



**HAL**  
open science

## La polydactylie chez le cheval de race Barbe

Ella Baville

► **To cite this version:**

| Ella Baville. La polydactylie chez le cheval de race Barbe. Sciences du Vivant [q-bio]. 2022. <dumas-04160512>

**HAL Id: dumas-04160512**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04160512v1>**

Submitted on 12 Jul 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.



Distributed under a Creative Commons CC BY-NC-ND 4.0 - Attribution - Non-commercial use - No Derivative Works - International License

## **CAMPUS VÉTÉRINAIRE DE LYON**

Année 2022 - Thèse n° 020

# **LA POLYDACTYLIE CHEZ LE CHEVAL DE RACE BARBE**

## **THESE**

Présentée à l'Université Claude Bernard Lyon 1  
(Médecine - Pharmacie)

Et soutenue publiquement le 30 juin 2022  
Pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

BAVILLE Ella



**CAMPUS VÉTÉRINAIRE DE LYON**

Année 2022 - Thèse n° 020

**LA POLYDACTYLIE CHEZ LE CHEVAL DE RACE  
BARBE**

**THESE**

Présentée à l'Université Claude Bernard Lyon 1  
(Médecine - Pharmacie)

Et soutenue publiquement le 30 juin 2022  
Pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

BAVILLE Ella



## Liste des Enseignants du Campus Vétérinaire de Lyon (26/01/2022)

Mme	ABITBOL	Marie	Professeur
M.	ALVES-DE-OLIVEIRA	Laurent	Maître de conférences
Mme	ARCANGIOLI	Marie-Anne	Professeur
Mme	AYRAL	Florence	Maître de conférences
Mme	BECKER	Claire	Maître de conférences
Mme	BELLUCO	Sara	Maître de conférences
Mme	BENAMOU-SMITH	Agnès	Maître de conférences
M.	BENOIT	Etienne	Professeur
M.	BERNY	Philippe	Professeur
Mme	BONNET-GARIN	Jeanne-Marie	Professeur
M.	BOURGOIN	Gilles	Maître de conférences
M.	BRUTO	Maxime	Maître de conférences Stagiaire
M.	BRUYERE	Pierre	Maître de conférences
M.	BUFF	Samuel	Professeur
M.	BURONFOSSE	Thierry	Professeur
M.	CACHON	Thibaut	Maître de conférences
M.	CADORÉ	Jean-Luc	Professeur
Mme	CALLAIT-CARDINAL	Marie-Pierre	Professeur
M.	CHABANNE	Luc	Professeur
Mme	CHALVET-MONFRAY	Karine	Professeur
M.	CHAMEL	Gabriel	Maître de conférences
M.	CHETOT	Thomas	Maître de conférences Stagiaire
Mme	DE BOYER DES ROCHES	Alice	Maître de conférences
Mme	DELIGNETTE-MULLER	Marie-Laure	Professeur
Mme	DJELOUADJI	Zorée	Professeur
Mme	ESCRIOU	Catherine	Maître de conférences
M.	FRIKHA	Mohamed-Ridha	Maître de conférences
M.	GALIA	Wessam	Maître de conférences
M.	GILLET	Benoit	AERC
Mme	GILOT-FROMONT	Emmanuelle	Professeur
M.	GONTHIER	Alain	Maître de conférences
Mme	GREZEL	Delphine	Maître de conférences
Mme	HUGONNARD	Marine	Maître de conférences
Mme	JOSSON-SCHRAMME	Anne	Chargé d'enseignement contractuel
M.	JUNOT	Stéphane	Professeur
M.	KODJO	Angeli	Professeur
Mme	KRAFFT	Emilie	Maître de conférences
Mme	LAABERKI	Maria-Halima	Maître de conférences
Mme	LAMBERT	Véronique	Maître de conférences
Mme	LE GRAND	Dominique	Professeur
Mme	LEBLOND	Agnès	Professeur
Mme	LEDOUX	Dorothée	Maître de conférences
M.	LEFEBVRE	Sébastien	Maître de conférences
Mme	LEFRANC-POHL	Anne-Cécile	Maître de conférences
M.	LEGROS	Vincent	Maître de conférences
M.	LEPAGE	Olivier	Professeur
Mme	LOUZIER	Vanessa	Professeur
M.	LURIER	Thibaut	Maître de conférences Stagiaire
M.	MAGNIN	Mathieu	Maître de conférences Stagiaire
M.	MARCHAL	Thierry	Professeur
Mme	MOSCA	Marion	Maître de conférences
M.	MOUNIER	Luc	Professeur
Mme	PEROZ	Carole	Maître de conférences
M.	PIN	Didier	Professeur
Mme	PONCE	Frédérique	Professeur
Mme	PORTIER	Karine	Professeur
Mme	POUZOT-NEVORET	Céline	Maître de conférences
Mme	PROUILLAC	Caroline	Professeur
Mme	REMY	Denise	Professeur
Mme	RENE MARTELLET	Magalie	Maître de conférences
M.	ROGER	Thierry	Professeur
M.	SAWAYA	Serge	Maître de conférences
M.	SCHRAMME	Michael	Professeur
Mme	SERGENTET	Delphine	Professeur
M.	TORTEREAU	Antonin	Maître de conférences
Mme	VICTONI	Tatiana	Maître de conférences
M.	VIGUIER	Eric	Professeur
Mme	VIRIEUX-WATRELOT	Dorothée	Chargé d'enseignement contractuel
M.	ZENNER	Lionel	Professeur



## REMERCIEMENTS

**A Monsieur le Professeur Damien Sanlaville,**

*De l'université Claude Bernard Lyon 1, Faculté de médecine de Lyon Sud,*

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de ma thèse,

Mes hommages respectueux.

**A Madame la Professeure Marie Abitbol,**

*De Vetagro Sup, campus vétérinaire de Lyon,*

Pour votre encadrement rigoureux tout au long de mon travail,

Pour votre disponibilité, votre patience et votre aide précieuse,

Mes remerciements chaleureux.

**A Monsieur le Professeur Jean-Luc Cadoré,**

*De Vetagro Sup, campus vétérinaire de Lyon,*

Pour m'avoir fait l'honneur de prendre part au jury de ma thèse,

Pour vos précieux conseils, votre patience et votre encadrement bienveillant

tout au long de ma cinquième année,

Mes sincères remerciements.



Ce travail a été en partie financé par les Crédits Incitatifs 2013 du département Génétique Animale de l'INRA





# TABLE DES MATIERES

<b>Table des annexes</b> .....	13
<b>Table des figures</b> .....	15
<b>Table des tableaux</b> .....	17
<b>Liste des abréviations</b> .....	19
<b>Introduction</b> .....	21
<b>Première partie : Etude bibliographique</b> .....	23
<b>I. Introduction : le développement embryonnaire du membre</b> .....	<b>25</b>
1. Généralités .....	25
2. La différenciation selon l'axe proximo-distal .....	29
2.1 Le modèle de la zone de détermination progressive .....	29
2.2 Le modèle des deux signaux .....	31
2.3 Le modèle du front de différenciation .....	31
3. La différenciation selon l'axe antéro-postérieur .....	33
3.1 Le modèle du gradient spacio-temporel .....	34
3.2 L'activation de <i>Sonic hedgehog</i> .....	35
3.3 La formation des doigts .....	37
4. La différenciation dorso-ventrale .....	37
<b>II. La polydactylie chez les mammifères</b> .....	<b>39</b>
1. Généralités .....	39
2. Polydactylies caractérisées à l'échelle moléculaire .....	40
2.1 La polydactylie chez la souris .....	40
i. Les mutations dans ZRS ( <i>ZPA Regulatory Sequence</i> ) .....	40
ii. Autres mutations identifiées chez la souris .....	42
2.2 La polydactylie chez l'homme .....	42
i. Des mutations dans ZRS .....	44
ii. Des mutations dans pré-ZRS .....	46
iii. Autres mutations identifiées chez l'Homme .....	46
2.3 La polydactylie chez le chat .....	47
2.4 La polydactylie chez le chien .....	50
3. La polydactylie chez le cheval .....	52
3.1 Généralités .....	52
3.2 Les cas rapportés .....	54
3.3 Considérations chirurgicales .....	63
3.4 Origines de la polydactylie chez le cheval .....	63
<b>III. Stratégies de recherche de gènes et de mutations chez le cheval</b> .....	<b>65</b>
1. Clonage positionnel .....	65
2. Approche gène candidat .....	67
3. Le séquençage des génomes .....	67
3.1 La constitution d'une banque de fragments d'ADN à séquencer .....	67
3.2 L'amplification des fragments d'ADN .....	68
3.3 Le séquençage par terminateurs réversibles .....	68

<b>Deuxième partie : Etude expérimentale.....</b>	<b>71</b>
<b>I. Contexte et buts de l'étude .....</b>	<b>73</b>
<b>II. Matériel et méthodes .....</b>	<b>75</b>
1. Animaux .....	75
1.1 Chevaux .....	75
1.2 Méthode de recrutement .....	75
1.3 Critères d'inclusion .....	75
1.4 Fiche de prélèvement, consentement et éthique .....	75
2. Examens cliniques .....	76
3. Examens complémentaires : radiographies et caryotypes .....	76
4. Arbres généalogiques .....	76
5. Extractions des ADN .....	76
5.1 Extraction de l'ADN à partir d'échantillons sanguins .....	76
5.2 Extraction de l'ADN à partir de crins .....	76
5.3 Concentration des ADN .....	76
6. Génotypage sur puce .....	76
7. Séquençage du génome entier .....	77
8. Amplification PCR ( <i>polymérase chain reaction</i> ) et séquençage Sanger .....	77
9. Analyses statistiques .....	78
10. Bases de données et outils génomiques .....	78
<b>III. Résultats .....</b>	<b>79</b>
1. Une polydactylie pré-axiale non syndromique chez le cheval Barbe .....	79
1.1 Examens cliniques .....	79
1.2 Radiographies des membres .....	81
1.3 Caryotypes .....	91
2. Une polydactylie héréditaire .....	93
3. Des mutations candidates .....	94
3.1 Etude d'association .....	94
3.2 Séquençage de génome entier .....	97
3.3 Recherche des régions ZRS et pZRS dans <i>LMBR1</i> équin .....	98
i. Séquençage de ZRS équin .....	99
ii. Séquençage de pZRS équin .....	99
3.4 Variants candidats retenus .....	100
3.5 Validation des variants candidats : corrélation génotype-phénotype et étude fonctionnelle .....	100
i. Génotypage de la famille étudiée pour le variant de pZRS .....	100
ii. Génotypage d'une large cohorte pour le variant de pZRS .....	101
iii. Impact fonctionnel potentiel du variant de pZRS .....	102
iv. Génotypage de la famille étudiée pour la variant de <i>GLI1</i> .....	103
v. Génotypage d'une large cohorte pour le variant de <i>GLI1</i> .....	104
vi. Prédiction de l'effet du variant de <i>GLI1</i> .....	105
vii. Vérification statistique de l'implication des deux variants retenus.....	106

<b>IV. Discussion</b> .....	<b>109</b>
1. Biais et limites de l'étude .....	109
1.1 Recrutement des animaux .....	109
1.2 Difficultés d'exploitation des clichés radiographiques .....	109
2. Phénotype de la polydactylie .....	110
2.1 Palpation des membres .....	110
2.2 L'apport des clichés radiographiques .....	110
2.3 Expressivité variable de la polydactylie .....	110
i. Une polydactylie pré-axiale unilatérale ou bilatérale touchant les membres antérieurs .....	110
ii. Les anomalies osseuses détectées .....	111
2.4 La présence de l'os carpal I .....	111
3. Mode de transmission de la polydactylie et origine .....	112
4. Identification de deux variants candidats dans pZRS et <i>GLI1</i> .....	112
5. Un variant candidat non retenu dans <i>GLI1</i> .....	113
6. Un variant candidat préférentiel dans pZRS .....	114
6.1 Comparaison avec les autres espèces .....	114
6.2 Corrélation génotype-phénotype et pénétrance .....	115
6.3 Mécanisme moléculaire .....	115
6.4 Impact fonctionnel du variant équin de pZRS .....	116
7. Perspectives .....	117
<b>Conclusion</b> .....	<b>119</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>121</b>
<b>Annexes</b> .....	<b>129</b>



## TABLE DES ANNEXES

Annexe 1 : Description des cas de polydactylie équine répertoriés à notre connaissance....	129
Annexe 2 : Fiche de prélèvement et de consentement à l'utilisation des prélèvements pour des recherches en génétique .....	133



## TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Caractéristiques morphologiques du membre chez divers vertébrés .....	25
Figure 2 : Les éléments squelettiques du membre antérieur chez le cheval .....	26
Figure 3 : Les axes de polarité de la main humaine .....	27
Figure 4 : Les axes de polarité du pied antérieur chez le cheval .....	27
Figure 5 : Développement du bourgeon du membre .....	28
Figure 6 : Embryon de souris à 10,5 jours de gestation observé au microscope électronique...	29
Figure 7 : Le modèle de la zone de détermination progressive .....	30
Figure 8 : L'expression de <i>fgf8</i> dans le bourgeon de membre de poulet .....	30
Figure 9 : Le modèle des deux signaux .....	31
Figure 10 : Le modèle du front de différenciation .....	32
Figure 11 : Rôle des gènes <i>Hoxa</i> dans la différenciation proximo-distale du bourgeon de membre .....	33
Figure 12 : L'expression du gène <i>Sonic hedgehog (Shh)</i> chez l'embryon de souris .....	33
Figure 13 : Le modèle d'expression spacio-temporelle de <i>Sonic hedgehog (Shh)</i> .....	34
Figure 14 : Rôle des gènes <i>Hoxd</i> dans la différenciation antéro-postérieure du bourgeon de membre .....	35
Figure 15 : Régulation de l'expression de <i>Shh</i> .....	36
Figure 16 : La différenciation des doigts .....	37
Figure 17 : Gènes impliqués dans la différenciation dorso-ventrale du bourgeon du membre.....	38
Figure 18 : Polydactylie pré-axiale et post-axiale chez l'homme .....	39
Figure 19 : L'intron 5 du gène <i>Lmbr1</i> contient une séquence régulatrice de <i>Shh</i> appelée ZRS..	41
Figure 20 : Expression de <i>Shh</i> chez des embryons de souris .....	41
Figure 21 : Mutations identifiées dans ZRS .....	21
Figure 22 : Polydactylies en raquette et en moufle chez le chat .....	48
Figure 23 : Radiographies de membres antérieurs de chats .....	48
Figure 24 : Les mutations connues de l'intron 5 du gène <i>Lmbr1</i> chez la souris, l'homme et le chat .....	49
Figure 25 : Chien Berger de Beauce et chien Norvégien de Macareux polydactyles .....	50
Figure 26 : Mutations canines de polydactylie .....	51
Figure 27 : Evolution des membres du cheval .....	52
Figure 28 : Préparation des os montrant une polydactylie tératogène et une polydactylie atavique chez le cheval .....	54
Figure 29 : Polydactylie unilatérale chez un poulain Selle français de deux jours .....	55
Figure 30 : Radiographie et échographie post-opératoires de la région métacarpienne proximale du membre thoracique gauche d'un poulain polydactyle .....	56
Figure 31 : Polydactylie unilatérale latérale chez un cheval Quarter Horse .....	57
Figure 32 : Investigations post opératoires sur le doigt surnuméraire d'un cheval polydactyle.....	58
Figure 33 : Polydactylie bilatérale chez un poulain Barbe .....	59
Figure 34 : Polydactylie bilatérale chez un poulain de Pure Race Espagnole .....	60
Figure 35 : Polydactylie unilatérale chez un poulain Quarter Horse .....	61
Figure 36 : Polydactylie sur les quatre membres chez une pouliche de six semaines .....	62
Figure 37 : Caryotype montrant une trisomie autosomique chez une jument de race Arabe...	64
Figure 38 : Comparaison de deux stratégies de clonage positionnel .....	66
Figure 39 : Principe de la technologie de séquençage de nouvelle génération Illumina® .....	69
Figure 40 : Photographie de la pouliche III4, vue de face .....	79

Figure 41 : Photographies des membres antérieurs de la pouliche III7 .....	80
Figure 42 : Photographie des membres antérieurs du poulain III11 .....	80
Figure 43 : Photographie des membres antérieurs du poulain II4, à l'âge de sept mois, vue de face .....	81
Figure 44 : Radiographies des membres antérieurs du cheval I1, extérieurement non polydactyle .....	82
Figure 45 : Radiographies de la région du boulet des membres antérieurs de la jument II13, extérieurement non polydactyle .....	83
Figure 46 : Radiographies de la région du boulet des membres antérieurs de la jument III12, extérieurement non polydactyle .....	84
Figure 47 : Radiographies de la région du boulet des membres antérieurs de la jument III13, extérieurement non polydactyle .....	85
Figure 48 : Radiographies de la région du boulet des membres antérieurs de la jument II20, extérieurement non polydactyle .....	86
Figure 49 : Radiographies des membres antérieurs de la jument II5, extérieurement non polydactyle .....	87
Figure 50 : Radiographies de la région du boulet des membres antérieurs de la jument II1, extérieurement non polydactyle .....	88
Figure 51 : Radiographies des membres antérieurs du poulain II4, à l'âge de sept mois .....	89
Figure 52 : Caryotype de l'individu II13, phénotypiquement non polydactyle .....	91
Figure 53 : Caryotype de l'individu II2, polydactyle .....	92
Figure 54 : Caryotype de l'individu III4, polydactyle .....	92
Figure 55 : Arbre généalogique de 67 membres de la famille de chevaux étudiée .....	93
Figure 56 : Manhattan plot de l'étude d'association .....	95
Figure 57 : Recherche des régions ZRS et pZRS équines par comparaison de la séquence de l'intron 5 de <i>LMBR1</i> dans différentes espèces .....	98
Figure 58 : Chromatogrammes de séquençage montrant un SNP A>C dans la séquence pZRS .....	99
Figure 59 : Arbre généalogique de la famille étudiée complété avec les résultats du génotypage de 36 individus pour le SNP A>C de pZRS .....	100
Figure 60 : Alignement des séquences de pZRS de différentes espèces .....	102
Figure 61 : Chromatogrammes de séquence montrant un SNP C>T dans la séquence de <i>GLI1</i> .....	103
Figure 62 : Arbre généalogique de la famille étudiée complété avec les résultats du génotypage de 31 individus pour le variant rs68704537 de <i>GLI1</i> .....	104
Figure 63 : Prédiction de l'effet du variant rs68704537 de <i>GLI1</i> , copie d'écran du résultat de PROVEAN .....	105
Figure 64 : Prédiction de l'effet du variant rs68704537 de <i>GLI1</i> , copie d'écran de la base de données Ensembl .....	106

## TABLE DES TABLEAUX

Tableau I : Gènes et locus identifiés dans de la polydactylie non syndromique chez l'Homme.....	43
Tableau II : Amorces de PCR et de séquençage Sanger .....	77
Tableau III : Caractéristiques radiographiques des membres des huit chevaux radiographiés.....	90
Tableau IV : Effectifs des descendants mâles et femelles polydactyles et non polydactyles des générations II et III de la famille étudiée .....	94
Tableau V : Quarante marqueurs les plus associés à la polydactylie .....	96
Tableau VI : Gènes candidats pour une polydactylie pré-axiale non syndromique .....	97
Tableau VII : Résultats du génotypage des chevaux polydactyles et non polydactyles de la famille étudiée pour le variant A>C de pZRS .....	100
Tableau VIII : Résultats du génotypage du SNP A>C de pZRS chez 344 chevaux et poneys.....	101
Tableau IX : Corrélation génotype-phénotype de 380 chevaux pour le variant de pZRS .....	102
Tableau X : Résultats du génotypage des chevaux polydactyles et non polydactyles de la famille étudiée pour le variant rs68704537 de <i>GLI1</i> .....	103
Tableau XI : Résultats du génotypage du variant rs68704537 de <i>GLI1</i> chez 69 chevaux de race Barbe et Arabe-Barbe .....	104
Tableau XII : Corrélation génotype-phénotype chez 100 chevaux, pour le variant rs68704537 de <i>GLI1</i> .....	105
Tableau XIII : Effectifs des individus polydactyles et non polydactyles de la famille étudiée et de la cohorte de chevaux génotypés pour l'allèle C du SNP de pZRS .....	106
Tableau XIV : Effectifs des individus polydactyles et non polydactyles de la famille étudiée et de la cohorte de chevaux génotypés pour l'allèle T du SNP rs68704537 de <i>GLI1</i> .....	107



## Liste des abréviations

ADN = acide désoxyribonucléique  
AER = *apical ectodermal ridge* = crête apicale ectodermique  
*Alx4* = *Aristaless-like homeobox 4*  
AR = acide rétinoïque  
ARN = acide ribonucléique  
BMP = *Bone morphogenetic protein*  
CAE = crête apicale ectodermique  
CNE = *conserved non coding element* = élément non codant conservé  
*Dbt* = *doublefoot*  
*DISP1* = *dispatched 1*  
EDTA = éthylène diamine tétra-acétique  
*En-1* = *Engrailed-1*  
EnvA = Ecole nationale vétérinaire d'Alfort  
ETS = *Erythroblast transformation specific*  
ETS1 = *ETS proto-oncogene 1, transcription factor*  
ETV = *ETS variant transcription factor*  
FGFs = facteurs de croissance fibroblastiques  
GABP $\alpha$  = *GA binding protein transcription factor subunit alpha*  
Gb = giga-bases  
GLI 1 = *GLI family zinc finger 1*  
GLI3 = *GLI kruppel family member 3*  
*Hand 2* = *heart and neural crest derivatives 2*  
Hox = *Homeobox*  
*Hw* = *Hemingway*  
*Hx* = *Hemimelix extra toes*  
IFCE = Institut français du cheval et de l'équitation  
*Ihh* = *Indian hedgehog*  
*IQCE* = *IQ domain-containing protein E*  
Kb = kilo-bases  
LMBR1 = *Limb development membrane protein 1*  
*Lmx1* = *LIM homeobox transcription factor 1*  
*Mei1s* = *Myeloid ecotropic viral integration site homeobox 1*  
*MIPOL1* : *Mirror-image polydactyly 1*  
*MSX1* = *Muscle segment homeobox 1*  
NGS = *next-generation sequencing*  
Pb = paire de bases  
PCR = *polymerase chain reaction*  
*Pdn* = *polydactyly nagoya*  
*PFR* = *phalanx forming region*  
*PITX1* = *Paired-like homeodomain transcription factor 1*  
PROVEAN = *protein variation effect analyzer*  
PZ = *progress zone* = zone de progression  
pZRS = pré-ZRS  
SHH = *Sonic hedgehog*  
SIFT = *sorting intolerant from tolerant*  
SIRE = système d'information relatif aux équidés

SNP = *single nucleotide polymorphism*  
SNV = *single nucleotide variant*  
Ssq = *sasquatch*  
STR = *short tandem repeat*  
Tbx = *T-box transcription factors*  
TULP3 = *Tubby-like protein 3*  
UK-1 = *United Kingdom 1*  
UK-2 = *United Kingdom 2*  
WMS = *werner mesomelic syndrome*  
WNT = *Wingless-Type MMTV integration site family members*  
Xt = *extra toes*  
ZAP = *zone d'activité polarisante*  
ZNF141 = *Zinc finger protein 141*  
ZP = *zone de progression*  
ZPA = *zone of polarization activity = zone d'activité polarisante*  
ZRS = *ZPA regulatory sequence = séquence régulatrice de la ZPA*

# INTRODUCTION

Chez les animaux, la polydactylie correspond à la présence d'un ou plusieurs doigts supplémentaires, au niveau des membres antérieurs et/ou postérieurs. Il s'agit d'un caractère congénital, c'est-à-dire se mettant en place au cours du développement embryonnaire et présent dès la naissance. Ce caractère peut être héréditaire ou non.

Cette malformation a été rapportée chez l'homme et chez de nombreuses espèces de vertébrés comme le chien, le chat, la souris, le poulet, la vache, le cheval, le cobaye, le chameau et les oiseaux. La polydactylie est rare chez le cheval, mais elle représente la malformation congénitale des membres la plus fréquente.

Récemment, des études génétiques ont permis d'identifier des causes de polydactylie chez l'Homme, chez qui les mutations causales sont très nombreuses, mais aussi chez le chat, le chien, et la souris. Concernant le cheval, aucune étude génétique n'a abouti à la découverte de mutation de polydactylie, à notre connaissance.

En 2005, un poulain de race Barbe a été présenté en consultation de chirurgie équine à l'Ecole nationale vétérinaire d'Alfort (EnvA) pour exérèse de deux doigts supplémentaires sur les membres antérieurs. D'autres poulains atteints de polydactylie ont été observés dans l'élevage auquel appartenait ce poulain. Une étude génétique a alors été entreprise, en collaboration entre les consultations de chirurgie équine (Dr Bianca Carstanjen) et de génétique (Dr Marie Abitbol) de l'EnvA. L'étude s'est poursuivie jusqu'à maintenant, suite à la découverte de nouveaux cas de polydactylie dans un élevage de chevaux Barbe en Allemagne. Notre étude s'inscrit dans ce contexte et elle visait à décrire le phénotype de polydactylie chez le cheval Barbe, d'essayer d'identifier le mode de transmission de cette anomalie et d'initier la recherche de la/des mutation(s) en cause.

