



HAL
open science

Cryptorchidie chez le chien : synthèse bibliographique. Analyse de pedigrees et biobanking d'ADN dans deux races : le Berger Blanc Suisse et le Spitz des Visigoths

Maxime Benhamou

► To cite this version:

Maxime Benhamou. Cryptorchidie chez le chien : synthèse bibliographique. Analyse de pedigrees et biobanking d'ADN dans deux races : le Berger Blanc Suisse et le Spitz des Visigoths. Médecine vétérinaire et santé animale. 2022. dumas-03970807

HAL Id: dumas-03970807

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03970807>

Submitted on 2 Feb 2023

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.

Année 2022

**CRYPTORCHIDIE CHEZ LE CHIEN : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.
ANALYSE DE PEDIGREES ET *BIOBANKING* D'ADN DANS DEUX
RACES : LE BERGER BLANC SUISSE ET LE SPITZ DES VISIGOTHS**

THÈSE

pour obtenir le diplôme d'État de

DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

présentée et soutenue publiquement devant

la Faculté de Médecine de Créteil (UPEC)

le 21 Juillet 2022

par

Maxime, Abraham, Francis, William BENHAMOU

sous la direction de

Lucie CHEVALLIER

JURY

Président du jury :	M. Gregory JOUVION	Professeur à l'EnvA
Directrice de thèse :	Mme Lucie CHEVALLIER	Maître de Conférences à l'EnvA
Examineur :	M. Alain FONTBONNE	Professeur à l'EnvA

Liste des enseignants intervenant dans l'encadrement des thèses de Doctorat vétérinaire



Version du 8 février 2022

Liste des Professeurs et Maîtres de conférences titulaires de l'HDR

M	Adjou	Karim	Professeur	DPASP
M	Audigié	Fabrice	Professeur	DEPEC
M	Bellier	Sylvain	Professeur	DSBP
M	Blaga	Radu	Maître de conférences HDR	DPASP
M	Blot	Stephane	Professeur	DEPEC
M	Boulouis	Henri-Jean	Professeur émérite	DSBP
Mme	Chahory	Sabine	Professeur	DEPEC
M	Chateau	Henry	Professeur	DSBP
Mme	Chetboul	Valerie	Professeur	DEPEC
Mme	Crevier-Denoix	Nathalie	Professeur	DSBP
M	Degueurce	Christophe	Professeur	DSBP
M	Denoix	Jean-Marie	Professeur	DEPEC
M	Desquilbet	Loïc	Professeur	DSBP
Mme	Dufour	Barbara	Professeur émérite	DPASP
M	Eloit	Marc	Professeur	DSBP
M	Fayolle	Pascal	Professeur émérite	DEPEC
M	Fédérighi	Michel	Professeur	DPASP
M	Fontbonne	Alain	Professeur	DEPEC
Mme	Gilbert	Caroline	Professeur	DSBP
M	Grandjean	Dominique	Professeur	DEPEC
Mme	Crimard-Ballif	Bénédicte	Professeur	DPASP
Mme	Haddad-Hoang Xuan	Nadia	Professeur	DPASP
M	Jouvion	Gregory	Professeur	DSBP
M	Kohlhauer	Matthias	Maître de conférences HDR	DSBP
Mme	Le Poder	Sophie	Professeur	DSBP
M	Manassero	Mathieu	Professeur	DEPEC
Mme	Maurey-Guéneq	Christelle	Maître de conférences HDR	DEPEC
M	Millemann	Yves	Professeur	DPASP
M	Perrot	Sébastien	Maître de conférences HDR	DSBP
Mme	Pilot-Storck	Fanny	Professeur	DSBP
M	Ponter	Andrew	Professeur	DPASP
Mme	Rivière	Julie	Maître de conférences HDR	DPASP
Mme	Robert	Céline	Professeur	DSBP
M	Tiret	Laurent	Professeur	DSBP
M	Tissier	Renaud	Professeur	DSBP
M	Verwaerde	Patrick	Professeur	DEPEC
Mme	Viateau	Véronique	Professeur	DEPEC

Liste des Maîtres de conférences et Ingénieurs de recherche DMV

M	Arné	Pascal	Maître de conférences	DPASP
Mme	Barassin	Isabelle	Maître de conférences	DPASP
Mme	Benckroun	Ghita	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Bertoni	Lelia	Maître de conférences	DEPEC
M	Bolnot	Francois	Maître de conférences	DPASP
Mme	Canonne-Guibert	Morgane	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Chevalier	Lucie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Cochet-Faivre	Noëlle	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Constant	Fabienne	Maître de conférences	DPASP
Mme	Cordonnier-Lefort	Nathalie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Crepeaux	Guillemette	Maître de conférences	DSBP
Mme	De Paula Reis	Alline	Maître de conférences	DPASP
Mme	Decambon	Adeline	Maître de conférences	DEPEC
M	Delsart	Maxime	Maître de conférences associé	DPASP
M	Desbois	Christophe	Maître de conférences	DEPEC
M	Deshuillers	Pierre	Maître de conférences	DSBP
M	Gauthier	Michel	Maître de conférences associé	DPASP
Mme	Guétin-Poirier	Valentine	Maître de conférences	DPASP
Mme	Jacquet	Sandrine	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Lagrée	Anne-Claire	Maître de conférences	DSBP
Mme	Le Roux	Delphine	Maître de conférences	DSBP
Mme	Legrand	Chantal	Maître de conférences associé	DSBP
Mme	Maignac	Genevieve	Maître de conférences	DSBP
M	Mauffré	Vincent	Maître de conférences	DPASP
Mme	Mlîmet	Narjès	Maître de conférences	DPASP
Mme	Mespouilhès-Rivière	Céline	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Mortier	Jérémy	Maître de conférences associé	DEPEC
M	Nudelmann	Nicolas	Maître de conférences	DEPEC
M	Pignon	Charly	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Polack	Bruno	Maître de conférences	DSBP
Mme	Ravary-Plumioën	Bérangère	Maître de conférences	DPASP
M	Reyes-Gomez	Edouard	Maître de conférences	DSBP
Mme	Risco-Castillo	Véronica	Maître de conférences	DSBP
Mme	Rose	Hélène	Maître de conférences associé	DSBP

Remerciements

A Monsieur Gregory JOUVION, Président du Jury de cette thèse, Professeur à l'EnvA ,

Pour avoir accepté d'occuper ce poste dans le cadre de ma thèse, pour son temps et sa présence lors de la soutenance de celle-ci.

A Mme Lucie CHEVALLIER, Directrice de thèse, Maître de conférences à l'EnvA,

Pour sa réponse lorsque je l'ai contacté afin de travailler avec elle sur ce projet, pour sa disponibilité et sa bienveillance durant toute sa réalisation, et pour son aide au cours des différentes étapes de ce travail.

A Monsieur Alain FONTBONNE, Examineur, Professeur à l'EnvA,

Pour l'intérêt porté à ce travail, pour sa participation et son aide dans le travail de rédaction sur ce domaine scientifique pour lequel son expertise était un véritable atout.

A Monsieur Guillaume ROBITEAU, Docteur Vétérinaire, DVM, PHD, Résident ECAR et en Reproduction,

Pour son aide apportée tout au long de la réalisation de cette thèse, pour son temps et sa bienveillance, dans le cadre de la partie bibliographique comme dans le cadre de la partie expérimentale. Merci du temps consacré à la récolte d'échantillons au sein du service de reproduction, mais aussi du temps consacré à la réalisation de manipulation en laboratoire sur son temps personnel.

Table des matières

Liste des figures.....	3
Liste des tableaux.....	5
Liste des abréviations.....	7
Introduction.....	9
Première partie : Etude bibliographique de la cryptorchidie	11
I. Formation du testicule et descente testiculaire.....	11
1. <i>Formation du testicule et de l'appareil reproducteur mâle</i>	11
a. Formation de la gonade indifférenciée chez l'embryon.....	12
b. Différenciation testiculaire.....	13
• Principaux acteurs de la différenciation testiculaire.....	13
SRY.....	13
SOX9.....	13
AMH.....	15
• La différenciation testiculaire.....	15
Formation des cellules de Sertoli.....	15
Formation des cellules de Leydig.....	16
2. <i>Descente testiculaire</i>	18
a. Translocation abdominale.....	18
b. Migration inguinoscrotale.....	19
c. Eléments impliqués dans le contrôle de la descente testiculaire.....	20
• INSL3/RXFP2.....	20
• Testostérone.....	20
II. Etat actuel des connaissances sur la cryptorchidie.....	21
1. <i>La cryptorchidie chez le chien</i>	21
a. Définition.....	21
b. Conséquences de la cryptorchidie.....	22
2. <i>Pourquoi suspecte-t-on une cause génétique chez le chien?</i>	23
3. <i>Gènes mis en cause jusqu'à aujourd'hui</i>	24
a. INSL3 et RXFP2.....	24
b. ESR1.....	25
c. UCN et ses récepteurs CRHR1 et CRHR2.....	26
d. Autres gènes candidats.....	26
4. <i>Autres causes possibles de la cryptorchidie</i>	27
a. Causes anatomiques.....	27
b. Causes endocriniennes.....	27
c. Causes environnementales.....	28
III. Rappels sur les modes de transmission des maladies héréditaires.....	29
1. <i>Modes de transmission monogéniques</i>	29
a. Transmission autosomique récessive.....	29
b. Transmission autosomique dominante.....	29
c. Transmission récessive liée à l'X.....	29
d. Transmission dominante liée à l'X.....	30
e. Transmission liée à l'Y.....	30
f. Transmission maternelle (par l'ADN mitochondrial).....	30
2. <i>Modèles polygénique et mixte, hétérogénéité génétique</i>	31
3. <i>Pénétrance incomplète et expressivité variable</i>	32
Deuxième partie : Etude expérimentale : Analyse d'arbres généalogiques de familles de chiens atteints et constitution d'une cohorte de chiens atteints de cryptorchidie et de chiens apparentés.....	33
I. Introduction.....	33
II. Matériel et méthode.....	34
1. <i>Matériel</i>	34

2. Méthode	34
a. Recrutement des chiens, recueil des pedigrees et des prélèvements	34
b. Phénotypage des chiens	35
c. Extraction d'ADN et stockage	35
d. Test statistique	35
e. Construction des arbres généalogiques	36
III. Résultats	37
1. Arbres généalogiques	37
2. Banque d'ADN	42
IV. Discussion	43
1. Caractère héréditaire de la cryptorchidie dans les deux familles étudiées	43
a. Discussion sur une transmission liée au sexe	44
b. Discussion sur l'hypothèse d'une transmission autosomique	46
c. Discussion d'un modèle polygénique et d'un modèle mixte	48
d. Discussion générale sur le mode de transmission de la cryptorchidie dans les deux familles étudiées	49
Conclusion	51
Liste des références bibliographiques	53
Annexe 1	57
Annexe 2	59
Annexe 3	61
Annexe 4	63
Annexe 5	65
Annexe 6	67
Annexe 7	71

Liste des figures

Figure 1 : Schéma de la migration embryonnaire des PGC (Mäkelä <i>et al.</i> , 2019).	12
Figure 2 : Schéma de la cascade d'auto-régulation de SOX9 (Mäkelä <i>et al.</i> , 2019).	14
Figure 3 : Schéma récapitulatif de la formation des cellules de Sertoli et de Leydig (Rotgers <i>et al.</i> , 2018).....	16
Figure 4 : Schéma récapitulatif des voies de régulation des principaux acteurs de la différenciation testiculaire (Rotgers <i>et al.</i> , 2018).	17
Figure 5 : Schéma de la descente testiculaire chez le chien (Baumans <i>et al.</i> , 1981).....	19
Figure 6 : Représentation graphique de la répartition d'une maladie dans la population selon les modèles polygénique et mixte.....	31
Figure 7 : des figures 8 à 11.	37
Figure 8 : Arbre généalogique d'une famille de Spitz des Visigoths atteinte de cryptorchidie.	38
Figure 9 : Arbre généalogique d'une famille de Berger Blanc Suisse atteinte de cryptorchidie.	39
Figure 10 : Schémas des deux types de familles nucléaires retrouvées dans les arbres généalogiques étudiés.....	40
Figure 11 : Schémas des 5 situations retrouvés dans l'étude des demi-frères dans les arbres généalogiques étudiés.....	41

Liste des tableaux

Tableau 1 : Modèle de tableau pour le calcul d'un Chi ² de comparaison entre un pourcentage observé et un pourcentage attendu.	35
Tableau 2 : Effectifs observés et attendus de mâles cryptorchides chez les Berger Blanc Suisse sous l'hypothèse d'une transmission dominante liée à l'X.	44
Tableau 3 : Effectifs observés et attendus de mâles cryptorchides chez les Spitz des Visigoths sous l'hypothèse d'une transmission dominante liée à l'X.	45
Tableau 4 : Effectifs observés et attendus de cryptorchides chez les Berger Blancs Suisse sous l'hypothèse d'une transmission autosomique récessive avec deux parents hétérozygotes.	47
Tableau 5 : Effectifs observés et attendus de cryptorchides chez les Spitz des Visigoths sous l'hypothèse d'une transmission autosomique récessive avec deux parents hétérozygotes.	47

Liste des abréviations

AMH = Hormone anti-Mullerienne

AR = Acide Rétinoïque

CGP = Cellules Germinales Primordiales

CGRP = *Calcitonin Gene-Related Peptide*

ChuvA = Centre hospitalier universitaire vétérinaire d'Alfort

CRHR = *Human Corticotropin-Releasing Hormone receptor gene*

CVE = Cellules endothéliales vasculaires

DDL = Degré De Liberté

DEHP = Phtalate de Diéthylhexyle

DHH = *Desert HedgeHog*

dObs = Différence observée entre les effectifs observés et attendus

EDTA = acide éthylène diamine tétra-acétique

EnvA = Ecole nationale vétérinaire d'Alfort

ESR = *EStrogen Receptor*

GLI1 = *GLI family zinc finger 1*

GnRH = *Gonadotropin-Releasing Hormone*

GWAS = *GenomeWide Association Study*

HH = *HedgeHog*

INSL3 = *INSulin-Like peptide 3*

PCB153 = Biphényle Polychloré 153

PMDS = *Persistent Mullerian Ducts Syndrom*

RAR = Récepteur de l'Acide Rétinoïque

RXFP2 = *RelaXin Family Peptide receptor 2*

SCC = Société Centrale Canine

SNP = *Single Nucleotide Polymorphism*

SOX = *SRY-box transcription factor*

SRY = *Sex-determining Region on Y*

T = Testostérone

UCN = *Urocortin*

Introduction

Chez le chien sain comme chez d'autres mammifères comme l'Homme, les testicules migrent d'une position caudo-rénale vers le scrotum au cours du développement, et y restent positionnées de façon permanente au cours de la vie de l'animal (Williams et Hutson, 1991).

En fonction des espèces, le développement testiculaire et la descente testiculaire ne surviennent pas aux mêmes périodes du développement de l'individu. Elle est particulièrement tardive chez le chien, où la descente testiculaire se termine après la naissance (Amann et Veeramachaneni, 2007).

L'affection qui nous intéresse dans cette étude, la cryptorchidie, officiellement appelée ectopie testiculaire, tire son nom du grec, *kruptos* qui signifie « caché », et *orchis* qui signifie « testicule ». La cryptorchidie correspond à un défaut de descente d'un ou des deux testicules dans le scrotum.

Elle est décrite chez de nombreuses espèces, dont l'Homme, chez qui elle a beaucoup été étudiée. L'affection est décrite chez la plupart des mammifères domestiques, mais chez le chien, malgré un grand nombre de publications, les études ayant tenté d'en déterminer la cause n'ont pas permis d'apporter de réponse claire.

Cette affection a une importance forte chez le chien, puisqu'elle a un impact sanitaire, physiologique et social. Un animal cryptorchide est normalement écarté de la reproduction, ce qui représente un réel enjeu pour les élevages canins. La cryptorchidie est d'ailleurs considérée comme un vice rédhibitoire si l'animal a plus de 6 mois lors de la vente (« Article R213-2 - Code rural et de la pêche maritime - Légifrance », s. d.).

Les chiens de race étant statistiquement plus touchés que les chiens croisés, et certaines races étant surreprésentées par rapport à d'autres, une origine génétique est suspectée depuis des années (Barone *et al.*, 1994), mais aucune des études menées jusqu'alors n'a pu montrer la mise en cause spécifique d'un ou plusieurs gènes dans l'espèce canine, même si certains locus ont été ou sont actuellement étudiés.

De plus, d'autres facteurs au cours du développement ont pu être mis en cause dans ce défaut de positionnement testiculaire, qu'ils soient endocriniens, anatomiques, ou environnementaux. Ces différents éléments seront détaillés plus loin. Il est donc non consensuel mais hautement probable que l'origine de l'affection ne soit pas purement génétique (Khan *et al.*, 2018).

Le but de cette thèse est donc tout d'abord de présenter cette affection en la replaçant dans le contexte du développement du sexe phénotypique chez le chien, puis de rappeler l'état des connaissances actuelles sur les causes possibles de cette affection.

Enfin, nous présenterons la partie expérimentale de cette étude, au cours de laquelle nous avons contacté deux élevages de chiens de race Spitz des Visigoths et Berger Blanc Suisse, avec des cas de cryptorchidie, afin d'étudier le mode de transmission au sein de deux familles.

De plus, nous avons collecté de l'ADN de chiens atteints de cryptorchidie, afin de créer une cohorte au sein de la banque d'ADN du service de génétique de l'EnvA (biobanque Cani-DNA).

Première partie : Etude bibliographique de la cryptorchidie

L'objectif de cette partie bibliographique sera tout d'abord de rappeler les différentes étapes du développement physiologique du testicule, de sa formation lors de l'embryogénèse à sa descente dans le scrotum, en s'intéressant particulièrement aux différents facteurs impliqués, génétiques ou non.

Ensuite, nous détaillerons l'état actuel des connaissances sur les éléments génétiques, mais aussi anatomiques, endocriniens ou environnementaux, pouvant être en cause dans le développement de la cryptorchidie, en se basant sur les études menées jusqu'à aujourd'hui sur le sujet.

I. Formation du testicule et descente testiculaire

1. Formation du testicule et de l'appareil reproducteur mâle

La formation de l'appareil reproducteur mâle est un mécanisme complexe, faisant intervenir des facteurs génétiques mais aussi hormonaux.

Elle est divisée en trois grandes étapes, à savoir la formation d'une gonade indifférenciée, puis la différenciation testiculaire, et enfin le développement des tractus et organes génitaux externes, associé à la descente testiculaire.

Les deux premières étapes peuvent être regroupées sous le terme de gonadogenèse, avec premièrement la formation de gonades indifférenciées chez l'embryon, puis dans un second temps la différenciation vers un ovaire ou vers un testicule.

Enfin, sous contrôle génétique et hormonal, se produit la mise en place des tractus urinaires et génitaux, le développement des organes génitaux externes, et la descente testiculaire (Mäkelä *et al.*, 2019).

