'Homme (Collins, 1995).

Notre étude débutée en 2004, a permis d'identifier 16 polymorphismes de nucléotides uniques (SNPs) présents dans ou à proximité de 4 gènes candidats, chez les chevaux Cob normand. En 2007, l'équipe de Jim Mickelson et Stéphanie Valberg a obtenu les résultats d'un « Génome Scan », utilisant 105 marqueurs de type microsatellites. A cette même

période, les données issues de l'assemblage du génome du Cheval devenaient accessibles. Le croisement des données de cartographie comparée entre les génomes équin et humain avec la connaissance de la pathogénie de l'affection équine ont fait ressortir *GYS1* comme gène candidat positionnel. Les deux approches se sont révélées complémentaires mais le clonage positionnel a permis d'identifier le gène responsable de l'affection équine plus rapidement.

Le séquençage et l'assemblage du génome du Cheval, achevé en 2007, entraînent un bouleversement technologique. En effet, en comparant le génome de chevaux de différentes races, environ 1,5 million de SNPs ont été identifiés (Chowdhary & Raudsepp 2008). Actuellement, des biopuces (microarrays) permettant d'analyser 60 000 SNPs simultanément sont disponibles. L'utilisation de puces pangénomiques « haut-débit » facilitera grandement l'identification de gènes à l'origine de caractères héréditaires remarquables. Mais au delà de la découverte de l'implication de gènes majeurs, les études du transcriptome permettront de révéler les réseaux fonctionnels de gènes. La disponibilité de puces permettant d'analyser le transcriptome du muscle du Cheval laisse envisager des études de génomique fonctionnelle comparée. Alors que le muscle des chevaux est particulièrement riche en glycogène (environ 450 mmol/kg *versus* 300-350 mmol/kg dans le muscle de l'Homme), les réserves de glycogène musculaire des chevaux atteints de myopathie par surcharge en polysaccharides sont multipliées par 1,7 (Brojer *et al.* 2006). Les études comparatives de la régulation des gènes chez le Cheval et l'Homme, chez des individus sains et lors de surcharges glycogéniques, pourraient mettre à jour l'ensemble des interactions géniques qui interviennent dans le métabolisme du glycogène.

### 5.1.2. Etudes histologique et enzymologique

L'**étude histologique** du phénotype PSSM chez les chevaux de race Cob normand a révélé une accumulation, dans les fibres musculaires des chevaux atteints, d'un polysaccharide proche du glycogène, résistant à l' $\alpha$ -amylase, qui présente des anomalies de branchement. La présence d'agrégats de polysaccharides, témoignant de leur moindre solubilité et biodisponibilité, pouvait laisser suspecter la présence d'une molécule moins branchée que le glycogène normal. Cependant, les analyses histochimiques n'ont pas permis d'identifier précisément le type de polysaccharide auquel nous nous intéressions. Le mélange de plusieurs molécules polysaccharidiques a même été envisagé. La caractérisation du ou des polysaccharides accumulés aurait demandé leur extraction et purification puis une identification par des méthodes de type spectrométrie de masse et chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). Cette caractérisation n'a pu être mise en œuvre.

**Aucun déficit total d'activité enzymatique** dans les voies de la glyco(géno)lyse n'a pu être détecté mais une activité deux fois plus intense de l'enzyme branchante du glycogène a été mesurée dans le muscle d'un cheval Cob normand atteint. Cette observation confirme le surcroît d'activité de l'enzyme GBE mesuré dans le muscle de chevaux Quarter Horse affectés (Annandale *et al.* 2004). Cependant, dans le muscle des chevaux atteints, la glycogène synthase est environ vingt fois plus active que dans le muscle des chevaux témoins (McCue *et al.* 2008). Le regain d'activité de la glycogène synthase n'est qu'en partie compensé par l'élévation de l'activité de l'enzyme branchante du glycogène. Ainsi, comme cela avait été suspecté par Brojer (Brojer *et al.* 2006), une augmentation du rapport entre l'activité de la glycogène synthase et l'enzyme branchante du glycogène est à l'origine de l'accumulation du polysaccharide anormal. La connaissance de l'étiologie de l'affection nous

permet de déduire qu'il s'agit d'une molécule de type amylopectine, moins branchée que le glycogène.

L'**étude morphométrique** a permis de distinguer deux niveaux d'atteinte, en fonction du type de fibres musculaires lésées et du pourcentage de fibres contenant des agrégats de polysaccharides anormaux. Lors d'atteinte sévère, 9 à 30 % des fibres présentent des agrégats polysaccharidiques amylase résistants. Les chevaux sévèrement atteints semblent plus âgés que ceux dont l'atteinte est modérée ; 2 des 6 chevaux de cette catégorie étaient homozygotes pour la mutation de *GYS1*. Cependant l'effectif de chevaux gravement atteints et homozygotes est extrêmement réduit. Afin de préciser si l'intensité et l'étendue des lésions sont liées à l'âge des chevaux et/ou au nombre d'allèles mutés et/ou à différents facteurs environnementaux (alimentation, entraînement), l'étude devrait être étendue à un nombre plus important d'animaux.

### 5.1.3. Etude physiologique

Les **tests de tolérance au glucose**, IVGTT, réalisés sur 4 chevaux Cob normand ont montré une sensibilité à l'insuline accrue chez les chevaux atteints de myopathie par surcharge en polysaccharides. Bien que moins précis que la méthode du « clamp » euglycémique hyperinsulinémique (qui consiste à injecter de façon constante de l'insuline et une perfusion variable de glucose pour stabiliser la glycémie à une valeur donnée), les tests de tolérance au glucose intra-veineux ont montré des différences significatives, en fonction du phénotype mais aussi de l'âge des chevaux (sensibilité à l'insuline accrue chez les jeunes). La technique est donc validée mais impose de comparer entre eux des chevaux de même âge. La réalisation de tests IVGTT sur un nombre plus important de chevaux permettrait de confirmer et préciser les résultats obtenus.

Les chevaux Cob normand atteints qui ont effectué un **test d'effort** soutenu, attelés ou sur tapis roulant, n'ont pas manifesté de « coup de sang » associé à une rhabdomyolyse aiguë. Un cheval a développé une boiterie à chaud pendant l'effort, probablement due à une douleur musculaire. Même après 2,5 heures de pas, trop, galop et passage d'obstacle nos chevaux de trait Cob normand attelés n'ont pas présenté de signes métaboliques ou biochimiques reflétant un stress métabolique important. De plus, l'expérience clinique indique que les chevaux de trait montrent les symptômes du « coup de sang » moins fréquemment et après un effort d'intensité plus importante que les Quarter Horses américains. Dans la bibliographie, des douleurs musculaires dorsales liées à la myopathie par surcharge en polysaccharides ont été rapportées chez les chevaux sportifs pratiquant le saut d'obstacles et le dressage (Quiroz-Rothe *et al.* 2002). Chez les chevaux Quarter Horse, même après un test bref et d'intensité modérée, tel que 11 minutes de pas et de trot, les animaux sévèrement affectés présentent une dégradation de l'ATP dans leurs fibres musculaires comparable à celle observée chez des chevaux sains qui effectueraient un effort à une vitesse deux fois plus élevée et pendant 5 fois plus longtemps. Les modifications métaboliques observées dans le muscle des chevaux Quarter Horses atteints, même lors d'un effort bref en conditions aérobies, témoignent d'un stress intense (Annandale *et al.* 2005).

La myopathie par surcharge en polysaccharides étudiée chez les chevaux Cob normand a donc la même origine que celle des chevaux Quarter Horses mais ses symptômes sont moins sévères et/ou moins fréquemment observés chez nos chevaux de trait. Pour ajuster l'entraînement et l'utilisation sportive des chevaux atteints à leur physiologie, une connaissance plus fine de leurs capacités de mobilisation des réserves énergétiques en conditions aérobies et anaérobies serait utile.