Dans la première partie de ce manuscrit, bibliographique, nous avons rappelé les bases génétiques du développement embryonnaire du membre des vertébrés. Puis nous avons présenté les origines génétiques de la polydactylie chez la souris, l'homme, le chat et le chien, ainsi que les descriptions de polydactylie publiées dans l'espèce équine ; avant de terminer avec la présentation des stratégies de recherche de gènes et de mutations chez le cheval.

Dans la seconde partie de ce manuscrit, nous avons décrit les méthodes et les résultats de nos recherches ayant porté sur une polydactylie se transmettant dans une large famille de chevaux de race Barbe et croisés Barbe, avant de discuter nos résultats à la lumière des connaissances actuelles sur la polydactylie équine.



**Première partie :**

**Étude bibliographique**



# I. Introduction : le développement embryonnaire du membre

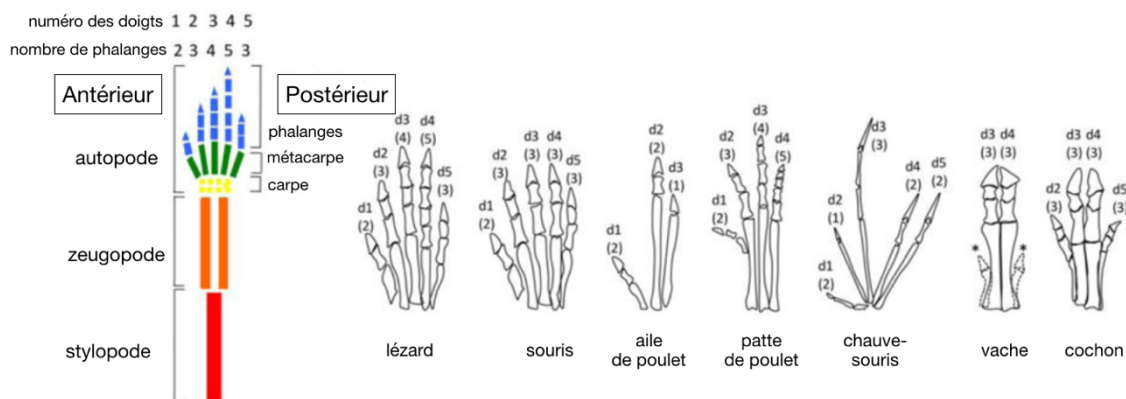
D'après les revues de (Delgado et Torres, 2016; Guéro, 2018; Guo *et al.*, 2013; Perrin *et al.*, 2008; Talamillo *et al.*, 2005; Tickle, 2015; Tickle et Towers, 2017; Tonkin, 2008; Zeller *et al.*, 2009; Zhu et Mackem, 2017)

Afin de comprendre les anomalies à l'origine d'une polydactylie, il est essentiel de comprendre les mécanismes régissant le développement des membres chez les vertébrés. Pour illustrer ces notions, nous nous baserons principalement sur les connaissances acquises dans l'espèce humaine, le poulet et la souris, qui sont des espèces modèles pour étudier le développement du membre.

## 1. Généralités

Il a été montré que le développement embryonnaire des membres supérieurs commençait dans l'espèce humaine dès le 24<sup>ème</sup> jour d'embryogenèse et se poursuivait jusqu'au 48<sup>ème</sup> jour. Celui des membres postérieurs débutait deux jours après. Le développement était initié au niveau des bourgeons des membres, structures formées par la migration des cellules du mésoderme latéral et des cellules du bord latéral des somites. Ils formaient de petites protubérances situées de part et d'autre de l'axe embryonnaire. C'est à partir de ces bourgeons que les quatre membres se développaient, selon trois axes de polarités (*Figures 1 à 4*) :

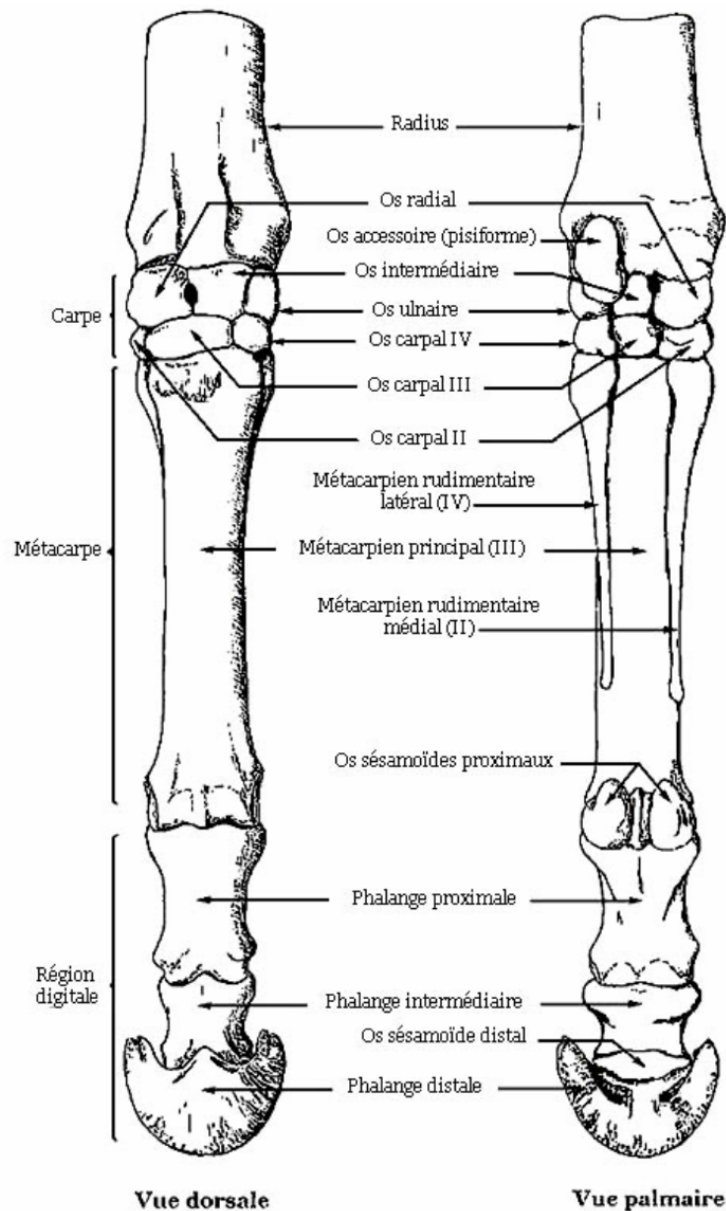
- l'axe proximo-distal, qui a été défini par la direction primaire de croissance, et qui forme les trois segments du membre : le stylopode, le zeugopode et l'autopode ;
- l'axe antéro-postérieur ou cranio-dorsal, qui a été défini par la séquence des doigts 1 à 5 ;
- l'axe dorso-ventral, qui correspondait au dos et à la paume de la main chez l'homme.



**Figure 1** : Caractéristiques morphologiques du membre chez divers vertébrés

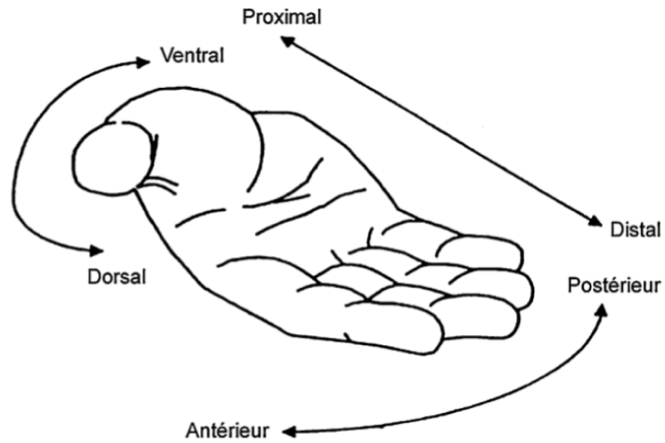
A gauche : architecture classique du membre à cinq doigts. Chez l'homme, le stylopode, segment proximal, contient un seul élément squelettique : l'humérus pour le membre supérieur ou le fémur pour le membre inférieur. Le zeugopode est formé du radius et de l'ulna pour le membre supérieur, du tibia et du péroné pour le membre inférieur. L'autopode contient l'ensemble des os de la main et du pied. Chez les différentes espèces de vertébrés représentés, cette architecture a évolué avec la fusion, la disparition ou la réduction de certaines structures. Les nombres (d1-d5) indiquent le nombre de doigts et les chiffres entre parenthèse le nombre de phalanges par doigt. \* indiquent des doigts vestigiaux (ergots)

(d'après Zhu et Mackem, 2017)



**Figure 2 :** Les éléments squelettiques du membre antérieur chez le cheval.

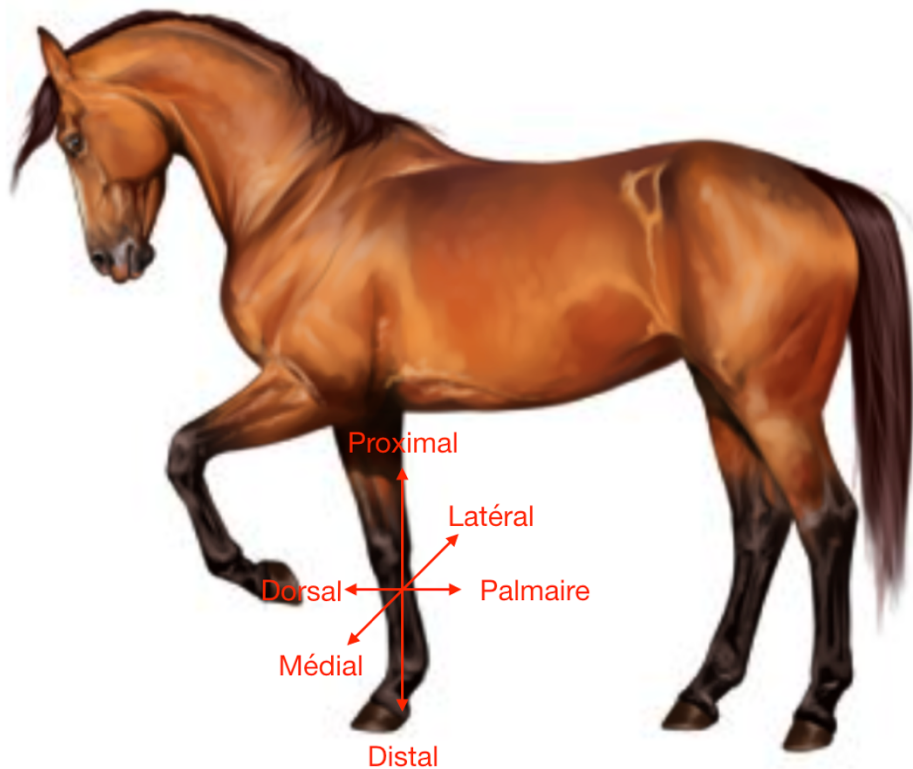
Le métacarpe se compose de trois os : l'os métacarpien principal (III) et deux os métacarpiens rudimentaires, un latéral (IV) et un médial (II). Ces deux os rudimentaires sont les vestiges des autres doigts du cheval qui ont disparu au cours de l'évolution. Le membre du cheval est pourvu d'un seul doigt se terminant par un seul sabot. La région digitale comprend trois phalanges (la phalange proximale, la phalange intermédiaire et la phalange distale) ainsi que deux os sésamoïdiens proximaux et un os sésamoïdien distal (« os naviculaire »).  
(d'après Barone, 1976)



**Figure 3** : Les axes de polarité de la main humaine

Les trois axes de polarité de la main humaine sont : l'axe proximo-distal qui s'étire du poignet jusqu'au bout des doigts, l'axe antéro-postérieur (également appelé l'axe cranio-caudal) selon lequel s'enchaînent les doigts 1 à 5 et l'axe dorso-ventral qui correspond au dos et à la paume de la main.

(d'après Tonkin, 2008)



**Figure 4** : Les axes de polarité du pied antérieur chez le cheval.

Chez le cheval, la nomenclature est légèrement différente. On parlera de l'axe dorso-palmaire (pour les membres antérieurs) ou dorso-plantaire (pour les membres postérieurs) au lieu de dorso-ventral. Au niveau de la main, les termes « antérieur » et « postérieur » sont respectivement remplacés par « médial » et « latéral ». On parlera donc de l'axe médio-latéral. Les termes « proximal » et « distal » restent inchangés pour désigner respectivement un élément proche de la racine du membre ou proche de l'extrémité libre.

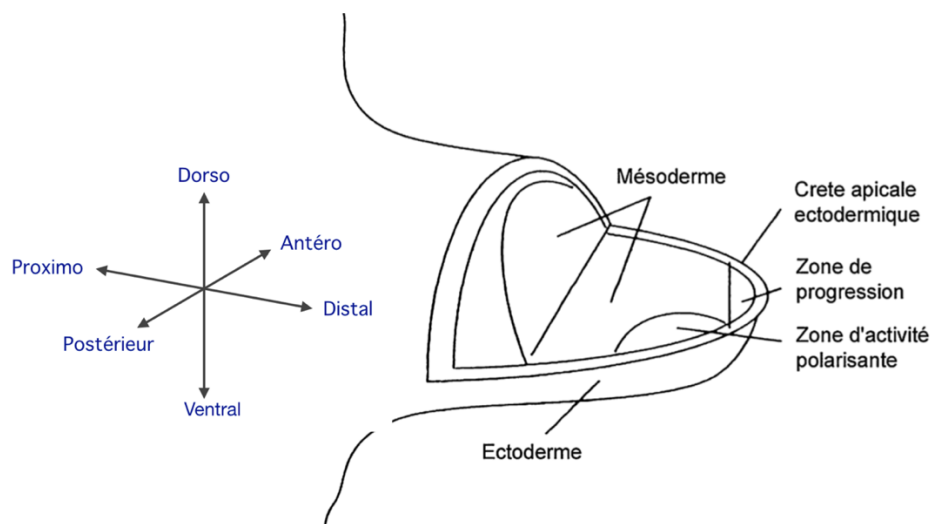
(Source image : <https://www.pinterest.fr>)

Il a été montré que les bourgeons des membres étaient constitués d'un axe mésenchymateux (d'origine mésodermique), recouvert par un feuillet ectodermique.

Au sein de l'axe mésenchymateux, les cellules provenant du mésoderme latéral étaient à l'origine de l'os et du cartilage alors que celles provenant des somites formaient les muscles et les tendons.

Il a été mis en évidence qu'il existait dans les bourgeons des membres trois centres de signalisation important. Il s'agissait de groupes de cellules spécialisées qui produisaient et libéraient des molécules dirigeant le développement des cellules voisines. Ces trois régions signalisatrices ont été nommées (*Figures 5 et 6*) :

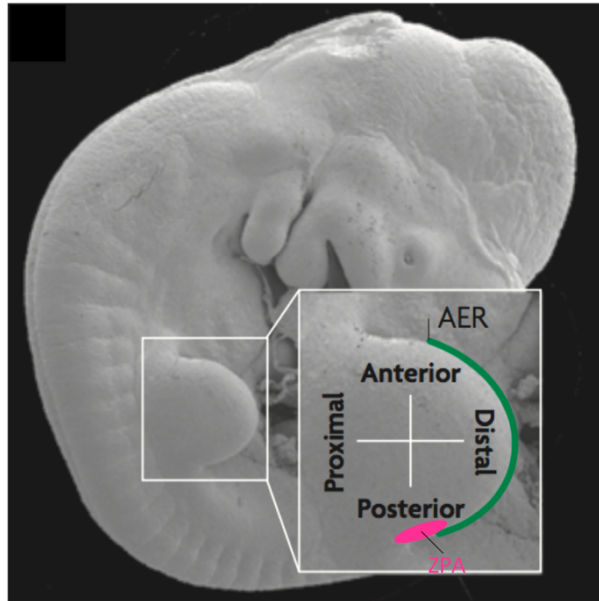
- la **crête apicale ectodermique** = **CAE** (*apical ectodermal ridge AER*), correspondant à un épaississement de l'ectoderme qui longe l'apex du bourgeon. Elle séparait le bourgeon en une partie dorsale et une partie ventrale. Elle était responsable de la croissance du membre selon l'axe proximo-distal. C'était la source de facteurs diffusibles qui déterminaient la **zone de progression** (ou zone de détermination progressive) = **ZP** (*progress zone PZ*) dont les cellules restaient à un état indifférencié et prolifératif ;
- l'**ectoderme** du bourgeon autre que la CAE ;
- la **zone d'activité polarisante** = **ZAP** (*zone of polarization activity ZPA*), située dans la région postérieure de l'axe mésenchymateux. Elle était responsable de la croissance selon l'axe antéro-postérieur.



**Figure 5 :** Développement du bourgeon du membre

Le mésoderme du bourgeon est recouvert par un feuillet ectodermique, s'épaississant au niveau de l'apex pour former la crête apicale ectodermique qui sépare le bourgeon en une partie dorsale et une partie ventrale. Les deux autres régions signalisatrices sont la zone de progression et la zone d'activité polarisante, située en partie postérieure du bourgeon.

(d'après Tonkin, 2008)



**Figure 6 :** Embryon de souris à 10,5 jours de gestation observé au microscope électronique. Le bourgeon du membre supérieur se forme au niveau du cœur. Le zoom montre les deux axes principaux de développement du membre. Le bourgeon du membre inférieur n'est pas visible. **AER** : Apical ectodermal ridge= crête apicale ectodermique (en vert), **ZPA** : zone d'activité polarisante (en rose) (d'après Zeller et al., 2009)

Il a été montré que le développement du membre était soumis à une régulation génétique complexe. Au cours de la mise en place et de la différenciation du bourgeon de membre, les différentes cellules recevaient des informations leur spécifiant leur position au sein des trois axes de polarité.

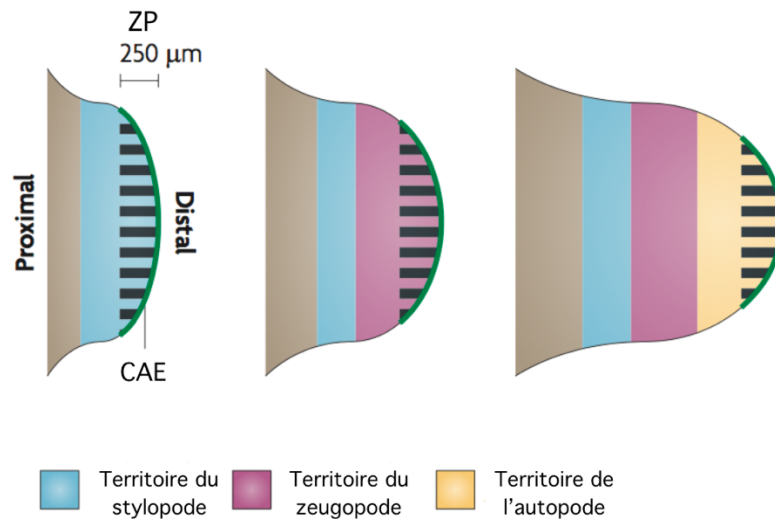
Les études ont montré que la croissance selon chaque axe était coordonnée dans le temps et l'espace et orchestrée par de nombreuses boucles de régulation interconnectées. Nous présenterons d'abord les modèles simples de développement selon chaque axe de polarité, pour aboutir à un modèle intégrant les interrelations.

## 2. La différenciation selon l'axe proximo-distal

**Remarque préliminaire :** les données présentées ci-dessous sont fondées sur des études menées chez la souris, le poulet et l'Homme. Chez la souris et le poulet, les gènes s'écrivent en minuscule et en italique. Chez l'Homme, les gènes s'écrivent en majuscule et en italique. Nous utiliserons cette règle issue de la nomenclature internationale.

2.1 Le modèle de la zone de détermination progressive (*progress-zone model*)  
(Delgado et Torres, 2016; Talamillo et al., 2005; Tickle, 2015; Zeller et al., 2009)

Ce modèle postule que des signaux en provenance de la crête apicale ectodermique maintiennent les cellules de la zone de progression dans un état indéterminé et prolifératif. L'identité de position des cellules mésenchymateuses le long de l'axe proximo-distal est déterminé par le moment de leur sortie de la ZP (*Figure 7*). Ainsi, les cellules quittant tôt la ZP au cours de la croissance du membre formeront des structures proximales alors que les cellules qui y séjournent plus longtemps auront un devenir distal (Zeller et al., 2009).

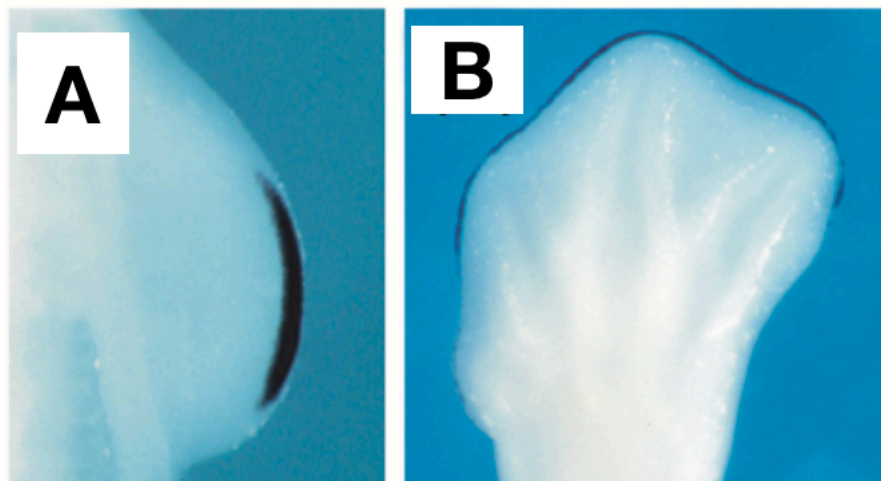


**Figure 7** : Le modèle de la zone de détermination progressive

La croissance progressant distalement, les cellules de la zone de progression ZP (zone hachurée en noir) les plus proximales ne vont plus recevoir les signaux en provenance de la crête apicale ectodermique CAE (ligne verte). Le « moment » de leur sortie de ZP détermine leur identité selon l'axe proximo-distal.

ZP= zone de progression (zone hachurée en noir), CAE = crête apicale ectodermique (ligne verte)  
(d'après Zeller et al., 2009)

Il a été montré que les signaux produits par la CAE étaient des molécules diffusibles de la famille des facteurs de croissance fibroblastiques (FGFs). Cinq de ces facteurs ont été identifiés. FGF8 est produit par l'ensemble des cellules de la CAE et pendant toute leur durée de vie (Figure 8). FGF2, FGF4, FGF9 et FGF17 sont synthétisés d'abord en région postérieure, puis progressent vers la région antérieure.



**Figure 8** : L'expression de *fgf8* dans le bourgeon de membre de poulet

**A** : Hybridation *in-situ* montrant l'expression localisée de *fgf8* au niveau de la crête apicale ectodermique chez un embryon de poulet de trois jours (couleur noire).

**B** : Hybridation *in-situ* montrant l'expression localisée de *fgf8* au niveau de l'ensemble de la crête apicale ectodermique chez un embryon de poulet de 6,5 jours (bordure noire).

(d'après Talamillo et al., 2005)

Le mécanisme moléculaire exact à l'origine de la formation du bourgeon du membre demeure inconnu. Il semblerait que la mise en place des bourgeons et le recrutement de cellules mésodermiques soient sous la dépendance des facteurs de transcription *Tbx5* et *Tbx4* (*T-box*

*Transcription Factors*), respectivement pour le bourgeon antérieur et le bourgeon postérieur. Alors que l'initiation de l'expression de *Tbx5* serait sous la dépendance des gènes homéotiques *Hox* (*Homeobox*), celle de *Tbx4* dépendrait de l'homéoprotéine PITX1 (*Paired Like Homeodomain 1*) (Tickle, 2015).

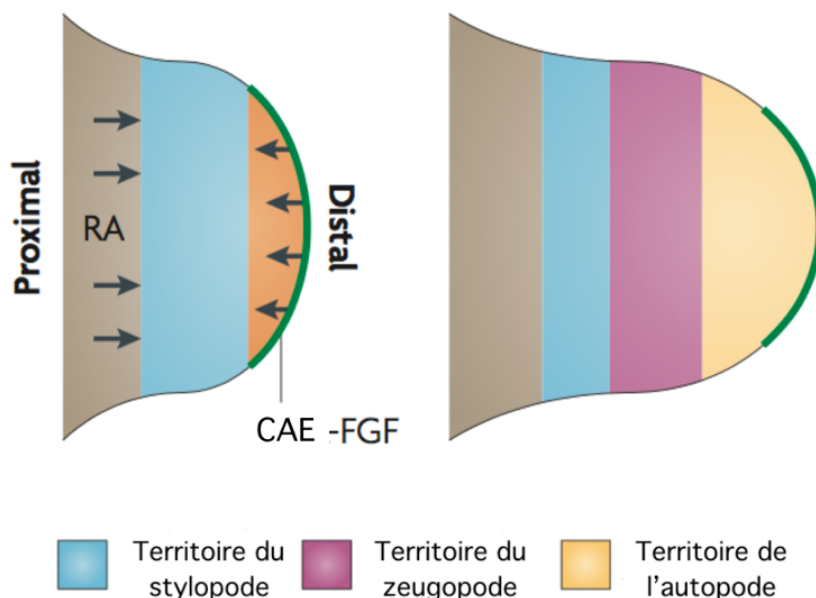
La mise en place de la CAE reposerait sur une boucle de régulation mettant en jeu les facteurs FGF10 et BMP (*Bone Morphogenetic Protein*) d'origine mésodermique et des signaux appelés WNT (famille de protéines sécrétées appelées *Wingless-Type MMTV Integration Site Family Members*) d'origine ectodermique.