C'est au cours de ces étapes décisives que se produit chez le chien mâle la formation des testicules et leur descente vers le scrotum, et donc que des anomalies peuvent apparaître, menant ainsi à une ectopie testiculaire (Romagnoli, 1991).

a. Formation de la gonade indifférenciée chez l'embryon

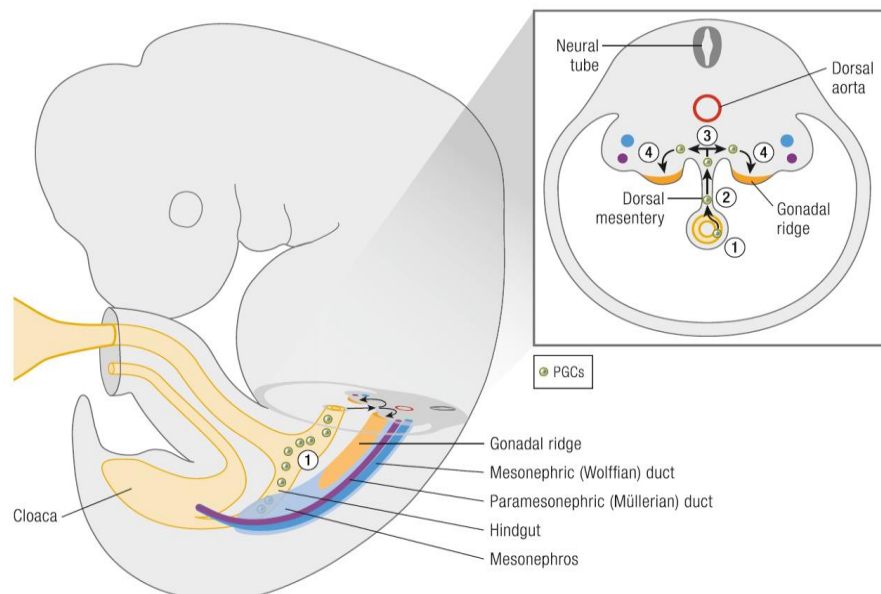
Chez la plupart des mammifères, la lignée des cellules germinales est déterminée selon le mode de l'épigénèse, c'est à dire qu'elle provient d'une population homogène de cellules embryonnaires, qui vont se différencier sous l'action de signaux inductifs. Les premières cellules de cette lignée sont appelées les cellules germinales primordiales (CGP) (Mäkelä *et al.*, 2019).

Les études portant sur les CGP ont été compliquées par leur faible nombre et par leur localisation au sein d'une population de cellules somatiques. Des études récentes ont permis d'étudier leur différenciation chez la souris et chez l'Homme (Mäkelä *et al.*, 2019).

Chez ces deux espèces, les CGP sont probablement induites au sein de l'épiblaste, ou de l'amnios dorsal, puis migrent dans l'embryon, et colonisent les crêtes gonadiques, deux structures embryonnaires longues et minces, situées crânio-caudalement à la surface dorsale de la cavité coelomique, couvrant le mésonephros. Cette migration représente un trajet important au sein de l'embryon dont le détail reste sujet à débat (Mäkelä *et al.*, 2019).

Cette migration reposerait sur des mécanismes actifs, en effet plusieurs études montrent que les CGP sont des cellules migratrices qui se déplacent activement dans l'embryon (Kuwana et Fujimoto, 1983 ; Donovan *et al.*, 1986 ; Molyneaux *et al.*, 2001 ; Molyneaux *et al.*, 2003), mais aussi sur des mécanismes passifs de par les mouvements induits par la croissance de l'embryon (Freeman, 2003). Ce mécanisme est illustré dans la figure 1.

Figure 1 : Schéma de la migration embryonnaire des PGC (Mäkelä *et al.*, 2019).



<https://academic.oup.com/edrv/article/40/4/857/5257800>

La voie de migration des PGC au cours du développement foetal précoce est indiquée. Une approche en quatre étapes peut être utilisée pour décrire le processus : (i) passage transépithélial dans l'épithélium endodermique, (ii) migration dorsale à travers le mésenchyme du mésentère intestinal, et (iii) migration latérale dans le mésoderme, et enfin (iv) coalescence avec les cellules somatiques des GR pour contribuer aux gonades embryonnaires.

Alors, sous contrôle génétique, une cascade moléculaire complexe contribue à former dans les crêtes gonadiques des structures gonadiques primordiales, constituées d'un mélange, encore non organisé, de cellules somatiques et de cellules germinales, les CGP. Ces populations seront à l'origine des futures gonades.

Ces cellules somatiques gonadiques seraient formées à partir de l'épithélium coelomique. Celui-ci prolifère, et sa membrane basale se désintègre, permettant aux cellules de pénétrer la gonade. Une division asymétrique de cet épithélium coelomique se produit, durant laquelle une cellule fille reste dans l'épithélium, et l'autre pénètre dans la gonade.

Cette population pénétrant dans la gonade serait à l'origine de la population des cellules somatiques gonadiques.

Ces ébauches gonadiques des embryons XX ou XY restent indifférenciables jusqu'à l'expression du gène *SRY* (Mäkelä *et al.*, 2019), dont le rôle sera détaillé plus loin.

b. Différenciation testiculaire

- *Principaux acteurs de la différenciation testiculaire*

SRY

Le gène *SRY* est un acteur majeur dans la différenciation testiculaire. Il a une action très transitoire, durant laquelle il enclenche les mécanismes de la détermination du sexe, avant de revenir à un niveau basal d'expression. Il n'a pas d'action directe sur la différenciation testiculaire, mais il est nécessaire qu'il soit exprimé au bon endroit, au bon moment, et en quantité suffisante pour permettre l'activation de facteurs aval, notamment *SOX9*, qui vont permettre d'induire la formation des testicules et la différenciation sexuelle masculine. Si la fenêtre d'expression de *SRY* n'est pas respectée, la gonade indifférenciée prendra la voie ovarienne (Hiramatsu *et al.*, 2009).

Chez la souris, la régulation de l'expression de *SRY* est contrôlée par plusieurs cascades complexes, centrées sur trois facteurs principaux, *GATA4*, *NR5A1* et *WT1* (Larney *et al.*, 2014). Il n'existe pas d'études similaires chez le chien actuellement.

Une fois le niveau spécifique de la protéine *SRY* atteint, il y a une stimulation de l'expression des gènes spécifiques aux mâles, c'est donc bien l'expression de *SRY* qui permet le passage de la gonade indifférenciée vers le développement mâle de la gonade et la formation du testicule.

SOX9

Cette présence ou absence de *SRY* dicte quelle voie de différenciation prendra la gonade, en induisant l'expression de *SOX9*, induisant lui-même la différenciation des cellules de pré-Sertoli (Koopman *et al.*, 1991).

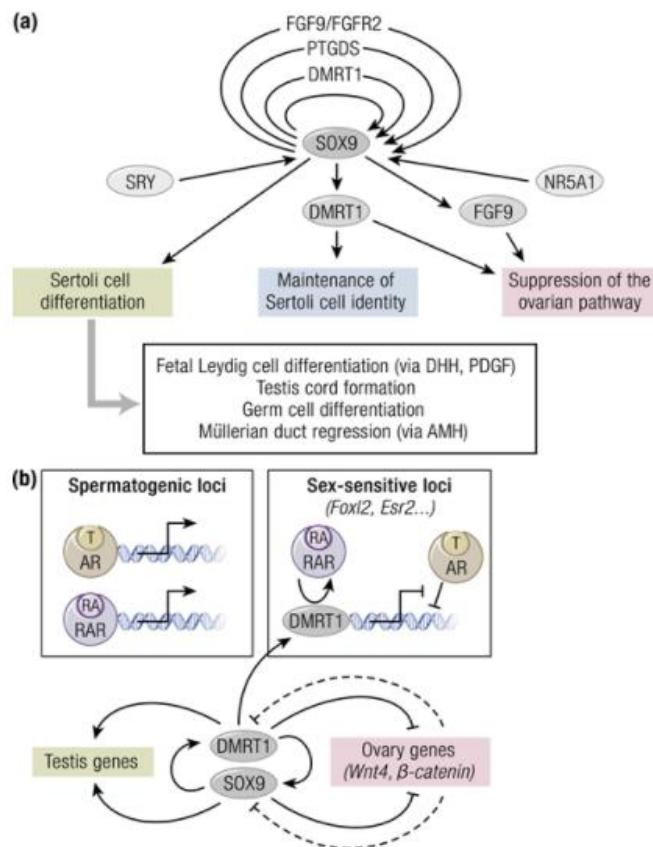
L'expression de *SOX9* est normalement induit par *SRY*, mais en l'absence de *SRY*, l'expression de *SOX9* suffit fonctionnellement à induire le développement testiculaire s'il est exprimé au bon moment

et en quantité suffisante. Il est donc indispensable et suffisant pour l'organogénèse testiculaire (Foster *et al.*, 1994).

Son action est dose-dépendante, et comme pour SRY, un seuil doit être atteint pour continuer cette différenciation. Une mutation de SOX9 conduit à un développement femelle (Wagner *et al.*, 1994).

SOX9 est donc la cible la plus importante de SRY. Une fois le seuil atteint, il maintient par une cascade d'interaction sa propre expression (Sekido et Lovell-Badge, 2008) comme le montre la figure 2.

Figure 2 : Schéma de la cascade d'auto-régulation de SOX9 (Mäkelä *et al.*, 2019).



<https://academic.oup.com/edrv/article/40/4/857/5257800> le 23 Juin 2021

(a) Régulation de SOX9 et son rôle dans la testiculogénèse. *Sox9* est initialement induit par l'action synergique de SRY et NR5A1. Plus tard, SOX9 maintient sa propre expression soit directement, soit par des boucles d'anticipation avec PTGDS, FGF9/FGFR2 et DMRT1. SOX9 orchestre le développement testiculaire en maintenant la différenciation/l'identité des cellules de Sertoli et la répression de la voie ovarienne soit directement, soit via la signalisation DMRT1 et FGF9. *DHH* et *AMH* font partie des gènes clés en aval de SOX9 nécessaires au développement réussi du système urogénital masculin. (b) Maintien du phénotype testiculaire. DMRT1 maintient le sexe masculin après la naissance avec SOX9. En plus de maintenir l'expression des gènes testiculaires, ils répriment ceux qui sont actifs dans le développement ovarien (*Wnt4*, *β-caténine*). DMRT1 fait également taire l'action de la PR aux locus sensibles au sexe (*Foxl2*, *Esr2*). Lorsque DMRT1 est absent, la PR est capable d'activer les gènes féminisants, qui répriment également *Dmrt1* et *Sox9* qui sont nécessaires pour maintenir l'identité des cellules de Sertoli. La signalisation AR empiète sur la transcription de *Foxl2* dans les cellules de Sertoli de souris. RAR = récepteur RA; T = testostérone.

Le nombre de cellules de pré-Sertoli, dont le rôle sera détaillé plus loin, est donc défini par l'action de SRY puis par SOX9. Au fur et à mesure que les cellules exprimant SRY et SOX9 prolifèrent, le nombre de cellules de pré-Sertoli s'accroît, augmentant ainsi la taille des gonades (Colvin *et al.*, 2001 ; Schmahl et Capel, 2003).

AMH

L'AMH n'a pas de rôle direct sur la différenciation testiculaire, mais est malgré tout un facteur très important produit par les cellules de Sertoli. Chez le mâle, sa production est importante jusqu'à la puberté puis décline et atteint un seuil stable durant la vie adulte (Aksfglaede *et al.*, 2010).

Il joue un rôle central dans le développement mâle puisqu'il induit la régression des canaux de Müller. En son absence, on observe des patients atteints de syndrome de persistance du canal de Müller (Josso *et al.*, 2013).

L'AMH a également été impliquée chez la souris comme étant un contrôleur du passage des cellules germinales du stade de gonocytes à celui de spermatogonies (Zhou *et al.*, 1993).

La régulation de l'expression de l'AMH résulte de divers mécanismes complexes, n'incluant pas que le gène SOX9. D'autres gènes de la famille SOX, comme SOX3, SOX4, SOX8, SOX10, SOX11 et SOX12 ont des rôles importants dans la mise en place et le maintien des fonctions sexuelles masculines (Polanco *et al.*, 2010 ; Singh *et al.*, 2013 ; Zhao *et al.*, 2017).

- *La différenciation testiculaire*

Formation des cellules de Sertoli

Une première vague de cellules somatiques gonadiques provenant de l'épithélium cœlomique vont, sous l'action de SRY puis de SOX9, se différencier en cellules de pré-Sertoli.

Peu de temps après l'apparition des cellules de pré-Sertoli, les cellules des crêtes gonadiques commencent à s'organiser. Les cellules de pré-Sertoli vont s'agréger, et commencer à former les cordons testiculaires, qui vont venir enfermer les cellules germinales, tandis que les autres cellules somatiques restent à l'extérieur. SOX9 est indispensable à cette formation, mais il peut pour la suite être remplacé par SOX8 ou SOX10 (Polanco *et al.*, 2010).

Les cordons testiculaires sont ensuite entourés par des myoblastes périvitubulaires, formant des tubules séminifères. Ces tubules sont liés au *rete testis* puis à l'épididyme. Ils restent fermés jusqu'à la puberté où ils se creuseront d'une lumière jusqu'au canal déférent. C'est à ce moment que les cellules germinales mâles entrent en méiose (Mäkelä *et al.*, 2019).

Les cellules de pré-Sertoli vont maturer, et il est aujourd'hui supposé que ce sont ces cellules matures, notamment via la voie de signalisation HedgeHog (HH), qui vont être à l'origine de la formation des cellules de Leydig (Rotgers *et al.*, 2018).

Formation des cellules de Leydig

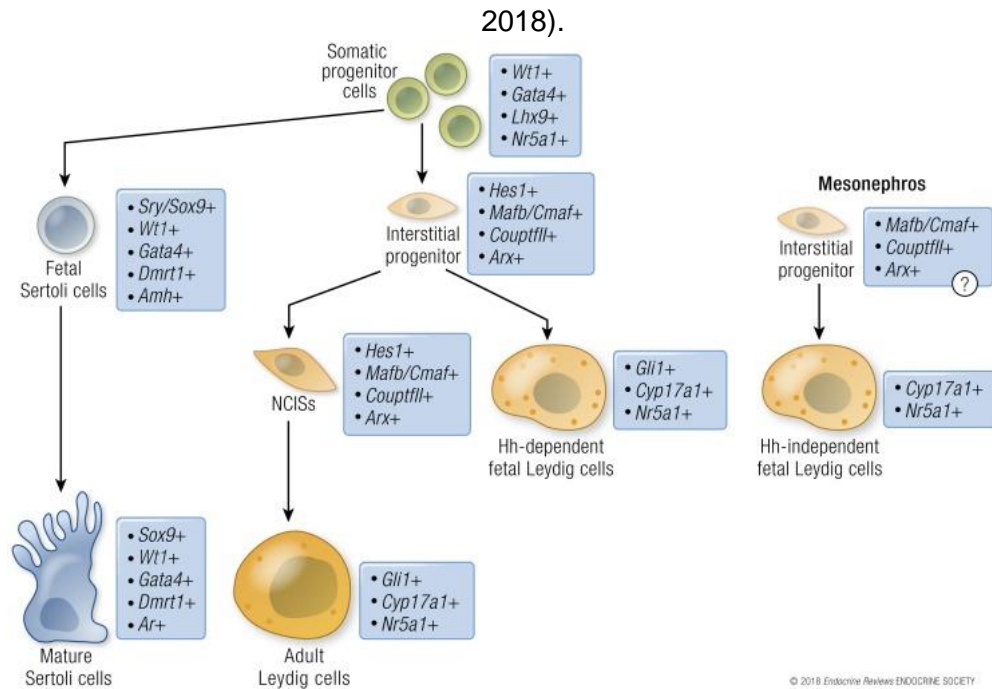
Les cellules de Leydig fœtales ont une origine encore débattue dans la communauté scientifique (Mäkelä *et al.*, 2019), mais elles sont probablement liées à des mécanismes dépendants des cellules de Sertoli, montrant la nécessité d'une population importante de cellules de pré-Sertoli (Bitgood *et al.*, 1996).

Elles seraient issues d'une seconde vague de cellules somatiques gonadiques en provenance de l'épithélium coelomique, qui sous l'action de Desert HedgeHog (DHH), un ligant de la voie de signalisation HH, produisent un facteur de transcription, GLI1, dont l'augmentation de l'expression coïncide avec la différenciation des cellules de Leydig fœtales. Une partie de ces cellules restent une population non stéroïdogène pour devenir des cellules de Leydig adultes après la naissance (Rotgers *et al.*, 2018).

Une autre population de cellules de Leydig fœtale, provenant du mésonephros, et n'exprimant pas GLI1, se développe indépendamment de la voie de signalisation HH. Ces cellules sont mal caractérisées mais exprimeraient des marqueurs similaires (Rotgers *et al.*, 2018).

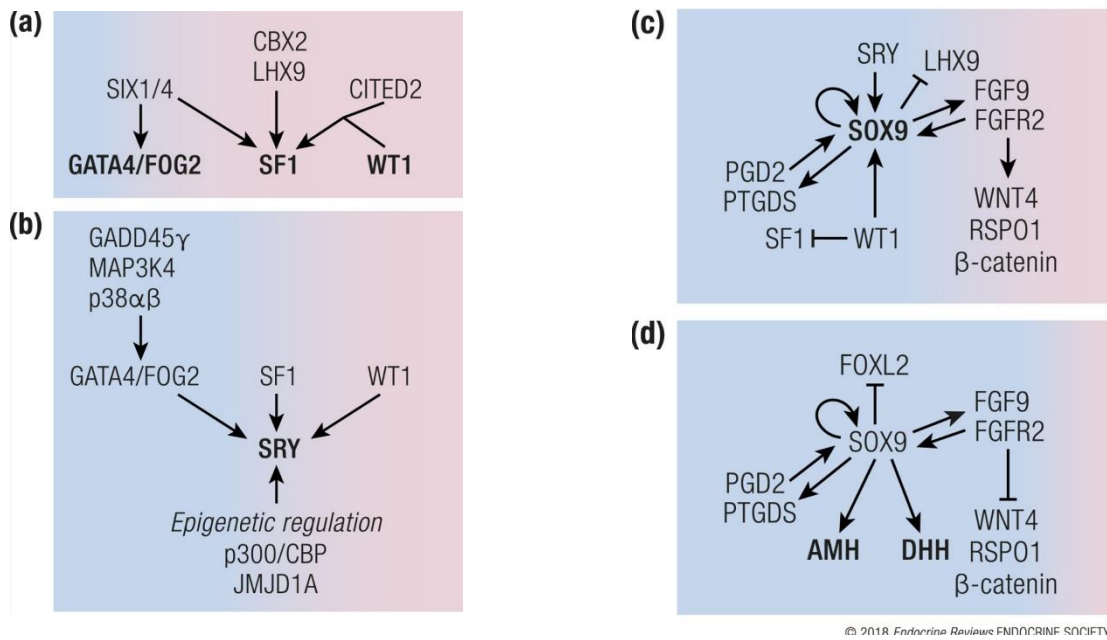
L'ensemble de ces mécanismes est représenté dans les figures 3 et 4 suivantes :

Figure 3 : Schéma récapitulatif de la formation des cellules de Sertoli et de Leydig (Rotgers *et al.*, 2018).