Chez les chevaux prédisposés, une ration à base de concentrés, riche en glucides, favorise l'apparition des crises. Il est possible d'adapter la ration énergétique du cheval en remplaçant les concentrés par des huiles. De plus, l'inadéquation entre la teneur énergétique de la ration et l'exercice demandé au cheval, comme le maintien d'une ration fortement calorique les jours de repos, provoque un excès de stockage de glycogène et entraîne la manifestation d'un « coup de sang » à la reprise du travail. Pour prévenir ce risque, il est conseillé de diminuer la valeur énergétique de la ration du cheval en période de repos (Firshman *et al.* 2003; Ribeiro *et al.* 2004).

Même s'il n'y a pas de traitement curatif de la myopathie par surcharge en polysaccharides, la diététique préventive est, dans la majorité des cas, efficace et satisfaisante pour les propriétaires des chevaux. Le développement de molécules permettant de diminuer le surcroît d'activité de la glycogène synthase musculaire laisserait envisager des perspectives thérapeutiques.

#### 5.1.4. Génétique moléculaire

La question de l'origine de la myopathie par surcharge en polysaccharides chez les chevaux Cob normand a été élucidée grâce à l'étude d'association génétique. Les travaux de génétique moléculaire ont également permis d'étudier finement le gène équin codant pour l'enzyme débranchante du glycogène et de mettre en évidence un nouveau transcrit.

La myopathie par surcharge en polysaccharides est due à une mutation ponctuelle dans le gène *GYS1* entraînant un « gain de fonction » de la glycogène synthase. La mutation de *GYS1* change une arginine en histidine dans la séquence protéique de l'enzyme, ce qui la rend plus active (McCue *et al.* 2008). Un test moléculaire, utilisant la technique de polymorphismes de longueur de fragments de restriction, réalisable sur l'ADN extrait à partir d'une prise de sang, de crins ou de cellules buccales, permet de détecter la présence de la mutation causale, transmise suivant un mode autosomique dominant. Les chevaux porteurs de la mutation à l'état hétérozygote ont un risque sur deux de la transmettre, les chevaux porteurs de la mutation à l'état homozygote ayant un risque de 100% d'avoir une descendance « atteinte ». Il est donc souhaitable d'écarter de la reproduction tous les chevaux porteurs de la mutation de *GYS1* si l'on veut éviter de possibles crises de coup de sang et si le cheval est destiné à la compétition. Le diagnostic génétique de l'affection est le seul diagnostic de certitude.

Cependant, dans notre population de chevaux Cob normand, nous avons observé 2 individus « faux positifs ». Parmi les chevaux Quarter Horses américains, le nombre élevé de chevaux « faux positifs » (22%) laisse supposer l'implication d'autres gènes à l'origine du phénotype PSSM. Il est possible que des gènes tels qu'*AGL*, *GBE* et *PFKM* modulent l'expression du phénotype et que des facteurs environnementaux puissent intervenir dans l'apparition de ces cas discordants. Les effets génétiques épistatiques et l'influence de l'environnement, notamment de l'alimentation des chevaux, sur le phénotype restent à étudier.

Lors de l'étude réalisée sur les chevaux Quarter Horses américains, en utilisant des marqueurs génétiques répartis sur l'ensemble du génome, une association statistiquement significative ( $p < 0,001$ ) entre un marqueur génétique qui n'était pas localisé sur le chromosome ECA10 (chromosome sur lequel se trouve *GYS1*) et le phénotype morbide a été montrée (McCue *et al.* 2008). Ce marqueur représente une piste pour explorer l'origine génétique de l'affection chez les chevaux qui ne sont pas porteurs de la mutation de *GYS1*.

Enfin, trois chevaux, deux Cob normand et une Percheronne étaient porteurs de la mutation de *GYS1* à l'état homozygote. Ces trois individus présentaient de graves lésions. L'étude de la corrélation entre la présence à l'état homozygote de l'allèle A de la mutation de *GYS1* et une atteinte sévère, étendue à un nombre important de chevaux, devrait permettre de dire si le degré de sévérité des lésions est d'origine génétique.

### **5.1.5. Approche transcriptionnelle et perspectives**

L'analyse fonctionnelle de l'expression des gènes dans les muscles atteints, sur une puce à oligonucléotides comprenant de 384 transcrits équins, a montré une inflammation, une inhibition de l'activité mitochondriale, une perturbation du métabolisme énergétique et une hypoxie chronique. Cette étude a révélé un niveau d'expression plus élevé du gène codant pour l'interleukine 18 (IL18) chez les chevaux atteints de myopathie par surcharge en polysaccharides. L'interleukine 18 représente un marqueur plasmatique potentiel qui pourrait éventuellement être utilisé pour le dépistage des chevaux prédisposés.

L'activité accrue de synthèse du glycogène chez les chevaux atteints entraîne un afflux plus important de glucose dans les cellules musculaires. Ainsi, le métabolisme énergétique de la cellule semble tourné vers une activité de synthèse du glycogène. L'augmentation de l'expression de l'IL 18 chez ces individus peut accentuer le phénomène en entraînant, via une cascade, une augmentation de l'activité de la glycogène synthase. L'exercice pourrait modifier notablement l'expression du phénotype car l'entraînement des chevaux provoque une augmentation des réserves de glycogène (McGowan *et al.* 2002b), l'exercice occasionne également une augmentation d'activité de la phosphofructokinase (Eto *et al.* 2004). Chez l'Homme, la transcription du gène et l'activité enzymatique de la glycogène synthase sont plus importantes chez les athlètes comparés à des individus sédentaires (Vestergaard *et al.* 1994). Il serait donc pertinent d'étudier les effets de l'entraînement sur l'expression de *GYS1*, *GBE*, *AGL* et *PFKM* et la régulation de leurs activités enzymatiques chez les chevaux sains et atteints. Des gènes comme celui de la glycogène synthase kinase GSK3beta (inhibitrice de la glycogène synthase), dont l'expression est augmentée chez les chevaux Cob normand atteints, pourraient également jouer un rôle important dans la variabilité de l'expression du phénotype chez les chevaux porteurs de la mutation délétère de *GYS1*. Les perspectives d'études transcriptomiques sur l'ensemble du génome du Cheval deviennent réalisables grâce au développement de biopuces contenant plus de 20 000 gènes équins. Ces études permettraient d'aborder l'impact de l'environnement et de l'entraînement des chevaux sur la variabilité d'expression du phénotype PSSM.

## **5.2. Pathologie comparée et origine de la myopathie par surcharge en polysaccharides chez les chevaux Cob normand**

### **5.2.1. Glycogénose de type 0 musculaire chez l'Homme**

En 2007, une glycogénose musculaire de type GSD0, due à l'absence d'activité de la glycogène synthase a été décrite chez l'Homme (Kollberg *et al.* 2007). Contrairement à la maladie équine, il ne s'agit pas d'un gain mais d'une perte de fonction de *GYS1*. Une mutation ponctuelle dans le gène *GYS1* entraîne l'apparition d'un codon stop prématuré au niveau de l'acide aminé 462 de l'enzyme. La région protéique portant les deux sites actifs qui se trouvent aux positions E510 et E518 est ainsi absente. Les trois enfants apparentés (frères et sœur) chez lesquels cette glycogénose a été diagnostiquée avaient une quantité de

glycogène normale dans le foie mais une absence de glycogène dans le muscle. Cette observation était liée à une expression normale de la glycogène synthase hépatique fonctionnelle (GYS2) alors que celle du gène *GYS1*, porteur de la mutation délétère à l'état homozygote, dans le muscle, était nulle. L'un des enfants est mort subitement d'un arrêt cardiaque à 10 ans. Il présentait une cardiomyopathie hypertrophique. Les enfants atteints avaient des difficultés à suivre le rythme des activités sportives et se fatiguaient rapidement. Leur incapacité à l'effort après seulement 3 à 4 minutes d'exercice, était liée avec un défaut d'éjection systolique et une faible capacité cardiaque. Leur tolérance au glucose n'était pas modifiée. Dans le muscle de ces individus, les fibres musculaires oxydatives étaient prédominantes et le nombre de mitochondries important (Kollberg *et al.* 2007).