Cependant, des expériences génétiques réalisées chez le poulet ont montré que l'identité proximo-distale des cellules était déterminée à un stade très précoce et que le *pool* de protéines inductrices augmentait consécutivement. Cela est en contradiction avec le modèle de la « zone de détermination progressive ». Un autre modèle a alors été proposé.

### 2.2 Le modèle des deux signaux (*two-signal model*)

(d'après Delgado et Torres, 2016 ; Zeller *et al.*, 2009)

Ce modèle suggère un effet antagoniste entre deux types de signaux. L'acide rétinoïque (AR) déterminerait une identité proximale des cellules du mésenchyme alors que les FGFs de la CAE qui antagoniseraient l'effet de l'AR induiraient une identité distale (*Figure 9*).



**Figure 9** : Le modèle des deux signaux

La région proximale (bleue) est déterminée par l'acide rétinoïque provenant du tronc alors que la région distale (orange), est déterminée par les FGFs issus de la CAE (CAE-FGF).

(d'après Zeller *et al.*, 2009)

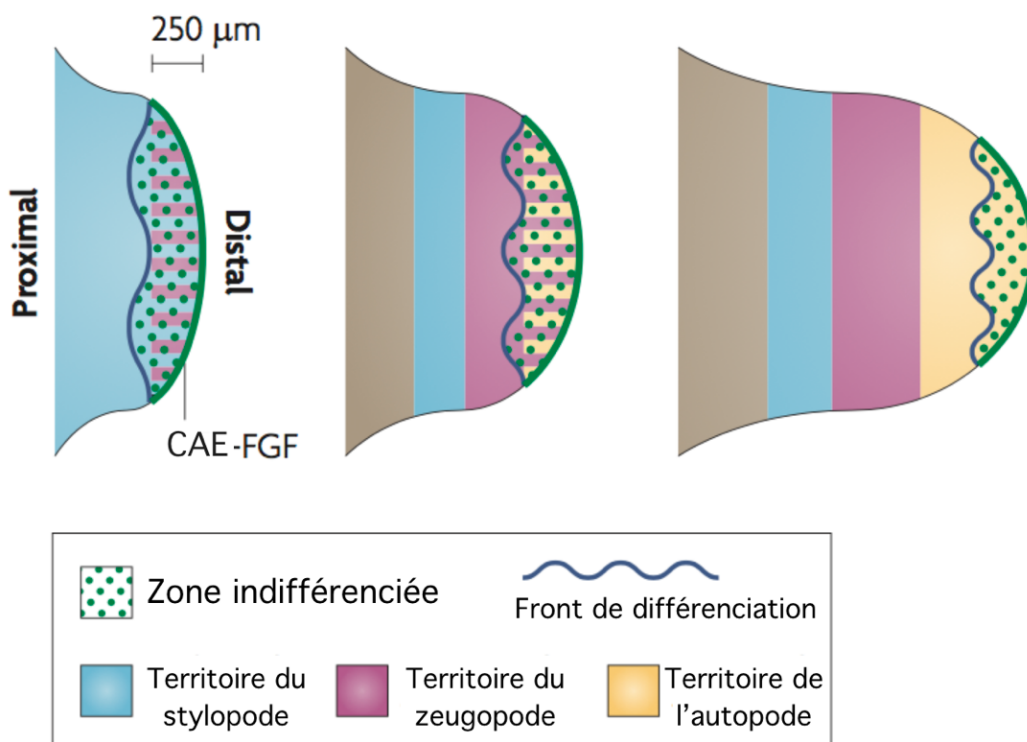
### 2.3 Le modèle du front de différenciation (*differentiation-front model*)

(d'après Delgado et Torres, 2016 ; Perrin *et al.*, 2008 ; Tonkin, 2008 ; Zeller *et al.*, 2009)

Ce modèle a été proposé afin de réconcilier les deux modèles précédents et proposer une description dynamique des événements moléculaires et cellulaires se produisant durant le développement de l'axe proximo-distal.

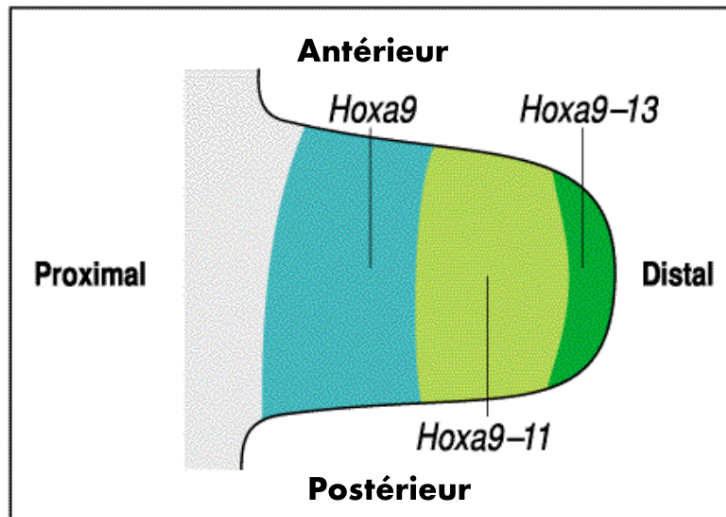
Les cellules les plus proximales seraient destinées précocement à donner des structures proximales. Mais cet état « par défaut » pourrait être modifié par les signaux provenant de la CAE.

Les FGFs maintiendraient les cellules mésenchymateuses distales dans un état indifférencié et prolifératif, alors que les cellules proximales seraient progressivement déterminées : elles exprimeraient des gènes spécifiques de leur segment et initieraient leur différenciation. La limite entre les cellules proximales déjà déterminées et les cellules plus distales soumises aux FGFs, simplement prédestinées, correspondrait au front de différenciation (*Figure 10*). Les cellules déterminées n'exprimeraient plus que les gènes correspondant à leur territoire. Par exemple le gène *Meis 1* (*Myeloid ecotropic viral integration site Homeobox 1*) pour le stylopode et les gènes homéotiques *Hox* (*Homeobox*) : *Hoxa 9* à *Hoxa 13* exprimés de manière imbriquée dans les futures zones du stylopode, du zeugopode et de l'autopode (*Figure 11*).



**Figure 10 :** Le modèle du front de différenciation

**CAE-FGF** = facteurs de croissance fibroblastiques (FGFs) produits au niveau de la crête apicale ectodermique (CAE). L'identité proximale est déterminée au fur et à mesure que les cellules quittent la zone indifférenciée, c'est-à-dire la zone soumise aux FGFs de la CAE. Une fois que les cellules ont traversé le front de différenciation (ligne bleue), elles n'expriment plus que les gènes définissant un segment particulier. (d'après Zeller et al., 2009)



**Figure 11 :** Rôle des gènes *Hoxa* dans la différenciation proximo-distale du bourgeon de membre

Les gènes homéotiques *Hoxa 9* à *Hoxa 13* s'expriment suivant un profil emboîté selon l'axe proximo-distal. (d'après Wolpert, 1999)

De même, la différenciation selon l'axe antéro-postérieur serait régie par différents mécanismes que nous allons présenter.

### 3. La différenciation selon l'axe antéro-postérieur

(d'après Zhu et Mackems, 2017 ; Tickle et Tower, 2017)

Il a été montré que la différenciation selon l'axe antéro-postérieur était régie par la zone d'activité polarisante (ZAP), située dans la région postérieure de l'axe mésenchymateux du bourgeon de membre. Cette zone était déterminée par l'expression localisée du gène *Sonic hedgehog* (*Shh*) par les cellules de la ZAP (Figure 12).



**Figure 12 :** L'expression du gène *Sonic hedgehog* (*Shh*) chez l'embryon de souris

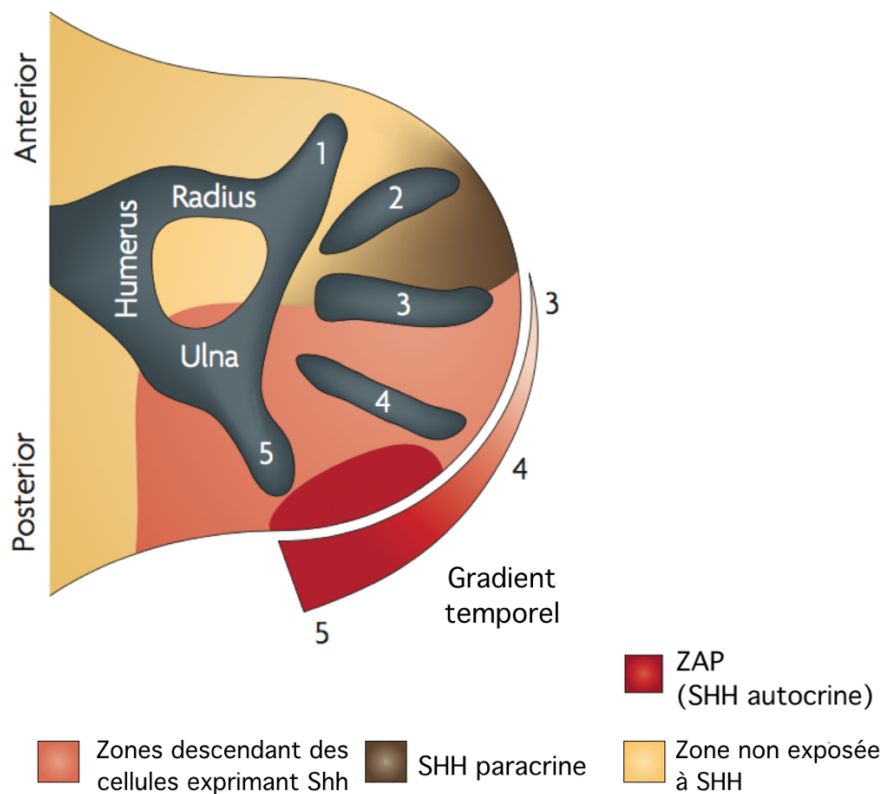
Hybridation *in-situ* montrant l'expression de *Shh* chez un embryon de souris de 11,5 jours. L'expression est localisée aux bords postérieurs des bourgeons des membres antérieurs et postérieurs (couleur bleue). (d'après Lettice et al., 2008)

### 3.1 Le modèle du gradient spacio-temporel

(d'après Guéro, 2018 ; Perrin *et al.*, 2008 ; Talamillo *et al.*, 2005 ; Tickle et Towers, 2017 ; Tonkin, 2008 ; Zeller *et al.*, 2009)

Lorsque les cellules mésodermiques quittent la ZPA, elles cesseraient d'exprimer *Shh*. La croissance se faisant depuis la région postérieure du bourgeon, les cellules quittant la ZPA pousseraient les autres cellules vers la région antérieure. Ainsi, de la région antérieure vers la région postérieure il y aurait (*Figure 13*) :

- des cellules n'ayant jamais exprimé *Shh*. Elles étaient au départ en dehors de la ZPA et se retrouveraient trop éloignées pour subir l'effet de SHH à distance. Elles donneraient le doigt I ;
- des cellules n'ayant jamais exprimé *Shh* mais soumises à l'action paracrine de SHH faiblement diffusible. Elles donneraient le doigt II et la partie antérieure du doigt III ;
- des cellules ayant exprimé brièvement *Shh*. Elles seraient à l'origine de la partie postérieure du doigt III ;
- des cellules ayant exprimé *Shh* pendant une durée plus longue qui donneraient l'ulna et les doigts IV et V.

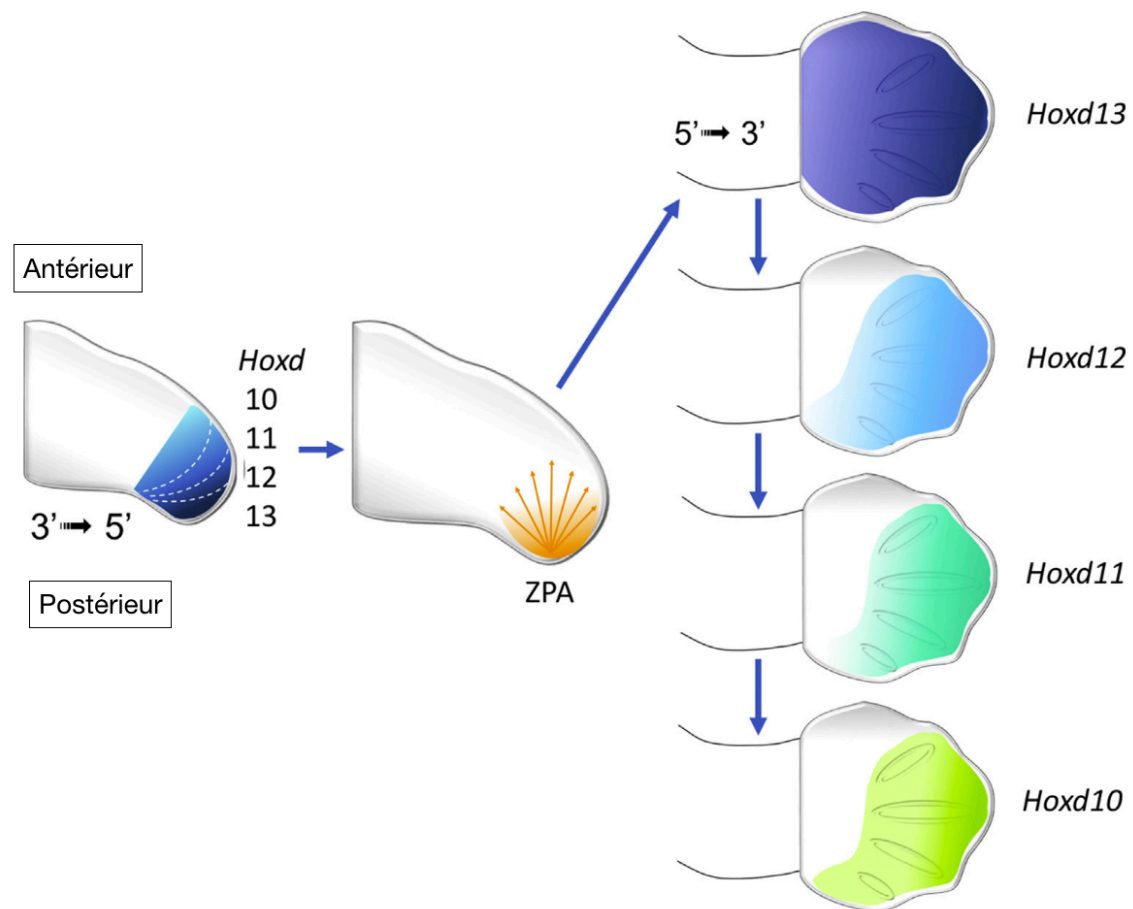


**Figure 13** : Le modèle d'expression spacio-temporelle de *Sonic hedgehog* (*Shh*)

L'identité antéro-postérieure des cellules est définie par un gradient spacio-temporel de la protéine SHH. Les cellules situées dans la ZPA (zone rouge) expriment *Shh*. Au moment où ces cellules cessent d'exprimer *Shh*, elles quittent la ZPA (cellules de la zone orange) et déplacent les cellules situées en dehors de la ZPA vers le pôle antérieur (cellules de la zone jaune) les rendant trop éloignées et donc non exposées à SHH. Les cellules ayant exprimé *Shh* donnent l'ulna, les doigts IV et V et une partie du doigt III. Les cellules donnant le doigt II et une partie du doigt III sont celles soumises à l'action paracrine de SHH (zone marron). L'humérus, le radius et le doigt I sont déterminés par un mécanisme indépendant de *Shh*.

(d'après Zeller *et al.*, 2009)

Le gradient de SHH aurait pour conséquence l'expression des gènes homéotiques *Hoxd9* à *Hoxd13* suivant un profil emboîté selon l'axe antéro-postérieur (Figure 14).



**Figure 14 :** Rôle des gènes *Hoxd* dans la différenciation antéro-postérieure du bourgeon de membre

Au moment de la création du bourgeon du membre, les gènes *Hoxd10* à *Hoxd13* s'expriment, chacun dans une zone plus restreinte que le précédent (figure de gauche). La lecture de l'ADN se produit alors dans le sens habituel 3'-5'. Ces gènes interviendraient dans la mise en place de la ZPA (zone orange). Puis l'expression de *Shh* par la ZPA permet une nouvelle expression des gènes *Hoxd*, suivant un profil emboîté selon l'axe antéro-postérieur. La lecture se fait alors dans le sens inverse 5'-3'. *Hoxd13* s'exprime sur toute la surface de l'autopode alors que l'expression de *Hoxd12*, *Hoxd11* et *Hoxd10* décroît spatialement et est localisée dans une zone plus restreinte à chaque fois. Ainsi, le territoire présomptif du doigt I est affecté par HOXD13 mais pas par HOXD10-12. (d'après Guéro, 2018)

Il a de plus été mis en évidence que la protéine SHH n'était pas réellement diffusible et ne créait pas vraiment de gradient. L'effet gradient du gène *Shh* passait en réalité par la régulation de l'expression de différents gènes et l'action de différents facteurs de transcription (Tickle et Towers, 2017).

### 3.2 L'activation de *Sonic hedgehog*

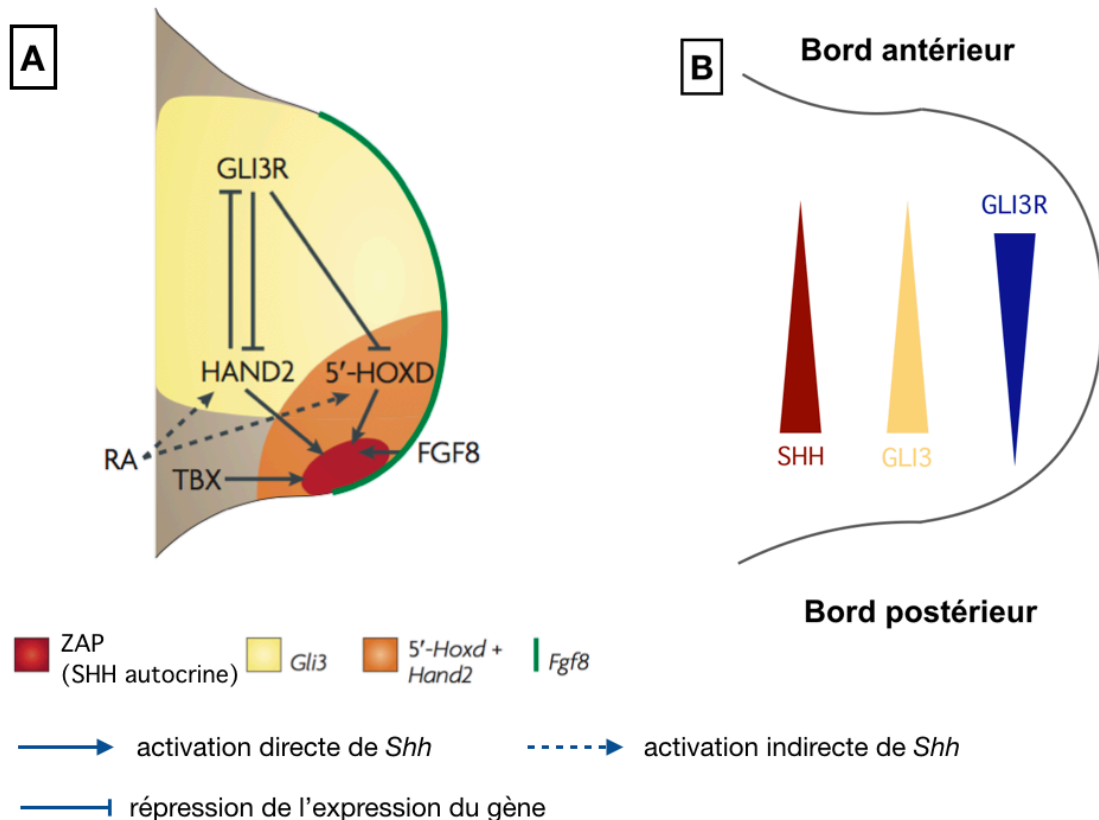
(d'après Delgado et Torres, 2016 ; Guéro, 2018 ; Guo *et al.*, 2013 ; Hill, 2007 ; Tickle et Towers, 2017 ; Zeller *et al.*, 2009 ; Zhu et Mackem, 2017)

Il a été mis en évidence que l'expression de *Shh* était soumise à une régulation complexe. Les gènes *Hand 2* (*Heart and neural crest derivatives 2*) et *5'-Hoxd* activeraient l'expression de *Shh* dans la ZPA. Ils seraient eux-mêmes régulés par l'action de la protéine GLI3 (*GLI Kruppel Family*

Member 3) qui existe sous deux formes : GLI3 (activateur de la transcription), et GLI3R sa forme répressive. Dans la partie antérieure du bourgeon, GLI3R inhiberait l'expression de *Hand2* et des *5'-Hoxd* et ainsi *Shh* ne s'exprimerait pas. L'expression de *Shh* serait ainsi restreinte à la partie postérieure du bourgeon où il existerait une boucle de régulation entre *Shh* et *Gli3* : *Shh* empêcherait la transformation de GLI3 en GLI3R (Figure 15).

D'autre part, l'acide rétinoïque, par l'intermédiaire de *Hand2* et des *5'-Hoxd*, FGF8 en provenance de la CAE et des gènes *Tbx* (*T-Box Transcription Factors*) pourrait activer l'expression de *Shh* dans la partie postérieure du bourgeon (Figure 15).

Enfin, *Alx4* (*Aristaless-like homebox 4*) inhiberait l'expression de *5'-Hoxd* donc de *Shh* en partie antérieure du bourgeon



**Figure 15** : Régulation de l'expression de *Shh*

**A** : Le réseau d'activation et d'inhibition de *Shh* cantonne son expression à la région postérieure du bourgeon du membre.

*5'-HOXD* : *5'-located Homeobox D* ; *FGF8* : *Fibroblast Growth Factor 8* ; *GLI3R* : forme répressive de *GLI3* ; *HAND2* : *Heart And Neural crest Derivatives 2* ; *RA* : acide rétinoïque ; *TBX* : *T-box*.

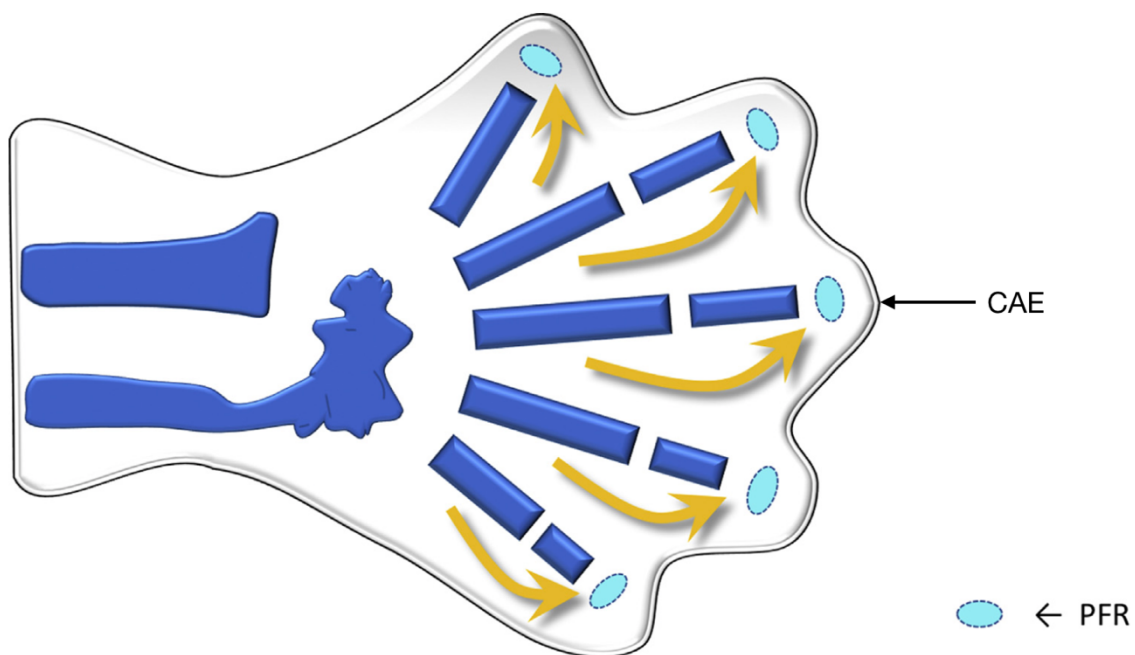
**B** : Gradient de concentration de *SHH*, *GLI3* et *GLI3R* entre les bords antérieur et postérieur du bourgeon. (d'après Zeller et al., 2009)

Il existerait ainsi une coordination entre la sécrétion des FGFs par la CAE et de *SHH* par la ZAP. La ZAP et la CAE seraient donc interdépendantes. *SHH* et les FGFs feraient ainsi partie d'une boucle de régulation permettant d'harmoniser la croissance proximo-distale et la croissance antéro-postérieure.