Progression de la lignée des cellules de soutien et interstitielles dans le testicule de la souris. Les cellules progénitrices somatiques de la gonade XY (vert) donnent naissance aux cellules de soutien et de Sertoli (bleu) ou à une population de progéniteurs interstitiels (orange pâle). La lignée des cellules de soutien et de Sertoli est définie par la régulation positive de *Sry*, puis de *Sox9*, qui les transforme en cellules épithéliales polarisées dans le testicule. Lorsque les cellules de Sertoli atteignent la maturité postnatale (bleu foncé), elles régulent à la baisse l'expression de l'AMH et acquièrent une sensibilité aux androgènes. La population de cellules progénitrices interstitielles est définie par l'expression de *Hes1* et d'autres gènes (*Arx*, *Coup11f*/*Nr2f2*, *Mafb*). Les cellules progénitrices interstitielles commencent à exprimer *Gli1* en réponse à la signalisation hedgehog des cellules de Sertoli et se différencient en cellules de Leydig fœtales (orange). Une population de cellules progénitrices interstitielles reste une population progénitrice non stéroïdogène qui donne naissance aux cellules de Leydig adultes (orange foncé) après la naissance. Une deuxième population de cellules progénitrices interstitielles est spécifiée dans le mésonephros et entre dans la gonade pendant le développement fœtal. Les cellules progénitrices interstitielles mésonephriques ne contribuent pas à la population de cellules de Leydig adultes.

Figure 4 : Schéma récapitulatif des voies de régulation des principaux acteurs de la différenciation testiculaire (Rotgers *et al.*, 2018).



Voies qui régissent la différenciation des cellules de Sertoli chez la souris. La différenciation des cellules de Sertoli oriente la gonade bipotentielle d'un destin féminin (rose) vers un destin masculin (bleu). (a) Lorsque la gonade commence à se former, la voie MAPK, SIX1/4, CBX2, LHX9 et CITED2 régulent à la hausse l'expression de GATA4/FOG, SF1 et WT1, qui sont nécessaires à la survie et à l'expansion du primordium gonadique. (b) Au début de la détermination du testicule, SF1, GATA4, et WT1 déclenchent l'expression de Sry. L'expression de Sry est également régulée épigénétiquement par p300/CBP et JMJD1A. (c) SRY régule à la hausse Sox9, ce qui conduit à la régulation à la hausse d'autres voies pro-teste (FGF9 et PGD2) tout en inhibant simultanément la voie pro-ovarienne WNT4/RSP01/ β -caténine. WT1 renforce le destin des cellules de soutien en supprimant SF1 et en favorisant SOX9. (d) Sous le contrôle de SOX9, les cellules de Sertoli en cours de différenciation commencent à sécréter de la DHH et de l'AMH qui contrôlent l'apparition de la lignée de cellules de Leydig et la différenciation dimorphique du tractus génital. SOX9 favorise en outre le destin masculin en réprimant la boîte de forkhead L2 (FOXL2) pro-ovarienne.

2. Descente testiculaire

La descente testiculaire désigne le passage des testicules de leur position intra-abdominale caudo-rénale à leur position scrotale.

En fonction des espèces, elle ne se produit pas au même moment du développement, et chez le chien en particulier, les testicules se situent au moment de la naissance entre le rein et l'anneau inguinal interne. Cinq jours plus tard, ils ont normalement atteint l'anneau inguinal externe, puis atteignent enfin leur position finale dans le scrotum après la naissance (Romagnoli, 1991).

Cette migration se découpe dans les études qui la décrivent en deux étapes distinctes, la translocation abdominale et la migration inguinoscrotale (Mäkelä *et al.*, 2019).

a. Translocation abdominale

Cette étape de la descente testiculaire correspond plus à un déplacement relatif du testicule par rapport au fœtus en croissance qu'à une véritable migration (Shono *et al.*, 1994).

Elle met en jeu une structure très importante appelée le « gubernaculum ». Il provient de la région inguinale, ou une papille de cellules mésenchymateuses apparaît en migrant dans le muscle oblique interne de l'abdomen (Shono *et al.*, 1994).

Cette papille se développe et forme le bulbe gubernaculaire, qui correspond au renflement dans la région inguinale, et la corde gubernaculaire, qui progresse par la gaine mésonéphrotique et atteint le testicule et les canaux de Wolff (Shono *et al.*, 1994).

Le bulbe gubernaculaire s'étend et progresse à travers la paroi abdominale et à travers l'anneau inguinal, et c'est cette partie que l'on nommera par la suite la partie extra abdominale du gubernaculum (Na *et al.*, 2007).

Le péritoine, s'évaginant également avec le gubernaculum, forme alors ce qu'on appellera le processus vaginal (Nation *et al.*, 2011).

Ainsi attaché au testicule et ancré à proximité de l'anneau inguinal, le gubernaculum va permettre de maintenir le testicule en place, tandis que le fœtus grandit, ce qui implique un mouvement relatif du testicule vers l'arrière par rapport au reste des structures qui suivent la croissance du fœtus et se déplacent passivement crânialement (Shono *et al.*, 1994).

Pour permettre au testicule de rester ainsi en place, son attache crâniale, le ligament suspenseur crânial va s'amincir et s'allonger.

Ces deux structures, le gubernaculum et le ligament suspenseur crânial, sont donc toutes les deux en cause dans la translocation abdominale de la descente testiculaire (Shono *et al.*, 1994).

b. Migration inguinoscrotale

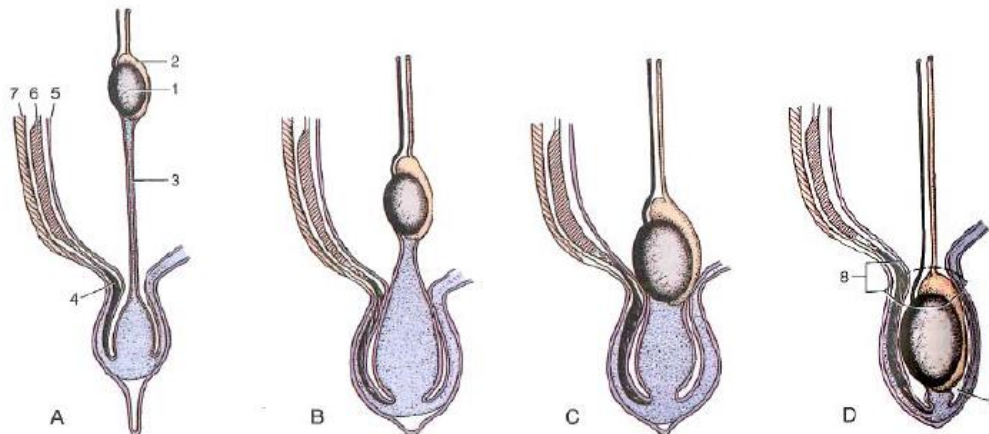
Le gonflement du bulbe gubernaculaire permet d'agrandir le canal inguinal, favorisant le passage du testicule au travers, notamment grâce à la pression des organes abdominaux (Romagnoli, 1991).

La partie extra-abdominale du gubernaculum, rattachée au fond du scrotum, va alors régresser, en faisant migrer avec lui le testicule et la queue de l'épididyme vers le fond du scrotum. Après avoir régressé, il laissera comme vestige le ligament scrotal, reliant la tunique vaginale pariétale au scrotum, et le ligament de la queue de l'épididyme, liant la tunique vaginale viscérale à la queue de l'épididyme (Hutson *et al.*, 1997).

Le canal inguinal se réduit alors, empêchant le testicule de revenir en arrière et aux viscères abdominaux de se hernier (sauf chez certaines espèces où la remontée des testicules reste physiologiquement possible, comme les rongeurs ou les lagomorphes) (Hutson *et al.*, 1997).

La descente testiculaire est schématisée dans la figure 5.

Figure 5 : Schéma de la descente testiculaire chez le chien (Baumans *et al.*, 1981).



- 1 : Testicule ; 2 : Epididyme ; 3 : Gubernaculum ; 4 : Muscle crémaster ; 5 : Péritoine ; 6 : Muscle oblique interne ; 7 : Muscle oblique externe ; 8 : Canal inguinal ; 9 : Cavité Vaginale
A à B : Translocation abdominale ; C à D : Migration inguinoscrotale

c. *Eléments impliqués dans le contrôle de la descente testiculaire*

- *INSL3/RXFP2*

INSL3 (*Insuline Like Factor* de type 3) est principalement produit par les cellules de Leydig chez le mâle. Il a été montré chez la souris qu'une mutation sur le gène *INSL3* aboutissait à un échec de différenciation du gubernaculum, et ainsi, à une cryptorchidie abdominale haute. Le même constat est fait pour le gène *RXFP2* (*Relaxin Family Peptide Receptor 2*), avec une cryptorchidie abdominale chez les individus déficients pour *RXFP2* (Truong *et al.*, 2003).

Les recherches ont permis de montrer que RXFP2 est un récepteur, activé par INSL3. En leur absence, on retrouve un gubernaculum mal développé, trop fin pour permettre de ramener le testicule jusqu'à l'anneau inguinal. Ils permettraient donc de stimuler le développement du gubernaculum, et semblent nécessaires via cette fonction à la translocation abdominale (Truong *et al.*, 2003).

- *Testostérone*

Le rôle de la testostérone dans le processus de descente testiculaire a longtemps été étudié. Il a été montré que chez la souris, malgré une mutation des récepteurs aux androgènes, la migration abdominale se déroulait correctement dans environ 90% des cas (Amann et Veeramachaneni, 2007).

Dans les études chez le rat et le porc, la migration inguinoscrotale se déroule également correctement dans 95% des cas étudiés lors d'une exposition à la flutamide, un anti-androgène, durant les derniers jours précédant la naissance. En revanche, si la flutamide est administrée plus tôt, entre 15 et 18 jours post-coït chez le rat, on a seulement 50 à 70% de migration inguinoscrotale complète (Amann et Veeramachaneni, 2007).

Enfin, chez l'Homme comme chez le chien, on remarque qu'un défaut en testostérone empêche la régression du gubernaculum, qui reste élargit (Amann et Veeramachaneni, 2007).

L'explication à toutes ces observations est que l'extrémité du bulbe gubernaculaire en croissance possède des récepteurs à un peptide, la CGRP. Ce peptide est sécrété par le nerf génito- fémoral, mais seulement si celui-ci a été imprégné plus tôt par la testostérone. On parle de « masculinisation du nerf génito- fémoral ». C'est cette sécrétion de CGRP, capté par les récepteurs situés à l'extrémité du bulbe gubernaculaire, qui guide sa croissance vers le testicule, puis sa régression à la fin du processus (Amann et Veeramachaneni, 2007).

La testostérone est donc nécessaire, de façon précoce, à cette masculinisation du nerf génito-fémoral, pour assurer une croissance puis une régression normale du gubernaculum (Amann et Veeramachaneni, 2007).

II. Etat actuel des connaissances sur la cryptorchidie

1. La cryptorchidie chez le chien

a. Définition

La cryptorchidie est une anomalie du développement définie comme étant un défaut dans la descente d'un ou des deux testicules vers le scrotum.

Lorsqu'un seul des deux testicules est concerné, on préférera le terme de « cryptorchidie unilatérale » à celui de « monorchidie » qu'on utilisera plutôt pour parler d'un individu n'ayant qu'un seul testicule, peu importe sa localisation (Romagnoli, 1991).

Un testicule cryptorchide peut donc logiquement être retrouvé sur l'ensemble du trajet de migration testiculaire, entre sa position abdominale haute initiale, et sa position scrotale normale lors d'absence d'anomalie.

On peut alors définir plusieurs « types » de testicules cryptorchides, comme selon cet article publié chez l'Homme (Mohta, 2004) :

- Un testicule descendu spontanément : on parle ici d'un testicule initialement non retrouvé en position scrotale mais finalement descendu spontanément et tardivement.
- Un testicule rétractile : on parle ici d'un testicule palpable légèrement au-dessus du scrotum, proche de sa position physiologique, et la plupart du temps normal en taille et en forme. Il peut être tiré et remis en position physiologique, mais finira par remonter vers sa position initiale.
- Un testicule glissant : Il s'agit d'un testicule inguinal que l'on peut tirer jusqu'à la base du scrotum mais qui revient en position inguinale dès que la tension est relâchée.
- Un testicule réellement non descendu : Il s'agit d'un testicule qui s'est arrêté sur son trajet migratoire entre le rétropéritoine et le scrotum.
- Un testicule ectopique : On parle alors d'un testicule qui a passé l'anneau inguinal externe mais qui n'a pas atteint le scrotum. Il peut alors être retrouvé dans des positions aberrantes comme le scrotum controlatéral, la région fémorale, ou la région périnéale.

b. Conséquences de la cryptorchidie

Un animal cryptorchide est prédisposé à plusieurs affections.

Tout d'abord, il a été montré par certaines études qu'un testicule cryptorchide présente de nombreux défauts histologiques, et qu'un animal cryptorchide présente une fertilité fortement diminuée, d'autant plus si la cryptorchidie est bilatérale (Romagnoli, 1991). Les mêmes constatations ont été faites chez l'Homme (Kurpisz *et al.*, 2010).

Il est également prouvé que la cryptorchidie est associée au développement de tumeurs testiculaires. En particulier, on aurait un risque 23 fois plus élevé pour les séminomes, et 16 fois plus élevé pour les sertolinomes. L'âge de survenue de ces tumeurs est également plus précoce dans la vie de l'animal (England *et al.*, 2011).

Les animaux cryptorchides sont également plus fréquemment sujets aux torsions testiculaires (Johnston *et al.*, 2001 ; Kurpisz *et al.*, 2010). En effet, un testicule cryptorchide possède une plus grande mobilité, notamment en position abdominale.

Enfin, la cryptorchidie est souvent associée à de nombreux autres défauts d'origine génétique, comme les hernies ombilicales ou inguinales, ou des défauts orthopédiques comme la dysplasie de la hanche ou la luxation de rotule (Romagnoli, 1991 ; Johnston *et al.*, 2001 ; « Guide pratique de reproduction clinique canine et féline », s. d.).

En raison de l'ensemble de ces conséquences, et parce qu'une origine héréditaire est suspectée, la cryptorchidie est considérée comme éliminatoire dans l'épreuve de confirmation pour de nombreuses races, empêchant l'animal d'obtenir son pedigree et de se reproduire en race pure. Comme évoqué en introduction, la cryptorchidie est également un vice rédhibitoire si l'animal est âgé de plus de 6 mois, pouvant donc dans certains cas être à l'origine d'une annulation de la vente d'un animal (« Article R213-2 - Code rural et de la pêche maritime - Légifrance », s. d.).

2. Pourquoi suspecte-t-on une cause génétique chez le chien?

La cryptorchidie est une maladie pour laquelle une cause génétique est suspectée, mais pas encore démontrée aujourd'hui.

En effet, pour mettre en évidence qu'une composante génétique est en cause, il faut d'abord montrer qu'il existe un excès de cas familiaux par rapport à la population générale (Abitbol et Chevallier, 2022).

La cause de cette suspicion pour la cryptorchidie vient dans un premier temps d'une étude basée sur l'étude de familles de Schnauzer nains comprenant des cryptorchides (Cox *et al.*, 1978).

Il a aussi été montré que parmi les chiens cryptorchides, un grand nombre provenaient d'accouplements avec de forts taux de consanguinité (Mialot, 1984).

Une étude allant encore dans le sens d'une cause génétique a été réalisée beaucoup plus récemment. Les auteurs ont évalué les données de sevrage de 11 230 portées dans 12 races de chiens de race pure et ont signalé un pourcentage très élevé de cryptorchides, diagnostiqués à 12 mois ou plus, issus d'accouplements entre porteurs présumés (parents d'au moins un individu cryptorchide préalablement identifié) comparé au pourcentage de cryptorchides dans la population globale avec 24,1 % contre 2,1%, respectivement (Gubbels *et al.*, 2009).

Mais pour pouvoir montrer avec certitude qu'une composante génétique est en cause, il faut montrer que cet excès de cas familiaux est dû à une composante génétique (Abitbol et Chevallier, 2022). Il faut donc se poser la question du biais d'environnement, puisqu'on ne peut exclure que la différence observée soit due à un élément environnemental présent dans les élevages.

Après correction des données, l'héritabilité de la cryptorchidie au sein d'une cohorte de naissance de 2 929 Boxers de race pure de 414 portées a été estimée à 0,23 en 2001 pour un modèle monogénique (Nielen *et al.*, 2001).

L'hypothèse que l'on retient aujourd'hui est celle de l'implication de nombreux gènes à faible pénétrance, dont l'association engendrerait une cryptorchidie, elle-même variable et dépendante d'autres gènes dits « gènes modificateurs », et de facteurs environnementaux (Mialot, 1984 ; Romagnoli, 1991 ; Khan *et al.*, 2018).

Des études supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre le mode de transmission de la cryptorchidie chez le chien et pour déterminer plus précisément les estimations d'héritabilité associée à ce caractère.

3. Gènes mis en cause jusqu'à aujourd'hui

Plusieurs analyses génétiques récentes ont étudié l'association de différents gènes candidats chez les chiens atteints de cryptorchidie.

Les principaux gènes étudiés seront présentés dans cette partie.

a. *INSL3* et *RXFP2*

INSL3 et son récepteur *RXFP2* ont fait l'objet de nombreuses études au cours des dernières années, notamment chez l'Homme et chez la Souris, de par leur implication dans le déroulement de la descente testiculaire.

En effet, une forte expression spécifique de *RXFP2* a été détectée au sein de plusieurs tissus d'intérêt dans le testicule en formation. De plus, il a été découvert que *RXFP2* est positivement régulé par *SOX9*, qui possède un rôle très important dans la formation du testicule (Feng *et al.*, 2009).

Chez le chien, une étude rapporte une substitution de l'acide aminé 22 de la protéine précurseur d'*INSL3* chez un Dalmatien de 1 an, cryptorchide bilatérale et atteint d'hypospadias. La corrélation entre l'atteinte présentée par ce chien et cette mutation n'est cependant pas démontrée (Cassata *et al.*, 2008).

De plus, une seconde étude sur ce même gène candidat pour la cryptorchidie canine n'a pas rapporté de différence de séquence entre un groupe de chiens sains et un groupe de chiens cryptorchides (Meyers-Wallen, 2009).

Dans une étude portant sur 22 chiens cryptorchides et 56 chiens sains de petites races âgés de 6 mois à 10 ans, les auteurs ont étudié la différence d'expression de l'ARNm de *INSL3*, et des concentrations tissulaires en *INSL3*, en répartissant les testicules étudiées en trois groupes : les testicules de chiens sains (testicules scrotaux normaux), les testicules de chiens cryptorchides unilatéraux et bilatéraux, et les testicules scrotaux des chiens cryptorchides unilatéraux (Hannan *et al.*, 2015).

Les concentrations d'ARNm d'*INSL3* étaient significativement plus élevées dans les testicules non descendus que dans les testicules normaux et les testicules scrotaux des chiens cryptorchides, et des différences similaires ont été observées pour le peptide *INSL3*.

A l'inverse, les quantités totales d'ARNm et de peptide *INSL3* par testicule non descendus étaient significativement inférieures aux quantités d'ARNm et de peptide *INSL3* par testicule normal en raison du poids plus faible des testicules non descendus (Hannan *et al.*, 2015).