Il existe des cas de glycogénoses humaines entraînant l'accumulation de polysaccharides de type amylopectine pour lesquels l'origine de la maladie est encore inconnue. Ainsi, Calore a décrit le cas d'une femme présentant des troubles progressifs de la marche et un déficit des ceintures dont la biopsie musculaire a révélé l'accumulation de polysaccharides de type amylopectine, résistant à l'amylase, l'observation de nombreuses mitochondries anormales autour de la surcharge et la présence de vacuoles, préférentiellement dans les fibres de type I. Il n'a pas été mis en évidence de déficit d'activité enzymatique mais la myophosphorylase était plus active chez la patiente atteinte que chez les témoins (Calore *et al.* 1992). Dans ce type de glycogénose, une mutation « gain de fonction » de la glycogène synthase pourrait être suspectée.

L'étude myopathie équine par surcharge en polysaccharides pourrait ainsi permettre de mieux comprendre les perturbations métaboliques liées à la synthèse du glycogène ou d'amylopectine dans d'autres contextes physiologiques.

### **5.2.2. Modèles murins**

Deux modèles de souris transgéniques chez lesquelles la glycogène synthase est surexprimée ont été développés. Ils miment l'atteinte d'une myopathie par surcharge en polysaccharides équine et apportent des précisions sur la physiopathologie de l'affection.

Un modèle de souris transgéniques qui surexpriment la glycogène synthase dans le muscle (utilisation du promoteur de la créatine kinase musculaire) a été étudié (Manchester *et al.* 1996). Chez ces souris, l'activité de la glycogène synthase est multipliée par dix, la quantité de glycogène dans les cellules musculaires augmentée cinq fois. L'augmentation de l'activité de la glycogène synthase est plus marquée dans les fibres musculaires rapides de type II. Les quantités protéiques du transporteur du glucose GLUT4 (transporteur dont l'efficacité et l'insertion dans la membrane cellulaire sont stimulés par l'insuline) ne sont pas modifiées ou diminuées suivant les muscles étudiés. L'activation de GYS, stimulée par l'insuline, peut donc entraîner l'accroissement des réserves de glycogène intracellulaire, même si le transport du glucose n'est pas modifié. Ainsi, l'augmentation de la quantité de glycogène dans les cellules musculaires chez les souris surexprimant GYS dans ce modèle est comparable aux observations faites chez les souris qui surexpriment le transporteur du glucose GLUT1 (transporteur qui assure le transport basal du glucose). Chez les souris qui surexpriment GYS, l'activité de la myophosphorylase est également augmentée (multipliée par trois). Ainsi, l'augmentation de l'activité de la myophosphorylase pourrait être un phénomène de compensation limitant la surcharge de glycogène, les activités de la glycogène synthase et de la myophosphorylase étant réciproquement régulées (Manchester *et al.* 1996).

Un second modèle de souris transgéniques surexprimant *GYS* a été produit chez des souris dont le gène de l' $\alpha$ -glucosidase acide (gène *GAA*, muté dans les cas de glycogénose de type II) avait été réprimé. Pour ce modèle, l'évolution des lésions au cours du temps a été observée et présente des similitudes intéressantes avec nos observations chez le Cheval. Chez ces souris transgéniques, la quantité de glycogène dans les cellules musculaires est doublée. Les souris qui surexpriment *GYS* dans leurs muscles présentent, dans le cytoplasme de leurs cellules musculaires, des accumulations libres de polysaccharides résistant à la digestion par l'amylase (Raben *et al.* 2001). Il s'agit de « polyglucosans », filaments de polysaccharides irrégulièrement et insuffisamment branchés, de type amylopectine, ayant les mêmes caractéristiques que ceux observés chez les chevaux atteints de myopathie par surcharge en polysaccharides. Le type de polysaccharide accumulé évolue avec l'âge des souris. Ainsi, à 2 mois, une augmentation de la quantité de glycogène intracellulaire était observée. Entre 3 et 4 mois, les jeunes souris accumulaient progressivement des polysaccharides de type amylopectine. A 7,5 mois, des structures granulaires et filamenteuses correspondant aux « polyglucosans » étaient observées, leur quantité augmentant jusqu'à 9 mois. L'accumulation progressive de la quantité de polysaccharides présentant des anomalies de branchement avec l'âge chez ces souris est concordante avec les observations faites sur les chevaux Cob normand atteints de myopathie par surcharge en polysaccharides chez lesquels les lésions semblent s'aggraver avec le temps. Chez les souris qui surexpriment *GYS*, l'activité de la glycogène synthase est fortement augmentée alors que celle de l'enzyme branchante du glycogène (GBE) reste constante. Ainsi, le rapport d'activité *GYS*/GBE passe de 8,3 chez les souris normales à 29,7 chez les souris transgéniques. L'activité accrue de *GYS* par rapport à GBE permet d'expliquer l'accumulation de polysaccharides proches du glycogène présentant de longues chaînes glucidiques mais peu de ramifications, de type amylopectine.

Pour apporter une validation fonctionnelle confirmant que la substitution Arg309His de *GYS1* est à l'origine de l'affection équine, il faudrait développer et étudier des souris transgéniques qui expriment le gène *GYS1* équin muté. La mutation délétère étant dominante, les souris ayant intégré le gène muté (sous l'influence d'un promoteur musculaire), introduit par transgénèse additive, devraient présenter un phénotype proche de celui des chevaux atteints de myopathie par surcharge en polysaccharides.

### **5.2.3. Mutation « gain de fonction » de *GYS1* : une nouvelle forme de glycogénose**

Les glycogénoses musculaires sont des affections résultant d'anomalies génétiques entraînant une altération d'une enzyme intervenant dans le métabolisme du glycogène. La myopathie par surcharge en polysaccharide équine, dont le phénotype est fortement associée à la mutation ponctuelle Arg309His de *GYS1*, responsable d'un gain de fonction de l'enzyme, est donc une glycogénose.

Elle s'apparente aux glycogénoses de type 0 liées à une altération de la glycogène synthase, *GYS1* musculaire ou *GYS2* hépatique, chaque enzyme étant codée par deux gènes distincts. Cependant, les glycogénoses de type 0 qui avaient jusqu'alors été décrites chez l'Homme étaient dues à des pertes d'activité de l'enzyme entraînant une absence de réserve glycogénique. Chez le Cheval, l'enzyme mutée est plus active et on observe une accumulation excessive de polysaccharides dans les cellules musculaires. La glycogénose équine associée à la mutation de *GYS1* est également la première glycogénose décrite qui se transmette suivant un mode autosomique dominant. Ces deux particularités, « gain de fonction » et « mutation dominante », la rendant originale par rapport aux glycogénoses précédemment décrites, on

pourrait distinguer la glycogénose équine, à l'origine de la myopathie par surcharge en polysaccharides, et la nommer glycogénose de type 0a.