### 3.3 La formation des doigts

(d'après Delgado et Torres, 2016 ; Guéro, 2018 ; Perrin *et al.*, 2008)

Il a été montré que l'individualisation des doigts se faisait par un mécanisme d'apoptose sélective des cellules mésodermiques, faisant intervenir des protéines de la famille des BMP : BMP-2, BMP-4 et BMP-7. Il semblerait que le facteur régulateur GLI3 soit également impliqué dans l'apoptose interdigitale. L'apoptose débiterait par la fragmentation de la CAE qui persisterait uniquement au niveau de l'extrémité des rayons cartilagineux (*Figure 16*). Entre la CAE et l'extrémité distale des rayons cartilagineux, une zone de croissance appelée région formatrice des phalanges (PFR : *phalanx forming region*) a été mise en évidence. L'identité de chaque doigt et le nombre de phalanges qui les compose seraient déterminés par le mésoderme interdigité, via des facteurs de transcription qui agissent sur la PFR.



**Figure 16 :** La différenciation des doigts

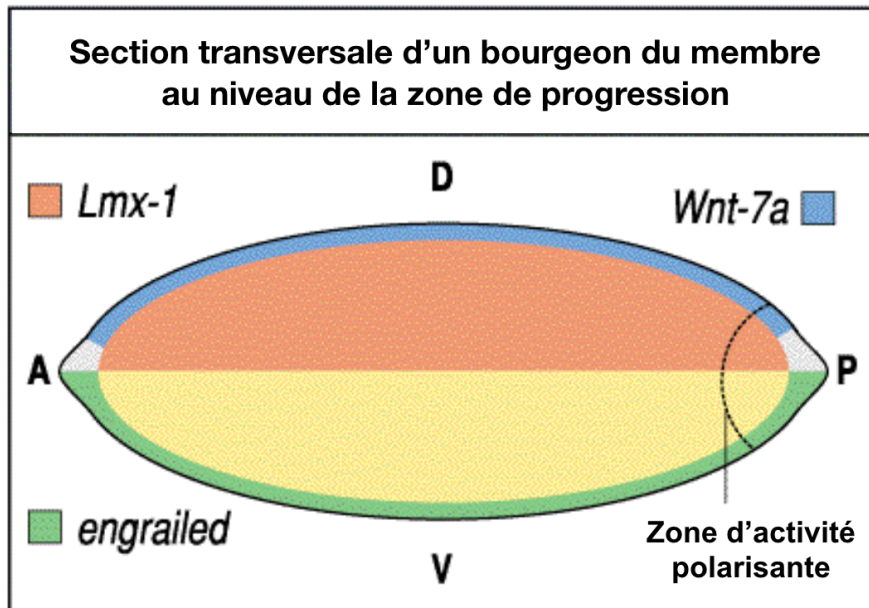
La région formatrice des phalanges (PFR, zones bleu clair) se trouve au sein du mésoderme, entre le squelette cartilagineux et la CAE (crête apicale ectodermique) qui régresse au niveau des espaces interdigités. Le contrôle de la croissance et de l'identité des futurs doigts se fait à partir d'une zone postérieure (flèches orange). (d'après Guéro, 2018)

### 4. La différenciation dorso-ventrale

(d'après Delgado et Torres, 2016 ; Guéro, 2018 ; Guo *et al.*, 2013 ; Philip-Sarles, 2008 ; Talamillo *et al.*, 2005 ; Tonkin, 2008)

Il a été mis en évidence que la différenciation dorso-ventrale était permise par les interactions entre l'ectoderme du bourgeon (autre que la CAE) et le mésoderme sous-jacent.

L'expression du gène *Wnt7a* (*Wingless-type mouse MMTV integration site family member 7a*) dans l'ectoderme dorsal induisait l'expression du gène *Lmx1* (*LIM homeobox transcription factor 1*) dans le mésoderme sous-jacent. Cela permettait l'acquisition d'un phénotype dorsal. Dans l'ectoderme ventral, *En-1* (*Engrailed-1*) inhibait l'expression de *Wnt7a*, ce qui permettait l'obtention d'un phénotype ventral (*Figure 17*).



**Figure 17 :** Gènes impliqués dans la différenciation dorso-ventrale du bourgeon du membre  
D = Dorsal, V = Ventral, A = Antérieur, P = Postérieur. Les couleurs correspondent aux zones d'expression des différents gènes. *Engrailed* : homologue d'*engrailed* ; *Lmx-1* : *LIM Homeobox Transcription Factor 1* ; *Wnt-7a* : *Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 7A*.  
(d'après Wolpert, 1999)

En résumé, il a été montré que le développement embryonnaire des membres était initié par deux paires de bourgeons constitués d'un axe mésodermique recouvert par des cellules ectodermiques. Les interactions entre les différents types de cellules aboutissaient à l'ébauche d'un membre présentant trois axes de polarité : proximo-distal, antéro-postérieur et dorso-ventral. La crête apicale ectodermique et la zone d'activité polarisante étaient interdépendantes. Les facteurs SHH et les FGFS se maintenaient mutuellement. Ces interactions activaient des éléments secondaires, en particulier les gènes homéotiques *Hox* qui s'exprimaient de manière segmentaire et étaient responsables de la mise en place des éléments squelettiques du membre. Les gènes *Hoxd* étaient responsables de l'architecture du membre selon l'axe antéro-postérieur tandis que les gènes *Hoxa* construisaient l'architecture proximo-distale.

Si au cours du développement, ces interactions complexes se voient perturbées, la morphologie définitive du membre peut être modifiée. C'est le cas lors de polydactylie.

## II. La polydactylie chez les mammifères

### 1. Généralités

(d'après Al Amin et Carter, 2021 ; Guo *et al.*, 2013 ; Philip-Sarles, 2008 ; Umair *et al.*, 2018)

Le mot polydactylie vient du grec « poly » qui signifie « nombreux » et de « dactylos » qui signifie « doigt ». Chez l'homme, la polydactylie se définit comme une malformation de la main ou du pied avec la présence d'un ou plusieurs doigts supplémentaires ou d'un ou plusieurs orteils supplémentaires. Chez les animaux, elle correspond à la présence d'un ou plusieurs doigts supplémentaires, au niveau des membres antérieurs et/ou postérieurs.

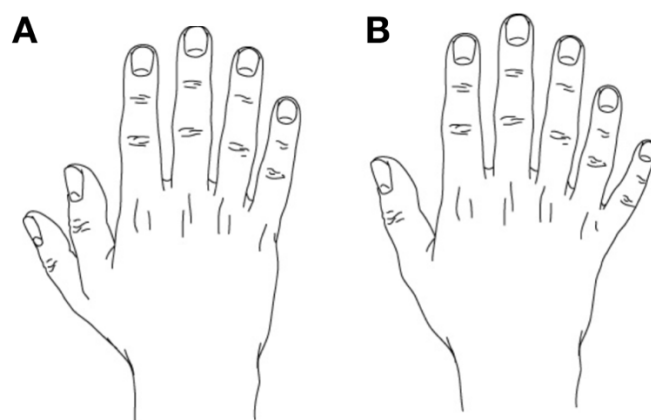
On entend par malformation une altération de l'anatomie normale et/ou de la structure fonctionnelle d'un organe ou d'un appareil.

Les anomalies se mettant en place par altération du processus normal de différenciation ou de croissance durant le développement embryonnaire et l'organogenèse sont qualifiés de caractères congénitaux (Giofré *et al.*, 2004). La polydactylie est donc un caractère congénital. Mais elle peut être héréditaire ou non.

Il existe une grande variabilité d'expression de la polydactylie, allant d'un simple bourgeon osseux seulement décelable à la radiographie à plusieurs doigts complètement développés. La polydactylie peut affecter seulement les membres antérieurs ou postérieurs, ou les quatre membres à la fois ou encore seulement un membre (cas très rare chez l'homme, mais identifié chez les animaux).

Les différentes formes de polydactylie ont été classées selon la position du ou des doigts supplémentaires. On distingue (*Figure 18*) :

- la polydactylie **pré-axiale** (ou radiale) lorsque le doigt surnuméraire est situé du côté du pouce chez l'homme et du côté interne du membre chez les autres mammifères ;
- la polydactylie **post-axiale** lorsque le doigt surnuméraire est situé du côté du 5<sup>ème</sup> doigt de la main ou du côté externe du membre chez les mammifères ;
- la polydactylie **centrale** qui concerne les trois doigts centraux. C'est la forme la plus rare chez les mammifères. Elle est souvent associée à une fusion des doigts, on parle alors de polysyndactylie.



**Figure 18 :** Polydactylie pré-axiale et post-axiale chez l'homme

**A :** polydactylie pré-axiale : duplication du pouce, **B :** polydactylie post-axiale : duplication de l'auriculaire.  
(Source : wikipédia. <https://fr.wikipedia.org/wiki/Polydactylie>)

La polydactylie peut être une anomalie isolée (polydactylie non syndromique). Il s'agit alors le plus souvent d'un caractère héréditaire, transmis selon un mode autosomique dominant chez l'homme (Al Amin et Carter, 2021 ; Umair *et al.*, 2018). Des formes de polydactylie associées à d'autres symptômes ont également été répertoriées. On parle dans ce cas de polydactylie syndromique (Al Amin et Carter, 2021 ; Umair *et al.*, 2018)

Des cas de polydactylies d'origine tératogène ont également été décrits, par exemple suite à la prise de thalidomide chez des femmes enceintes (Monaco, 2000).

Les espèces pour lesquelles les connaissances sont les plus précises concernant la polydactylie sont l'Homme, la souris, le chat et le chien. Mais de nombreux cas ont été rapportés chez d'autres espèces telles que le cheval, la vache, le cobaye ou le chameau (Valloire-Lucot, 2012).

## 2. Polydactylies caractérisées à l'échelle moléculaire

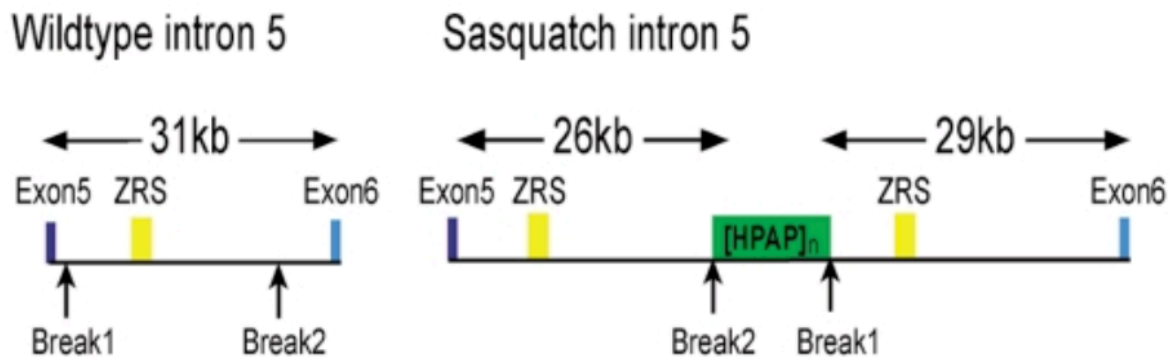
### 2.1 La polydactylie chez la souris

La souris de laboratoire a été beaucoup utilisée dans les travaux étudiant le développement du membre. Les mutations à l'origine de polydactylie décrites chez la souris sont très variées. Différents modes de transmission ont été identifiés. La polydactylie dans cette espèce peut être syndromique ou non syndromique. Nous allons présenter les principales mutations de souris qui ont conduit à la découverte des mécanismes moléculaires à l'origine d'une polydactylie.

#### i. Les mutations dans ZRS (ZPA Regulatory Sequence)

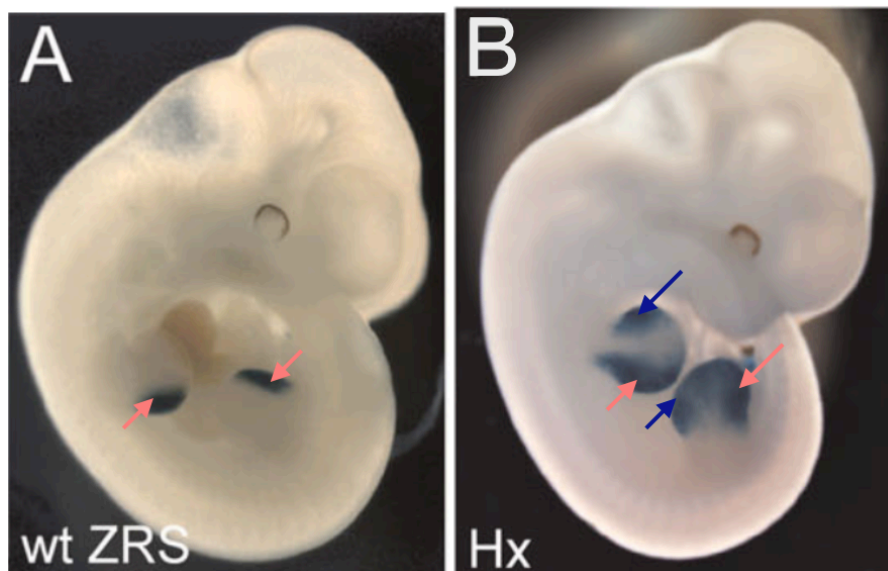
Sharpe et collaborateurs (Sharpe *et al.*, 1999) ont mis en évidence une polydactylie pré-axiale chez des souris mutantes (obtenue par transgénèse aléatoire d'insertion) appelées *Sasquatch* (*Ssq*). Les individus homozygotes pour la mutation *Ssq* étaient polydactyles à la fois sur les antérieurs et les postérieurs et présentaient une réduction de la longueur des tibias (appelée hémimélie) sur les postérieurs. Les individus hétérozygotes présentaient une polydactylie restreinte aux postérieurs. La mutation *Ssq* perturbait donc le développement du membre selon les axes antéro-postérieur et proximo-distal. Par hybridation *in situ*, les auteurs ont mis en évidence l'expression ectopique du gène *Shh* dans la partie antérieure du bourgeon du membre chez les souris mutantes *Ssq*. Il semblait donc que l'insertion du transgène perturbe la capacité de *Shh* à intégrer le signal répresseur qui empêchait normalement son expression dans la partie antérieure du bourgeon (Sharpe *et al.*, 1999).

Le transgène s'était inséré sur le chromosome 5 de la souris, dans l'intron 5 du gène *Lmbr1*, (*Limb development membrane protein 1*) situé à environ un Mégabase (Mb) de *Shh* (Lettice *et al.*, 2002). L'intron 5 de *Lmbr1* contenait un CNE (*Conserved Non Coding Element* ou Élément Non Codant Conservé), c'est-à-dire une séquence non codante très bien conservée chez les mammifères au cours de l'évolution. Sa taille a été identifiée à 800 paires de base (pb). Il semblait que cette séquence agisse comme régulateur en *cis* de l'expression de *Shh* dans la ZPA du bourgeon du membre. Elle a été nommée ZRS (ZPA Regulatory Sequence ou Séquence de Régulation de la ZPA). La mutation *Ssq* correspondait à la duplication de ZRS qui s'était produite lors de l'insertion au hasard du transgène (*Figure 19* ; Lettice *et al.*, 2003).



**Figure 19 :** L'intron 5 du gène *Lmbr1* contient une séquence régulatrice de *Shh* appelée ZRS  
 A gauche : l'intron 5 de *Lmbr1* chez une souris sauvage. A droite : l'intron 5 chez une souris mutante *Sasquatch*  
 Les exons 5 et 6 sont représentés respectivement en bleu foncé et bleu clair. La séquence ZRS (ZPA Regulatory Sequence) correspond au cadre jaune. Les points d'insertion de la duplication sont représentés par les flèches. Chez la souris mutante *Ssq*, le rectangle vert indique le lieu d'insertion du transgène. On note une duplication de ZRS. *Wildtype* : sauvage.  
 (d'après Lettice et al., 2003)

Par la suite, deux autres mutations dans ZRS ont été mises en évidence chez la souris. Il a été montré que la mutation *hemimelix extra toes (Hx)* correspondait à une substitution G>A en position 545 dans ZRS. Elle entraînait une polydactylie pré-axiale et un raccourcissement du tibia et du radius à l'origine d'une torsion de l'axe des membres. La mutation *M100081* correspondait à une substitution A>G en position 406 et était associée à une polydactylie pré-axiale et un raccourcissement du tibia. Elles étaient toutes deux responsables d'une expression ectopique de *Shh* dans la partie antérieure du bourgeon du membre (*Figure 20 ; Lettice et al., 2008*)



**Figure 20 :** Expression de *Shh* chez des embryons de souris

Embryons de souris transgéniques, au stade 11,5 jours. Le transgène est constitué du gène rapporteur *LacZ* (qui donne une coloration bleue en présence de Xgal), placé sous le contrôle de ZRS sauvage (A) ou de ZRS mutant *Hx* (B)

**A :** L'expression de *Shh* est limitée à la région postérieure du bourgeon du membre (flèches roses).

**B :** L'expression de *Shh* est retrouvée à la fois dans la région antérieure (flèches bleues) et dans la région postérieure (flèches roses) du bourgeon de chaque membre.

(Lettice et al., 2008)

Les travaux de Amano *et al.*, (2017) ont mis en évidence le mécanisme moléculaire de la mutation *Hx*. La substitution faisait apparaître, au sein de la séquence de ZRS, un nouveau motif de liaison *cis* pour un facteur de transcription activateur. Dans ce cas, il s'agirait du facteur MSX1 (*Muscle Segment Homeobox 1*) (Amano *et al.*, 2017).

## ii. Autres mutations identifiées chez la souris

Il a été mis en évidence que la mutation *doublefoot* (*Dbt*) était une mutation autosomique semi-dominante située sur le chromosome 1 de la souris. Elle était responsable d'une polydactylie pré-axiale affectant les quatre membres et entraînait la formation de six à neuf doigts par membre. Les homozygotes mutés n'étaient pas viables, du fait d'importantes malformations faciales. Les hétérozygotes pouvaient présenter également une malformation des tibias, un crâne élargi, une hydrocéphalie et une baisse de la fertilité et de la viabilité. La mutation *doublefoot* correspondait à la délétion d'un long fragment de 600 pb contenant 24 gènes et une partie de la séquence d'un 25<sup>ème</sup> gène. La perte d'autant de gènes pouvait expliquer les autres malformations retrouvées.

Chez les individus hétérozygotes, les auteurs ont mis en évidence une modification du gradient de GLI3R et du ratio GLI3/GLI3R selon l'axe antéro-postérieur du bourgeon du membre (voir partie sur le développement du membre). GLI3R se retrouvait en quantité inférieure à GLI3 dans la région antérieure du bourgeon. Cela pouvait expliquer l'expression ectopique du gène *Indian hedgehog* (*Ihh*) mise en évidence dans le bourgeon du membre. Il a été mis en évidence que *Ihh* était impliqué dans la différenciation, prolifération et maturation des chondrocytes au cours du développement. Il était situé à 50 kilobases (kb) en amont du site de la délétion. Le mécanisme moléculaire exact à l'origine de son expression ectopique dans le bourgeon du membre est resté inconnu. La délétion pouvait affecter un élément régulateur en *cis* de *Ihh*, situé à proximité ou au sein de la séquence délétée (Babbs *et al.*, 2008).

Deux mutations affectent la séquence du gène *Gli3* ont été mise en évidence. La mutation *Extra toes* (*Xt*) est une délétion entraînant l'abolition totale de l'expression du gène *Gli3* chez les homozygotes mutés et une expression réduite chez les individus hétérozygotes. Les homozygotes étaient non viables et présentaient une polydactylie sévère. Les hétérozygotes présentaient une polydactylie pré-axiale modérée associée à des anomalies crâniennes.

La mutation *Polydactyly Nagoya* (*Pdn*) correspondait à l'insertion d'un rétrotransposon au sein de la séquence de *Gli3*, ce qui modifiait l'épissage du gène. Les homozygotes mutés présentaient une polydactylie pré-axiale aux quatre membres, une malformation du sternum, une hémimélie des tibias et mouraient rapidement après la naissance. Les hétérozygotes présentaient une polydactylie plus modérée avec un doigt supplémentaire sur les membres antérieurs et un doigt simplement élargi sur les membres postérieurs (Schimmang *et al.*, 1994 ; Valloire-Lucot, 2012).

## 2.2 La polydactylie chez l'Homme

Il a été montré que la polydactylie était la malformation de la main la plus fréquente chez l'homme. Sa prévalence a été estimée entre 0,3 à 3,6 enfants atteints pour 1000 naissances. Au moins dix locus et six gènes ont été identifiés comme causes d'une polydactylie non syndromique humaine (Umair *et al.*, 2018). Ils sont présentés dans le tableau I.

*Tableau 1* : Gènes et locus identifiés dans de la polydactylie non syndromique chez l'Homme  
D'après : (Umair *et al.*, 2018 ; OMIM : <https://www.omim.org>).

Type de polydactylie	Locus, gènes	Phénotype	OMIM
Pré-axiale type 1	<i>ZRS</i> : ZPA regulatory sequence <i>GLI1</i> : GLI Family Zinc Finger 1	Duplication du pouce	174400
Pré-axiale type 2	<i>ZRS</i>	Pouce à trois phalanges	174500
Pré-axiale type 3	Inconnus	Duplication de l'index	174600
Pré-axiale type 4	<i>ZRS</i> <i>GLI3</i> : GLI Family Zinc Finger 3	Polysyndactylie	174700
Post-axiale type A1	<i>GLI3</i>	Duplication du 5 <sup>ème</sup> doigt et du 5 <sup>ème</sup> orteil	174200
Post-axiale type A2	<i>13q21-q32</i>	Duplication du 5 <sup>ème</sup> doigt	602085
Post-axiale type A3	<i>19p13.2-p13.1</i>	Duplication du 5 <sup>ème</sup> doigt et/ou du 5 <sup>ème</sup> orteil	607324
Post-axiale type A4	<i>7q22.1</i>	Duplication du 5 <sup>ème</sup> doigt ou doigt supplémentaire incomplet avec protubérance cutanée	608562
Post-axiale type A5	<i>13q13.3-q21</i>	Duplication du 5 <sup>ème</sup> doigt et/ou du 5 <sup>ème</sup> orteil	263450
Post-axiale type A6	<i>ZNF141</i> : Zinc Finger Protein 141	Duplication du 5 <sup>ème</sup> doigt et/ou du 5 <sup>ème</sup> orteil	615226
Post-axiale type A7	<i>IQCE</i> : IQ Domain-Containing Protein E	Duplication du 5 <sup>ème</sup> orteil	617642
Post-axiale type A-EVC	<i>GLI1</i>	Duplication du 5 <sup>ème</sup> doigt et/ou du 5 <sup>ème</sup> orteil et/ou doigt ou orteil supplémentaire incomplet avec protubérance cutanée	165220
Post-axiale type B	<i>GLI3</i> , <i>13q21-q32</i> , <i>19p13.2-p13.1</i> , <i>7q21-q34</i>	Doigt supplémentaire incomplet, petite protubérance cutanée avec parfois un ongle ou 5 <sup>ème</sup> doigt bifide	608562

En miroir	<i>MIPOL1 : Mirror-Image Polydactyly 1</i> <i>PITX1 : Paired Like Homeodomain 1</i>	1 <sup>er</sup> doigt absent. Duplication des doigts postérieurs et inversion de l'ordre des doigts.	135750
Centrale	Inconnus	Duplication du 2 <sup>ème</sup> , 3 <sup>ème</sup> ou 4 <sup>ème</sup> doigt	
Dorsale	Inconnus	Doigt supplémentaire à la face dorsale de la main ou du pied	
Polysyndactylie de type Haas	<i>GLI3, ZRS</i>	Polysyndactylie (fusion de tous les doigts) et présence d'un rayon supplémentaire pré ou post-axial	186200

OMIM : référence de la base de données *Online Mendelian Inheritance in Man*, <https://www.omim.org>.  
A-EVC : *Ellis-van Creveld syndrome*

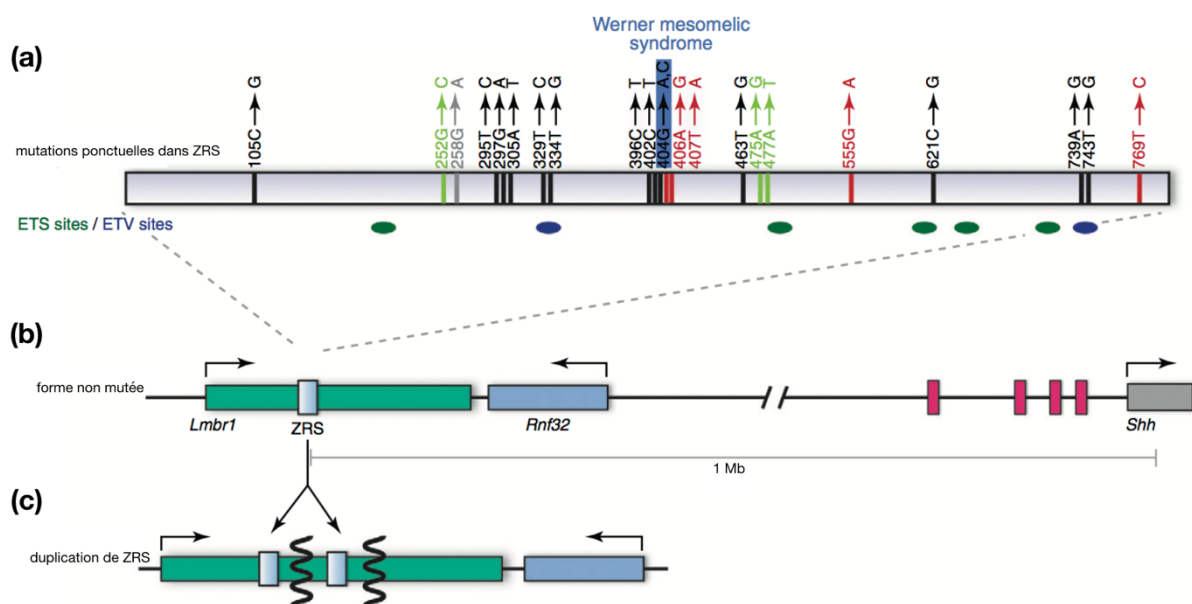
Nous allons présenter brièvement les gènes et séquences connus à ce jour pour être à l'origine de polydactylie chez l'homme (*Tableau I*).