Les concentrations et la quantité totale d'ARNm de *RXFP2* dans les testicules non descendus étaient presque nulles et inférieures à celles des testicules normaux et des testicules scrotaux des chiens cryptorchides.

Ces résultats suggèrent que *INSL3* dans les testicules non descendus des chiens cryptorchides est exprimé par unité de poids, mais peut être produit avec une quantité inférieure lorsqu'on s'intéresse à l'ensemble du testicule cryptorchide (Hannan *et al.*, 2015).

En outre, cette étude fournit des résultats selon lesquels le gène *RXFP2* est à peine exprimé dans les testicules non descendus mais l'est normalement dans les testicules scrotaux des chiens sains et cryptorchides (Hannan *et al.*, 2015).

Il est cependant important de noter que ces résultats ne signifient pas nécessairement que le récepteur n'a pas été exprimé pendant la période fœtale et néonatale chez les chiens cryptorchides. D'autres études seront donc nécessaires pour préciser l'implication de ces gènes dans l'apparition de la cryptorchidie.

De plus, deux autres études sur des SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) présents dans le gène *RXFP2* ne rapportent pas de différences significatives de fréquences alléliques entre les chiens cryptorchides et les chiens sains (Sironi *et al.*, 2007 ; Meyers-Wallen, 2009).

Ceci diffère des résultats obtenus chez l'Homme, où une variation d'un acide aminé de ce gène a été démontré comme étant associé à la présence de cryptorchidie chez l'individu (Bogatcheva *et al.*, 2007).

Une autre étude portant sur 28 fœtus de chiens mâles issus de neuf portées de chiennes de races moyennes, ainsi que sur les testicules et restes gubernaculaires de 4 chiens adultes sains et 9 chiens adultes cryptorchides, a suggéré un rôle de *RXFP2* dans la descente testiculaire.

En effet, l'étude du récepteur par immunolocalisation a montré sa présence dans les membranes cellulaires du muscles gubernaculaire, des tissus connectifs, et dans les cellules épithéliales du canal efférent (Arrighi *et al.*, 2010). Cette étude a montré que la présence de *RXFP2* dans ces tissus était limitée à une fenêtre gestationnelle allant environ de 35 à 45 jours, coïncidant avec la différenciation des gonades indifférenciées en testicules fonctionnels.

A nouveau, aucune immunoréactivité de *RXFP2* n'a été détectée dans les tissus de chiens adultes cryptorchides, mais comme précédemment, cela ne permet pas de conclure, car cela ne signifie pas que *RXFP2* n'était pas présent durant la période fœtale et néonatale.

b. *ESR1*

Des études menées sur d'autres espèces ont suggéré un rôle pour le gène *ESR1* (*Estrogen Receptor 1*) du récepteur $ESR\alpha$ dans la descente testiculaire et la cryptorchidie (Hutson *et al.*, 1997 ; Yoshida *et al.*, 2005 ; Galan *et al.*, 2007).

Au contraire, une étude impliquant 40 chiens cryptorchides et 68 chiens normaux de deux races (Teckels miniatures et Chihuahuas), de 5 mois à 16 ans, n'indique aucune association entre les SNP analysés dans la région 3' du gène *ESR1* et la cryptorchidie (Pathirana *et al.*, 2010).

En revanche, une immunoréactivité plus élevée de la protéine $ESR\alpha$ a été observée dans les testicules cryptorchides par rapport aux testicules scrotaux dans un échantillon de 18 Berger Allemand âgé d'un mois (Jung *et al.*, 2016).

Dans le testicule en position scrotale, l'immunoréactivité de la protéine $ESR\alpha$ n'a été détectée que dans les cellules de Leydig, alors que dans le testicule cryptorchide, l'immunoréactivité de la protéine $ESR\alpha$ était importante dans les cellules de Sertoli également (Jung *et al.*, 2016).

Cependant, dans une étude plus récente portant sur 10 chiens cryptorchides et 30 chiens sains, d'âges variables (de 1 à 7 ans) et de différentes races, l'immunoréactivité de la protéine ESR α n'a été détectée dans les testicules d'aucun des deux groupes. Il est donc possible que cette protéine ne soit retrouvée dans les testicules que pendant une fenêtre de temps restreinte chez le jeune, puis qu'elle ne soit plus exprimée chez l'adulte (Prapaiwan *et al.*, 2017).

En revanche dans cette étude, l'immunoréactivité de la protéine ESR β a été détectée dans tous les testicules et son expression était plus élevée dans les testicules de chiens sains par rapport aux testicules abdominaux et scrotaux des chiens cryptorchides (Prapaiwan *et al.*, 2017).

c. UCN et ses récepteurs CRHR1 et CRHR2

Une étude a suggéré des différences d'expression du gène de l'urocortine (*UCN*) et de ses récepteurs CRHR1 et CRHR2, entre des testicules normaux et cryptorchides.

Cette étude, impliquant cinq chiens normaux et cinq chiens cryptorchides unilatéraux, de races moyennes et d'âge allant de 2 à 8 ans, a montré une expression plus faible du gène *UCN* et du récepteur CRHR2 dans les testicules des chiens cryptorchides.

Sur la base des effets antitumoraux rapportés de l'*UCN* médiée par CRHR2 dans d'autres espèces, les auteurs ont émis l'hypothèse que l'expression inférieure de *UCN* et CRHR2 chez les chiens cryptorchides les prédisposent aux tumeurs testiculaires (Squillacioti *et al.*, 2019).

Malgré tout, il faut rester vigilant au regard de la taille réduite de l'échantillon.

Un lien entre UCN/CRHR et la migration testiculaire doit encore être démontré pour pouvoir aller plus loin.

d. Autres gènes candidats

Dans une étude d'association pangénomique (GWAS = *Genome-Wide Association Study*) portant sur 204 Husky de Sibérie mâles, dont 105 cryptorchides diagnostiqués à 6 mois, les auteurs ont identifié six régions génomiques situées sur les chromosomes 6, 9, 24, 27 et deux régions sur le chromosome X, potentiellement associées à la cryptorchidie.

Les auteurs ont également identifié trois gènes candidats sur les chromosomes 24, 27 et X, connus pour être fonctionnellement liés au remodelage de la matrice extracellulaire, et qui pourraient être impliqués dans l'allongement du gubernaculum et dans la descente testiculaire chez le chien (Zhao *et al.*, 2014).

Dans une publication séparée basée sur la même étude, les auteurs ont signalé l'identification d'une région candidate sur le chromosome 27 contenant le gène du récepteur de l'AMH de type II (*AMHR2*) associé à la cryptorchidie (Zhao *et al.*, 2013).

Il a déjà été montré que des mutations de ce gène provoquaient un syndrome de persistance du canal de Müller (PMDS) chez le Schnauzer nain (Wu *et al.*, 2009).

Cinquante pour cent des chiens atteints de PMDS sont cryptorchides unilatéraux ou bilatéraux (Meyers-Wallen, 2009), soulignant un potentiel lien entre cette région du chromosome 27, le PMDS, et la cryptorchidie, qui reste cependant à démontrer.

En utilisant une approche basée sur la connaissance de la fonction des gènes, des auteurs ont évalué 20 gènes candidats pour leur association avec la cryptorchidie.

Dans un essai préliminaire sur 38 frères et sœurs, sept SNP identifiés dans un gène codant pour la chaîne α du collagène de type II (*COL2A1*), ont été observés comme étant associés à la cryptorchidie, mais cette association n'a pas été retrouvée lorsque les analyses ont été étendues pour inclure l'intégralité des 156 chiens cryptorchides ou apparentés recrutés dans l'étude (Zhao *et al.*, 2010).

De nouvelles études utilisant une approche GWAS pour découvrir de nouveaux gènes candidats, et impliquant des chiens de races différentes sont nécessaires pour obtenir une meilleure compréhension de l'implication des facteurs génétiques dans la cryptorchidie chez le chien et pour étudier si les mécanismes génétiques sous-jacents à la cryptorchidie sont similaires ou différents entre les différentes races de chiens.

4. Autres causes possibles de la cryptorchidie

a. Causes anatomiques

La cryptorchidie étant par définition un défaut de la descente testiculaire, toute anomalie anatomique gênant ce processus peut conduire à l'apparition de cette affection (Hutson *et al.*, 1997).

Il peut s'agir par exemple, d'une persistance du ligament suspenseur crânial empêchant le bon déroulement de la translocation abdominale (Mialot, 1984).

Il peut également s'agir d'un mauvais positionnement du bulbe gubernaculaire, guidant alors le testicule dans une mauvaise position plutôt qu'à l'entrée du canal inguinal (Romagnoli, 1991).

Enfin, une disproportion de taille entre le testicule et le canal inguinal peut gêner voir empêcher la migration transinguinale du testicule, hypothèse en accord avec la plus grande incidence de la cryptorchidie chez les chiens de petite race (Romagnoli, 1991).

b. Causes endocriniennes

Les causes endocriniennes sont également souvent évoquées comme cause possible de cryptorchidie.

De par son rôle de masculinisation du nerf génito-fémoral, la testostérone est un élément très important dans le bon déroulement de la descente testiculaire. Une quantité insuffisante de testostérone ou une insensibilité aux androgènes provoquent une migration inguinoscrotale incomplète, et on retrouve alors des testicules cryptorchides en position abdominale ou inguinale (Hutson *et al.*, 1997).

Comme expliqué précédemment, une cause endocrinienne connue est l'association entre PMDS et cryptorchidie chez les animaux avec un défaut de sécrétion de l'AMH. Cette association a été étudiée dans des familles de Schnauzer Nain (Marshall *et al.*, 1982).

Enfin, chez l'Homme, des déficits hypothalamiques ou hypophysaires sont souvent en cause. Des traitements médicaux, à base de GnRH notamment, ont permis la descente testiculaire chez de nombreux enfants. En revanche, l'efficacité de ce traitement n'a pas été le sujet de beaucoup d'études chez le chien, cette cause doit donc encore être démontrée dans cette espèce (Johnston *et al.*, 2001).

c. Causes environnementales

De nombreux facteurs environnementaux ont été découverts chez l'Homme.

Le premier d'entre eux est l'exposition de la mère aux œstrogènes au cours de la grossesse. Ceux-ci inhibent la sécrétion d'INSL3 et des androgènes, rejoignant alors les explications données plus haut sur les causes génétiques et endocriniennes. Chez l'Homme, le risque de cryptorchidie est multiplié par 2,9 suite à une exposition de la mère aux œstrogènes (Palmer *et al.*, 2009).

De nombreuses molécules comme les phtalates ou certains pesticides, ayant une action dites oestrogen-*like* ou anti-androgène, ont la capacité d'inhiber la descente testiculaire chez les rongeurs (Toppari *et al.*, 2006).

Dans un autre rapport récent, il a été suggéré que certains produits chimiques de l'environnement, y compris le phtalate de diéthylhexyle (DEHP) et le biphényle polychloré 153 (PCB153), pourraient accroître l'incidence de la cryptorchidie (Lea *et al.*, 2016).

Cependant, des études de corrélation directe entre les produits chimiques environnementaux et la cryptorchidie font défaut.

Enfin, une étude menée chez l'Homme a montré un lien entre la prise d'antalgique de palier 1 (ici le paracétamol, l'ibuprofène et l'acide acétylsalicylique) et une masculinisation réduite chez l'animal. En effet, ces molécules auraient, à partir de certaines doses, une action anti-androgénique pouvant être comparable à celle des phtalates (Kristensen *et al.*, 2011).

Cependant, aucune étude similaire n'a été réalisée chez le chien pour évaluer les effets des antalgiques utilisés dans cette espèce.

III. Rappels sur les modes de transmission des maladies héréditaires

Les rappels cités dans la partie III sont adaptés du polycopié d'enseignement de génétique de 1^{ère} année à l'EnvA (Abitbol et Chevallier, 2022).

1. Modes de transmission monogéniques

a. Transmission autosomique récessive

Dans le cas d'un mode de transmission autosomique récessif, le phénotype n'est exprimé que si l'individu est homozygote « atteint », c'est-à-dire ayant deux copies d'un allèle muté.

Un individu affecté est généralement issu de parents hétérozygotes, donc non affectés, ce que l'on appelle des porteurs asymptomatiques (=porteurs sains).

Après la naissance d'un individu atteint issus de deux individus cliniquement sains, chaque nouveau-né supplémentaire a un risque de 25% d'être atteint.

On observe également une fréquence de la maladie plus élevée dans le cas de mariages consanguins.

b. Transmission autosomique dominante

Dans le cas d'un mode de transmission autosomique dominante, le phénotype est exprimé dès lors que l'individu possède un allèle atteint. un individu atteint peut être homozygote ou hétérozygote pour l'allèle muté.

Ainsi, on peut en déduire qu'au moins l'un des parents d'un individu affecté est généralement affecté. Le caractère d'intérêt peut être transmis par les deux sexes.

Un individu né d'un mariage entre un individu affecté (hétérozygote) et un individu sain a un risque de 50% d'être affecté.

c. Transmission récessive liée à l'X

Ce mode de transmission fonctionne de la même façon que le mode autosomique récessif, sauf que le gène d'intérêt se situe sur le chromosome X.

L'affection touche à peu près exclusivement des individus mâles, et on remarque que les mâles atteints naissent généralement de parents non atteints avec une mère qui est porteuse asymptomatique (ou conductrice).

Il n'y a pas de transmission du caractère ou de la maladie d'un individu mâle à un individu mâle dans le pedigree puisque le père transmet son chromosome Y aux descendants mâles, même si le

croisement d'un mâle atteint et d'une femelle porteuse asymptomatique peut donner l'apparence d'une transmission d'un individu mâle à un individu mâle.

d. Transmission dominante liée à l'X

Ce mode de transmission fonctionne de la même façon que le mode autosomique dominant, sauf que le gène d'intérêt se situe sur le chromosome X. L'affection touche les deux sexes, et les femelles plus souvent que les mâles.

Les troubles sont le plus souvent moins sévères chez les femelles hétérozygotes affectées que chez les mâles affectés, et un individu né d'une femelle affectée a un risque de 50% d'être affecté, indépendamment de son sexe.

Un mâle affecté croisé avec une femelle saine transmet le phénotype à toutes ses filles, mais à aucun de ses fils puisqu'il leur transmet son chromosome Y.

e. Transmission liée à l'Y

Lorsque le gène est lié au chromosome Y, la maladie ne touche que les mâles. Un individu exprime la maladie dès lors qu'il possède un chromosome Y muté.

L'affection affecte seulement les mâles, et tous les mâles affectés ont un père affecté. Tous les fils d'un mâle affecté sont affectés, cela est dû au fait qu'un mâle affecté transmettra nécessairement son chromosome Y, et donc la mutation en cause, à l'ensemble de ses fils.

f. Transmission maternelle (par l'ADN mitochondrial)

Ce mode de transmission concerne les mutations contenues dans l'ADN mitochondrial.

Seules les femelles transmettent de l'ADN mitochondrial à leurs descendants.

Une maladie liée à l'ADN mitochondrial chez une femelle se transmet à chacun de ses descendants, quel que soit son sexe. Selon la proportion de mitochondries porteuses de la mutation transmise aux descendants, la maladie présentera une expressivité variable.

2. Modèles polygénique et mixte, hétérogénéité génétique

Pour la grande majorité des affections, le mode de transmission n'est pas monogénique. Leur transmission est plus complexe, et répond à d'autres modèles.

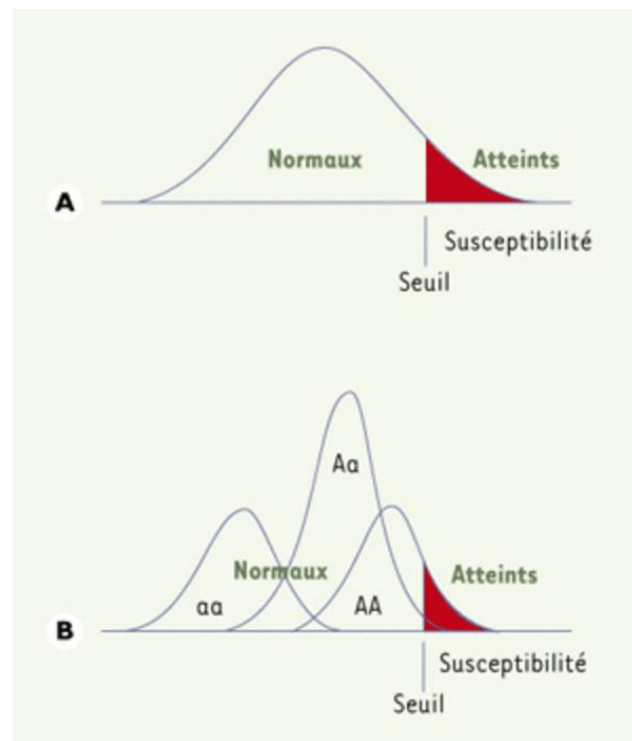
Les deux modèles les plus fréquents sont le modèle polygénique (ou multifactoriel) et le modèle mixte.

Dans le modèle polygénique ou multifactoriel, la maladie est déterminée par un grand nombre de gènes qui se transmettent individuellement selon l'un des modèles cités ci-dessus, et par des facteurs environnementaux. L'effet individuel de ces gènes est faible. Selon le génotype d'un individu et l'environnement dans lequel il évolue, un individu sera plus ou moins susceptible de développer la maladie (Feingold, 2005).

Dans le modèle mixte, la maladie est déterminée par un gène à effet majeur se transmettant selon l'un des modèles cités ci-dessus, mais dont l'effet est modulé par des polygènes modificateurs, avec de nouveaux un grand nombre de gènes et de facteurs environnementaux à effet faible modulant la sensibilité d'un individu à présenter la maladie (Feingold, 2005).

La figure 6 ci-dessous présente des exemples de courbes de répartition de la population pour ces deux modèles.

Figure 6 : Représentation graphique de la répartition d'une maladie dans la population selon les modèles polygénique et mixte.



A. Modèle polygénique B. Modèle mixte
(issu de Feingold, 2005).

Enfin, au sein d'une même espèce comme l'espèce canine, une même affection peut être causée de manière indépendante par des gènes différents en fonction des familles ou des races. Ainsi, il est possible qu'un gène mis en cause dans l'apparition d'une affection au sein d'une famille ne soit pas celui qui induit la même affection au sein d'une autre famille (ou race). On parle alors d'hétérogénéité génétique.

3. Pénétrance incomplète et expressivité variable

Les interactions entre gènes, ou entre allèles, au sein du génome sont nombreuses et complexes. Ces interactions entraînent fréquemment des variations phénotypiques chez des individus partageant un même génotype.

Il est possible, par exemple, que pour un même génotype, le phénotype exprimé par deux individus soit différent. On parle alors d'expressivité variable.

De plus, on observe parfois que pour un même génotype, le caractère étudié ne sera pas forcément exprimé. On parle alors de pénétrance incomplète. On peut alors calculer un taux de pénétrance, correspondant au nombre d'individus exprimant le caractère rapporté au nombre d'individus porteurs du génotype en cause (Abitbol et Chevallier, 2022).

Deuxième partie :

Etude expérimentale : Analyse d'arbres généalogiques de familles de chiens atteints et constitution d'une cohorte de chiens atteints de cryptorchidie et de chiens apparentés

I. Introduction

Cette partie bibliographique nous montre que l'origine de la cryptorchidie n'est aujourd'hui pas encore clairement déterminée. Une implication génétique est suspectée et certains locus nécessitent d'être encore étudiés.