D'autre part, chez les chevaux porteurs de la mutation gain de fonction de *GYS1*, le glucose qui entre dans les cellules musculaires est plus rapidement métabolisé en glycogène. Cette facilitation de la mise en réserve du glucose, associée à une entrée plus rapide du glucose dans les cellules musculaires, peut expliquer l'augmentation de la sensibilité des chevaux à l'insuline. A l'opposé, dans certains cas de glycogénose de type V (déficit en myophosphorylase), la glycogène synthase est inhibée et les malades peuvent présenter une forme de résistance à l'insuline (Nielsen *et al.* 2002). Des formes de diabète sont également parfois observés lors de glycogénose de VII (déficit en phosphofructokinase) (Ristow *et al.* 1999). L'hypersensibilité à l'insuline développé par les individus atteints est donc une troisième originalité de la glycogénose équine de type 0a.

#### **5.2.4. Mutation de *GYS1* dans différentes races de chevaux**

L'origine génétique de la myopathie par surcharge en polysaccharides est commune aux chevaux Cob normand, Quarter Horses et à 15 autres races équines (McCue *et al.* 2008). La présence de lésions est fréquente (prévalence de 35 % parmi les étalons Cob normand des Haras nationaux, 36 % parmi les chevaux de trait Belge américains (Firshman *et al.* 2005), 10 % parmi les chevaux Quarter Horse (McCue & Valberg 2007)). La mutation de *GYS1*, présente dans des races éloignées avec une fréquence élevée, n'a semble-t-il pas été contre-sélectionnée. Cette mutation remonterait au-delà de 1200 ans, à une époque où les chevaux étaient utilisés quotidiennement pour le travail et les déplacements et pour lesquels la nourriture pouvait être rare (McCue *et al.* 2008). L'activité accrue de la glycogène synthase pouvait apporter un avantage sélectif aux chevaux qui avaient une alimentation pauvre. Alors qu'aujourd'hui les chevaux sont sédentaires, logés dans des boxes tout en recevant des rations riches en concentrés, cette mutation peut engendrer des douleurs musculaires et peut donc devenir délétère par les symptômes qu'elle provoque. Ainsi, la myopathie par surcharge en polysaccharides, glycogénose musculaire équine, serait pour les chevaux « un mal des temps modernes ».

### 5.3. Conclusion

Près d'un tiers des chevaux Cob normand sont porteurs de la substitution Arg309His de *GYS1* qui entraîne une augmentation de l'activité de l'enzyme et l'accumulation dans les muscles lisses, striés et cardiaque d'un polysaccharide de type amylopectine. Lorsqu'ils reçoivent une alimentation riche en concentrés et sont utilisés à des fins sportives, notamment pour l'attelage, ces chevaux sont susceptibles de présenter boiteries, baisses de performances, voire des « coups de sang ». Pour éviter ces effets délétères, deux stratégies semblent envisageables :

- ✓ La sélection de lignées de chevaux Cob normand « de loisirs et de sport » exempts de la mutation morbide de *GYS1*. Les reproducteurs de ces lignées pourraient être sélectionnés grâce au test génétique.
- ✓ Le dépistage des chevaux porteurs de la mutation de *GYS1* et l'adaptation de leur environnement (notamment l'alimentation et l'entraînement) afin de limiter l'accumulation de polysaccharides anormaux, de favoriser la biodisponibilité du glycogène (stimulation de la glycolyse) et d'augmenter les capacités oxydatives des muscles striés. En cas de survenue, l'inflammation musculaire et l'hypoxie devraient être traitées afin de pallier les manifestations symptomatiques.

L'étude de l'impact de la ration alimentaire (niveau énergétique, quantité et nature des sucres) et du type d'entraînement des chevaux sur l'expression du phénotype PSSM devrait permettre d'optimiser l'adaptation de l'environnement aux chevaux porteurs de la mutation délétère. L'étude de la corrélation entre la présence à l'état homozygote de l'allèle A de la mutation de *GYS1* et des lésions sévères ainsi que le suivi de l'évolution des lésions en fonction de l'âge, de l'alimentation et de l'activité des chevaux permettront de connaître plus précisément le déterminisme génétique et l'influence de l'environnement sur le développement de cette affection. L'utilisation de puces pangénomiques équinnes permettra d'observer l'ensemble des gènes dont le niveau d'expression est modifié chez les chevaux porteurs de la mutation de *GYS1* et d'étudier les facteurs qui peuvent augmenter ou limiter ces dérégulations. Enfin, la conduite de ces recherches sur des chevaux de différentes races permettra de mieux connaître l'origine de la variabilité d'expression du phénotype observée entre chevaux Quarter Horses et Cob normand.

Les chevaux Cob normand porteurs de la mutation gain de fonction de *GYS1* offrent donc un modèle d'étude pour comprendre les régulations génétiques et les effets de l'environnement intervenant lors d'une augmentation de la glycolyse et de l'élévation du rapport d'activité de la glycogène synthase par rapport à l'enzyme branchante du glycogène, dans le muscle.

## Bibliographie

- Amato A.A. (2000) Acid maltase deficiency and related myopathies. *Neurol Clin* **18**, 151-65.
- Annandale E.J., Valberg S.J. & Essen-Gustavsson B. (2005) Effects of submaximal exercise on adenine nucleotide concentrations in skeletal muscle fibers of horses with polysaccharide storage myopathy. *Am J Vet Res* **66**, 839-45.
- Annandale E.J., Valberg S.J., Mickelson J.R. & Seaquist E.R. (2004) Insulin sensitivity and skeletal muscle glucose transport in horses with equine polysaccharide storage myopathy. *Neuromuscul Disord* **14**, 666-74.
- Arad M., Benson D.W., Perez-Atayde A.R., McKenna W.J., Sparks E.A., Kanter R.J., McGarry K., Seidman J.G. & Seidman C.E. (2002) Constitutively active AMP kinase mutations cause glycogen storage disease mimicking hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* **109**, 357-62.
- Bao Y., Dawson T.L.J. & Chen Y.T. (1996a) Human glycogen debranching enzyme gene (AGL): complete structural organization and characterization of the 5' flanking region. *Genomics* **38**, 155-65.
- Bao Y., Kishnani P., Wu J.Y. & Chen Y.T. (1996b) Hepatic and neuromuscular forms of glycogen storage disease type IV caused by mutations in the same glycogen-branching enzyme gene. *J Clin Invest* **97**, 941-8.
- Bao Y., Yang B.Z., Dawson T.L.J. & Chen Y.T. (1997) Isolation and nucleotide sequence of human liver glycogen debranching enzyme mRNA: identification of multiple tissue-specific isoforms. *Gene* **197**, 389-98.
- Bowling A.T., Byrns G. & Spier S. (1996) Evidence for a single pedigree source of the hyperkalemic periodic paralysis susceptibility gene in quarter horses. *Anim Genet* **27**, 279-81.
- Brojer J.T., Essen-Gustavsson B., Annandale E.J. & Valberg S.J. (2006) Proglycogen, macroglycogen, glucose, and glucose-6-phosphate concentrations in skeletal muscles of horses with polysaccharide storage myopathy performing light exercise. *Am J Vet Res* **67**, 1589-94.
- Brown B. & Brown D. (1966) Lack of an alpha-1,4-glucan: alpha-1,4-glucan 6-glycosyl transferase in a case of type IV glycogenosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **56**, 725-9.
- Calore E.E., Pellissier J.F., Figarella-Branger D., de Barsy T., Pouget J. & Serratrice G. (1992) Polysaccharide amylopectin-type storage myopathy. *Rev Neurol (Paris)* **148**, 696-703.
- Carbone L., Nergadze S.G., Magnani E., Misceo D., Francesca Cardone M., Roberto R., Bertoni L., Attolini C., Francesca Piras M., de Jong P., Raudsepp T., Chowdhary B.P., Guerin G., Archidiacono N., Rocchi M. & Giulotto E. (2006) Evolutionary movement of centromeres in horse, donkey, and zebra. *Genomics* **87**, 777-82.
- Ceh L., Hauge J.G., Svenkerud R. & Strande A. (1976) Glycogenosis type III in the dog. *Acta Vet Scand* **17**, 210-22.
- Chowdhary B.P. & Raudsepp T. (2008) The horse genome derby: racing from map to whole genome sequence. *Chromosome Res* **16**, 109-27.
- Chowdhary B.P., Raudsepp T., Honeycutt D., Owens E.K., Piumi F., Guerin G., Matisse T.C., Kata S.R., Womack J.E. & Skow L.C. (2002) Construction of a 5000(rad) whole-