#### i. Des mutations dans ZRS

De très nombreuses mutations ponctuelles dans ZRS, associées à différentes formes de polydactylie, ont été mises en évidence. ZRS est situé dans l'intron 5 du gène *LMBR1*. Pour la plupart des mutations, le mécanisme moléculaire n'a pas été élucidé. En revanche, il a été montré que certaines mutations ponctuelles modifiaient le profil de liaison de facteurs de transcription impliqués dans la régulation à distance de l'expression de *SHH* (Amano *et al.*, 2017 ; Anderson *et al.*, 2012 ; Lettice *et al.*, 2017, 2012 ; Umair *et al.*, 2018). Deux mécanismes différents pouvaient être mis en jeu. Soit la substitution entraînait la perte d'un motif de liaison *cis* auquel se liait normalement un facteur de transcription répresseur soit elle faisait apparaître un nouveau motif de liaison *cis* auquel se liait un facteur de transcription activateur. De telles mutations impliquant par exemple les facteurs de transcription de la famille ETS (*Erythroblast Transformation Specific*), tels que ETS1 (*ETS Proto-Oncogene 1, Transcription Factor*), GABP $\alpha$  (*GA Binding Protein Transcription Factor Subunit Alpha*), ETV4 (*ETS Variant Transcription Factor 4*) et ETV5 (*ETS Variant Transcription Factor 5*) ont été identifiées (Anderson *et al.*, 2012 ; Lettice *et al.*, 2012)(*Figure 21*).

Il a été montré que ETS1 et GABP $\alpha$  déterminaient les limites d'expression de *Shh* dans le bourgeon du membre donc déterminaient les limites de la ZPA. ETV4 et ETV5 agissaient en restreignant l'expression de *Shh* au bord postérieur du bourgeon des membres, évitant ainsi son expression ectopique en dehors de la ZPA. Deux mutations ponctuelles par substitution dans deux familles différentes ont été identifiées au sein d'un des sites de liaison ETV, en position 739 et 743 (*Figure 21*). En modifiant l'équilibre du nombre des sites de liaison des facteurs ETS, ces mutations entraînaient la dérégulation de l'expression de *Shh* dans la partie antérieure du bourgeon des membres (Lettice *et al.*, 2012).

Le terme « ZRS associated-syndroms » (syndromes associés à ZRS) a été suggéré pour classer les anomalies des membres causées par des modifications de la séquence de ZRS (Wieczorek *et al.*, 2010). Les sujets atteints du syndrome mésomélique de Werner (« Werner mesomelic syndrome », WMS) présentent une polydactylie pré-axiale des mains et des pieds et/ou la présence de cinq doigts mais sans pouce, associée à une hypoplasie ou une aplasie des tibias. L'origine moléculaire a été identifiée dans deux familles différentes. Il s'agissait d'une substitution G>A ou G>C en position 404 (Figure 21, Anderson *et al.*, 2012). Ces mutations ponctuelles avaient pour conséquence la perte de liaison d'un facteur de transcription répresseur et donc l'expression de *Shh* au-delà de sa frontière habituelle, s'étendant dans la partie antérieure du bourgeon du membre (Anderson *et al.*, 2012 ; Lettice *et al.*, 2017). Un autre exemple était la duplication complète de ZRS, causant une polydactylie de type Haas (voir tableau I ; Figure 21 ; Wieczorek *et al.*, 2010).



**Figure 21** : Mutations identifiées dans ZRS

(a) La séquence ZRS située dans l'intron 5 de *LMBR1* est détaillée en haut dans le cadre gris, montrant les positions des mutations ponctuelles connues à l'origine de polydactylie pré-axiale. En noir : chez l'homme ; en rouge : chez la souris ; en vert : chez le chat ; en gris : chez le poulet. Les positions des sites de liaison des facteurs de transcription ETS (ETS1/ GAPB $\alpha$ ) et ETV (ETV4/ETV5) sont représentés respectivement par les ovales verts et bleus. La position de la mutation « Werner mesomelic syndrome » est surlignée en bleu. (b) *Shh* et ses séquences régulatrices situées en amont sont représentés dans le schéma du milieu. En rose sont représentées les séquences activatrices « enhancers ». (c) La duplication de la séquence ZRS est à l'origine de la polydactylie de type Haas. Le segment dupliqué peut être de longueur variable. (d'après Anderson *et al.*, 2012)

Enfin il a été montré que de nombreux sites de liaison pour les facteurs HOXD étaient situés au niveau de l'extrémité 5' de ZRS. C'est le nombre de sites de liaison qui déterminait le niveau d'expression de *Shh*, au cours des premiers stades du développement. Ainsi la perte de motifs de liaison par mutations ponctuelles avait pour conséquence une diminution du niveau d'expression de *Shh*, dépendante du nombre de sites de liaison perdus (Lettice *et al.*, 2017).

## ii. Des mutations dans pré-ZRS

Au cours d'une étude portant sur une cohorte d'enfants présentant une polydactylie pré-axiale non syndromique de type I, Xiang et collaborateurs (Xiang *et al.*, 2017) ont mis en évidence quatre mutations ponctuelles par substitution chez six individus. Ces mutations sont situées dans une région de l'intron 5 de *LMBR1*, située à 585 paires de base en amont de ZRS. Cette région a été nommée pré-ZRS (pZRS). Potuijt et collaborateurs (Potuijt *et al.*, 2018) ont également détecté une mutation ponctuelle par substitution dans la séquence de pZRS chez dix individus d'une même famille présentant un pouce triphalangé et une polysyndactylie affectant les mains et les pieds. Une caractérisation fonctionnelle à l'aide d'embryons de souris transgéniques a été réalisée. Elle a montré une extension significative du territoire d'expression de *SHH* à l'ensemble du bourgeon du membre.

La région pZRS est également le siège de mutations responsables de polydactylie chez le chien (voir partie 2.4 la polydactylie chez le chien) (Park *et al.*, 2008).

## iii. Autres mutations identifiées chez l'Homme

(Umair *et al.*, 2018 ; OMIM: <https://www.omim.org>)

Aucune mutation dans la séquence codante du gène *SHH* n'est connue à ce jour pour être à l'origine de polydactylie chez l'Homme (Tickle et Towers, 2017; Xiang *et al.*, 2017). Cela s'expliquerait par le fait qu'une telle mutation empêcherait le développement d'autres tissus et serait alors létale.

Les principaux gènes identifiés dans de la polydactylie non syndromique humaine et les protéines associées sont présentés ci-dessous :

- *GLI3 (Gli Kruppel Family Member 3)* (OMIM 165240) (Anderson *et al.*, 2012 ; Tickle et Towers, 2017 ; Xiang *et al.*, 2017)

Il a été montré que la protéine *GLI3* intervient dans la création du gradient de *SHH* dans le bourgeon du membre et a ainsi un rôle majeur dans la détermination spatiale de l'expression de *SHH* dans le bourgeon (voir partie développement selon l'axe antéro-postérieur). Des mutations dans la séquence de *GLI3* peuvent être responsables de diverses formes de polydactylie non syndromique pré-axiale de type IV (OMIM 174700) ou post-axiale de type A1 et B (OMIM 174200), mais aussi de polydactylie syndromique. C'est le cas dans le syndrome de céphalo-poly-syndactylie de Greig (OMIM 175700) ou le syndrome de Pallister-Hall (OMIM 146510).

- *GLI1 (Gli Family Zinc Finger 1)* (OMIM 165220)

Il a été montré qu'il s'agissait d'un autre facteur de transcription impliqué dans l'expression de *SHH*, appartenant à la même famille que *GLI3*. Deux mutations différentes ont été identifiées. La première était une mutation non-sens qui induisait une polydactylie post-axiale de type 8 (OMIM 618123) (Palencia-Campos *et al.*, 2017). La seconde était une mutation faux-sens qui entraînait une polydactylie pré-axiale de type I (OMIM 174400) (Ullah *et al.*, 2019). Il s'agissait de deux mutations récessives.

- *ZNF141 (Zinc Finger Protein 141)* (OMIM 194648)

Il a été mis en évidence que la protéine *ZNF141* était codé par un gène situé sur le chromosome 4. Une mutation autosomique récessive a été identifiée chez des membres d'une

famille pakistanaise. Cette mutation faux-sens était à l'origine d'une polydactylie post-axiale de type A6 (OMIM 615226). Cette mutation n'a été identifiée que dans une seule famille pakistanaise (Kalsoom *et al.*, 2013).

- IQCE (*IQ Domain-Containing Protein E*) (OMIM 617631)

Il a été montré que la protéine IQCE était un élément d'un complexe protéique qui se fixait à la base des cils des cellules et permet la transmission du signal médié par *SHH*. Une mutation à l'origine de polydactylie post-axiale de type A7 affectant uniquement les membres inférieurs a été identifiée (OMIM 617642) (Umair *et al.*, 2017).

- MIPOL1 (*Mirror Image Polydactyly 1*) (OMIM 606850)

Une mutation par translocation au sein d'un gène alors inconnu, nommé *MIPOL1*, sur le chromosome 14, a été identifiée. L'individu présentait une polydactylie en miroir sur les mains et les pieds, sans autre malformation (Kondoh *et al.*, 2002). C'est le seul cas rapporté de polydactylie impliquant ce gène.

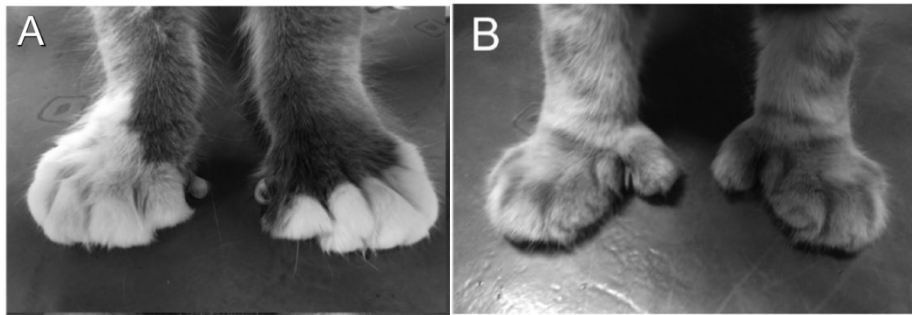
- PITX1 (*Paired-like Homeodomain transcription factor 1*) (OMIM 602149)

Il a été montré que le gène *PITX1* codait des facteurs de transcription qui agissaient tout au long du développement du membre inférieur, mais pas du membre supérieur. Une mutation ponctuelle faux-sens, autosomique dominante, a d'abord été identifiée. (Gurnett *et al.*, 2008). Elle entraînait un phénotype de type pied-bot associé à d'autres malformations des membres inférieurs telle qu'une polydactylie pré-axiale. Par la suite une délétion au sein de la séquence codante de *PITX1* a été mise en évidence (Klopocki *et al.*, 2012). Elle était associée à différentes malformations des membres inférieurs comme une hémimélie tibiale et une polydactylie en miroir.

### 2.3 La polydactylie chez le chat

Les chats possèdent cinq doigts aux membres antérieurs et quatre doigts aux membres postérieurs. Un exemple historique de polydactylie est celle des chats d'Hemingway. Ces chats sont les descendants du chat polydactyle offert à Ernest Hemingway par un marin dans les années 1930. Aujourd'hui ils forment une population d'environ 40 chats dont la plupart sont polydactyles (<https://www.hemingwayhome.com>).

En plus des chats de maison (sans pedigree) polydactyles, deux races de chat sont connues pour présenter des individus polydactyles : le Maine Coon et le Pixie Bob. Quelle que soit la race, il a été mis en évidence que la polydactylie non syndromique était toujours pré-axiale chez le chat. Elle était souvent localisée sur les membres antérieurs. Le nombre de doigts supplémentaires variait de un à trois doigts par patte et l'anomalie observée n'était pas toujours symétrique. Les doigts supplémentaires pouvaient être accompagnés de leur propre griffe et coussinet. Deux morphologies de polydactylie ont été décrites pour les membres antérieurs : en moufle et en raquette (*Figures 22 et 23* ; Hamelin, 2011 ; Hamelin *et al.*, 2016 ; Lettice *et al.*, 2008).

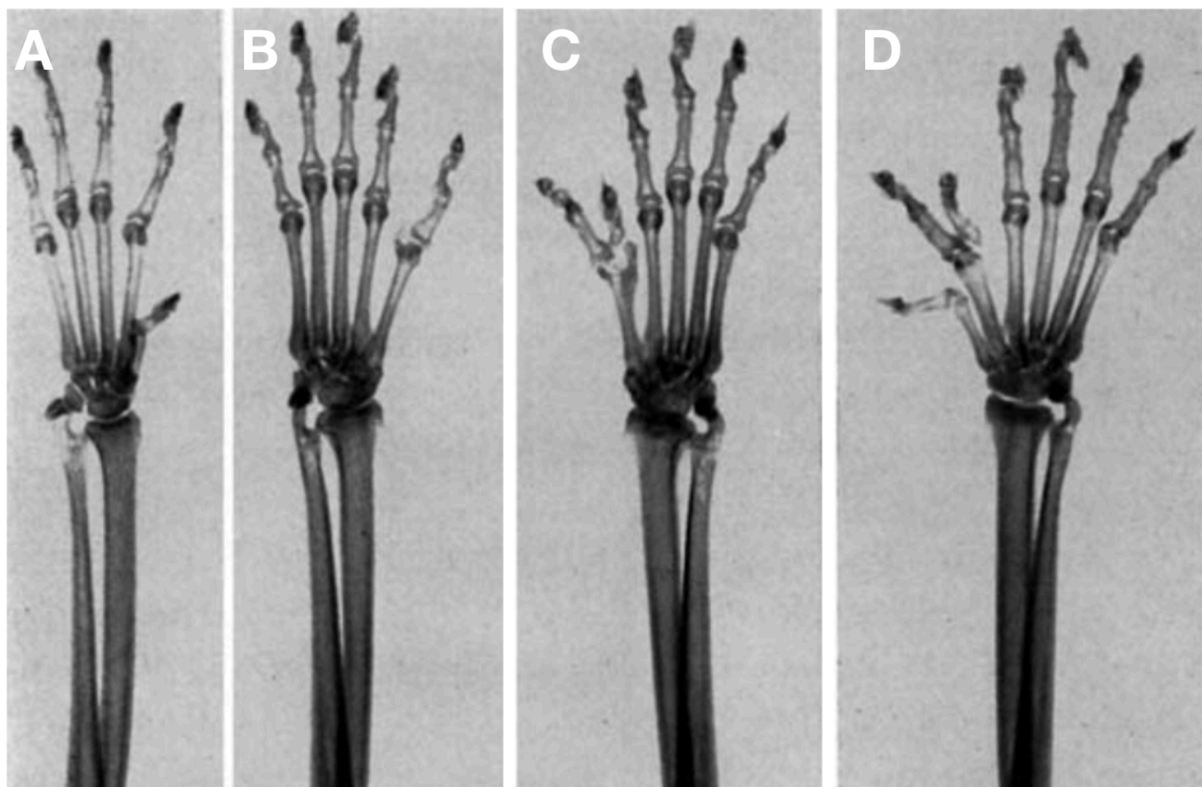


**Figure 22 :** Polydactylies en raquette et en moufle chez le chat

**A :** polydactylie en raquette. Les doigts sont répartis de façon homogène sur la patte.

**B :** polydactylie en moufle. Noter l'espace entre les doigts.

(d'après Hamelin *et al.*, 2016)



**Figure 23 :** Radiographies de membres antérieurs de chats

**A :** Membre antérieur gauche d'un chat non polydactyle

**B :** Membre antérieur gauche d'un chat présentant un doigt supplémentaire

**C :** Membre antérieur droit d'un chat présentant deux doigts supplémentaires (il s'agit d'un même animal que sur le cliché B). Notez l'asymétrie entre les deux antérieurs.

**D :** Membre antérieur droit d'un chat présentant trois doigts supplémentaires

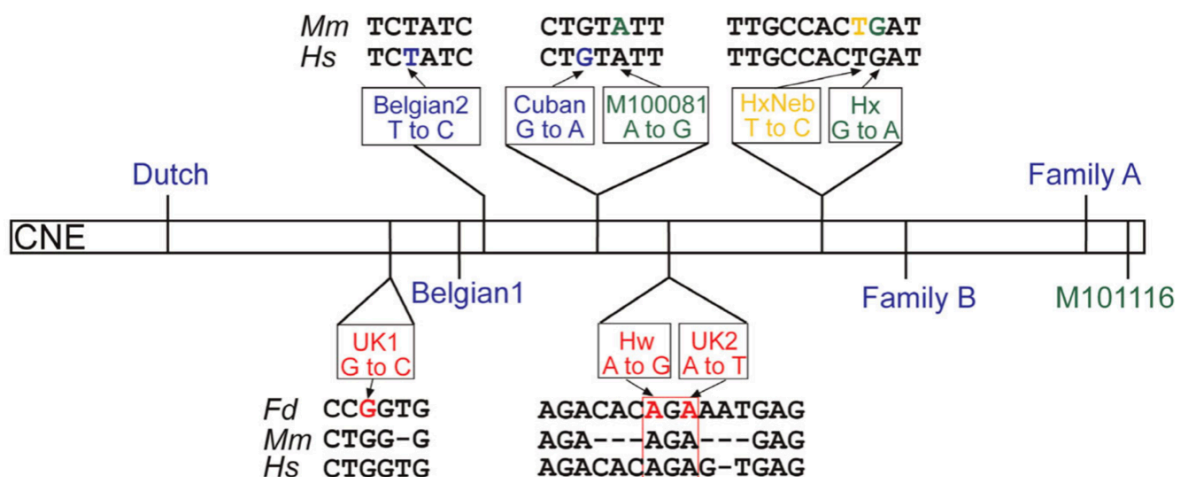
(d'après Danforth, 1947)

Seuls quelques rares cas de polydactylie n'affectant que les membres postérieurs ont été rapportés, de manière anecdotique. Il a été montré que la transmission se faisait selon un mode autosomique dominant (Hamelin, 2011 ; Hamelin *et al.*, 2020, 2016).

Au niveau osseux, il a été mis en évidence que la polydactylie féline pouvait s'accompagner de modification de conformation des os du carpe et du tarse, sans s'accompagner de boiterie ou de gêne au déplacement. Les modifications rapportées étaient par exemple la disparition de l'os accessoire du carpe, la présence d'os carpiens ou tarsiens supplémentaires et des fusions entre éléments osseux (Hamelin, 2011).

L'origine génétique de la polydactylie féline a été recherchée. Lettice et collaborateurs (Lettice *et al.*, 2008) ont élargi à l'espèce féline leurs travaux sur ZRS. Ils ont travaillé sur deux populations de chats. La première se composait de chats nord-américains dont certains faisaient partie des chats d'Hemingway. Le second groupe était constitué de chats britanniques. Les chats d'Hemingway présentaient une mutation appelée *Hw* (*Hemingway*), correspondant à une substitution A>G en position 479 dans ZRS (situé dans l'intron 5 du gène *LMBR1* (Figure 24 ; Lettice *et al.*, 2008). Cette même mutation a également été retrouvée chez d'autres chats polydactyles Nord-Américains testés mais n'existait pas chez les chats britanniques testés, ce qui suggérait un allèle commun responsable de polydactylie féline sur le continent Nord-Américain. Dans cette étude, la polydactylie liée à cette mutation *Hw* était restreinte aux membres antérieurs.

Chez les chats britanniques, deux mutations ont été identifiées. Les mutations appelées *UK-1* (*United Kingdom 1*) et *UK-2* (*United Kingdom 2*) étaient des substitutions ponctuelles en position 257 et 481 dans ZRS respectivement (Figure 24). La mutation *UK-2* entraînait une polydactylie des quatre membres, alors que la mutation *UK-1* entraînait dans 80 % des cas une polydactylie restreinte aux antérieurs (Lettice *et al.*, 2008). L'étude de souris transgéniques, avec le gène *LacZ* sous contrôle de ZRS contenant les mutations félines, a montré que la polydactylie pré-axiale observée dans ces cas était également liée à l'expression ectopique de *SHH* dans la partie antérieure du bourgeon du membre.



**Figure 24** : Les mutations connues de l'intron 5 du gène *Lmbr1* chez la souris, l'homme et le chat

Le CNE (élément non codant conservé = ZRS) de 800 pb est représenté par le rectangle noir. Les différentes mutations connues sont représentées. En bleu, les mutations humaines. En vert, les mutations de la souris. En rouge, les mutations du chat. En bas, les séquences correspondantes chez l'homme et la souris (*Fd* : *Felis domesticus* (chat) ; *Mm* : *Mus musculus* (souris) ; *Hs* : *Homo sapiens* (homme))

Remarque : la figure est incomplète pour les mutations humaines connues dans le CNE de *LMBR1* (voir Figure 21)

(d'après Lettice *et al.*, 2008)

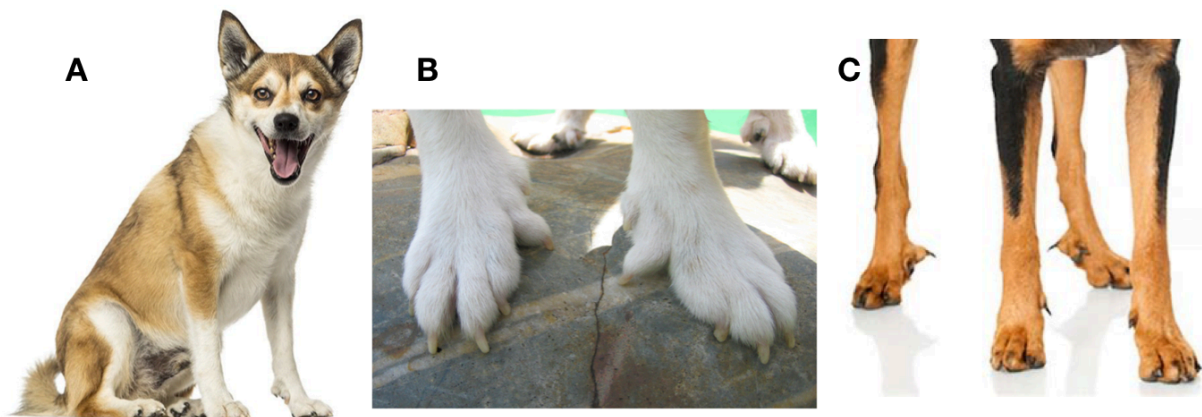
Par la suite, la caractérisation phénotypique et génétique de la polydactylie féline a été entreprise dans la race Maine Coon (Hamelin, 2011; Hamelin *et al.*, 2020, 2016). La mutation *Hw* a été retrouvée chez des chats de cette race appartenant à des lignées américaines, allemandes et danoises, mais elle n'a pas été retrouvée dans une lignée canadienne étudiée. Aucune autre mutation n'a été identifiée dans ZRS, ni dans la séquence pré-ZRS féline (zone siège de mutation responsables de polydactylie chez le chien, voir partie 2.4 la polydactylie chez le chien ci-dessous). De plus, la mutation *Hw* a été identifiée chez des chats présentant

de la polydactylie sur les antérieurs, mais aussi les postérieurs. Les mutations *UK-1* et *UK-2* n'ont pas été identifiées chez les Maine Coon polydactyles. Enfin, il a été mis en évidence une pénétrance incomplète de la mutation *Hw*.