L'objectif de cette partie expérimentale a donc été de collecter des prélèvements de chiens cryptorchides et de leurs apparentés pour commencer la création d'une cohorte d'individus au sein de la banque d'ADN canin Cani-DNA permettant la réalisation de futures études génétiques sur le sujet.

Nous avons pris contact avec des élevages de chiens dont certains individus étaient atteints de cryptorchidie. En récupérant avec l'accord des éleveurs les données de l'élevage, nous avons retracé une généalogie des chiens de l'élevage où sont indiqués les individus atteints. Ces arbres ont été étudiés afin d'analyser la transmission de la cryptorchidie dans ces familles.

En parallèle, les éleveurs nous ont transmis les coordonnées des propriétaires actuels des individus issus de portées comprenant des chiens cryptorchides, afin que nous puissions les contacter pour récupérer les pedigrees et des échantillons d'ADN de ces individus atteints et de leurs apparentés.

Le service de reproduction du ChuvA a également effectué des prélèvements de sang sur les individus cryptorchides présentés en consultation avec le consentement des propriétaires, toutes races de chiens confondues, dans le but d'étoffer notre cohorte, qui pourra servir à de futures analyses génétiques.

II. Matériel et méthode

1. Matériel

Deux élevages nous ont contacté, un élevage de Berger Blanc Suisse et un autre élevage de Spitz des Visigoths, et nous ont transmis les informations concernant les chiens issus de l'élevage.

Avec l'aide des éleveurs, nous avons pu contacter les propriétaires ayant adopté les chiens de ces portées, afin de leur faire réaliser des frottis buccaux et extraire l'ADN de ces chiens.

Nous avons reçu des réponses avec 13 frottis buccaux :

- 8 frottis buccaux de Berger Blanc Suisse apparentés et leur pedigree, comprenant 5 mâles atteints, 2 mâle sain, et 1 femelle.
- 5 frottis buccaux de Spitz des Visigoths apparentés et leur pedigree, 1 mâle atteint et 4 femelles.

En parallèle, nous avons collecté 27 échantillons de sang prélevé sur tube EDTA, provenant de chiens cryptorchides (toutes races confondues) reçus en consultation au service de reproduction du ChuvA.

2. Méthode

a. Recrutement des chiens, recueil des pedigrees et des prélèvements

Une communication écrite (reproduite en Annexe 1) demandant la participation volontaire d'éleveurs de chiens souhaitant nous aider à comprendre cette affection a été publié sur le site de la Société Centrale Canine.

Les propriétaires ont été contactés par courrier, après que les éleveurs les aient prévenus de notre démarche.

Le courrier envoyé contenait une lettre explicative pour que nos objectifs et le sens de notre démarche soient clairs (Annexe 2).

Il contenait aussi un jeu de deux cytobrosses pour chaque individu à prélever, une fiche (Annexe 3) pour expliquer la réalisation des prélèvements, ainsi qu'une fiche de consentement éclairé concernant l'utilisation des prélèvements à des fins de recherche, que les propriétaires des chiens devaient signer (Annexe 4).

Pour les échantillons sanguins, ceux-ci ont été prélevés sur tube EDTA sur des chiens cryptorchides lors de leur présentation au service de reproduction avec accord écrit des propriétaires (Annexe 5), puis directement transmis au laboratoire de génétique de l'EnvA (U955-IMRB, Team 10-Biology of the neuromuscular system, Inserm, UPEC, Ecole nationale vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, France) par les cliniciens du service de reproduction.

b. Phénotypage des chiens

Pour les chiens recrutés par le biais des élevages, la cryptorchidie a été diagnostiquée par le vétérinaire de l'élevage par palpation testiculaire après les 6 mois de l'animal.

Pour les chiens recrutés par le service de reproduction du ChuvA, le diagnostic de cryptorchidie est fait par échographie et palpation systématiquement.

c. Extraction d'ADN et stockage

A partir de ces différents échantillons, l'ADN génomique des chiens a été extrait du sang total prélevé sur tube EDTA à l'aide du kit de purification d'ADN sanguin Max-well® 16 ou des cellules buccales à l'aide du kit de purification d'ADN Max-well® 16 Buccal Swab LEV, tous deux utilisant l'instrument Maxwell® 16 (Promega, Dübendorf, Suisse) selon les protocoles présentés en annexes 5 et 6.

Après extraction, l'ADN des chiens prélevés était stocké à -20°C dans la biobanque canine Cani-DNA (<http://dog-genetics.genouest.org>).

d. Test statistique

Les nombres de chiens atteints et sains ont été comparés aux nombres attendus pour chaque mode de transmission discuté.

Les effectifs sont présentés dans un tableau comme suit :

Tableau 1 : Modèle de tableau pour le calcul d'un Chi² de comparaison entre un effectif observé et un effectif attendu.

	Atteints	Sains	Total
Observé	O _A	O _S	N
Attendu	A _A	A _S	N

N = Nombre total d'individus observés

O_A = Nombre de mâles cryptorchides observés

O_S = Nombre de mâles sains observés

A_A = Nombre de mâles cryptorchides attendus

A_S = Nombre de mâles sains attendus

On calcul alors le Chi2 avec la formule suivante :

$$D_{\text{obs}} = (O_A - A_A)^2 / A_A + (O_S - A_S)^2 / A_S$$

Pour un niveau de confiance à 95% (risque d'erreur $\alpha = 5\%$), on rejette l'hypothèse du mode de transmission étudié si $D_{\text{obs}} > 3,84$.

Le calcul des intervalles de confiance d'un pourcentage sont calculés selon la formule suivante :

$$\hat{\pi} \pm 1,96 \times \sqrt{(\hat{\pi}(1-\hat{\pi})/n)}$$

Avec n l'effectif total, et $\hat{\pi}$ le pourcentage étudié.

e. Construction des arbres généalogiques


Les arbres généalogiques ont été dessinés à l'aide du logiciel GenoPro® (version 3.1.0.1).


III. Résultats


1. Arbres généalogiques


Les pedigrees recueillis pour les deux élevages ainsi que les données phénotypiques des chiens transmises par les éleveurs ont permis la réalisation d'arbres généalogiques.

Figure 7 : Légende des figures 8 à 11.

 = Femelle saine

 = Mâle sain

 = Mâle cryptorchide

 = Individu dont l'ADN à été récolté

n/N = Nombre d'individus cryptorchides / Nombre de mâles dans la fratrie

Figure 8 : Arbre généalogique d'une famille de Spitz des Visigoths atteinte de cryptorchidie.

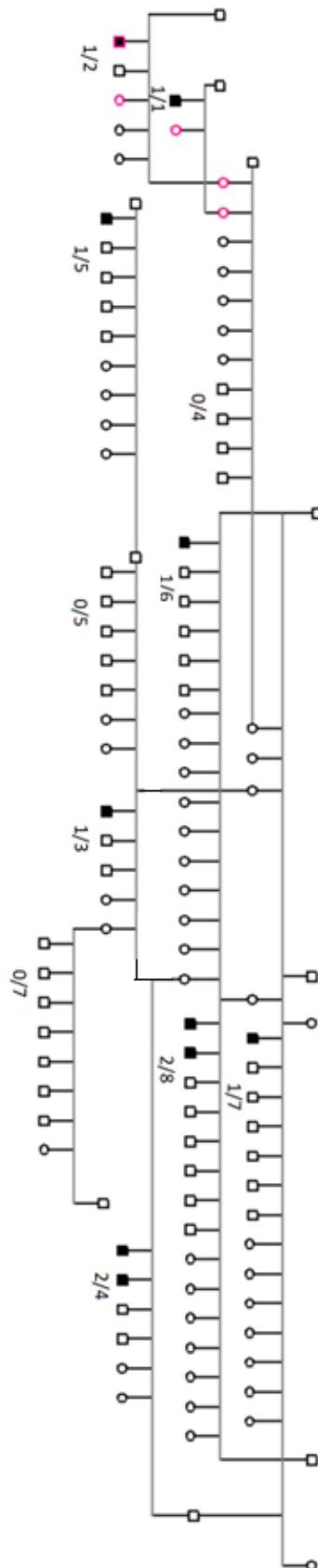
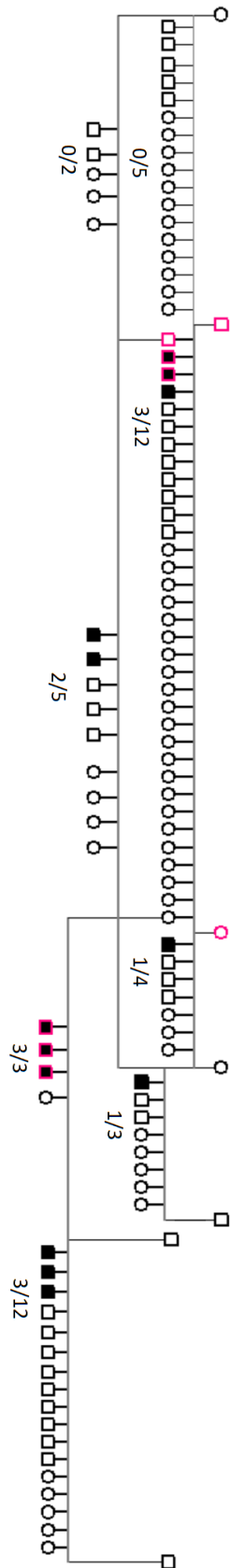


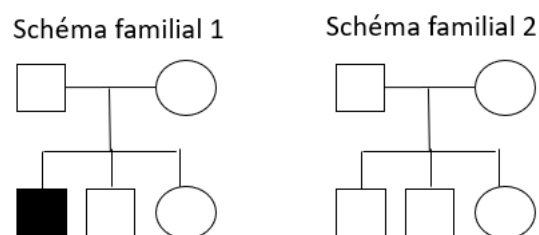
Figure 9 : Arbre généalogique d'une famille de Berger Blanc Suisse atteinte de cryptorchidie.



Concernant les arbres généalogiques présentés figures 8 et 9, on notera les éléments suivants :

- Les femelles n'étant pas concernées par le phénomène de descente testiculaire, il n'y a que des mâles atteints.
- Les mâles atteints étant écartés de la reproduction en race pure, les parents de mâles atteints sont dans ces deux familles toujours des individus sains.
- Lorsque l'on considère les portées issues d'un accouplement ayant donné au moins un fils atteint (soit un total de 39 chiots mâles pour les Berger Blanc Suisse et 36 chiots mâles pour les Spitz des Visigoths), on dénombre 13 chiots atteints, soit 13/39 soit 33% de descendants atteints chez les Berger Blanc Suisse et 10 chiots atteints, soit 10/36 soit 28%, chez les Spitz des Visigoths.
- On observe dans ces arbres généalogiques deux schémas familiaux (autrement dit deux types de familles nucléaires) (Figure 10) : (1) des parents cliniquement sains avec des fils sains et atteints, et (2) des parents cliniquement sains avec des fils sains uniquement (les filles et les mères étant toujours saines, car n'ayant pas de testicules).

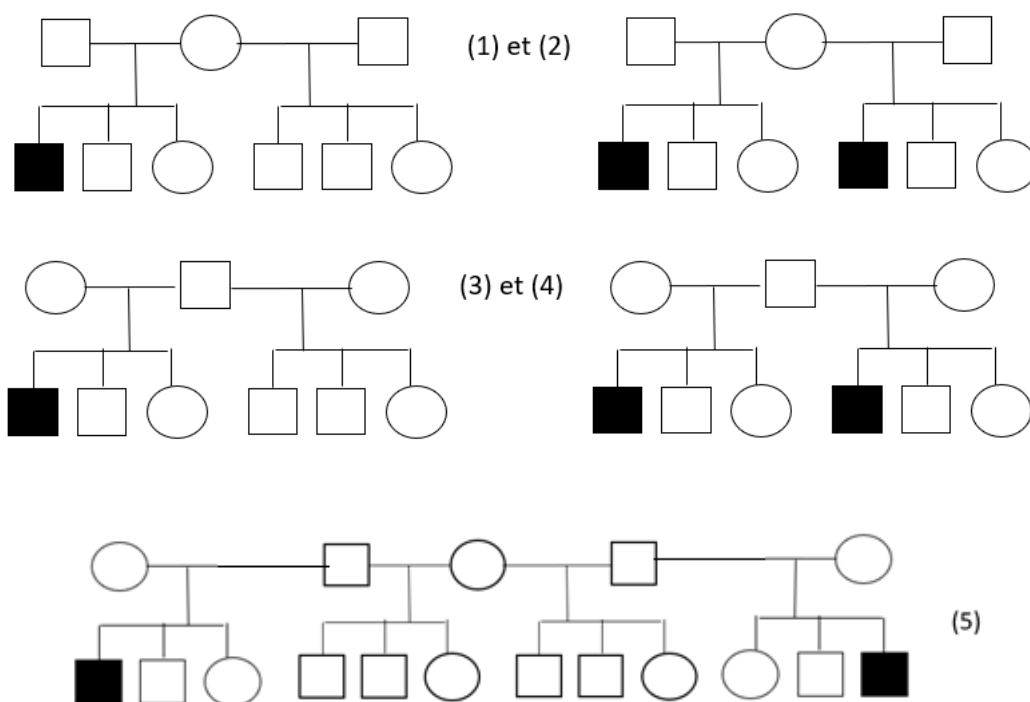
Figure 10 : Schémas des deux types de familles nucléaires retrouvées dans les arbres généalogiques étudiés.



- Dans la famille des Spitz des Visigoths, on recense dans l'arbre 11 fratries, dont 8 présentent au moins un cas de cryptorchidie. Parmi ces fratries, deux sont issues de mariages consanguins et 6 non consanguins (selon la profondeur de génération connue ici).
- Dans la famille des Berger Blanc Suisse aucun accouplement entre chiens apparentés n'est présent.

- En ce qui concerne l'étude des demi-frères, dans la famille des Spitz des Visigoths, on remarque quatre schémas possibles (figure 11) : (1) une femelle accouplée avec un mâle donne des fils atteints et avec un autre mâle ne donne pas de fils atteints, (2) une femelle donne des fils atteints avec tous les mâles avec qui elle est accouplée, (3) un mâle accouplée avec une femelle donne des fils atteints et avec une autre femelle ne donne pas de fils atteints, (4) un mâle donne des fils atteints avec toutes les femelles avec qui il est accouplé. En ce qui concerne l'étude des demi-frères, dans la famille des Berger Blanc Suisse, on remarque les schémas (2), (3) et (4) ainsi qu'un schéma supplémentaire (5) avec une femelle accouplée à deux mâles différents qui ne donne pas de fils atteints (0/2 et 0/5 respectivement) alors que ces deux mâles ont des fils atteints avec d'autres femelles. L'ensemble de ces schémas est représenté dans la figure 11.

Figure 11 : Schémas des 5 situations retrouvés dans l'étude des demi-frères dans les arbres généalogiques étudiés



- Dans l'arbre des Spitz des Visigoths, on remarque que l'accouplement de femelles de la famille atteinte avec des mâles non apparentés donne des fils atteints (1/5, 1/1 et 1/2, Figure 8). C'est également le cas chez les Berger Blanc Suisse (3/3 et 3/12, Figure 9).

2. Banque d'ADN

Au total, une cohorte de 40 chiens, dont 33 chiens atteints et de 7 chiens apparentés sains a été créée au sein de la biobanque d'ADN canine de l'EnvA (faisant partie de Cani-DNA).

Cette cohorte comprend des chiens de races ou d'apparences raciales diverses (Berger Blanc Suisse (n=9), Spitz des Visigoths (n=5), Spitz (n=2), Chihuahua (n=3), Cavalier King Charles (n=2), Teckel (n=2), Bouledogue anglais (n=1), Berger des Pyrénées(n=1), Fila de Sao Miguel (n=1), Staffordshire Bull Terrier (n=1), Berger Allemand (n=4), Bichon Maltais (n=1), Labrador (n=2), Coton de Tuléar (n=1), Husky Sibérien (n=1), Bull Terrier (n=1), Yorkshire Terrier (n=1), Golden Retriever (n=1)) et 1 croisé.

Leur âge lors du prélèvement est compris entre 6 mois (âge minimum du diagnostic de la cryptorchidie) et 7,5 ans.

Parmi les individus cryptorchides observés, 3 individus présentaient une cryptorchidie bilatérale (2 inguinales bilatérales et 1 inguinale à droite et abdominale à gauche), et 32 individus étaient atteints de cryptorchidie unilatérale (10 abdominales gauches, 9 abdominales droites, 3 inguinales gauches et 10 inguinales droites).

Cette cohorte pourra être étoffée au fil des consultations de reproduction au ChuvA et permettra par la suite la réalisation d'études sur l'ensemble du génome afin d'identifier d'éventuels locus, puis gènes candidats pour la cryptorchidie.

IV. Discussion

1. Caractère héréditaire de la cryptorchidie dans les deux familles étudiées

Comme citées précédemment, plusieurs études ont déterminé la prévalence de la cryptorchidie dans l'espèce canine (Romagnoli, 1991 ; Johnston *et al.*, 2001 ; Yates *et al.*, 2003).

Une de ces études, menée sur 3518 chiens donne finalement une incidence corrigée entre 3,3 et 6,8% (Yates *et al.*, 2003).

Dans les deux familles de chiens étudiées, on obtient 19% de chiens atteints de cryptorchidie dans la famille de Spitz des Visigoths, et 28% de chiens atteints de cryptorchidie dans la famille de Berger Blanc Suisse (respectivement 10 chiens atteints sur un total de 52 et 13 sur 46).

Il semblerait donc qu'il y ait un écart important entre la prévalence dans la population globale et au sein de ces deux familles.

Ainsi, il semblerait qu'il y ait un excès de cas dans ces deux familles. Un excès de cas familiaux peut avoir deux causes distinctes. Soit on observe plus de cryptorchides dans ces familles à cause de facteurs environnementaux partagés, soit à cause de facteurs génétiques partagés, soit les deux.

En effet, les familles partagent des gènes mais aussi un environnement, et il reste à prouver que celui-ci n'est pas seul en cause dans la surreprésentation de la cryptorchidie chez les individus de cette famille par rapport à la population globale. Ici, nous avons trop peu d'informations sur les conditions d'élevages pour l'exclure. Il semble néanmoins peu probable que des facteurs environnementaux communs soient la cause unique d'une anomalie de descente testiculaire. Par ailleurs les deux races étudiées présentent une taille et une morphologie très différentes, ce qui suggère que ces deux critères-là ne sont pas impliqués de manière majeure.

Comme nous l'avons vu dans la partie I concernant les rappels sur les modes de transmission, la part de la génétique est variable en fonction des maladies, allant d'affections purement environnementales à complètement génétiques.

Pour ce qui est de la cryptorchidie dans les deux familles étudiées, si nous émettons l'hypothèse de l'intervention d'un ou de plusieurs facteurs génétiques, nous pouvons discuter des modes de transmission les plus probables, monogénique lié au sexe ou autosomique, puis polygénique en se basant sur l'analyse des arbres généalogiques construits à partir des pedigrees et des données phénotypiques collectées.

a. Discussion sur une transmission liée au sexe

- Exclusion d'une transmission liée au chromosome Y

Comme rappelé précédemment, lors d'une transmission liée au chromosome Y, tous les fils d'un mâle atteint sont atteints, et tout individu atteint est issu d'un père atteint également.