- genome radiation hybrid panel in the horse and generation of a comprehensive and comparative map for ECA11. *Mamm Genome* **13**, 89-94.
- Coleman R.A., Winter H.S., Wolf B., Gilchrist J.M. & Chen Y.T. (1992) Glycogen storage disease type III (glycogen debranching enzyme deficiency): correlation of biochemical defects with myopathy and cardiomyopathy. *Ann Intern Med* **116**, 896-900.
- Collinder E., Lindholm A. & Rasmuson M. (1997) Genetic markers in standardbred trotters susceptible to the rhabdomyolysis syndrome. *Equine Vet J* **29**, 117-20.
- Corpet F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* **16**, 10881-90.
- de Barsey T. & Pellissier J.F. (1991) Muscular glycogenoses. *Rev Med Interne* **12**, 198-204.
- de Givry S., Bouchez M., Chabrier P., Milan D. & Schiex T. (2005) CARTHAGENE: multipopulation integrated genetic and radiation hybrid mapping. *Bioinformatics* **21**, 1703-4.
- De La Corte F.D., Valberg S.J., MacLeay J.M. & Mickelson J.R. (2002) Developmental onset of polysaccharide storage myopathy in 4 Quarter Horse foals. *J Vet Intern Med* **16**, 581-7.
- De La Corte F.D., Valberg S.J., MacLeay J.M., Williamson S.E. & Mickelson J.R. (1999) Glucose uptake in horses with polysaccharide storage myopathy. *Am J Vet Res* **60**, 458-62.
- De Paepe B., Creus K.K. & De Bleecker J.L. (2007) Chemokine profile of different inflammatory myopathies reflects humoral versus cytotoxic immune responses. *Ann N Y Acad Sci* **1109**, 441-53.
- Defline C. & Benamou-Smith A. (2002) Myopathie à stockage de polysaccharides chez un cheval de race lourde. *Prat. Vét. Equine* **34**, 51-5.
- DiMauro S., Hartwig G.B., Hays A., Eastwood A.B., Franco R., Olarte M., Chang M., Roses A.D., Fetell M., Schoenfeldt R.S. & Stern L.Z. (1979) Debrancher deficiency: neuromuscular disorder in 5 adults. *Ann Neurol* **5**, 422-36.
- DiMauro S. & Lamperti C. (2001) Muscle glycogenoses. *Muscle Nerve* **24**, 984-99.
- Dranchak P.K., Leiper F.C., Valberg S.J., Piercy R.J., Carling D., McCue M.E. & Mickelson J.R. (2007) Biochemical and genetic evaluation of the role of AMP-activated protein kinase in polysaccharide storage myopathy in Quarter Horses. *Am J Vet Res* **68**, 1079-84.
- Dranchak P.K., Valberg S.J., Onan G.W., Gallant E.M., Binns M.M., Swinburne J.E. & Mickelson J.R. (2006) Exclusion of linkage of the RYR1, CACNA1S, and ATP2A1 genes to recurrent exertional rhabdomyolysis in Thoroughbreds. *Am J Vet Res* **67**, 1395-400.
- Dranchak P.K., Valberg S.J., Onan G.W., Gallant E.M., MacLeay J.M., McKenzie E.C., De La Corte F.D., Ekenstedt K. & Mickelson J.R. (2005) Inheritance of recurrent exertional rhabdomyolysis in thoroughbreds. *J Am Vet Med Assoc* **227**, 762-7.
- ENCODE P.C. (2007) Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* **447**, 799-816.
- Erbay E., Park I.H., Nuzzi P.D., Schoenherr C.J. & Chen J. (2003) IGF-II transcription in skeletal myogenesis is controlled by mTOR and nutrients. *J Cell Biol* **163**, 931-6.

- Eto D., Yamano S., Mukai K., Sugiura T., Nasu T., Tokuriki M. & Miyata H. (2004) Effect of high intensity training on anaerobic capacity of middle gluteal muscle in Thoroughbred horses. *Res Vet Sci* **76**, 139-44.
- Ewing B., Hillier L., Wendl M.C. & Green P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res* **8**, 175-85.
- Firshman A.M., Baird J.D. & Valberg S.J. (2005) Prevalences and clinical signs of polysaccharide storage myopathy and shivers in Belgian draft horses. *J Am Vet Med Assoc* **227**, 1958-64.
- Firshman A.M., Valberg S.J., Bender J.B., Annandale E.J. & Hayden D.W. (2006) Comparison of histopathologic criteria and skeletal muscle fixation techniques for the diagnosis of polysaccharide storage myopathy in horses. *Vet Pathol* **43**, 257-69.
- Firshman A.M., Valberg S.J., Bender J.B. & Finno C.J. (2003) Epidemiologic characteristics and management of polysaccharide storage myopathy in Quarter Horses. *Am J Vet Res* **64**, 1319-27.
- Fyfe J.C., Giger U., Van Winkle T.J., Haskins M.E., Steinberg S.A., Wang P. & Patterson D.F. (1992) Glycogen storage disease type IV: inherited deficiency of branching enzyme activity in cats. *Pediatr Res* **32**, 719-25.
- Germain D.P. (2002) Lysosomes and lysosomal storage diseases. *J Soc Biol* **196**, 127-34.
- Gordon R.B., Brown D.H. & Brown B.I. (1972) Preparation and properties of the glycogen-debranching enzyme from rabbit liver. *Biochim Biophys Acta* **289**, 97-107.
- Gregory B.L., Shelton G.D., Bali D.S., Chen Y.T. & Fyfe J.C. (2007) Glycogen storage disease type IIIa in curly-coated retrievers. *J Vet Intern Med* **21**, 40-6.
- Harris P.A. (1991) The equine rhabdomyolysis syndrome in the United Kingdom: epidemiological and clinical descriptive information. *Br Vet J* **147**, 373-84.
- Harvey J.W., Calderwood Mays M.B., Gropp K.E. & Denaro F.J. (1990) Polysaccharide storage myopathy in canine phosphofructokinase deficiency (type VII glycogen storage disease). *Vet Pathol* **27**, 1-8.
- Hays A.P., Hallett M., Delfs J., Morris J., Sotrel A., Shevchuk M.M. & DiMauro S. (1981) Muscle phosphofructokinase deficiency: abnormal polysaccharide in a case of late-onset myopathy. *Neurology* **31**, 1077-86.
- Hers H. (1964) Glycogen storage diseases. In: *Advances in metabolic regulation* (eds. by Levine R & Luft R), pp. 1-44. Academic Press, New York.
- Herszberg B., Chaffaux S. & Guérin G. (2007) Les myopathies d'effort équinées. *Actes de la 33ème journée de la recherche équine, INRA-Haras Nationaux*, 71-9.
- Howell R.R. & Williams J.C. (1983) The glycogen storage disease. In: *The metabolic basis of inherited disease*. (ed. by J. B. Stanbury JBW, D. Fredrickson, J. L. Goldstein and M. S. Brown, McGraw Hill Book Company), pp. 141-66.
- Huang X. & Madan A. (1999) CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res* **9**, 868-77.
- Iwamasa T., Fukuda S., Tokumitsu S., Ninomiya N., Matsuda I. & Osame M. (1983) Myopathy due to glycogen storage disease: pathological and biochemical studies in relation to glycogenosome formation. *Exp Mol Pathol* **38**, 405-20.
- Jolly R.D., Hill F.I., Hill J.A., Mehrtens G.N., Davey P.M. & Hopcroft D.H. (2002) Polyglucosan body disease in a mixed-breed dog. *N Z Vet J* **50**, 32-5.