Au total, de nombreuses mutations associées à une polydactylie pré-axiale ont été identifiées dans le CNE de *LMBR1* appelé ZRS (environ quinze chez l'homme aujourd'hui et au moins sept chez d'autres espèces : souris, chat, poulet) (Anderson *et al.*, 2012). C'étaient des mutations ponctuelles par substitution ou une duplication. Elles étaient réparties dans toute la longueur de ZRS. Cela suggérait que l'élément en entier était responsable de la régulation de l'expression de *SHH*. Les études ont montré que le degré d'expression ectopique, et donc le degré de gravité de la polydactylie semblait dépendant de chaque mutation et de chaque espèce. Les mécanismes moléculaires, qui pouvaient être de deux types, étaient similaires à ceux étudiés chez l'homme (voir partie 2.2 ci-dessus).

#### 2.4 La polydactylie chez le chien

Les chiens possèdent habituellement cinq doigts aux membres antérieurs et quatre doigts aux membres postérieurs. La forme de polydactylie la plus répandue chez le chien est l'existence d'un ergot simple ou double sur les postérieurs. Ce caractère peut être toléré, désiré ou même considéré comme indispensable pour répondre aux standards de certaines races comme le Berger de Beauce (*Figure 25*) ou le Montagne des Pyrénées. Ainsi la polydactylie pré-axiale a été décrite chez le chien. Elle affectait quasiment exclusivement les membres postérieurs. Cependant, une forme affectant les membres antérieurs et postérieurs a été décrite chez le chien Norvégien de Macareux ou « Norwegian Lundehund » (*Figure 25*). Dans toutes les races étudiées, la polydactylie était transmise selon un mode autosomique dominant.



**Figure 25 :** Chien Berger de Beauce et chien Norvégien de Macareux polydactyles

**A :** Chien Norvégien de Macareux (source : <https://www.chien.com>)

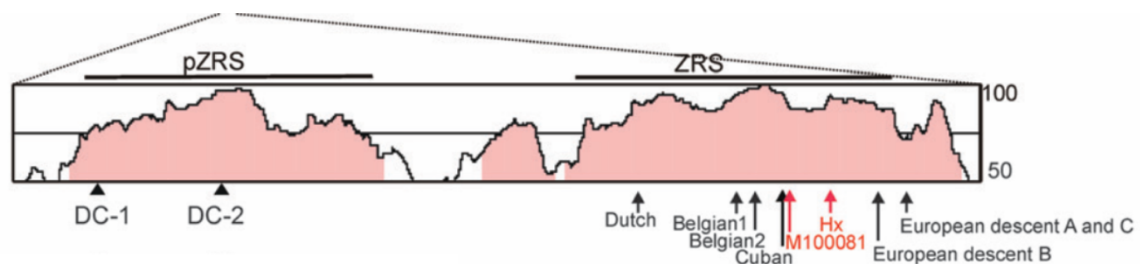
**B :** Membres antérieurs d'un chien Norvégien de Macareux. Cette race possède six doigts sur chacun de ses membres (*d'après Metzger et al., 2016*)

**C :** Membres d'un chien Berger de Beauce possédant des doubles ergots aux postérieurs (*photo : www.remedes-animaux.org*)

Lors d'une étude portant sur l'impact des variations de longueur de séquences répétées en tandem sur les caractéristiques morphologiques canines, Fondon et Garner (2004) ont étudié

88 races de chien. Les auteurs ont repéré l'existence d'une mutation chez le chien Montagne des Pyrénées, correspondant à une délétion de 51 pb dans la séquence du gène *ALX4* (*Aristaless-like homebox 4*). Cette mutation, à l'état homozygote, était associée à la polydactylie sur les membres postérieurs. Elle n'a été retrouvée dans aucune autre race. Cependant, il avait été montré que la polydactylie chez le Montagne des Pyrénées ne correspondait pas à un simple caractère mendélien et que sa transmission semblait complexe. Les auteurs ont donc conclu que la polydactylie dans cette race pouvait être associée seulement en partie à la mutation de *ALX4* (Fondon et Garner, 2004).

En 2004, Park *et al.*, ont également étudié la polydactylie canine et ont d'abord identifié une région du chromosome 16, associée à la polydactylie chez le chien de race Sapsaree (Park *et al.*, 2004). En poursuivant leurs travaux, ils ont pu identifier et localiser deux mutations différentes sur ce chromosome (Park *et al.*, 2008). Ces mutations se trouvaient dans l'intron 5 du gène *LMBR1*. Il s'agissait de mutations présentes dans une séquence qu'ils ont appelée pré-ZRS ou pZRS. Cette séquence était située en amont de la séquence ZRS, responsable comme nous l'avons vu précédemment de polydactylie chez l'homme, la souris et le chat. Ces mutations ont été nommées *DC-1* (identifiée chez le chien Sapsaree et chez d'autres races coréennes) et *DC-2*, trouvée chez les chiens de races occidentales (Park *et al.*, 2008), y compris le chien Norvégien de Macareux (Figure 26 ; Kropatsch *et al.*, 2015).



**Figure 26 :** Mutations canines de polydactylie

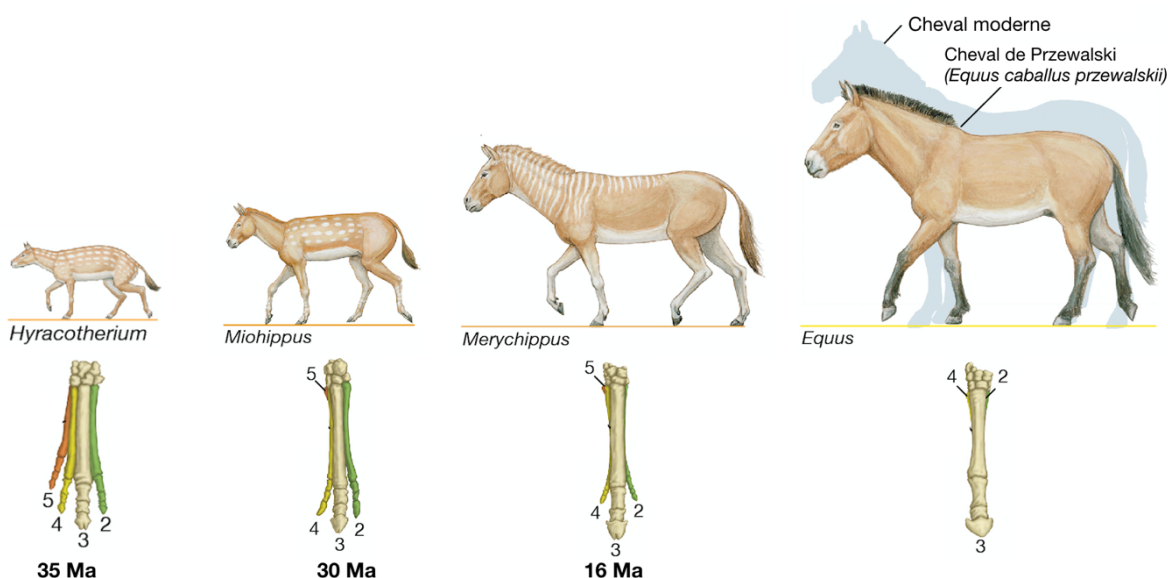
Région de l'intron 5 du gène *LMBR1* analysée avec le logiciel VISTA (<http://genome.lbl.gov/vista>). Le graphique représente les régions avec plus de 50 % d'homologie entre le génome canin et le génome humain. Les régions représentées en roses sont celles pour lesquelles l'homologie est supérieure à 75 % (échelle à droite). Les flèches noires indiquent les mutations identifiées chez l'homme, les flèches rouges celles identifiées chez la souris. Les mutations responsables de polydactylie chez le Sapsaree (*DC-1*) et chez les autres races occidentales (*DC-2*) sont indiquées par les triangles noirs. Elles sont situées dans la séquence conservée pré-ZRS ou pZRS (*d'après Park et al., 2008*). Dutch : mutation hollandaise. Belgian : mutations belges, Cuban : mutation cubaine, European descent : mutation européennes, M1000081 : mutation de souris, Hx : mutation *Hemimelic extra toes* de souris.

Park *et al.*, (2008) ont mis en évidence la présence de la mutation *DC-2* chez des chiens Montagne des Pyrénées. Ainsi, dans cette race, il semblait que la polydactylie soit plutôt liée à la mutation *DC-2* dans pZRS plutôt qu'à la mutation dans *ALX4*.

### 3. La polydactylie chez le cheval

#### 3.1 Généralités

Le cheval moderne est connu sous le nom de *Equus caballus*. Au cours de son évolution, il a vu sa taille et son poids augmenter et le nombre de ses doigts diminuer (Figure 27). Il a été mis en évidence qu'il y a 55 millions d'années, son ancêtre le plus lointain, *Hyracotherium* (= *Eohippus*), possédait quatre doigts sur les membres antérieurs et trois sur les membres postérieurs. Il y a 30 millions d'années, *Miohippus* ne prenait appui plus que sur trois doigts sur les antérieurs, le 4<sup>ème</sup> doigt étant devenu vestigial. Puis *Merychippus*, il y a 16 millions d'années, ne se déplaçait que sur le doigt central. Enfin il y a 5 millions d'année, *Pliohippus* a acquis un membre comparable à celui du cheval moderne pourvu d'un seul doigt se terminant par un seul sabot en contact avec le sol : le doigt III. Les autres doigts sont restés présents sous la forme des os métacarpiens II et IV rudimentaires.



**Figure 27 :** Evolution des membres du cheval

Alors que *Hyracotherium*, l'ancêtre le plus lointain du cheval, possédait cinq doigts, le cheval moderne ne possède plus qu'un doigt principal (le doigt III). Les os métacarpiens rudimentaires II et IV constituent les vestiges des autres doigts qui ont progressivement régressés au cours de l'évolution.

Source : <https://www.britannica.com/animal/horse/Evolution-of-the-horse>

Même si la polydactylie est rare chez le cheval, il a été mis en évidence qu'elle représentait la malformation congénitale des membres la plus fréquente. La majorité des cas rapportés (80 %) concernait un doigt surnuméraire en face médiale d'un membre antérieur, prenant origine au niveau des métacarpes II et IV (Carstanjen *et al.*, 2007; Stanek and Hantak, 1986). Le doigt supplémentaire pouvait aussi prendre origine au niveau du carpe, incluant le plus souvent la présence d'un os carpal I (Trumble, 2005). Dans une étude incluant 100 chevaux, 60 % présentaient une polydactylie unilatérale, 24 % une polydactylie bilatérale et 15 % avaient les quatre membres atteints (Barber, 1990). Aucune prédisposition sexuelle n'a été observée.

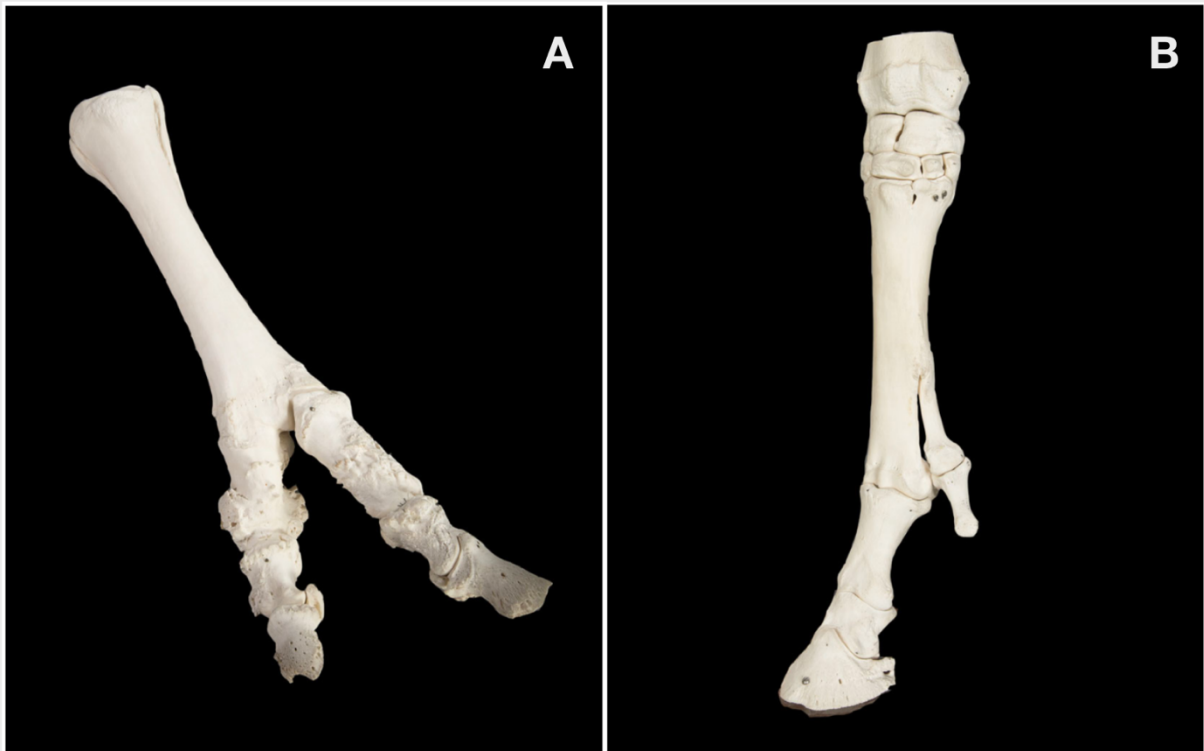
Le diagnostic de polydactylie chez le cheval est basé sur l'examen clinique. Cependant, une évaluation radiographique complète des régions des métacarpes et métatarses et des articulations adjacentes (carpe et tarse) est nécessaire pour déterminer de possibles anomalies osseuses non visibles extérieurement (Carstanjen *et al.*, 2007).

Il a été montré que la polydactylie pouvait s'accompagner de déformations angulaires et d'instabilités articulaires ou encore d'autres anomalies congénitales dans le cas de polydactylie syndromique, comme des malformations de la mâchoire, de l'arthrogrypose (multiples contractures articulaires), ou de l'adactylie sur un autre membre (Chan and Munroe, 1996 ; Gray *et al.*, 2019 ; Trumble, 2005).

La classification la plus répandue chez le cheval distingue deux à trois formes de polydactylie (Gray *et al.*, 2019 ; Stanek and Hantak, 1986) :

- (1) la forme tératogène : l'animal présente une séparation en deux fragments de l'extrémité distale du membre, résultant en deux doigts complètement séparés avec l'apparence d'un sabot fendu. Dans la plupart des cas, toutes les phalanges sont affectées et les os métacarpiens ou métatarsiens II et IV sont normaux (*Figure 28*). Malgré son nom, à ce jour aucun agent tératogène à l'origine de cette malformation n'a été identifié ;
- (2) la forme atavique dans laquelle le doigt surnuméraire prend origine à l'extrémité distale du métacarpe ou du métatarse II et IV. Cette forme ne s'accompagne pas d'autres anomalies squelettiques. On entend par atavique la réapparition d'un caractère, qui était présent chez un ancêtre mais qui avait disparu au cours d'une ou plusieurs générations. Il semble que ce soit la forme la plus couramment rencontrée (*Figure 28*) ;
- (3) la forme symétrique bilatérale héréditaire, décrite chez le chien et le poulet, qui est suspectée chez le cheval.

Cependant cette classification présente des limites : des cas ont été décrits pour lesquels le même animal présentait deux formes différentes (tératogène et atavique) sur deux membres différents (Sepúlveda *et al.*, 2011 ; Stanek et Hantak, 1986).



**Figure 28** : Préparation des os montrant une polydactylie tératogène et une polydactylie atavique chez le cheval

**A** : polydactylie tératogène : la scissure de la première phalange donne naissance à deux doigts séparés et un sabot fendu extérieurement.

**B** : polydactylie atavique : le doigt surnuméraire est localisé à la face médiale du membre antérieur et prend origine au niveau de l'extrémité distale de l'os métacarpien II qui est bien développé.

(d'après Beste et Whitfield-Cargile, 2019)

### 3.2 Les cas rapportés

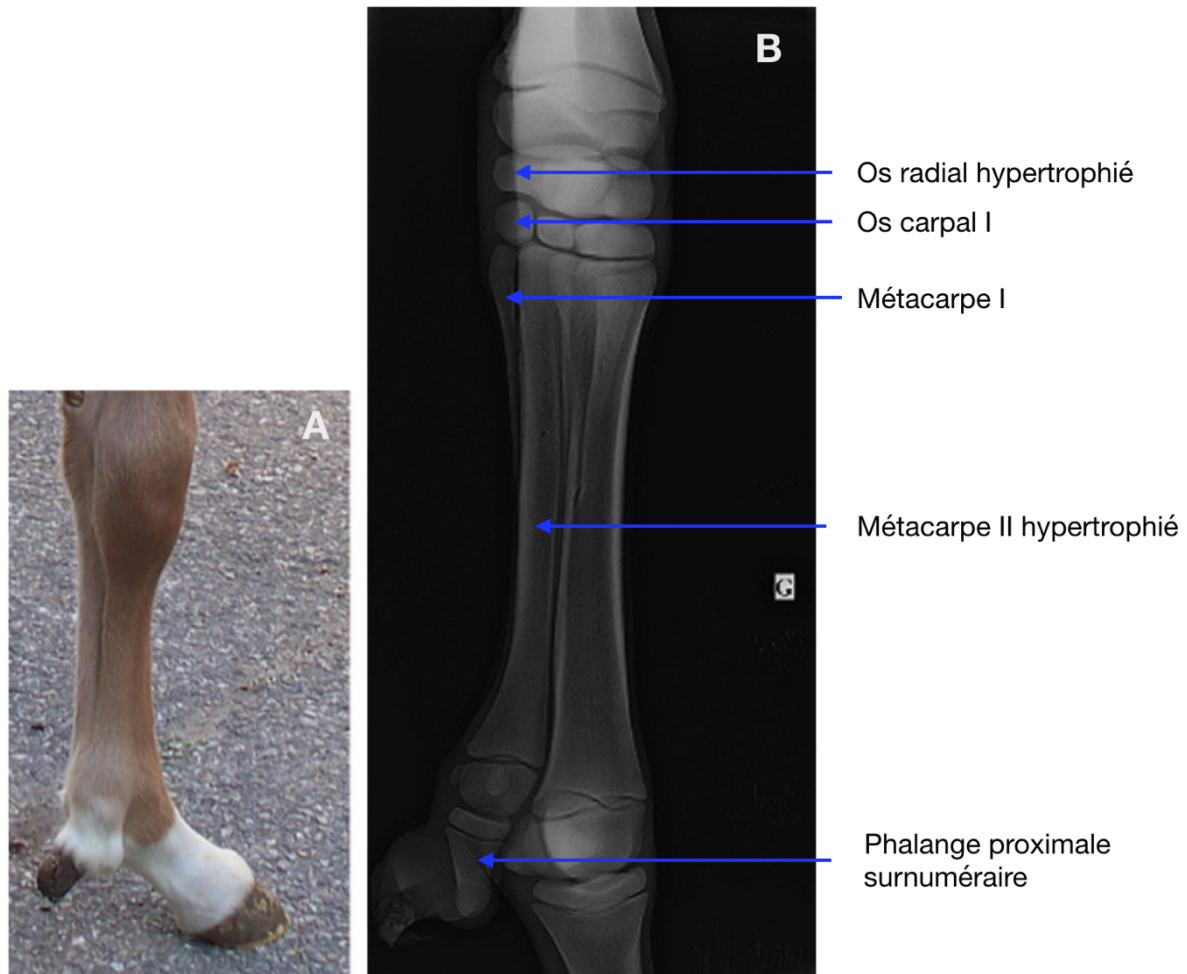
Le tableau présenté en Annexe 1 recense l'ensemble des cas de polydactylie équine publiés dans la littérature scientifique, à notre connaissance. On a pu noter une grande diversité des cas décrits quant à l'anatomie du ou des membres atteints et des structures osseuses impliquées. Le nombre de phalanges qui composent le doigt supplémentaire était variable, tout comme la présence des os sésamoïdes proximaux et de l'os sésamoïde distal. Une fusion des os sésamoïdes proximaux était possible (Colbourne *et al.*, 1991).

Les autres anomalies osseuses associées à la polydactylie et couramment rapportées étaient :

- la présence d'un os carpal I, qui pouvait être de taille augmentée et de forme inhabituelle. Cet os pouvait être présent de manière physiologique chez le cheval, mais il semblait que sa taille et sa forme puissent être modifiées en cas de polydactylie (Carstanjen *et al.*, 2007 ; Colbourne *et al.*, 1991 ; Gray *et al.*, 2019 ; Novales Durán *et al.*, 2013) ;
- la déformation de certains os du carpe, notamment l'os radial du carpe et l'os carpal II (Barber, 1990 ; Colbourne *et al.*, 1991 ; Novales Durán *et al.*, 2013) ;
- la présence d'os carpiens ou métacarpiens surnuméraires (Barber, 1990) ;
- un développement excessif et un élargissement d'un os métacarpien, le plus souvent celui à l'origine du doigt surnuméraire ;
- des déformations angulaires de type varus ou valgus des carpes ou des boulets ;
- des fractures phalangiennes associées (Barber, 1990 ; Sepúlveda *et al.*, 2011).

Nous allons détailler certains cas illustrant ces propos.

Gray *et al.*, (2019) ont récemment décrit deux cas de polydactylie unilatérale des membres antérieurs et ont réalisé un suivi des cas à long terme (*Figure 29* ; Gray *et al.*, 2019).



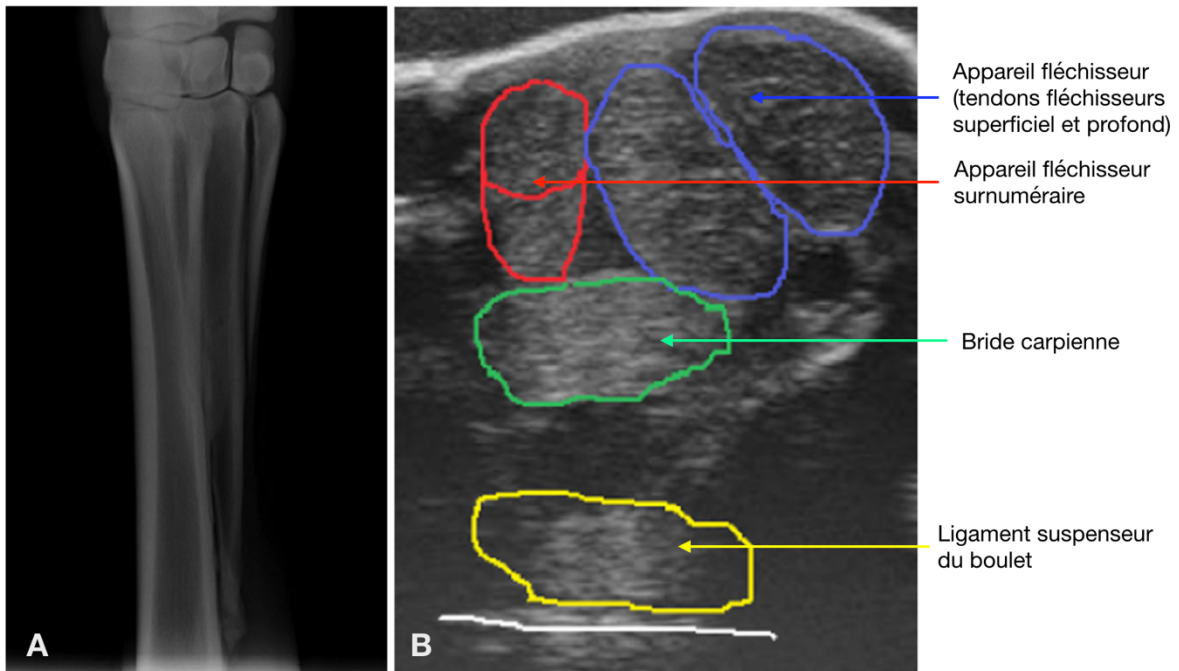
**Figure 29** : Polydactylie unilatérale chez un poulain Selle français de deux jours

**A** : Vue médiale du membre antérieur gauche. Le doigt surnuméraire semble fusionné au doigt principal dans la région métacarpienne, puis se détache de ce dernier à hauteur du boulet et se termine par une petite extrémité cornée. On constate une discrète rotation externe du boulet et une déviation angulaire modérée en valgus.

**B** : Radiographie en incidence dorso-médiale palmaro-latérale de la région métacarpienne du membre thoracique gauche. L'os métacarpien II hypertrophié s'articule distalement avec deux os sésamoïdiens proximaux et une première phalange incomplètement développée. On remarque également un os métacarpien I rudimentaire articulé à l'os carpal I, et une hypertrophie adaptative de l'os radial du carpe.

(d'après Gray *et al.*, 2019)

Ce poulain a subi une correction chirurgicale par ostéotomie et amputation à hauteur du tiers distal de l'os métacarpien II. Le doigt surnuméraire possédait ses propres tendons fléchisseur et extenseur et deux faisceaux d'innervation et de vascularisation (un médial et un latéral). Un examen radiographique (*Figure 30*) ainsi qu'une IRM (imagerie par résonance magnétique) ont été réalisés en période post-opératoire. Ces examens ont révélé une fusion des os métacarpiens II et III, garantissant une bonne stabilité articulaire. Une échographie de la région métacarpienne proximale a également été pratiquée. Elle a révélé la persistance d'un appareil fléchisseur palmaire complet surnuméraire (*Figure 30*).