En effet, si le gène en cause dans cette affection se situait sur le chromosome Y, un mâle atteint tiendrait forcément son gène défaillant du chromosome Y de son père.

Dans nos arbres, aucun mâle atteint ne descend d'un père atteint, d'autant qu'un mâle atteint de cryptorchidie est normalement écarté de la reproduction.

Il est donc hautement improbable que ce mode de transmission soit celui en cause au sein de nos deux familles.

- Une transmission dominante liée au chromosome X est-elle envisageable ?

Dans le cas de la cryptorchidie, un mâle atteint est écarté de la reproduction, donc un mâle reproducteur serait forcément porteur de l'allèle sain (génotype X+Y, avec + l'allèle sain). Ainsi, a priori, les femelles ont hérité d'un allèle sain de leur père. Ce qui signifierait qu'une femelle ayant un fils atteint serait de génotype X+X_m, avec m l'allèle muté.

Ainsi, l'affection serait transmise par la mère, avec une proportion attendue de 50% de fils atteints (car chaque fils a dans ce cas une chance sur deux d'hériter du chromosome X muté de sa mère).

L'analyse des arbres généalogiques montre que pour les couples qui ont au moins un fils atteint :

- chez les Berger Blanc Suisse 13 chiots mâles sont atteints sur 39 mâles produits au total, soit 33% de descendants atteints.

- 10 chiots mâles sont atteints sur 36 chiots mâles en tout, soit 28% chez les Spitz des Visigoths.

On peut alors réaliser un test de Chi² à 1 degré de liberté (ddl) partir des effectifs de chiens observés et attendus selon ce mode de transmission :

Tableau 2 : Effectifs observés et attendus de mâles cryptorchides chez les Berger Blanc Suisse sous l'hypothèse d'une transmission dominante liée à l'X.

Berger Blanc Suisse	Cryptorchides	Sains	Total
Observé	13	26	39
Attendu	19,5	19,5	39

Tableau 3 : Effectifs observés et attendus de mâles cryptorchides chez les Spitz des Visigoths sous l'hypothèse d'une transmission dominante liée à l'X.

Spitz des Visigoths	Cryptorchides	Sains	Total
Observé	10	26	36
Attendu	18	18	36

Nos effectifs observés et attendus sont tous supérieurs à 5 donc les conditions pour la réalisation du test Chi2 sont valides.

On peut donc calculer la valeur du Chi2 :

$$D_{\text{obs BBS}} = (10-18)^2/18 + (26-18)^2/18 = 4,33$$

$$D_{\text{obs SdV}} = (10-18)^2/18 + (26-18)^2/18 = 7,1$$

Donc pour nos deux familles, la valeur du Chi2 obtenue est supérieure à la valeur seuil de 3,84. La p-value associée est donc inférieure à 0,05. Il y a donc une différence significative entre les effectifs observés et attendus selon un mode de transmission dominant lié à l'X.

Dans nos familles, le nombre d'individus cryptorchides est significativement inférieur aux nombres attendus en cas de transmission dominante liée à l'X.

Nous pouvons donc rejeter ce mode de transmission avec un degré d'erreur de 5%.

- Transmission récessive liée au chromosome X

On rappelle que concernant la cryptorchidie, un mâle atteint étant systématiquement écarté de la reproduction, les pères ne peuvent pas être porteurs de l'allèle en cause sur leur chromosome X (génotype X+Y).

Dans cette hypothèse, les femelles ayant au moins un fils atteint seraient donc toutes hétérozygotes (génotype XmX+) puisqu'elles héritent forcément d'un X sain de leur père.

Ainsi, de la même façon que pour le mode de transmission lié à l'X dominant, 50% des fils de cette mère devraient hériter de l'allèle atteint et être cryptorchides.

Nous retrouvons la même situation que pour une transmission dominante liée au chromosome X, avec le même calcul de Chi2. Nous pouvons donc rejeter ce mode de transmission avec un degré d'erreur de 5%.

Ainsi, l'analyse statistique des effectifs de chiots mâles atteints et non atteints dans les fratries comportant au moins un atteint nous permet d'exclure, avec une erreur de 5%, un mode de transmission lié au sexe. Néanmoins, une transmission liée à l'X dominante ou récessive avec une pénétrance incomplète reste possible.

b. Discussion sur l'hypothèse d'une transmission autosomique

- Hypothèse d'une transmission autosomique dominante

On rappelle dans le cas de la cryptorchidie, que les mâles atteints sont écartés de la reproduction et que les femelles n'expriment pas le phénotype. Ainsi dans l'hypothèse d'un mode de transmission autosomique dominant, les mâles reproducteurs seraient donc tous homozygotes sains.

Ce serait donc les mères qui seraient « porteuses » et qui transmettraient cet allèle dominant, mais sans pouvoir l'exprimer puisqu'elles n'ont pas de testicules (génotype +/- avec + l'allèle sain et - l'allèle muté).

Pour évaluer ce mode de transmission nous pouvons nous baser sur la proportion de mâles atteints dans les fratries issues de parents ayant au moins un descendant atteint.

Statistiquement, une femelle hétérozygote a 50% de chance de transmettre l'allèle muté à chacun de ses descendants. On devrait donc trouver 50% de mâles atteints dans les fratries des femelles ayant au moins un fils atteint.

Dans le cas où la pénétrance de l'allèle muté serait complète, la situation se trouve être à nouveau la même que pour les modes de transmission liés à l'X précédemment cités, et nous avons montré que le nombre de fils atteints attendus et observés sont significativement différents. Nous pouvons donc rejeter le mode de transmission autosomique dominant à pénétrance complète avec un degré d'erreur de 5%.

Si un mode de transmission autosomique dominant à pénétrance complète est très probablement exclu, en revanche, un mode de transmission autosomique dominant à pénétrance incomplète est envisageable.

Dans ce cas-là, la pénétrance de l'allèle muté serait de 13/19,5 soit $67 \pm 21\%$ dans la famille de Berger Blanc Suisse et de 10/18 soit $56 \pm 23\%$ dans la famille des Spitz des Visigoths. Evidemment un calcul précis de la pénétrance nécessiterait de connaître l'allèle muté et d'étudier la corrélation génotype-phénotype sur un plus grand nombre d'animaux.

- Hypothèse d'une transmission autosomique récessive

Pour un mode de transmission autosomique récessif, un individu atteint est nécessairement homozygote pour l'allèle en cause dans l'affection.

Les mâles atteints étant écartés de la reproduction, les pères de mâles atteints seraient donc nécessairement hétérozygotes, puisqu'ils transmettent forcément à leur fils atteint l'allèle en cause.

Les femelles ne pouvant exprimer la cryptorchidie, les mères de mâles atteints seraient donc soit homozygotes, soit hétérozygotes pour l'allèle en cause.

Dans le cas où la mère serait homozygote, elle transmettrait toujours l'allèle atteint, et les fils issus de couples ayant au moins un fils atteint auraient donc une chance sur deux d'être cryptorchides.

Dans le cas où les deux parents seraient hétérozygotes, autrement dit porteurs sains, chaque descendant mâle aurait 1 chance sur 4 d'hériter de deux copies de l'allèle et donc d'être cryptorchide.

Ce dernier cas est plus probable que le précédent (mère homozygote) sauf si le niveau de consanguinité des mères de ces élevages sont élevés. Nous ferons l'hypothèse que les mères sont hétérozygotes pour réaliser les calculs d'effectifs attendus, mais il est possible que la réalité soit un entre deux avec la plupart des mères hétérozygotes et certaines homozygotes mutées.

Sous l'hypothèse d'un mode de transmission autosomique récessif avec des parents porteurs sains, le calcul de Chi2 se fait en dénombrant les chiots cryptorchides dans les fratries comportant au moins un atteint et les effectifs attendus correspondent à ¼ du nombre total de mâles dans les fratries.

On obtient les effectifs suivants :

Tableau 4 : Effectifs observés et attendus de cryptorchides chez les Berger Blancs Suisse sous l'hypothèse d'une transmission autosomique récessive avec deux parents hétérozygotes.

Berger Blancs Suisses	Cryptorchides	Sains	Total
Observé	13	26	39
Attendu	9,75	29,25	39

Tableau 5 : Effectifs observés et attendus de cryptorchides chez les Spitz des Visigoths sous l'hypothèse d'une transmission autosomique récessive avec deux parents hétérozygotes.

Spitz des Visigoths	Cryptorchides	Sains	Total
Observé	10	26	36
Attendu	9	27	36

Nos effectifs observés et attendus sont tous supérieurs à 5 donc les conditions pour la réalisation du test Chi2 sont valides.

On peut donc calculer la valeur du Chi2 :

$$D_{\text{obs BBS}} = (13-9,75)/9,75 + (26-29,25)^2/29,25 = 1,56$$

$$D_{\text{obs SdV}} = (10-9)^2/9 + (26-27)^2/27 = 0,15$$

Donc pour nos deux familles, $\text{Chi}2 < 3,84$ donc la p-value $> 0,05$, on conclue à une absence de différence entre les effectifs observés et attendus.

Dans les deux familles étudiées, le nombre d'individus observés par rapport à ce qui est attendu sous un mode de transmission autosomique récessif à pénétrance complète avec deux parents porteurs sains n'est pas significativement différent des nombres attendus.

Les proportions de femelles homozygotes et hétérozygotes dans nos familles n'est pas connu, il est possible que certaines femelles soient homozygotes pour l'allèle muté, particulièrement pour les femelles de la lignée atteinte de cryptorchidie ayant un taux de consanguinité élevé.

Dans ces deux familles, sous l'hypothèse d'une cause génétique monogénique (commune ou différente), l'hypothèse d'une transmission autosomique récessive à pénétrance complète avec une majorité de mères hétérozygotes est envisageable.

c. Discussion d'un modèle polygénique et d'un modèle mixte

Les modes de transmission étudiés précédemment sont des modes de transmission simple, où le phénotype lié au gène étudié est soit exprimé, soit non exprimé.

Dans le cas de la cryptorchidie, même si les individus sont soit cryptorchides, soit sains, la réalité est plus complexe.

En effet, certains individus sont cryptorchides unilatéraux (= monorchides), ou bien bilatéraux. De plus, un testicule cryptorchide peut être abdominal, inguinal, ou encore dans une position hors de son trajet migratoire classique.

Il est donc probable qu'il n'y ait pas un unique gène responsable de la cryptorchidie chez le chien, ni même chez le Spitz des Visigoths ou le Berger Blanc Suisse, mais qu'il y ait plusieurs gènes en cause.

Une hypothèse serait qu'un gène majeur détermine la présence de l'affection, mais que d'autres gènes ou des facteurs environnementaux impliqués dans la descente testiculaire interviennent également, ce qui expliquerait la variabilité des phénotypes observés.

Dans le cas d'un modèle polygénique ou modèle mixte, les proportions d'atteints et de sains dans les portées ne suivent pas les proportions mendéliennes attendues. Il est possible que l'on soit dans cette situation.

Il est difficile de conclure sur le mode de transmission de la cryptorchidie dans les deux familles étudiées. Les modes de transmission autosomique récessif, autosomique dominant à pénétrance incomplète ou polygénique ou en modèle mixte sont envisageables. De plus, il est possible que les facteurs génétiques qui entraînent la cryptorchidie dans les deux familles étudiées soient spécifiques de chaque race et que l'on soit dans une situation d'hétérogénéité génétique si on considère l'ensemble des races.

Des analyses génétiques plus poussées sur un plus grand nombre de chiens et de familles seront nécessaires pour conclure sur le caractère héréditaire de la cryptorchidie, sur son mode de transmission et sur les facteurs génétiques impliqués.

d. Discussion générale sur le mode de transmission de la cryptorchidie dans les deux familles étudiées

Au final, ce qui peut être observé dans les deux familles étudiées est le fait que les mâles atteints naissent de parents cliniquement sains, que tous les fils ne sont pas forcément atteints, que les proportions d'atteints dans les fratries sont plus proches de 25% que de 50%, que des femelles donnant des petits atteints avec un mâle peuvent ne pas en donner avec un autre, et vice versa, et que le phénotype est à expressivité variable puisque le niveau et la latéralité de la cryptorchidie sont variables.

Dans ces deux familles, on remarque que le phénotype cryptorchide est présent que les portées soient issues de parents apparentés ou non. La consanguinité n'a pas l'air d'avoir un effet majeur sur l'apparition de la maladie.

Par ailleurs, on remarque dans les arbres que l'accouplement de femelles ayant des apparentés atteints de cryptorchidie avec des mâles extérieurs à la famille peut donner des petits atteints. A moins que l'allèle muté soit très fréquent dans la race, les mâles extérieurs à la lignée atteinte ont plus de chance d'être homozygotes sains.

Ces deux derniers arguments seraient plutôt en défaveur d'un mode de transmission autosomique récessif et plutôt favorable à un mode de transmission autosomique dominant à pénétrance incomplète.

Cela reste à nuancer chez les Spitz des Visigoths. En effet, cette race présente un très faible effectif (seulement 160 naissances en 2021). Il est donc probable que les lignées de la race présentent un fort taux de consanguinité. Ainsi il est beaucoup plus probable au sein de cette race que des mâles extérieurs à la famille étudiée soient porteurs de l'allèle muté.

A posteriori, il aurait été intéressant de mesurer les taux de consanguinité dans la famille des Spitz des Visigoths pour avoir un regard plus critique sur les modes de transmission les plus probables.

Finalement, différents modes de transmission restent envisageables (autosomique dominant à pénétrance incomplète, autosomique récessif ou complexe avec plusieurs facteurs génétiques en jeu et des facteurs environnementaux). L'étude d'autres familles sera nécessaire pour en avoir une idée plus précise.

Par ailleurs, nous pouvons nous demander si tous les chiens ont été correctement phénotypés. Des erreurs de phénotypage entraîneraient des erreurs d'analyse du mode de transmission. Un phénotypage précis est l'étape clé d'une analyse génétique.

Enfin, l'échantillon étudié reste relativement réduit, et certains biais d'échantillonnage n'ont peut-être pas été pris en compte. Il est donc important d'interpréter les résultats obtenus avec vigilance.

Ajouter des chiens phénotypés par des vétérinaires et recruter de nouvelles familles seront des étapes nécessaires pour compléter cette étude initiale.

Conclusion

La cryptorchidie est une maladie étudiée depuis plusieurs dizaines d'années dans l'espèce canine, mais aussi dans l'espèce humaine.

Malgré les nombreuses études réalisées sur le sujet, la suspicion d'hérédité pour cette affection n'a jamais été prouvée formellement chez le chien.

Plusieurs gènes, notamment certains déjà étudiés chez l'Homme, ont fait l'objet d'analyses génétiques, et plusieurs d'entre eux nécessiteraient d'être étudiés de façon plus poussée.

C'est finalement dans l'objectif de rendre possible ce type d'études que des élevages ont été contactés au cours de ce travail de thèse afin de pouvoir constituer des arbres généalogiques de familles de chiens atteints et analyser la transmission de la cryptorchidie dans ces familles.

Les effectifs relativement réduits de chiens dans les deux familles étudiées ne permettent pas d'obtenir une réponse claire à la question du mode de transmission de la cryptorchidie dans ces familles.

Néanmoins, une composante génétique est suspectée compte tenu de la fréquence d'apparition de la maladie dans les familles étudiées, même si une cause environnementale intrinsèque aux élevages étudiés ne peut être absolument exclue.

Le mode de transmission pourrait être monogénique sur un modèle autosomique dominant à pénétrance incomplète, autosomique récessif, mais l'hypothèse polygénique ou mixte, associant plusieurs gènes et de paramètres environnementaux est également probable étant donné la complexité du phénomène de descente testiculaire.

Pour identifier d'éventuels locus, voire gènes candidats et les étudier, il sera probablement nécessaire de réaliser des analyses sur l'ensemble du génome d'une importante cohorte de chiens.

En parallèle de la constitution des arbres généalogiques, ce travail de thèse aura permis de collecter l'ADN de 36 chiens atteints de cryptorchidie et de 5 apparentés à des chiens atteints.

Cette cohorte est disponible sur demande via la biobanque Cani-DNA.

Liste des références bibliographiques

- ABITBOL M., CHEVALLIER L. (2022) Document de cours de Génétique Moléculaire : Approche génétique de l'amélioration et de la santé des animaux domestique. Polycopié. Maisons Alfort, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité Pédagogique d'Ethologie, de Physiologie et de Génétique vétérinaires.
- AKSGLAEDE L., SØRENSEN K., BOAS M., *et al.* (2010) Changes in anti-Müllerian hormone (AMH) throughout the life span: a population-based study of 1027 healthy males from birth (cord blood) to the age of 69 years. *J Clin Endocrinol Metab* 95(12), 5357-5364
- AMANN R.P., VEERAMACHANENI D.N.R. (2007) Cryptorchidism in common eutherian mammals. *Reproduction* 133(3), 541-561
- ARRIGHI S., BOSI G., GROPPETTI D., ARALLA M., CREMONESI F. (2010) An insight into testis and gubernaculum dynamics of INSL3-RXFP2 signalling during testicular descent in the dog. *Reprod Fertil Dev* 22(5), 751-760
- BARONE M.A., ROELKE M.E., HOWARD J., *et al.* (1994) Reproductive Characteristics of Male Florida Panthers: Comparative Studies from Florida, Texas, Colorado, Latin America, and North American Zoos. *Journ Mammal* 75(1), 150-162
- BAUMANS V., DIJKSTRA G., WENSING C.J. (1981) Testicular descent in the dog. *Anat Histol Embryol* 10(2), 97-110
- BITGOOD M.J., SHEN L., MCMAHON A.P. (1996) Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Curr Biol* 6(3), 298-304
- BOGATCHEVA N.V., FERLIN A., FENG S., *et al.* (2007) T222P mutation of the insulin-like 3 hormone receptor LGR8 is associated with testicular maldescent and hinders receptor expression on the cell surface membrane. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292(1), E138-144
- CASSATA R., IANNUZZI A., PARMA P., *et al.* (2008) Clinical, cytogenetic and molecular evaluation in a dog with bilateral cryptorchidism and hypospadias. *Cytogenet Genome Res* 120(1-2), 140-143
- COLVIN J., GREEN R., SCHMAHL J., CAPEL B., ORNITZ D. (2001) Male-to-Female Sex Reversal in Mice Lacking Fibroblast Growth Factor 9. *Cell* 104, 875-89
- COX V.S., WALLACE L.J., JESSEN C.R. (1978) An anatomic and genetic study of canine cryptorchidism. *Teratology* 18(2), 233-240
- DONOVAN P.J., STOTT D., CAIRNS L.A., HEASMAN J., WYLIE C.C. (1986) Migratory and postmigratory mouse primordial germ cells behave differently in culture. *Cell* 44(6), 831-838
- ENGLAND G., VON HEIMENDAHL A. (2011) BSAVA Manual of Canine and Feline Reproduction and Neonatology, 2^{ème} éd., Quedgeley, British Small Animal Veterinary Association.
- FEINGOLD J. (2005) Maladies multifactorielles : un cauchemar pour le généticien. *Med Sci (Paris)* 21(11), 927-933
- FENG S., FERLIN A., TRUONG A., *et al.* (2009) INSL3/RXFP2 signaling in testicular descent. *Ann N Y Acad Sci* 1160, 197-204
- FOSTER J.W., DOMINGUEZ-STEGLICH M.A., GUIOLI S., *et al.* (1994) Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* 372(6506), 525-530
- GALAN J.J., GUARDUCCI E., NUTI F., *et al.* (2007) Molecular analysis of estrogen receptor alpha gene AGATA haplotype and SNP12 in European populations: potential protective effect for cryptorchidism and lack of association with male infertility. *Hum Reprod* 22(2), 444-449
- GUBBELS E.J., SCHOLTEN J., JANSS L., ROTHUIZEN J. (2009) Relationship of cryptorchidism with sex ratios and litter sizes in 12 dog breeds. *Anim Reprod Sci* 113(1-4), 187-195
- FONTBONNE A., LEVY X., FONTAINE E., GILSON C. Guide pratique de reproduction clinique canine et féline (s. d.) . In *Sauramps Medical*. [<https://www.livres-medicaux.com/races-reproduction-elevage/22558-guide-pratique-de-reproduction-clinique-canine-et-feline.html>] (consulté le 17/05/2022).