- Jolly R.D., Van-de-Water N.S., Richards R.B. & Dorling P.R. (1977) Generalized glycogenosis in beef shorthorn cattle, heterozygote detection. *Aust J Exp Biol Med Sci* **55**, 14U-50.
- Kel A.E., Gossling E., Reuter I., Cheremushkin E., Kel-Margoulis O.V. & Wingender E. (2003) MATCH: A tool for searching transcription factor binding sites in DNA sequences. *Nucleic Acids Res* **31**, 3576-9.
- Kishnani P.S., Bao Y., Wu J.Y., Brix A.E., Lin J.L. & Chen Y.T. (1997) Isolation and nucleotide sequence of canine glucose-6-phosphatase mRNA: identification of mutation in puppies with glycogen storage disease type Ia. *Biochem Mol Med* **61**, 168-77.
- Kochan R.G., Lamb D.R., Lutz S.A., Perrill C.V., Reimann E.M. & Schlender K.K. (1979) Glycogen synthase activation in human skeletal muscle: effects of diet and exercise. *Am J Physiol* **236**, E660-6.
- Kollberg G., Tulinius M., Gilljam T., Ostman-Smith I., Forsander G., Jotorp P., Oldfors A. & Holme E. (2007) Cardiomyopathy and exercise intolerance in muscle glycogen storage disease 0. *N Engl J Med* **357**, 1507-14.
- Langohr I.M. & Tanabe M. (2005) Idiopathic complex polysaccharide storage disease in an abyssinian cat. *Vet Pathol* **42**, 502-6.
- Larcher T., Herszberg B., Molon-Noblot S., Guigand L., Chaffaux S., Guerin G. & Cherel Y. (2008) Polysaccharide storage myopathy in cob normand draft horses. *Vet Pathol* **45**, 154-8.
- Lentz L.R., Valberg S.J., Balog E.M., Mickelson J.R. & Gallant E.M. (1999) Abnormal regulation of muscle contraction in horses with recurrent exertional rhabdomyolysis. *Am J Vet Res* **60**, 992-9.
- Lentz L.R., Valberg S.J., Herold L.V., Onan G.W., Mickelson J.R. & Gallant E.M. (2002) Myoplasmic calcium regulation in myotubes from horses with recurrent exertional rhabdomyolysis. *Am J Vet Res* **63**, 1724-31.
- Liu W., de Castro M.L., Takrama J., Bilous P.T., Vinayagamoorthy T., Madsen N.B. & Bleackley R.C. (1993) Molecular cloning, sequencing, and analysis of the cDNA for rabbit muscle glycogen debranching enzyme. *Arch Biochem Biophys* **306**, 232-9.
- Lucchiari S., Pagliarani S., Salani S., Filocamo M., Di Rocco M., Melis D., Rodolico C., Musumeci O., Toscano A., Bresolin N. & Comi G.P. (2006) Hepatic and neuromuscular forms of glycogenosis type III: nine mutations in AGL. *Hum Mutat* **27**, 600-1.
- MacLeay J.M., Sorum S.A., Valberg S.J., Marsh W.E. & Sorum M.D. (1999a) Epidemiologic analysis of factors influencing exertional rhabdomyolysis in Thoroughbreds. *Am J Vet Res* **60**, 1562-6.
- MacLeay J.M., Valberg S.J., Sorum S.A., Sorum M.D., Kassube T., Santschi E.M., Mickelson J.R. & Geyer C.J. (1999b) Heritability of recurrent exertional rhabdomyolysis in Thoroughbred racehorses. *Am J Vet Res* **60**, 250-6.
- Maire I., Baussan C., Moatti N., Mathieu M. & Lemonnier A. (1991) Biochemical diagnosis of hepatic glycogen storage diseases: 20 years French experience. *Clin Biochem* **24**, 169-78.
- Malinowski K., Betros C.L., Flora L., Kearns C.F. & McKeever K.H. (2002) Effect of training on age-related changes in plasma insulin and glucose. *Equine Vet J Suppl*, 147-53.

- Malthus R., Clark D.G., Watts C. & Sneyd J.G. (1980) Glycogen-storage disease in rats, a genetically determined deficiency of liver phosphorylase kinase. *Biochem J* **188**, 99-106.
- Manchester J., Skurat A.V., Roach P., Hauschka S.D. & Lawrence J.C., Jr. (1996) Increased glycogen accumulation in transgenic mice overexpressing glycogen synthase in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 10707-11.
- Manktelow B.W. & Hartley W.J. (1975) Generalized glycogen storage disease in sheep. *J Comp Pathol* **85**, 139-45.
- Manolis A.S., Tzeis S., Triantafyllou K., Michaelidis J., Pyrros I., Sakellaris N., Kranidis A. & Melita H. (2005) Erythropoietin in heart failure and other cardiovascular diseases: hematopoietic and pleiotropic effects. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* **5**, 355-75.
- McCue M.E. & Valberg S.J. (2007) Estimated prevalence of polysaccharide storage myopathy among overtly healthy Quarter Horses in the United States. *J Am Vet Med Assoc* **231**, 746-50.
- McCue M.E., Valberg S.J., Miller M.B., Wade C., DiMauro S., Akman H.O. & Mickelson J.R. (2008) Glycogen synthase (GYS1) mutation causes a novel skeletal muscle glycogenosis. *Genomics* **91**, 458-66.
- McGowan C.M., Fordham T. & Christley R.M. (2002a) Incidence and risk factors for exertional rhabdomyolysis in thoroughbred racehorses in the United Kingdom. *Vet Rec* **151**, 623-6.
- McGowan C.M., Golland L.C., Evans D.L., Hodgson D.R. & Rose R.J. (2002b) Effects of prolonged training, overtraining and detraining on skeletal muscle metabolites and enzymes. *Equine Vet J Suppl*, 257-63.
- McGowan C.M., McGowan T.W. & Patterson-Kane J.C. (2008) Prevalence of equine polysaccharide storage myopathy and other myopathies in two equine populations in the United Kingdom. *Vet J*, Epub ahead of print.
- Milan D., Jeon J.T., Looft C., Amarger V., Robic A., Thelander M., Rogel-Gaillard C., Paul S., Iannuccelli N., Rask L., Ronne H., Lundstrom K., Reinsch N., Gellin J., Kalm E., Roy P.L., Chardon P. & Andersson L. (2000) A mutation in PRKAG3 associated with excess glycogen content in pig skeletal muscle. *Science* **288**, 1248-51.
- Milenkovic D., Oustry-Vaiman A., Lear T.L., Billault A., Mariat D., Piumi F., Schibler L., Cribiu E. & Guerin G. (2002) Cytogenetic localization of 136 genes in the horse: comparative mapping with the human genome. *Mamm Genome* **13**, 524-34.
- Minassian B.A. (2001) Lafora's disease: towards a clinical, pathologic, and molecular synthesis. *Pediatr Neurol* **25**, 21-9.
- Mucher E., Jayr L., Rossignol F., Amiot F., Gidrol X. & Barrey E. (2006) Gene expression profiling in equine muscle tissues using mouse cDNA microarrays. *Equine Vet J Suppl*, 359-64.
- Murakami H., Takagi A., Nanaka S., Ishiura S. & Sugita H. (1980) Glycogenosis II in Japanese quails. *Jikken Dobutsu* **29**, 475-8.
- Nakayama A., Yamamoto K. & Tabata S. (2001) Identification of the catalytic residues of bifunctional glycogen debranching enzyme. *J Biol Chem* **276**, 28824-8.
- Naylor J.M., Nickel D.D., Trimino G., Card C., Lightfoot K. & Adams G. (1999) Hyperkalaemic periodic paralysis in homozygous and heterozygous horses: a co-dominant genetic condition. *Equine Vet J* **31**, 153-9.