**Figure 30:** Radiographie et échographie post-opératoires de la région métacarpienne proximale du membre thoracique gauche d'un poulain polydactyle

**A :** Radiographie en incidence dorso-médiale palmaro-latérale du métacarpe montrant un site d'ostéotomie net et ne révélant aucun signe radiographique d'instabilité carpo-métacarpienne.

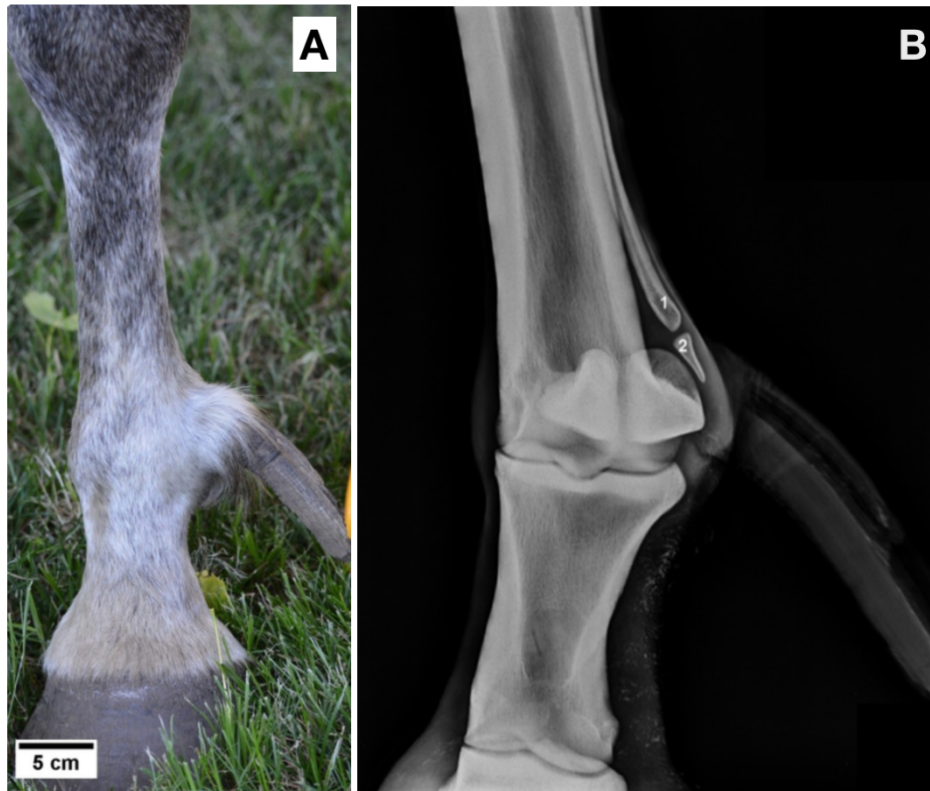
**B :** Echographie de la région métacarpienne proximale palmaire montrant la persistance d'un appareil fléchisseur surnuméraire.

(d'après Gray et al., 2019)

Il a été mis en évidence que lors de polydactylie, le doigt surnuméraire avait souvent ses propres tendons fléchisseur superficiel, fléchisseur profond et tendons suspenseurs du boulet mais ne possédait pas toujours de tendons extenseurs (Gray et al., 2019 ; Stanek and Hantak, 1986). Les réseaux artériels, veineux et nerveux ont été retrouvés mais montraient des modifications anatomiques sur le membre polydactyle.

Un suivi clinique a été réalisé deux ans après l'intervention chirurgicale. L'animal ne présentait aucune boiterie et les aplombs étaient dans les normes.

Artigas *et al.*, (2020) ont très récemment rapporté un cas de polydactylie unilatérale chez un hongre Quarter Horse de sept ans (Artigas *et al.*, 2020). Le doigt surnuméraire était mobile et non douloureux à la manipulation. Il prenait origine au niveau de l'os métacarpien IV et était orienté en direction latéro-palmaire, ce qui avait été peu fréquemment observé (*Figure 31*). Le propriétaire a rapporté que le petit sabot du doigt surnuméraire était présent dès la naissance. Il était tombé spontanément à l'âge d'un an et demi puis avait repoussé. Cette anomalie n'entraînait pas de boiterie chez l'animal.



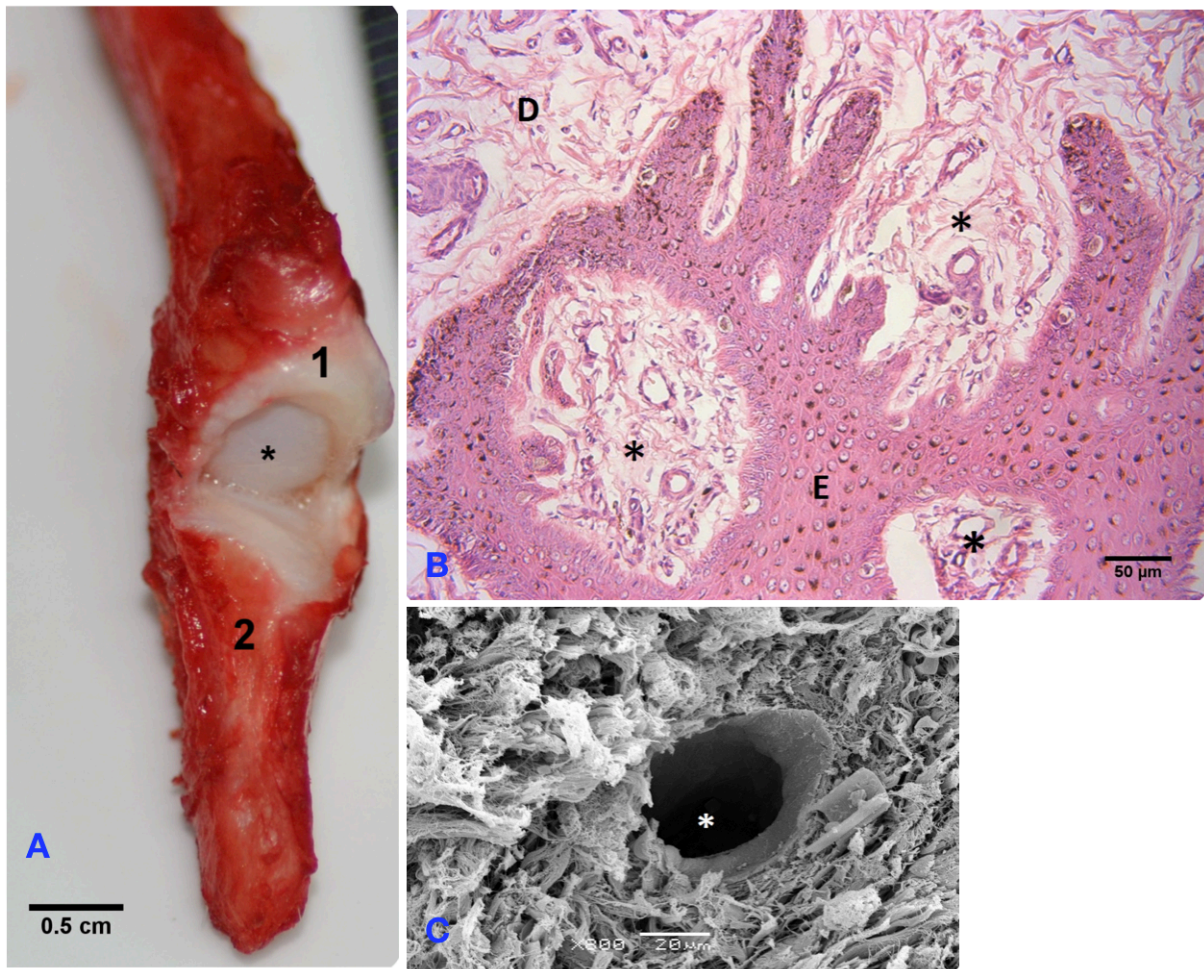
**Figure 31** : Polydactylie unilatérale latérale chez un cheval Quarter Horse

**A** : Vue de face du membre antérieur gauche. L'inspection et la palpation ont révélé un doigt surnuméraire mobile prenant origine au niveau de l'articulation métacarpo-phalangienne et s'orientant en direction latéro-palmaire. La partie distale du doigt surnuméraire était pourvue d'un sabot incurvé et de forme cylindrique, sans surface solaire, de 15 cm de long. La palpation des os métacarpiens a révélé une nette asymétrie avec un os métacarpien IV plus long

**B** : Radiographie en incidence dorso-latérale palmaro-médiale du boulet du membre antérieur gauche. Le doigt surnuméraire est constitué d'une unique petite phalange de forme triangulaire, articulée avec l'extrémité distale de l'os métacarpien IV qui est allongé et dévié en direction latéro-palmaire.

(d'après Artigas *et al.*, 2020)

Une intervention chirurgicale consistant au retrait de la phalange surnuméraire et du tiers distal de l'os métacarpien IV a été pratiquée. L'analyse de la jonction métacarpo-phalangienne du doigt surnuméraire a révélé une articulation de type synoviale avec la présence d'un cartilage articulaire et d'un liquide de type synovial (*Figure 32*). L'analyse histologique de la production cornée a mis en évidence une désorganisation de la jonction dermo-épidermique : les lamelles dermales du podophylle étaient bien présentes mais les lamelles épidermales du kéraphylle n'ont pas été retrouvées (*Figure 32*). Cela a été relié à l'absence de phalange à l'intérieur de la boîte cornée. En microscopie électronique, les tubules de la corne pariétale ont été retrouvés (*Figure 32*).



**Figure 32 :** Investigations post opératoires sur le doigt surnuméraire d'un cheval polydactyle  
**A :** Dissection de la jonction métacarpo-phalangienne du doigt surnuméraire. Présence d'un liquide de type synovial et d'un cartilage articulaire (\*) sur la surface articulaire de l'extrémité distale de l'os métacarpien IV (1) et de la phalange rudimentaire (2).  
**B :** Image histologique de la jonction dermo-épidermique (\*) montrant les papilles dermales du podophylle et des structures atypiques similaires à des lamelles. Coloration hématoxyline – éosine. D : derme, E : épiderme.  
**C :** Image obtenue en microscopie électronique de la jonction dermo-épidermique. Un tubule cornéen (\*) est observé.  
 (d'après Artigas et al., 2020)

Carstanjen *et al.*, (2007) ont décrit la prise en charge chirurgicale d'un cas de polydactylie bilatérale chez un poulain de race Barbe (Carstanjen *et al.*, 2007). Les membres antérieurs semblaient sains à la naissance mais un doigt supplémentaire bien visible extérieurement était apparu peu après sur le membre antérieur droit (*Figure 33*). L'animal ne présentait aucune boiterie. Il a été pris en charge chirurgicalement à la demande du propriétaire.



**Figure 33** : Polydactylie bilatérale chez un poulain Barbe

**A** : L'inspection et la palpation des deux membres antérieurs ont révélé la présence d'un doigt supplémentaire mobile au niveau de l'os métacarpien II sur l'antérieur droit (flèche noire) et suggérait un doigt supplémentaire non individualisé extérieurement sur l'antérieur gauche, sous une petite zone cornifiée de 0,5 cm x 0,3 cm (flèche blanche)

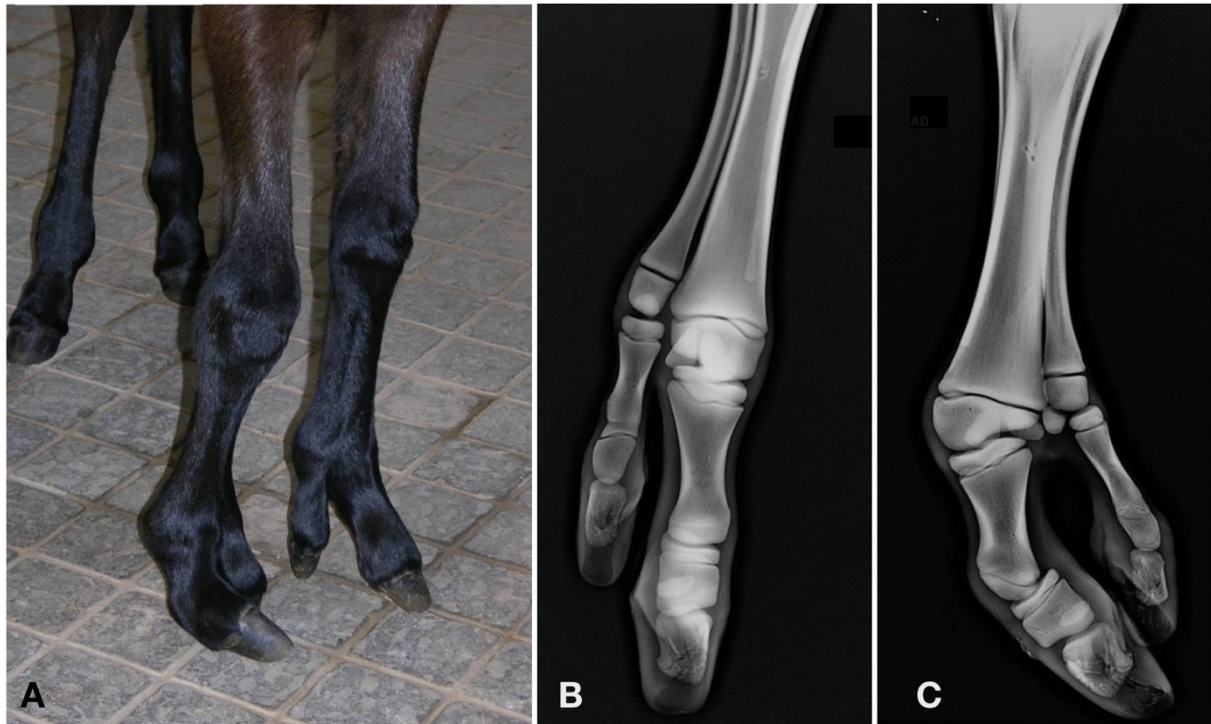
**B** : L'évaluation radiographique de la région du carpe gauche a révélé la présence d'un os carpal I bien développé (flèche)

**C** : Radiographie en incidence dorso-médiale palmaro-latérale du membre antérieur droit. L'os métacarpien II est hypertrophié et s'articule distalement avec un doigt surnuméraire composé de trois phalanges (I, II et III)

**D** : Radiographie en incidence dorso-médiale palmaro-latérale du membre antérieur gauche. L'os métacarpien II est légèrement hypertrophié et s'articule distalement avec un doigt surnuméraire constitué d'une seule phalange (flèche blanche).

(d'après Carstanjen *et al.*, 2007)

Novales Duran *et al.*, (2013) ont rapporté trois cas de polydactylie. La polydactylie décrite ci-dessous concernait un poulain de Pure Race Espagnole de sept jours présentant une boiterie importante des membres antérieurs et de sévères déviations angulaires (*Figure 34* ; Novales Durán *et al.*, 2013). Du fait de la complexité du cas, aucun traitement chirurgical n'a été entrepris.

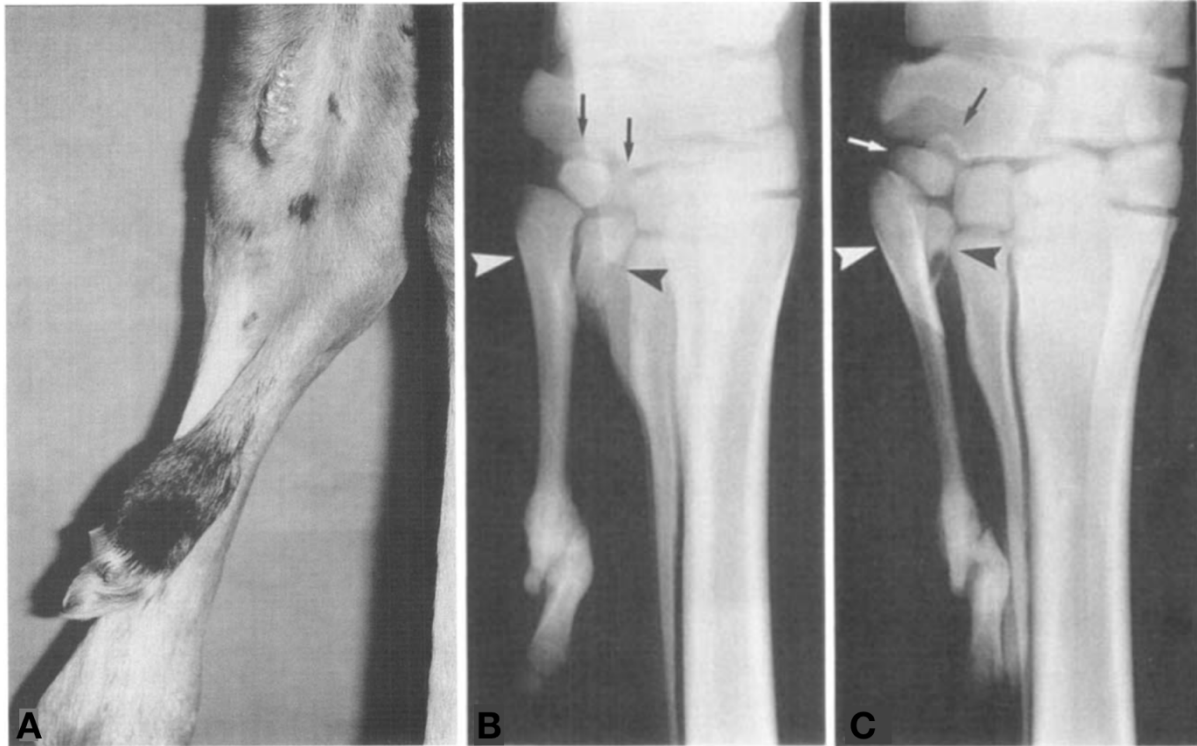


**Figure 34** : Polydactylie bilatérale chez un poulain de Pure Race Espagnole

**A** : L'inspection des membres antérieurs a révélé deux doigts surnuméraires en région médiale. L'animal était très instable lors de l'appui sur le membre antérieur droit qui présentait une sévère déviation angulaire en varus des articulations métacarpo-phalangienne et interphalangienne proximale.

**B** : Radiographie en incidence dorso-palmaire du membre antérieur gauche. **C** : Radiographie en incidence dorso-palmaire du membre antérieur droit. Chaque doigt surnuméraire se développait dans le prolongement de l'os métacarpien II et se composait de trois phalanges et d'un os sésamoïde proximal. Sur l'antérieur droit, noter l'hypoplasie de l'épiphyse distale de l'os métacarpien III, à l'origine de la forte déviation angulaire du boulet. (d'après Novales Durán *et al.*, 2013)

Barber a décrit un cas inhabituel de polydactylie unilatérale chez un poulain Quarter Horse de deux mois, présentant deux os carpiens et deux os métacarpiens surnuméraires (*Figure 35 ; Barber, 1990*).



**Figure 35** : Polydactylie unilatérale chez un poulain Quarter Horse

**A** : Vue médio-palmaire du membre antérieur gauche. La région du carpe est élargie et il y a un doigt surnuméraire en position médiale.

**B** : Radiographie en incidence dorso-palmaire du membre antérieur gauche.

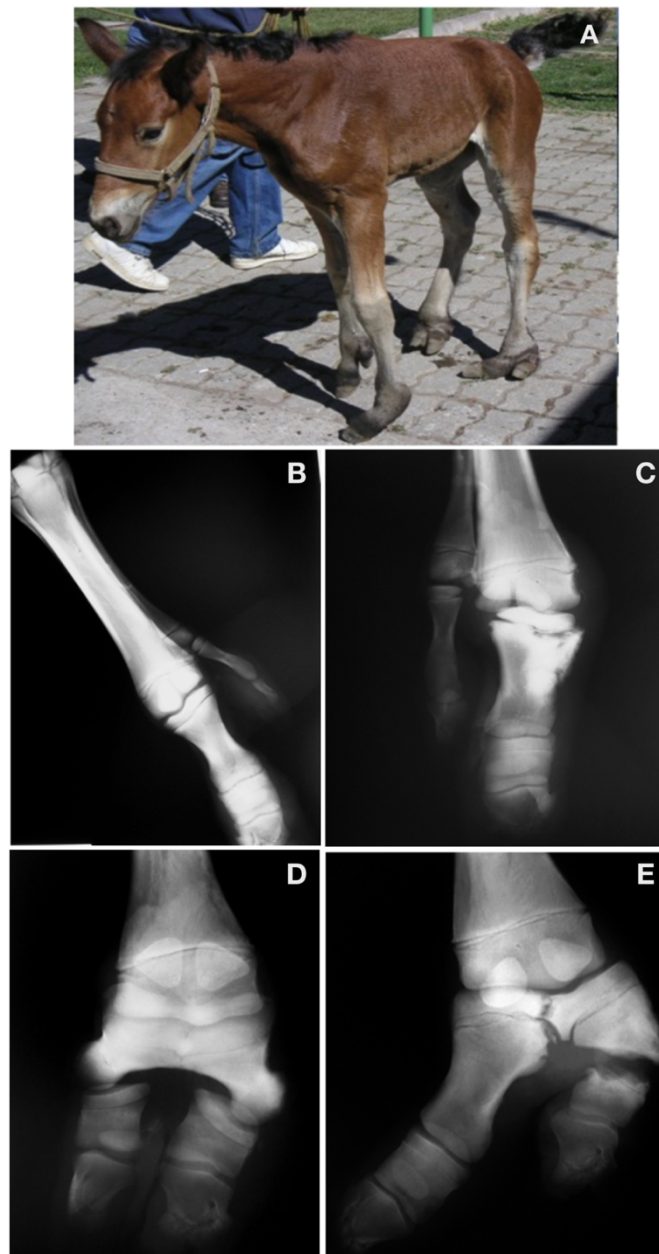
**C** : Radiographie en incidence dorso-médiale plantaro-latérale du membre antérieur gauche.

Présence de deux os carpiens surnuméraires (flèches) et de deux os métacarpiens surnuméraires en région médiale (têtes de flèches) dont le plus long présente une fracture distale. L'os radial du carpe est élargi médialement et s'articule distalement avec les deux os carpiens surnuméraires. L'os ulnaire du carpe, l'os intermédiaire du carpe, l'os carpal III et l'os carpal IV sont légèrement sous-développés et malformés.

(d'après Barber, 1990)

L'os métacarpien supplémentaire le plus long a été retiré chirurgicalement par la technique de désarticulation. L'autre os métacarpien et les os carpiens supplémentaires ont été conservés. Trente mois après la chirurgie, une légère déformation en valgus et un élargissement du carpe persistaient mais le cheval ne présentait aucune boiterie.

Un cas surprenant chez une pouliche de six semaines a été rapporté par Sepúlveda *et al.*, (2011). L'animal présentait une polydactylie sur les quatre membres, mais deux formes différentes affectaient les antérieurs et les postérieurs (*Figure 36 ; Sepúlveda et al., 2011*).



**Figure 36** : Polydactylie sur les quatre membres chez une pouliche de six semaines

**A** : Pouliche présentant une polydactylie sur les quatre membres.

**B** : Radiographie du membre antérieur droit, incidence dorso-latérale palmaro-médiale. Le doigt surnuméraire est constitué de deux phalanges et d'un os sésamoïdien proximal. L'os métacarpien II est hypertrophié.

**C** : Radiographie du membre antérieur gauche, incidence dorso-médiale palmaro-latérale du boulet. Le doigt surnuméraire est constitué de deux phalanges et de deux os sésamoïdiens proximaux. L'os métacarpien II est hypertrophié. On note une sévère déviation angulaire en valgus du boulet ainsi qu'une fracture Salter-Harris de type 2 de la deuxième phalange du doigt principal.

**D** : Radiographie du membre postérieur droit, incidence dorso-plantaire du boulet. Le doigt supplémentaire prend origine au niveau de l'articulation métatarso-phalangienne. On note un dédoublement des trois phalanges formant deux doigts distincts. La première phalange est partiellement fusionnée à l'os métatarsien III. Une luxation complète de l'articulation métatarso-phalangienne (hyperextension), est présente mais non visible sur cette vue.

**E** : Radiographie du membre postérieur gauche, incidence dorso-plantaire du boulet. Le doigt supplémentaire prend origine au niveau de l'articulation métatarso-phalangienne. On note le même dédoublement des trois phalanges formant deux doigts distincts. Une luxation complète de l'articulation métatarso-phalangienne (hyperextension) est présente également mais non visible sur cette vue. On remarque aussi une déviation en varus du boulet, une perte d'architecture des deux phalanges distales et une fracture de la phalange proximale du doigt latéral associée à des signes radiographiques d'ostéolyse.

(d'après Sepúlveda et al., 2011)

Ce cas était donc très atypique puisque la polydactylie des membres antérieurs était compatible avec la forme atavique décrite dans la classification des polydactylies équinées, alors que celle des membres postérieurs était compatible avec la forme tératogène. Les luxations, fractures et signes d'ostéolyse observés sur les membres postérieurs étaient en défaveur d'une prise en charge chirurgicale.