- HANNAN M.A., KAWATE N., KUBO Y., *et al.* (2015) Expression analyses of insulin-like peptide 3, RXFP2, LH receptor, and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in testes of normal and cryptorchid dogs. *Theriogenology* 84(7), 1176-1184
- HIRAMATSU R., MATOBA S., KANAI-AZUMA M., *et al.* (2009) A critical time window of Sry action in gonadal sex determination in mice. *Development* 136(1), 129-138
- HUTSON J.M., HASTHORPE S., HEYNS C.F. (1997) Anatomical and functional aspects of testicular descent and cryptorchidism. *Endocr Rev* 18(2), 259-280
- JOHNSTON S.D., ROOT KUSTRITZ M.V., OLSON P.S. (2001) Canine and feline theriogenology. Philadelphia, PA, Saunders
- JOSSO N., REY R.A., PICARD J.-Y. (2013) Anti-müllerian hormone: a valuable addition to the toolbox of the pediatric endocrinologist. *Int J Endocrinol* 2013, 674105. DOI : 10.1155/2013/674105
- JUNG H.Y., YOO D.Y., JO Y.K., *et al.* (2016) Differential expression of estrogen receptor α and progesterone receptor in the normal and cryptorchid testis of a dog. *Lab Anim Res* 32(2), 128-132
- KHAN F.A., GARTLEY C.J., KHANAM A. (2018) Canine cryptorchidism: An update. *Reprod Domest Anim* 53(6), 1263-1270
- KOOPMAN P., GUBBAY J., VIVIAN N., GOODFELLOW P., LOVELL-BADGE R. (1991) Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 351(6322), 117-121
- KRISTENSEN D.M., HASS U., LESNÉ L., *et al.* (2011) Intrauterine exposure to mild analgesics is a risk factor for development of male reproductive disorders in human and rat. *Hum Reprod* 26(1), 235-244
- KURPISZ M., HAVRYLUK A., NAKONECHNYJ A., CHOPYAK V., KAMIENICZNA M. (2010) Cryptorchidism and long-term consequences. *Reprod Biol* 10(1), 19-35
- KUWANA T., FUJIMOTO T. (1983) Active locomotion of human primordial germ cells in vitro. *Anat Rec* 205(1), 21-26
- LARNEY C., BAILEY T.L., KOOPMAN P. (2014) Switching on sex: transcriptional regulation of the testis-determining gene Sry. *Development* 141(11), 2195-2205
- LEA R.G., BYERS A.S., SUMNER R.N., *et al.* (2016) Environmental chemicals impact dog semen quality in vitro and may be associated with a temporal decline in sperm motility and increased cryptorchidism. *Sci Rep* 6(1), 31281
- MÄKELÄ J.-A., KOSKENNIEMI J.J., VIRTANEN H.E., TOPPARI J. (2019) Testis Development. *Endoc Rev* 40(4), 857-905
- MARSHALL L.S., OEHLERT M.L., HASKINS M.E., SELDEN J.R., PATTERSON D.F. (1982) Persistent Müllerian duct syndrome in miniature schnauzers. *J Am Vet Med Assoc* 181(8), 798-801
- MEYERS-WALLEN V.N. (2009) Review and update: genomic and molecular advances in sex determination and differentiation in small animals. *Reprod Domest Anim* 44 Suppl 2, 40-46
- MIALOT J.-P. (1984) Pathologie de la reproduction chez les carnivores domestiques. Maisons Alfort, Editions du Point Vétérinaire
- MOHTA A. (2004) Cryptorchidism: What's new? *Indian Pediatr* 41, 1019-23
- MOLYNEAUX K.A., STALLOCK J., SCHAIBLE K., WYLIE C. (2001) Time-lapse analysis of living mouse germ cell migration. *Dev Biol* 240(2), 488-498
- MOLYNEAUX K.A., ZINSZNER H., KUNWAR P.S., *et al.* (2003) The chemokine SDF1/CXCL12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival. *Development* 130(18), 4279-4286
- NA A.F., HARNAEN E.J., FARMER P.J., *et al.* (2007) Cell membrane and mitotic markers show that the neonatal rat gubernaculum grows in a similar way to an embryonic limb bud. *J Pediatr Surg* 42(9), 1566-1573
- NATION T.R., BURAUINDI S., FARMER P.J., *et al.* (2011) Development of the gubernaculum during testicular descent in the rat. *Anat Rec (Hoboken)* 294(7), 1249-1260
- NIELEN A.L., JANSS L.L., KNOL B.W. (2001) Heritability estimations for diseases, coat color, body weight, and height in a birth cohort of Boxers. *Am J Vet Res* 62(8), 1198-1206

- PALMER J.R., HERBST A.L., NOLLER K.L., *et al.* (2009) Urogenital abnormalities in men exposed to diethylstilbestrol in utero: a cohort study. *Environ Health* 8, 37
- PATHIRANA I.N., TANAKA K., KAWATE N., *et al.* (2010) Analysis of single nucleotide polymorphisms in the 3' region of the estrogen receptor 1 gene in normal and cryptorchid Miniature Dachshunds and Chihuahuas. *J Reprod Dev* 56(4), 405-410
- POLANCO J.C., WILHELM D., DAVIDSON T.-L., KNIGHT D., KOOPMAN P. (2010) Sox10 gain-of-function causes XX sex reversal in mice: implications for human 22q-linked disorders of sex development. *Hum Mol Genet* 19(3), 506-516
- PRAPAIWAN N., MANEE-IN S., MOONARMART W., SRISUWATANASAGUL S. (2017) The expressions in oxytocin and sex steroid receptors in the reproductive tissues of normal and unilateral cryptorchid dogs. *Theriogenology* 100, 59-65
- ROMAGNOLI S.E. (1991) Canine cryptorchidism. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 21(3), 533-544
- ROTGERS E., JØRGENSEN A., YAO H.H.-C. (2018) At the Crossroads of Fate—Somatic Cell Lineage Specification in the Fetal Gonad. *Endocr Rev* 39(5), 739-759
- SCHMAHL J., CAPEL B. (2003) Cell proliferation is necessary for the determination of male fate in the gonad. *Dev Biol* 258(2), 264-276
- SECRETARIAT GÉNÉRAL DU GOUVERNEMENT (2003) Article R213-2 relatif à la cession d'animaux et de produits animaux. In Légifrance. [https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000006588800] (consulté le 18/05/2022)
- SEKIDO R., LOVELL-BADGE R. (2008) Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature* 453(7197), 930-934
- SHONO T., RAMM-ANDERSON S., HUTSON J.M. (1994) Transabdominal testicular descent is really ovarian ascent. *J Urol* 152(2 Pt 2), 781-784
- SINGH A.P., CUMMINGS C.A., MISHINA Y., ARCHER T.K. (2013) SOX8 regulates permeability of the blood-testes barrier that affects adult male fertility in the mouse. *Biol Reprod* 88(5), 133
- SIRONI L., RAMELLI P., LAZZARI B., *et al.* (2007) Analysis of RXFP2 (LGR8) as candidate gene for canine cryptorchidism. *Reprod Domest Anim* 42 (Suppl. 2), 82
- SQUILLACIOTI C., PELAGALLI A., LUCA A.D., *et al.* (2019) Urocortinergic system in the epididymis of the normal and cryptorchid dogs. *Reprod Domest Anim* 54(7), 956-963
- TOPPARI J., VIRTANEN H., SKAKKEBAEK N.E., MAIN K.M. (2006) Environmental effects on hormonal regulation of testicular descent. *J Steroid Biochem Mol Biol* 102(1-5), 184-186
- TRUONG A., BOGATCHEVA N.V., SCHELLING C., DOLF G., AGOULNIK A.I. (2003) Isolation and Expression Analysis of the Canine Insulin-Like Factor 3 Gene1. *Biol Reprod* 69(5), 1658-1664
- WAGNER T., WIRTH J., MEYER J., *et al.* (1994) Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* 79(6), 1111-1120
- WILLIAMS M.P.L., HUTSON J.M. (1991) The phylogeny of testicular descent. *Pediatr Surg Int* 6(3), 162-166
- WU X., WAN S., PUJAR S., *et al.* (2009) A single base pair mutation encoding a premature stop codon in the MIS type II receptor is responsible for canine persistent Müllerian duct syndrome. *J Androl* 30(1), 46-56
- YATES D., HAYES G., HEFFERNAN M., BEYNON R. (2003) Incidence of cryptorchidism in dogs and cats. *Vet Rec* 152(16), 502-504
- YOSHIDA R., FUKAMI M., SASAGAWA I., *et al.* (2005) Association of Cryptorchidism with a Specific Haplotype of the Estrogen Receptor α Gene: Implication for the Susceptibility to Estrogenic Environmental Endocrine Disruptors. *J Clin Endocrinol & Metabol* 90(8), 4716-4721
- ZHAO X., DU Z.-Q., ROTHSCCHILD M.F. (2010) An association study of 20 candidate genes with cryptorchidism in Siberian Husky dogs. *J Anim Breed Genet* 127(4), 327-331
- ZHAO X., ONTERU S., SAATCHI M., GARRICK D., ROTHSCCHILD M. (2013) Bayesian Inference Identifies a Candidate Region Associated with Canine Cryptorchidism that Includes the AMHR2 Gene. *Animal Industry Report* 659(1). [https://doi.org/10.31274/ans_air-180814.73]

- ZHAO X., ONTERU S., SAATCHI M., GARRICK D., ROTHSCCHILD M. (2014) A genome-wide association study for canine cryptorchidism in Siberian Huskies. *J Anim Breed Genet* 131(3), 202-209
- ZHAO L., ARSENAULT M., NG E.T., *et al.* (2017) SOX4 regulates gonad morphogenesis and promotes male germ cell differentiation in mice. *Dev Biol* 423(1), 46-56
- ZHOU B., WATTS L.M., HUTSON J.M. (1993) Germ cell development in neonatal mouse testes in vitro requires müllerian inhibiting substance. *J Urol* 150(2 Pt 2), 613-616

Annexe 1

ENCART - Projet de recherche sur le déterminisme génétique de l'ectopie testiculaire chez le chien

Soutenus par le fonds de recherche Société Centrale Canine / Agria, des vétérinaires de l'École nationale vétérinaire d'Alfort (EnvA), dont le Professeur Alain Fontbonne, et de l'Université vétérinaire de Pérouse (Italie), s'associent pour travailler sur le déterminisme génétique des affections de l'appareil génital chez le chien, et notamment sur le déterminisme de l'ectopie testiculaire. Afin de soutenir les efforts de sélection menés depuis de nombreuses années, ces travaux de recherche pourraient permettre de proposer des tests de dépistage pour identifier les animaux génétiquement porteurs ou à risque de transmettre l'affection avant leur mise à la reproduction. Pour cela, l'étude devra porter sur un maximum de chiens atteints, de race ou d'apparence raciale, mais également sur des animaux cliniquement sains et apparentés à ces individus (parents, descendants et collatéraux).

Dans un premier temps, nos équipes cherchent donc à collecter toutes les informations disponibles concernant des cas de cryptorchidie diagnostiqués sur des chiens de plus de six mois, notamment chez des chiens de race à forte prédisposition raciale. Une certaine forme de tabou autour de cette affection a jusqu'alors limité nos efforts de recherche. Il n'est pas honteux de posséder ou d'avoir produit un ou plusieurs chiens cryptorchides, aidez-nous à progresser dans la compréhension de l'ectopie testiculaire, contactez-nous : **Dr Guillaume Robiteau** (CERCA (EnvA) / Université de Pérouse) guillaume.robiteau@vet-alfort.fr – **Dr Ambre Jaraud** (EnvA / Société Centrale Canine) ambre.jaraud@vet-alfort.fr. Une totale confidentialité est assurée, vis-à-vis des sociétés cynophiles (SCC et clubs de race) comme des autres éleveurs ou particuliers : aucune donnée privée ne saurait être transmise à des services extérieurs aux unités de recherche de l'École nationale vétérinaire d'Alfort ou de l'Université de Pérouse.

Annexe 2



Établissement d'enseignement
supérieur et de recherche du
Ministère de l'agriculture et de l'alimentation
**PORTEUR D'HISTOIRE
ACTEUR D'AVENIR**

Lucie Chevallier, DVM, PhD
Maître de Conférences en Génétique Moléculaire et Médicale
Co-responsable du CRB-Anim - EnVA (Biobanque EnVA)
Génétique médicale comparée
Bâtiment Bressou, RDC
Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort
7 avenue du Général de Gaulle
94704 Maisons-Alfort CEDEX



Maisons-Alfort, le 24/07/2020

Envoi kit prélèvements pour programme recherche sur la cryptorchidie

Bonjour,

Voici 3 jeux de trois brochettes, qui vous permettront de prélever 3 chiens.

Les brochettes ne nous permettent cependant pas d'extraire beaucoup d'ADN, donc s'il est possible de faire une prise de sang quand vous irez chez votre vétérinaire, ce serait parfait. Vous pouvez leur donner mes coordonnées pour plus d'explications sur ce projet de recherche.

Ci-joint des fiches de renseignement (le plus important pour nous est d'avoir le nom du chien et son numéro d'identification).

Si les pedigrees des chiens sont sur LOF Select, pas besoin de les joindre, sinon une copie sera nécessaire.

Ci-joint également, une enveloppe (non affranchie) pour le retour des prélèvements et des fiches d'informations.

En vous remerciant de votre implication, n'hésitez pas à me contacter pour toute question.

Très cordialement,

Lucie Chevallier

Annexe 3

Instructions pour l'utilisation des brossettes buccales chez le chien



IMPORTANT : il ne doit pas y avoir de nourriture dans la bouche du chien lors du prélèvement. Si nécessaire, attendre 30 minutes après que le chien ait mangé avant de réaliser le prélèvement.

Noter le nom du chien sur l'emballage de chaque brosse.

Utiliser **2 ou 3 brosses par chien** (2 pour les chiens sains et 3 pour les atteints).

Prélèvement

Retirer la brosse de son emballage sans toucher l'extrémité. Relever le bord de la babine du chien puis placer la brosse entre la babine et la gencive. Plaquer une main sur la joue du chien pour maintenir la brosse entre la babine et la gencive si nécessaire. Frotter vigoureusement en tournant la brosse, avec la même pression que vous utiliseriez pour vous brosser les dents, pendant 20 à 30 secondes.

Envoi

Laisser les brosses sécher à l'air libre 10 secondes avant de les replacer dans leurs emballages, **sans les fermer**. Envoyer à température ambiante, en lettre simple.

Accompagner les prélèvements de la fiche de renseignement fournie.

Annexe 4

RECHERCHE GÉNÉTIQUE CHEZ LE CHIEN ET LE CHAT



CRB-Anim EnvA
7 avenue du Général de Gaulle
94700 Maisons-Alfort



Dans le cadre de recherches génétiques dans les différentes races canines et félines via le projet national de biobanque Cani-DNA, nous collectons des échantillons sanguins et buccaux de chiens et de chats appartenant à toutes les races.

Comment procéder ?

- Remplir le **formulaire**,
- Joindre une **photocopie du pedigree** (sauf si disponible sur LOF select pour les chiens français),
- Joindre un prélèvement sanguin (**5 mL de sang sur tube EDTA**, conservé et envoyé à **température ambiante**, dans une enveloppe protégée, en tarif **lettre simple** ou **colissimo**) ou à défaut **2 à 3 brochettes buccales** (envoyées en lettre simple) portant le nom de l'animal et la date de prélèvement,

Les docteurs vétérinaires de l'EnvA ainsi que tous les membres du CRB-Anim et du projet Cani-DNA s'engagent à respecter une totale confidentialité sur les informations transmises.

Identité de l'animal

(N° de dossier EnvA, s'il y a lieu : _____)

Nom : _____ **Date de naissance :** _____ **Espèce :** _____

Sexe : M F Stérilisé(e) **Race :** _____ **N° d'identification :** _____

Coordonnées du vétérinaire : _____

Affection(s) :

Toute photocopie d'examen complémentaires est la bienvenue pour la compréhension et l'analyse du cas.

Remarque(s) :

Adresse électronique : _____

Je consens au stockage et à l'utilisation de l'ADN de mon animal (décrit ci-dessus) à des fins de recherche génétique. Les informations et les prélèvements étant stockés de façon **strictement confidentielle**, je comprends que je ne pourrais pas recevoir de résultats individuels.

Date :

Signature du propriétaire,
précédée de la mention « lu et approuvé » :

Annexe 5

CRB-Anim EnvA
7 avenue du Général de Gaulle
94700 Maisons-Alfort
crb@vet-alfort.fr
ambre.jaraud@vet-alfort.fr



Une biobanque pour la santé de tous

En identifiant chez nos animaux domestiques l'origine de leurs maladies génétiques, très proches de certaines maladies humaines, nous pouvons mieux soigner les animaux et les hommes.

Le projet national de biobanque pour les animaux domestiques (CRB-Anim) est présent à l'EnvA. La biobanque de l'EnvA permet de collecter de l'ADN de chiens et de chats. Ces prélèvements sont ensuite stockés puis distribués à des laboratoires de recherche qui étudient les maladies génétiques présentes dans certaines races.

Ce projet, respectueux du bien-être de l'animal, n'inclut **aucune expérimentation sur les animaux**. Cette procédure est complètement **gratuite**.

Consentement pour les prélèvements CRB-Anim EnvA

J'autorise ce(s) prélèvement(s) sur mon animal ou mes animaux, dans le cadre de la **préservation de la diversité génétique des races et de la recherche sur les maladies génétiques** :

- SANG** (5 mL)
- BROSSETTE BUCCALE**
- TISSUS** (à l'issue d'une intervention chirurgicale ou d'une biopsie)

Les informations et les prélèvements, stockés de façon **strictement confidentielle**, pourront être utilisés par l'EnvA ou des utilisateurs sélectionnés par le comité scientifique de CRB-Anim.


En raison de cette confidentialité préservée tout au long du processus de stockage et d'utilisation des données, je comprends que je ne pourrais pas recevoir de résultats individuels.