- Nielsen J.N., Vissing J., Wojtaszewski J.F., Haller R.G., Begum N. & Richter E.A. (2002) Decreased insulin action in skeletal muscle from patients with McArdle's disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**, E1267-75.
- Ogimoto A., Okubo M., Okayama H., Shin Y.S., Endo Y., Ebara T., Inoue K., Ohtsuka T., Tahara H., Murase T. & Higaki J. (2007) A Japanese patient with cardiomyopathy caused by a novel mutation R285X in the AGL gene. *Circ J* **71**, 1653-6.
- Park H.B., Marklund S., Jeon J.T., Mickelson J.R., Valberg S.J., Sandberg K. & Andersson L. (2003) Molecular characterization and mutational screening of the PRKAG3 gene in the horse. *Cytogenet Genome Res* **102**, 211-6.
- Penedo M.C., Millon L.V., Bernoco D., Bailey E., Binns M., Cholewinski G., Ellis N., Flynn J., Gralak B., Guthrie A., Hasegawa T., Lindgren G., Lyons L.A., Roed K.H., Swinburne J.E. & Tozaki T. (2005) International Equine Gene Mapping Workshop Report: a comprehensive linkage map constructed with data from new markers and by merging four mapping resources. *Cytogenet Genome Res* **111**, 5-15.
- Perrocheau M., Boutreux V., Chadi S., Mata X., Decaunes P., Raudsepp T., Durkin K., Incarnato D., Iannuzzi L., Lear T.L., Hirota K., Hasegawa T., Zhu B., de Jong P., Cribeu E.P., Chowdhary B.P. & Guerin G. (2006) Construction of a medium-density horse gene map. *Anim Genet* **37**, 145-55.
- Piercy R.J. & Rivero J.-L.L. (2004) Muscle disorders of equine athletes. In: *Equine Sports Medicine and Surgery* (ed. by Saunders), pp. 77-110.
- Quiroz-Rothe E., Novales M., Aguilera-Tejero E. & Rivero J.L. (2002) Polysaccharide storage myopathy in the M. longissimus lumborum of showjumpers and dressage horses with back pain. *Equine Vet J* **34**, 171-6.
- Raben N., Danon M., Lu N., Lee E., Shliselfeld L., Skurat A.V., Roach P.J., Lawrence J.C., Jr., Musumeci O., Shanske S., DiMauro S. & Plotz P. (2001) Surprises of genetic engineering: a possible model of polyglucosan body disease. *Neurology* **56**, 1739-45.
- Raben N. & Sherman J.B. (1995) Mutations in muscle phosphofructokinase gene. *Hum Mutat* **6**, 1-6.
- Rafiquzzaman M., Svenkerud R., Strande A. & Hauge J.G. (1976) Glycogenosis in the dog. *Acta Vet Scand* **17**, 196-209.
- Render J.A., Common R.S., Kennedy F.A., Jones M.Z. & Fyfe J.C. (1999) Amylopectinosis in fetal and neonatal Quarter Horses. *Vet Pathol* **36**, 157-60.
- Ribeiro W.P., Valberg S.J., Pagan J.D. & Gustavsson B.E. (2004) The effect of varying dietary starch and fat content on serum creatine kinase activity and substrate availability in equine polysaccharide storage myopathy. *J Vet Intern Med* **18**, 887-94.
- Ristow M., Vorgerd M., Mohlig M., Schatz H. & Pfeiffer A. (1999) Insulin resistance and impaired insulin secretion due to phosphofructo-1-kinase-deficiency in humans. *J Mol Med* **77**, 96-103.
- Rosenfield E.L., Popova I.A. & Chibisov I.V. (1976) Some cases of Type III glycogen storage disease. *Clin Chim Acta* **67**, 123-30.
- Rudolph J.A., Spier S.J., Byrns G. & Hoffman E.P. (1992a) Linkage of hyperkalaemic periodic paralysis in quarter horses to the horse adult skeletal muscle sodium channel gene. *Anim Genet* **23**, 241-50.
- Rudolph J.A., Spier S.J., Byrns G., Rojas C.V., Bernoco D. & Hoffman E.P. (1992b) Periodic paralysis in quarter horses: a sodium channel mutation disseminated by selective breeding. *Nat Genet* **2**, 144-7.

- Saftig P., Tanaka Y., Lullmann-Rauch R. & von Figura K. (2001) Disease model: LAMP-2 enlightens Danon disease. *Trends Mol Med* **7**, 37-9.
- Sahoo S., Blumberg A.K., Sengupta E. & Hart J. (2002) Type IV glycogen storage disease. *Arch Pathol Lab Med* **126**, 630-1.
- Sandelin A., Carninci P., Lenhard B., Ponjavic J., Hayashizaki Y. & Hume D.A. (2007) Mammalian RNA polymerase II core promoters: insights from genome-wide studies. *Nat Rev Genet* **8**, 424-36.
- Sandstrom B., Westman J. & Ockerman P.A. (1969) Glycogenesis of the central nervous system in the cat. *Acta Neuropathol* **14**, 194-200.
- Sato T., Itou T. & Sakai T. (2003) Molecular cloning of equine muscle-type phosphofructokinase cDNA. *J Vet Med Sci* **65**, 645-8.
- Shen J.J. & Chen Y.T. (2002) Molecular characterization of glycogen storage disease type III. *Curr Mol Med* **2**, 167-75.
- Simmons M.M. (1994) Lafora disease in the cow? *J Comp Pathol* **110**, 389-401.
- Spier S.J., Carlson G.P., Holliday T.A., Cardinet G.H., 3rd & Pickar J.G. (1990) Hyperkalemic periodic paralysis in horses. *J Am Vet Med Assoc* **197**, 1009-17.
- Sponseller B.T., Valberg S.J., Ward T.L., Fales-Williams A.J. & Mickelson J.R. (2003) Muscular weakness and recumbency in a Quarter Horse colt due to glycogen branching enzyme deficiency. *Equine Vet Educ* **15**, 182-8.
- Suzuki Y., Yamashita R., Shirota M., Sakakibara Y., Chiba J., Mizushima-Sugano J., Nakai K. & Sugano S. (2004) Sequence comparison of human and mouse genes reveals a homologous block structure in the promoter regions. *Genome Res* **14**, 1711-8.
- Tan P., Allen J.G., Wilton S.D., Akkari P.A., Huxtable C.R. & Laing N.G. (1997) A splice-site mutation causing ovine McArdle's disease. *Neuromuscul Disord* **7**, 336-42.
- Taylor C., Cox A.J., Kernohan J.C. & Cohen P. (1975) Debranching enzyme from rabbit skeletal muscle. Purification, properties and physiological role. *Eur J Biochem* **51**, 105-15.
- Tein I. (1996) Metabolic myopathies. *Semin Pediatr Neurol* **3**, 59-98.
- Tsujino S., Nonaka I. & DiMauro S. (2000) Glycogen storage myopathies. *Neurol Clin* **18**, 125-50.
- Tsujino S., Shanske S., Valberg S.J., Cardinet G.H., 3rd, Smith B.P. & DiMauro S. (1996) Cloning of bovine muscle glycogen phosphorylase cDNA and identification of a mutation in cattle with myophosphorylase deficiency, an animal model for McArdle's disease. *Neuromuscul Disord* **6**, 19-26.
- Valberg S.J., Cardinet G.H., Carlson G.P. & DiMauro S. (1992) Polysaccharide storage myopathy associated with recurrent exertional rhabdomyolysis in horses. *Neuromuscul Disord* **2**, 351-9.
- Valberg S.J., Carlson G.P., Cardinet G.H., Birks E.K., Jones J.H., Chomyn A. & DiMauro S. (1994) Skeletal muscle mitochondrial myopathy as a cause of exercise intolerance in a horse. *Muscle Nerve* **17**, 305-12.
- Valberg S.J., Macleay J.M., Billstrom J.A., Hower-Moritz M.A. & Mickelson J.R. (1999) Skeletal muscle metabolic response to exercise in horses with 'tying-up' due to polysaccharide storage myopathy. *Equine Vet J* **31**, 43-7.