Numéro(s) CLOVIS de mon animal (ou mes animaux) : A..... -

Fait à Maisons-Alfort, le :

Signature du propriétaire :

Annexe 6

	MODE OPERATOIRE 131	Réf : MO-EXP-BM- 131
	Extraction d'ADN génomique à partir de brochettes ou cotons tiges buccaux avec l'automate Maxwell Promega	Version 2 Date : 08/06/2015 Page 1/4

1. Objet et domaine d'application

Ce mode opératoire décrit le principe d'utilisation de l'extracteur d'acides nucléiques et de protéines de type « Maxwell » de la société Promega®, pour extraire de l'ADN génomique à partir d'un prélèvement de type brochettes buccales ou cotons-tiges buccaux secs.

2. Documents de référence

Manuel technique de l'automate Maxwell : réf TM295.

Manuel technique du Kit Maxwell 16 LEV Blood DNA Kit and Maxwell 16 Buccal Swab LEV DNA Purification Kit : réf TM333.

Fiche de sécurité du Thiocyanate de guanidine N°CAS : 593-84-0.

Fiche de sécurité de l'Ethanol N°CAS : 67-65-0.

3. Liste de diffusion et si nécessaire niveau de confidentialité

Toute personne du groupe 3, équipe 10 de l'U955 Imrb ainsi que toute personne appartenant à un laboratoire partenaire ou collaborateur de la biobanque Cani-DNA, en vue de réaliser une extraction d'ADN à partir de brochettes buccales ou cotons-tiges buccaux.

4. Hygiène et sécurité

Porter une blouse.

Porter des gants.

Eliminer les déchets solides contaminés par les cellules buccales (brochettes et cotons-tiges après extraction) et tous les consommables dans une poubelle DASRI.

5. Principe de la méthode


Le principe de cette méthode consiste à récolter l'ADN fixé sur des billes magnétiques après une lyse mécanique et des lavages, achevés par une élution finale sans précipitation de l'ADN.

6. Matériels nécessaires

- Blouse et gants à usage unique.
- Automate Maxwell.
- Centrifugeuse à microtubes tournant à minimum 10.000 tr/min.
- Kit Maxwell 16 LEV Blood DNA Kit and Maxwell 16 Buccal Swab LEV DNA Purification Kit (avec LEV Plungers, tubes d'élution (0,5 ml) et Clearing Columns).
- Bain-marie à sec agitant (à 56 °C).
- Pince coupante (type bricolage) si brochettes buccales.
- Une paire de ciseaux si cotons tiges buccaux.
- Vortex de paillasse.
- Poubelle DASRI.
- Pipetman 1000 µl et 200 µl.
- Cônes 1000 µl et 20-200 µl.
- Tubes type Eppendorf de 1,5 ml.

7. Réactifs (chimiques et biologiques)

- Protéinase K en solution (incluse dans le kit, à conserver à température ambiante).
- Cartouches Maxwell de réactifs (Maxwell 16 LEV Cartridges, incluses dans le kit).
- Solution de lyse (Lysis buffer, inclus dans le kit).

	MODE OPERATOIRE 131	Réf : MO-EXP-BM- 131
	Extraction d'ADN génomique à partir de brossettes ou cotons tiges buccaux avec l'automate Maxwell Promega	Version 2 Date : 08/06/2015 Page 2/4

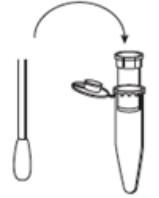
- Solution d'éluion (Elution buffer, inclus dans le kit).

8. Contrainte de la méthode


Etre présent à la fin du cycle d'extraction (26 minutes) afin de sortir les tubes d'éluion et éviter leur évaporation.

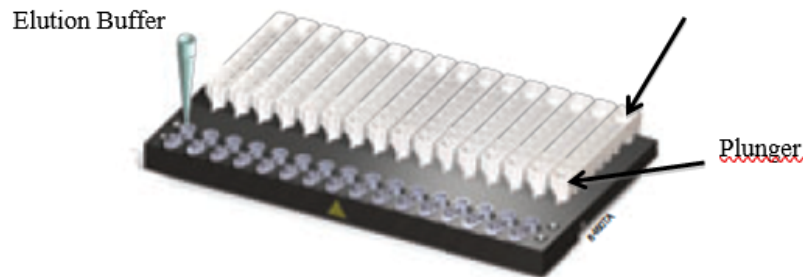
9. Contenu du mode opératoire

01. Allumer le **bain marie agitant** à sec à 56 °C.
02. Numéroté (annoter) des **tubes 1,5 ml** type Eppendorf avec la référence de chaque prélèvement. Seize prélèvements peuvent être traités en même temps.
03. Placer une **Clearing Column** (colonne) dans chaque tube de 1,5 ml.
04. **Couper** chaque **coton tige** ou chaque **brossette à sa base**.
05. **Placer** un **coton tige** ou une **brossette** dans chaque **Clearing Column**. Pour les **brossettes**, les **plier en deux**. Remarque : si la brosette est conservée dans de l'alcool, il faudra au préalable la sécher.



06. Ajouter **30 µl de protéinase K** (du kit) sur chaque brosette ou coton tige.
07. Ajouter **300 µl de Lysis Buffer** (du kit) sur chaque brosette ou coton tige.
08. Fermer les tubes 1,5 ml contenant les colonnes et les brosettes/cotons tiges, au besoin en coupant l'attache du bouchon sur le tube, souvent trop courte.
09. **Vortexer 10 secondes**.
10. Placer dans le **bain marie** à sec à **56 °C** durant **1 à 2 heures**, agitation **1400 tr/min**.
11. Retirer du bain marie à sec, éteindre le bain marie.
12. **Centrifuger** les tubes à **minimum 10.000 tr/min** durant **2 minutes**.
13. Retirer les tubes de la centrifugeuse et jeter la colonne contenant la brosette ou le coton tige dans une poubelle DASRI.
14. **Annoter des tubes 0,5 ml** (du kit) avec les références de chaque prélèvement.
15. Préparer le **rack support LEV** (noir et métallique) contenant autant de cartouches que d'échantillons à traiter (16 au maximum). Les cartouches doivent être réparties sur la largeur si le nombre d'échantillon est inférieur à 16.
16. **Enlever le film** métallique qui ferme les cartouches (vérifier qu'il ne reste pas de film plastique).
17. Placer les tubes 0,5 ml en regard de chaque cartouche.
18. **Déposer 50 µl d'Elution Buffer** dans chaque tube 0,5 ml. Laisser les tubes ouverts, couvercle vers soi (voir dessin).
19. **Ajouter un Plunger** dans chaque alvéole n°8 (alvéole la plus proche de soi).
20. **Déposer le lysat** obtenu par centrifugation des colonnes (et contenu dans le tube 2 ml), dans chaque alvéole n°1 (la plus éloignée de soi).


	MODE OPERATOIRE 131	Réf : MO-EXP-BM- 131
	Extraction d'ADN génomique à partir de brossettes ou cotons tiges buccaux avec l'automate Maxwell Promega	Version 2 Date : 08/06/2015 Page 3/4



21. Allumer l'automate Maxwell.
22. Vérifier que « LEV » et « Rsch » sont affichés à l'écran.
23. Dans les écrans suivants, naviguer à l'aide des boutons **flèches** et valider avec le bouton **Run/Stop**.
 -Menu.....Run
 -Menu.....DNA
 -Menu.....**FFPE/Cells**
24. Si le menu est correct, valider en pressant Run.
25. Ouvrir la porte du Maxwell et presser Run pour faire sortir le plateau.
26. Vérifier que le support à tiges métalliques **fines** et **peint en noir** (LEV) est en place.
27. Placer le **rack support LEV** avec les cartouches et les tubes 0,5 ml sur le plateau.
28. Presser Run pour que le plateau se rétracte et fermer la porte. L'extraction commence automatiquement.
29. A la fin du processus, la machine émet 5 bips. Il est souhaitable d'ouvrir la porte et de récupérer les tubes 0,5 ml contenant l'ADN élué rapidement afin d'éviter son évaporation.
30. Ouvrir la porte et **vérifier que des Plungers ne sont pas encore accrochés aux tiges métalliques**. Si le tiroir est sorti alors qu'ils sont encore sur les tiges, il y a un fort risque d'endommager de l'automate. Détacher alors les Plungers restants sur les tiges avant de presser Run pour faire sortir le plateau.
31. Presser **Run** pour **faire sortir le plateau**.
32. Récupérer les tubes 0,5 ml contenant l'ADN.
33. Jeter les cartouches avec les Plungers dans une poubelle DASRI.
34. Fermer la porte de l'automate et l'éteindre.

35. Ranger les tubes 0,5 ml dans une boîte, annoter la boîte.
36. Conserver les ADNs à +4 °C ou -20 °C.

Annexe 7

	MODE OPERATOIRE 172	Réf : MO-EXP-BM- 172
	Extraction d'ADN génomique à partir de sang total ou d'un anneau leucocytaire avec l'automate Maxwell <u>Promega</u>	Version 3 Date : 10/07/2015 Page 1/4

1. Objet et domaine d'application

Ce mode opératoire décrit le principe d'utilisation de l'extracteur à billes Maxwell de la société Promega, pour produire de l'ADN à partir de sang total ou d'un anneau leucocytaire.

2. Documents de référence

Manuel technique du Maxwell® Réf : TM295

Manuel technique du Kit Maxwell® d'extraction d'ADN à partir sang Réf : TM284

Fiche de données de sécurité Thiocyanate de Guanidium N° CAS : 593-84-0

3. Liste de diffusion et si nécessaire niveau de confidentialité

Toute personne du groupe 3, équipe 10 de l'U955 Imrb ainsi que toute personne appartenant à un laboratoire partenaire ou collaborateur de la bio banque Cani-DNA, en vue de réaliser une extraction d'ADN à partir d'un prélèvement sanguin réalisé chez un chien.

4. Hygiène et sécurité

Porter des gants et une blouse pour se protéger des solutions de digestion contenant du guanidium.

L'ensemble des consommables doit être jeté dans le DASRI mis à disposition près de la machine.

5. Principe de la méthode

Extraire l'ADN de sang total ou d'un anneau leucocytaire par élution d'ADN fixé sur billes magnétiques après une lyse mécanique. Ce protocole permet d'obtenir entre 4ug et jusqu'à 60ug d'ADN très pur pour chaque individu. 16 prélèvements peuvent être traités simultanément.

6. Matériels nécessaires

Appareil Maxwell

Micropipette 200 µl

Micropipette 1000 µl

Kit extraction Maxwell 16 mouse tail DNA purification kit Promega Réf : AS1010

Tubes Eppendorf 1,5 ml

500 à 700 µl de sang total ou d'anneau leucocytaire

7. Contraintes de la méthode

Etre présent après le cycle (1h 25min) pour sortir les tubes d'élution et éviter une trop forte évaporation.

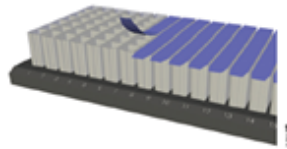
8. Contenu du mode opératoire

1- Préparer les échantillons :

Resuspendre les prélèvements de sang à l'aide d'une P1000

2- Préparer le rack contenant autant de cartouches que d'échantillons à traiter
Les cartouches doivent être réparties sur la largeur si le nombre d'échantillon est inférieur à 16.

3- Enlever le film métallique qui obture les cartouches (vérifier qu'il ne reste pas de film plastique).



4- Positionner les échantillons, 500 µl à 750 µl maxi de sang dans l'alvéole n°1, le broyeur en position 7



5- Allumer l'automate et vérifier que « SEV » et « USER » sont affichés.

Dans les écrans suivants, naviguer à l'aide des boutons marqués d'une flèche et valider par le bouton Run.

Pour vérifier ou modifier les paramètres du mode « USER » sélectionner « 3. Setup » dans le Menu. Puis « 1. View user setting » pour visualiser les paramètres ou « 2. Change setup » pour modifier les paramètres. Sélectionner ensuite « 1. DNA ».

Les paramètres du mode USER « User settings » pour le protocole DNA sont les suivants :

Etape	Temps (en minutes)
<u>Lysis time</u>	4
Binding time	4
Drying time	3
Elution time	4
<u>Number of passes</u>	4

6- Pour démarrer le cycle d'extraction, sélectionnez successivement :

===Menu=== « Run »


===Menu=== « DNA »

===Verification sample type : DNA=== « OK »

L'appareil affiche alors « Open the door ».

7- Ouvrir la porte et presser « Run » pour faire avancer le plateau.

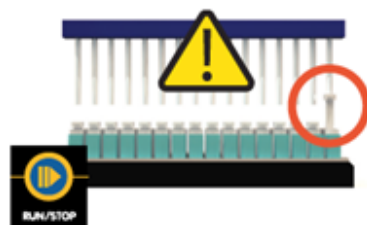
8- Transférer les cassettes sur le plateau.

	MODE OPERATOIRE 172	Réf : MO-EXP-BM- 172
	Extraction d'ADN génomique à partir de sang total ou d'un anneau leucocytaire avec l'automate Maxwell <u>Promega</u>	Version 3
		Page 3/4

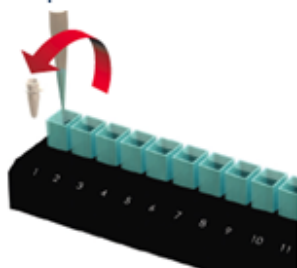
- 9- Ajouter une cuvette de couleur bleu (élution) dans le réceptacle avant, pour chaque échantillon et y ajouter 500 µl de tampon d'élution.




- 10- Presser le bouton « Run » ; le plateau se rétracte dans la machine ; fermer la porte et le cycle d'extraction démarre automatiquement pour une durée de 1h25min.
- 11- Préparer un jeu de tube Eppendorf pour récupérer l'ADN en solution.
- 12- A la fin du processus, la machine bip 2 fois. Il est souhaitable d'ouvrir la porte et de récupérer les cuvettes contenant l'ADN élué rapidement. *Le cycle d'extraction comprend des temps de chauffe, l'atmosphère de l'enceinte peut provoquer une importante évaporation.*
- 13- Ouvrir la porte et vérifier que les Plungers ne sont pas restés accrochés aux tiges métalliques. Si le tiroir est sorti alors qu'ils sont encore sur les tiges, il y a risque d'endommagement de la machine.



- 14- Presser « Run » pour faire sortir le plateau
- 15- Récupérer les tubes d'élution et les poser sur le Rack magnétique (cela permet de capturer les billes résiduelles).



- 16- Poser le Rack incliné pour capturer les billes sur un bord de la cuvette.

	MODE OPERATOIRE 172	Réf : MO-EXP-BM- 172
	Extraction d'ADN génomique à partir de sang total ou d'un anneau leucocytaire avec l'automate Maxwell <u>Promega</u>	Version 3 Date : 10/07/2015 Page 4/4

- 17- Pencher le Rack dans le sens opposé et transférer l'ADN en solution, environ 300 μ l, dans un Eppendorf.
- 18- Jeter les cuvettes bleues et les Rack dans la poubelle DASRI.
- 19- Vérifier la propreté de la machine et essuyer délicatement les traces noires de billes magnétiques avec un kleenex.
- 20- Pour un autre Run, repartir au point 3.
- 21- En fin de manip, fermer la porte et éteindre la machine.

CRYPTORCHIDIE CHEZ LE CHIEN : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE. ANALYSE DE PEDIGREES ET *BIOBANKING* D'ADN DANS DEUX RACES : LE BERGER BLANC SUISSE ET LE SPITZ DES VISIGOTHS

AUTEUR : Maxime BENHAMOU

RÉSUMÉ :

L'ectopie testiculaire, ou la cryptorchidie est une anomalie du développement définie comme étant un défaut dans la descente d'un ou des deux testicules vers le scrotum. C'est une affection à forte importance dans l'espèce canine, avec des impacts sanitaires, physiologiques et sociaux.

Dans ce manuscrit, cette affection est replacée dans le contexte de l'embryogénèse, et plus précisément dans le contexte du développement testiculaire, en rappelant les principaux mécanismes menant à la formation puis à la migration du testicule chez le chien.

La cryptorchidie a beaucoup été étudiée chez le chien, mais aussi chez l'Homme et plusieurs autres espèces. Une cause héréditaire est suspectée, mais n'a jamais pu être formellement démontrée. Plusieurs gènes d'intérêt ont été analysés, et certains nécessitent de plus amples investigations pour pouvoir conclure sur leur implication dans le développement de cette maladie.

C'est dans cet objectif que ce travail de thèse a collecté des données généalogiques et phénotypiques afin de construire les arbres généalogiques de deux familles de chiens (Berger blanc Suisse et Spitz des Visigoths) et leur analyse pour comprendre la transmission de l'affection dans ces familles. L'effectif restreint des chiens dans les deux familles étudiées ne permet pas de conclure clairement sur le caractère héréditaire, ni sur le mode de transmission de la cryptorchidie dans ces deux familles même si des pistes sont évoquées.

L'ADN de plusieurs dizaines de chiens cryptorchides et d'apparentés à des chiens atteints a été prélevé et est stocké dans la biobanque Cani-DNA. Cette cohorte a vocation à être étoffée, pour permettre la réalisation d'études futures sur cette affection.

MOTS CLÉS :

CRYPTORCHIDIE, GENETIQUE, CHIEN, SPITZ DES VISIGOTHS, BERGER BLANC SUISSE

JURY :

Président : Pr JOUVION Grégory

Directrice de thèse : Dr CHEVALLIER Lucie

Examineur : Pr FONTBONNE Alain

CRYPTORCHIDISM IN DOGS: A REVIEW OF THE LITERATURE. PEDIGREE ANALYSIS AND DNA BIOBANKING IN TWO BREEDS: THE SWISS WHITE SHEPHERD AND THE VISIGOTH SPITZ

AUTHOR: Maxime BENHAMOU

SUMMARY:

Testicular ectopia, or cryptorchidism, is a developmental anomaly defined as a defect in the descent of one or both testes into the scrotum. It is a condition of great importance in the canine species, with health, physiological and social impacts.

In this manuscript, this condition is placed in the context of embryogenesis, and more precisely in the context of testicular development, by recalling the main mechanisms leading to the formation and then the migration of the testis in the dog.

Cryptorchidism has been extensively studied in dogs, but also in humans and several other species. A hereditary cause is suspected, but has never been formally demonstrated. Several genes of interest have been analyzed, and some of them need further investigation to be able to conclude on their involvement in the development of this disease.

With this in mind, this thesis work collected genealogical and phenotypic data in order to construct family trees for two families of dogs (Swiss White Shepherd and Visigoth Spitz) and analyze them to understand the transmission of the disease in these families. The small number of dogs in the two families studied does not allow to conclude clearly on the hereditary character, nor on the mode of transmission of cryptorchidism in these two families even if some leads are evoked.

The DNA of several dozen cryptorchid dogs and relatives of affected dogs has been collected and is stored in the Cani-DNA biobank. This cohort is intended to be expanded, to allow future studies on this condition.

KEYWORDS:

CRYPTORCHIDISM, GENETICS, DOG, VISIGOTH SPITZ, SWISS WHITE SHEPHERD

JURY:

Chairperson: Pr JOUVION Grégory

Thesis Director: Dr CHEVALLIER Lucie

Reviewer: Pr FONTBONNE Alain