- Valberg S.J., Townsend D. & Mickelson J.R. (1998) Skeletal muscle glycolytic capacity and phosphofructokinase regulation in horses with polysaccharide storage myopathy. *Am J Vet Res* **59**, 782-5.
- Valberg S.J., Ward T.L., Rush B., Kinde H., Hiraragi H., Nahey D., Fyfe J. & Mickelson J.R. (2001) Glycogen branching enzyme deficiency in quarter horse foals. *J Vet Intern Med* **15**, 572-80.
- Valentine B., Divers T., Murphy D. & Todhunter P. (1998) Muscle biopsy diagnosis of equine motor neuron disease and equine polysaccharide storage myopathy. *Equine Vet Educ* **10**, 42-50.
- Valentine B.A. (1999) Polysaccharide storage myopathy in draft and draft-related horses and ponies. *Equine Practice* **21**, 16-9.
- Valentine B.A. (2005) Diagnosis and treatment of equine polysaccharide storage myopathy. *Journal of Equine Veterinary Science* **25**, 52-61.
- Valentine B.A., Credille K.M., Lavoie J.P., Fatone S., Guard C., Cummings J.F. & Cooper B.J. (1997) Severe polysaccharide storage myopathy in Belgian and Percheron draught horses. *Equine Vet J* **29**, 220-5.
- Valentine B.A., Habecker P.L., Patterson J.S., Njaa B.L., Shapiro J., Holshuh H.J., Bildfell R.J. & Bird K.E. (2001) Incidence of polysaccharide storage myopathy in draft horse-related breeds: a necropsy study of 37 horses and a mule. *J Vet Diagn Invest* **13**, 63-8.
- Vestergaard H., Andersen P.H., Lund S., Schmitz O., Junker S. & Pedersen O. (1994) Pre- and posttranslational upregulation of muscle-specific glycogen synthase in athletes. *Am J Physiol* **266**, E92-101.
- Vladutiu G.D. (2000) The molecular diagnosis of metabolic myopathies. *Neurol Clin* **18**, 53-104.
- Vora S., Giger U., Turchen S. & Harvey J.W. (1985) Characterization of the enzymatic lesion in inherited phosphofructokinase deficiency in the dog: an animal analogue of human glycogen storage disease type VII. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 8109-13.
- Vorgerd M., Karitzky J., Ristow M., Van Schaftingen E., Tegenthoff M., Jerusalem F. & Malin J.P. (1996) Muscle phosphofructokinase deficiency in two generations. *J Neurol Sci* **141**, 95-9.
- Walvoort H.C. (1983) Glycogen storage diseases in animals and their potential value as models of human disease. *J Inherit Metab Dis* **6**, 3-16.
- Walvoort H.C., Dormans J.A. & van den Ingh T.S. (1985) Comparative pathology of the canine model of glycogen storage disease type II (Pompe's disease). *J Inherit Metab Dis* **8**, 38-46.
- Ward T.L., Valberg S.J., Adelson D.L., Abbey C.A., Binns M.M. & Mickelson J.R. (2004) Glycogen branching enzyme (GBE1) mutation causing equine glycogen storage disease IV. *Mamm Genome* **15**, 570-7.
- Ward T.L., Valberg S.J., Lear T.L., Guerin G., Milenkovic D., Swinburne J.E., Binns M.M., Raudsepp T., Skow L., Chowdhary B.P. & Mickelson J.R. (2003) Genetic mapping of GBE1 and its association with glycogen storage disease IV in American Quarter horses. *Cytogenet Genome Res* **102**, 201-6.
- Weckx S., Del-Favero J., Rademakers R., Claes L., Cruts M., De Jonghe P., Van Broeckhoven C. & De Rijk P. (2005) novoSNP, a novel computational tool for sequence variation discovery. *Genome Res* **15**, 436-42.

- White R.C. & Nelson T.E. (1974) Re-evaluation of the subunit structure and molecular weight of rabbit muscle amylo-1,6-glucosidase-4-alpha-glucanotransferase. *Biochim Biophys Acta* **365**, 274-80.
- Wolfsdorf J.I. & Weinstein D.A. (2003) Glycogen storage diseases. *Rev Endocr Metab Disord* **4**, 95-102.
- Xie X., Lu J., Kulbokas E.J., Golub T.R., Mootha V., Lindblad-Toh K., Lander E.S. & Kellis M. (2005) Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature* **434**, 338-45.
- Zirlik A., Abdullah S.M., Gerdes N., MacFarlane L., Schonbeck U., Khera A., McGuire D.K., Vega G.L., Grundy S., Libby P. & de Lemos J.A. (2007) Interleukin-18, the metabolic syndrome, and subclinical atherosclerosis: results from the Dallas Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**, 2043-9.

## **Etude de la myopathie héréditaire par surcharge en polysaccharides chez les chevaux Cob normand**

### Résumé

Nous avons recherché la base génétique de la prédisposition à la myopathie par surcharge en polysaccharides. C'est une des causes du syndrome « coup de sang » de certains chevaux lourds : baisse de performances, boiterie, crampes, myoglobulinurie. L'étude du phénotype chez le Cob normand a précisé l'épidémiologie, les lésions et la pathogénie de cette affection. L'analyse fonctionnelle de l'expression des gènes dans les muscles atteints montre une inflammation, une inhibition de l'activité mitochondriale, une perturbation du métabolisme énergétique et une hypoxie. La caractérisation structurale et fonctionnelle du gène de l'enzyme débranchante du glycogène (*AGL*) a mis en évidence un nouveau transcrit équin. Une étude d'association entre le phénotype et les polymorphismes de quatre gènes candidats a confirmé l'origine de cette myopathie : une mutation ponctuelle du gène de la glycogène synthase (*GYS1*). Cette nouvelle forme de glycogénose se comporte selon un mode autosomique dominant.

## **Study of the inherited polysaccharide storage myopathy in Cob normand draught horses**

### Abstract

The genetic basis of predisposition to the polysaccharide storage myopathy (PSSM) was investigated in the horse. PSSM is one of the causes of “tying-up” syndrome developed by draught breeds : lower performances, lameness, cramps, myoglobinurie. The phenotype of the affection was better defined in terms of epidemiology, lesions and pathogenesis. Functional analysis of gene expression in affected muscles revealed an inflammation, an inhibition of the mitochondria activity, an energetic metabolism disorder and an hypoxia. The structural and functional characterisation of the glycogen debranching enzyme gene (*AGL*) revealed a new equine splice variant. An association study between the phenotype and polymorphisms in four candidate genes confirmed the origin of this myopathy : a new single base mutation in the muscle glycogen synthase gene (*GYS1*). This new type of glycogenosis behaves as an autosomal dominant trait.