### 3.3 Considérations chirurgicales

Il a été montré que l'excision chirurgicale du doigt surnuméraire était recommandée pour des raisons esthétiques et pour prévenir d'éventuelles boiteries ou blessures par traumatisme du membre polydactyle comme du membre controlatéral (Barber, 1990 ; Carstanjen *et al.*, 2007 ; Colbourne *et al.*, 1991 ; Trumble, 2005). L'approche chirurgicale et le résultat post-opératoire sont individu-dépendants, selon la localisation et l'anatomie du doigt surnuméraire.

Dans la forme tératogène, les deux doigts du sabot fendu étant en contact avec le sol, l'excision du doigt surnuméraire imposerait un report de poids trop important à supporter pour le doigt restant qui est de plus petite taille que la normale. Dans ce cas, l'excision du doigt supplémentaire n'est pas recommandée (Beste et Whitfield-Cargile, 2019). Dans la forme atavique, il y a habituellement un doigt normalement développé, accompagné d'un plus petit doigt supplémentaire qui n'est pas en contact avec le sol. L'excision chirurgicale est alors envisageable. Deux approches chirurgicales ont été décrites : la désarticulation de l'articulation métacarpo-phalangienne rudimentaire ou l'ostéotomie et l'amputation de la partie distale du métacarpe impliqué. Cette dernière est la technique de choix, il a été montré qu'elle apportait un meilleur résultat esthétique et fonctionnel. Elle consiste en une ostéotomie en biseau pratiquée à la moitié ou au tiers distal du métacarpe du doigt supplémentaire puis en une suture du périoste sur le site d'ostéotomie afin de prévenir toute nouvelle formation osseuse (Gray *et al.*, 2019).

Il n'y a pas d'urgence à pratiquer une correction chirurgicale chez le poulain nouveau-né. Si le site chirurgical est proche du cartilage de conjugaison de l'épiphyse distale des métarpes, il est conseillé de repousser la chirurgie. En effet le risque est de léser ce cartilage de croissance et donc d'interférer avec la croissance en longueur du membre. L'excision chirurgicale pourra être pratiquée après la fermeture physiologique des cartilages de conjugaison (Beste et Whitfield-Cargile, 2019 ; Colbourne *et al.*, 1991). Une intervention chirurgicale précoce est recommandée dans un cas : si le membre présente une déformation angulaire significative, qui risque de s'aggraver au cours de la croissance (Beste et Whitfield-Cargile, 2019).

Les examens d'imagerie pré-opératoires sont indispensables afin de déterminer les éléments osseux et tissus mous présents, d'identifier les structures tendineuses et ligamentaires reliant le doigt supplémentaire au membre et d'estimer le pronostic sportif futur.

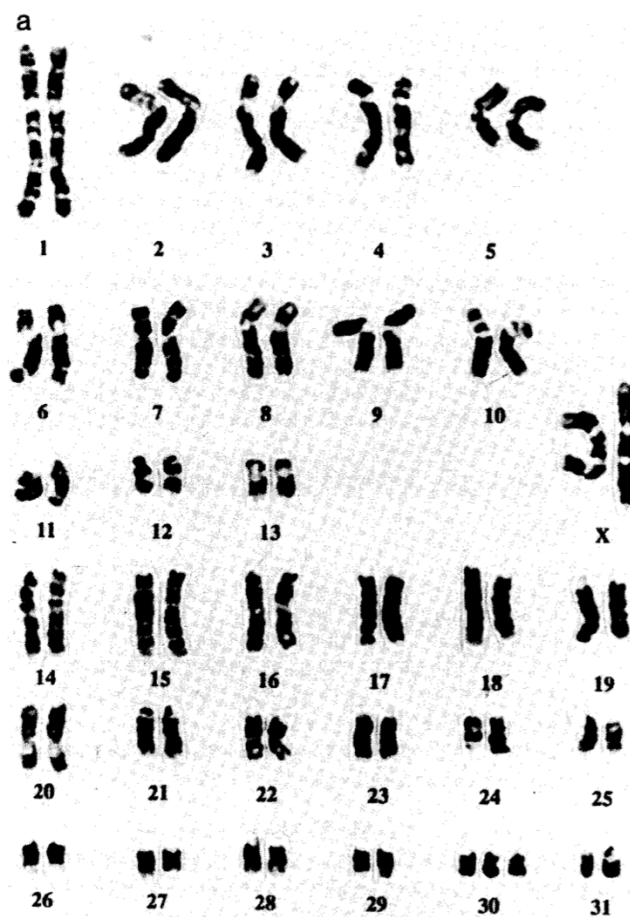
Le pronostic sportif après chirurgie semble très bon à excellent pour la forme atavique, sous réserve que le membre atteint ne présente pas d'autres anomalies.

### 3.4 Origines de la polydactylie chez le cheval

L'origine exacte de la polydactylie chez le cheval n'a encore jamais été décrite dans la littérature scientifique. La majorité des cas rapportés était issu d'accouplements entre deux individus indemnes phénotypiquement. Un seul cas de polydactylie héréditaire a été rapporté chez un poulain et sa mère (Stanek et Hantak, 1986). Les deux individus présentaient une polydactylie bilatérale et médiale, chaque doigt surnuméraire s'articulant dans le

prolongement de l'os métacarpien II. La mère avait été opérée à l'âge de 10 ans, avant la naissance de son poulain polydactyle. L'étalon était indemne. Les analyses cytogénétiques n'ont pas révélé d'anomalies chromosomiques : caryotypes 64 XX pour la mère et 64 XY pour le poulain. Il était impossible d'établir des conclusions sur le mode de transmission de ce caractère mais les auteurs ont suggéré l'hypothèse d'une transmission autosomique dominante à pénétrance incomplète.

D'autres auteurs ont réalisé des analyses cytogénétiques (Artigas *et al.*, 2020 ; Giofré *et al.*, 2004) qui n'ont pas montré d'anomalie chromosomique. Seul un cas de polydactylie associée à un anomalie chromosomique a été décrit (Bowling et Millon, 1990). Il concernait une jument de trois ans de race Arabe. Elle présentait une petite taille, une démarche raide, des déviations angulaires des membres antérieurs et une légère polydactylie bilatérale (os métacarpiens articulés). Il s'agissait d'un cas de trisomie autosomique pour le chromosome 30 : caryotype 65 XX, + 30 (Figure 37). Les caryotypes des deux parents n'ont pas révélé d'anomalie. Ce cas a été associé à un âge maternel avancé : la mère avait 23 ans.



*Figure 37* : Caryotype montrant une trisomie autosomique chez une jument de race Arabe. La trisomie concerne le chromosome 30. (d'après Bowling et Millon, 1990)

Notre étude portant sur l'origine génétique de la polydactylie chez le cheval de race Barbe, nous allons voir à présent quelles sont les stratégies possibles de recherche de gènes et de mutations chez le cheval.

### III. Stratégies de recherche de gènes et de mutations chez le cheval

Différentes stratégies sont possibles pour identifier les gènes et les mutations responsables d'un caractère délétère ou d'un caractère d'intérêt chez les animaux. Ces techniques sont applicables au cheval.

L'approche gène candidat consiste à faire une hypothèse sur le gène en cause du caractère étudié et à confirmer son implication. A l'inverse, avec le clonage positionnel, on ne fait pas d'hypothèse de départ sur le gène incriminé, mais on recherche le(s) gène(s) impliqué(s) par leur position dans le génome. Le séquençage permet d'avoir accès à la séquence nucléotidique des gènes et ainsi d'identifier une mutation à l'échelle nucléotidique.

Nous allons présenter ces différentes techniques.

#### 1. Clonage positionnel

(d'après Milan, 2000 ; Read et Donnai, 2009 ; Strachan et Read, 1998)

Le gène à l'origine du caractère étudié est recherché par sa position dans le génome. Les étapes du clonage positionnel sont les suivantes :

(1) Le recrutement et le phénotypage de l'ensemble des individus étudiés. L'étude est réalisée soit sur des familles entières soit sur deux cohortes, c'est-à-dire deux groupes d'individus atteints et indemnes (contrôles).

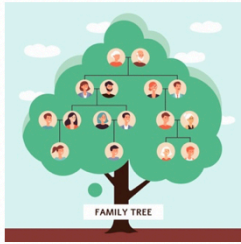
(2) Le génotypage des individus. Il est réalisé à l'aide de marqueurs génétiques polymorphes qui sont répartis à intervalles réguliers dans le génome. Ces marqueurs peuvent être de deux types :

- les microsatellites : ce sont des courtes séquences de deux à six nucléotides répétées en tandem. Par exemple, la séquence  $(CA)_n$ , avec  $n$  le nombre de répétitions est un marqueur microsatellite. Leur polymorphisme est lié au nombre de répétitions de la séquence. Ils sont également appelés STR (*Short Tandem Repeat*) ;
- les marqueurs SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*). Ces marqueurs sont constitués d'un seul nucléotide. Ce sont des marqueurs bi-alléliques : seulement deux allèles possibles par SNP. Ils sont donc bien moins informatifs que les microsatellites pris individuellement, mais ils sont beaucoup plus nombreux.

L'objectif du génotypage est de localiser le gène responsable du caractère étudié, en l'absence d'indice concernant sa position. Pour cela, on cherche à encadrer le locus en cause par deux marqueurs flanquants. Ces marqueurs doivent être liés au locus en cause, c'est-à-dire assez proches de l'allèle muté pour que des allèles des marqueurs soient quasi systématiquement transmis avec lui. Pour les identifier, on suit la transmission conjointe ou non des allèles du marqueur et des phénotypes « atteint » ou « indemne » dans des familles (c'est la stratégie de l'analyse de liaison familiale) ou bien on compare les fréquences alléliques des marqueurs entre le groupe "atteint" et le groupe "indemne", c'est la stratégie de l'étude d'association. Cette étape aboutit à l'identification d'une région candidate, encadrée si possible par au minimum deux marqueurs dans la stratégie de l'analyse de liaison familiale ou définie par des marqueurs très associés dans la stratégie de l'étude d'association (*Figure 38*).

## Analyse de liaison

- Pour les **familles**



- Génotypage

- Suivi de la transmission conjointe ou non des allèles des marqueurs et du phénotype

- Analyse statistique **LOD score**

=> **Liaison** ou non entre les marqueurs et le phénotype « atteint »

## Etude d'association

**GWAS** = *Genome Wide Association Study*

- Pour les **cohortes**



- Génotypage

- Comparaison des génotypes dans les deux groupes « atteints » et « non atteints »

-Analyse statistique : test du **Chi 2**

=>**Association** ou non entre les marqueurs et le phénotype « atteint »

**Figure 38 :** Comparaison de deux stratégies de clonage positionnel

*LOD* : *logarithm of the odd*

- (3) L'inventaire de l'ensemble des gènes présents dans la région candidate (grâce aux bases de données) puis leur classement par ordre de priorité d'examen. Pour établir cet ordre on peut s'intéresser pour chaque gène à :
  - la fonction du gène : ce que l'on sait du gène permet-il d'en faire un candidat pour la maladie recherchée ?
  - son profil d'expression : le gène s'exprime-t-il dans un tissu atteint par la maladie ?
  - la connaissance d'une maladie homologue : un des gènes de cette région est-il impliqué dans une maladie similaire chez une autre espèce ?
- (4) La recherche de la ou des mutations à l'origine du caractère étudié, en suivant l'ordre d'examen des gènes établi. Cette recherche peut se faire par séquençage de chaque gène (en commençant par ses séquences codantes ou exons) ou désormais par un séquençage complet du génome d'un individu atteint en analysant en priorité la région candidate.

Deux étapes complémentaires consistent à valider la mutation à l'échelle de la population (corrélation génotype-phénotype, présence/absence dans d'autres races, fréquence) et à confirmer du point de vue physiopathologique l'effet de la mutation, c'est-à-dire à s'assurer que c'est bien la mutation que l'on a identifiée qui est responsable du caractère étudié.

Remarque : l'utilisation des marqueurs de type SNP a progressivement remplacé l'usage des microsatellites, du fait notamment de la commercialisation de puces à marqueurs SNP équinés, dont les différentes versions disponibles permettent de génotyper en une seule fois un individu pour 54 602 SNPs (puce Illumina® *Equine SNP50 BeadChip*), 65 157 SNPs (puce Illumina® *Equine SNP70 BeadChip*) et même 670 806 SNPs (puce Affymetrix® *Axiom Equine genotyping array*)(Chassier et al., 2018; Raudsepp et al., 2019).

Comme exemples de succès de clonages positionnels chez le cheval, nous pouvons citer l'identification de mutations responsables de nanisme (Eberth *et al.*, 2018) ou d'une dilution de la couleur de la robe spécifique du poney Shetland (Tanaka *et al.*, 2019).

## **2. Approche gène candidat**

(d'après Milan, 2000 ; Read and Donnai, 2009 ; Strachan and Read, 1998)

L'étude de type gène candidat a pour point de départ l'hypothèse d'un gène dit « candidat », responsable du caractère étudié. Cette hypothèse vient de l'observation du même phénotype dans une autre espèce chez laquelle on connaît le gène en cause ou bien de la connaissance de la fonction du gène. Ce gène est alors un bon candidat, car on sait qu'il est responsable, lorsqu'il est muté, du caractère étudié dans une autre espèce ou que sa perte/modification de fonction est compatible avec le phénotype étudié.

On focalise donc sa recherche sur un ou quelques gènes. L'avantage de cette stratégie est qu'elle est simple, rapide et généralement peu coûteuse. L'inconvénient est qu'elle est très réductrice (on ne s'intéresse qu'à un ou quelques gènes) et ne garantit pas le succès.

L'approche gène candidat a cependant permis de mettre en évidence des mutations équinnes. Comme exemples de succès nous pouvons citer l'identification des mutations responsables des couleurs de robe bai, noir et alezan (Rieder *et al.*, 2001).

## **3. Le séquençage des génomes**

(d'après Raous, 2013 ; Van Dijk et Thermes, 2021 ; Illumina)

Le séquençage consiste à déterminer l'enchaînement des nucléotides d'une molécule d'acide nucléique : ADN (acide désoxyribonucléique) ou ARN (acide ribonucléique). Les prémices de cette technologie remontent aux années 1970 avec les travaux de Frederick Sanger. La méthode Sanger a permis le séquençage entier du génome humain dans les années 2000, après plus de dix ans de travail. Dans le but de séquencer de manière beaucoup plus rapide et à moindre coût des génomes de grande taille, de nouvelles technologies ont vu le jour. C'est le séquençage dit à « haut débit » ou de nouvelles générations (*Next-Generation Sequencing*, NGS), permettant de réaliser des milliers ou des millions de réactions en parallèle. On parle de séquençage massif en parallèle.

Nous allons présenter la technologie Illumina® qui est la plus largement utilisée aujourd'hui et celle employée dans notre étude expérimentale.

Les étapes du séquençage Illumina sont : la constitution d'une banque de fragments d'ADN à séquencer, l'amplification des fragments d'ADN et le séquençage en lui-même.

### 3.1 La constitution d'une banque de fragments d'ADN à séquencer

Cette étape consiste en la préparation d'une banque (bibliothèque) de fragments d'ADN simples brins associés à des ligands ou « adaptateurs ». Ces adaptateurs ont deux rôles : (1) permettre l'accrochage et l'amplification sur une cellule de flux (un support solide qui permet une amplification en phase solide) et (2) servir d'accroche pour les amorces qui seront le point de départ du séquençage.

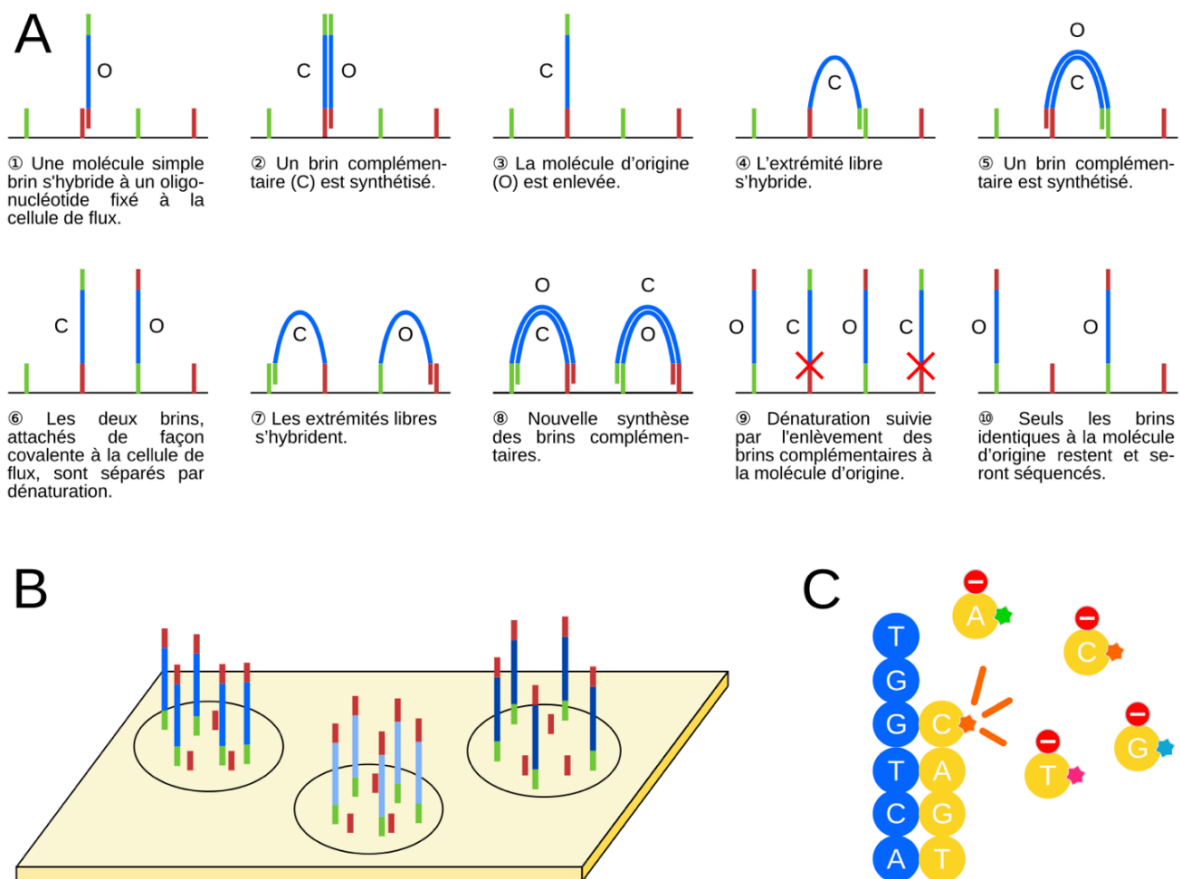
Les molécules d'ADN sont fragmentées aléatoirement, et dénaturées afin d'obtenir un ensemble de molécules simple brin. Chaque fragment fixe deux adaptateurs, un à chaque extrémité et vient s'hybrider sur la cellule de flux par complémentarité de son adaptateur avec des oligonucléotides fixés sur la cellule (le support solide ; *Figure 39*). La technologie Illumina permet de traiter des fragments faisant entre 50 et 200 pb.

### 3.2 L'amplification des fragments d'ADN

L'amplification se fait par la formation de ponts. En présence d'une ADN polymérase et de nucléotides, un brin complémentaire au brin matrice est synthétisé. Ces deux brins sont séparés par dénaturation et un lavage élimine le brin matrice d'origine. L'extrémité libre du brin restant s'hybride avec un oligonucléotide de la cellule situé à proximité, formant un pont. Un nouveau brin complémentaire (identique au brin matrice d'origine) est synthétisé et une nouvelle dénaturation sépare les deux brins. Le même processus se répète. On aboutit à la formation d'un « cluster », c'est-à-dire un ensemble de milliers de molécules simple brin, toutes identiques au brin matrice d'origine. A d'autres endroits de la cellule, on aura les clusters correspondant à d'autres fragments initiaux de la banque. A la fin de l'amplification, les brins complémentaires sont retirés par clivage chimique au niveau de leur ligand (*Figure 39*).

### 3.3 Le séquençage par terminateurs réversibles

L'étape de séquençage débute par l'hybridation des amorces sur tous les brins de tous les clusters, au niveau de leur adaptateur. A chaque cycle, un seul nucléotide est incorporé. Chaque nucléotide est marqué par un fluorochrome spécifique et porteur d'un groupement de protection « STOP » à son extrémité 3'OH qui bloque la polymérisation suivante (*Figure 39*). Une étape d'imagerie permet de reconnaître chaque fluorochrome et d'en déduire le nucléotide incorporé. Après détection du signal, le fluorochrome et le groupement de protection sont retirés, permettant l'ajout d'un nouveau nucléotide.



**Figure 39** : Principe de la technologie de séquençage de nouvelle génération Illumina®

**A** : Les étapes de l'amplification en pont sur la cellule de flux (trait noir horizontal). Les adaptateurs et les oligonucléotides fixés à la cellule de flux sont symbolisés par les bâtonnets rouges et verts.

**B** : Différents clusters sont obtenus en même temps sur une même cellule de flux.

**C** : Réaction de séquençage. En bleu : brin fixé sur la cellule de flux, servant de matrice. En jaune : nucléotides incorporés. Etoiles verte, orange, bleue et rose : fluorochromes. Panneau « stop » : groupement de protection (d'après Raous, 2013 ; Van Dijk et Thermes, 2021)

Le principal intérêt de la technologie Illumina par rapport aux autres technologies NGS est sa productivité. Illumina peut générer jusqu'à 600 gigabases (Gb) par cycle de séquençage. Mais ses principales limites sont la petite taille des fragments qu'elle peut séquencer (maximum 200 pb).

La figure 39 présente le séquençage des fragments dit « *single end* ». Une autre approche dite « *paired end* », permet de séquencer à la fois le brin matrice et le brin complémentaire. Cela apporte une meilleure précision pour l'alignement des séquences contenant des motifs répétés et la possibilité de détecter les insertions, délétions ou inversions de nucléotides.

Après nettoyage et alignement des séquences générées sur un génome de référence (dans notre cas le génome de référence équin disponible : EquCab3.0, [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)), les différences entre le génome de référence et le génome séquencé peuvent être identifiées, à l'échelle nucléotidique. Notons que le génome de référence équin a été généré par le séquençage du génome d'un individu de race Pur-sang (Raudsepp *et al.*, 2019). La comparaison du génome séquencé d'un cheval à celui du génome de référence peut conduire à la mise en évidence de milliers de variants, qu'il faudra ensuite trier pour rechercher une mutation responsable d'un phénotype d'intérêt. La possibilité d'avoir à disposition une banque de génomes de chevaux de différentes races déjà séquencés permet de filtrer

efficacement les variants afin d'éliminer les polymorphismes inter-raciaux et inter-individuels et de faciliter la mise en évidence de mutations (Bauer *et al.*, 2017; Metzger *et al.*, 2017).

Le séquençage de génomes entiers s'est banalisé ces dernières années, du fait de la baisse des coûts du séquençage NGS. C'est une stratégie qui est de plus en plus employée pour rechercher des mutations équine, seule ou en complément d'un clonage positionnel (Bauer *et al.*, 2017; Hack *et al.*, 2021; Towers *et al.*, 2013).

## **Deuxième partie**

### **Etude expérimentale**



## I. Contexte et buts de l'étude

Il a été mis en évidence que le cheval Barbe était originaire d'Afrique du Nord. Il y a 2000 ans, il était appelé cheval de Barbarie par les Romains. A partir du VIII<sup>ème</sup> siècle, il a quitté le Maghreb pour s'étendre en Espagne, en Italie et en France sous la selle de guerriers dits « barbares », d'où le nom de la race. Croisés aux chevaux Arabes, les chevaux Barbes ont donné naissance à une race sœur : l'Arabe-Barbe. De par son endurance, sa robustesse et sa résistance aux variations climatiques, le Barbe était autrefois utilisé comme cheval de guerre. Aujourd'hui c'est un cheval d'endurance et de loisir par excellence. Il est très utilisé en attelage au Maghreb et pour les spectacles équestres en Europe.

Il a été montré que la polydactylie était rare chez le cheval mais représentait la malformation congénitale la plus fréquemment observée (voir première partie). De multiples cas ont été rapportés chez le cheval, mais aucune étude génétique de cette maladie n'a été publiée à notre connaissance.

Des cas de polydactylie non-syndromique ont été identifiés parmi les individus d'une famille de chevaux Barbe et croisés Barbe, dont l'un des membres avait été présenté en consultation de chirurgie équine à l'EnvA (Carstanjen et *al.*, 2007). A la suite de cette identification, d'autres cas de polydactylie ont été répertoriés dans cette famille. Une étude a été initiée pour caractériser cette polydactylie.

Les buts de notre travail étaient :

- de caractériser le phénotype de polydactylie ségrégeant dans cette large famille de chevaux Barbe ;
- de rechercher le mode de transmission de cette anomalie ;
- d'initier la recherche de mutations qui pourraient être responsables de cette polydactylie équine.



## II. Matériel et méthodes

### 1. Animaux

#### 1.1 Chevaux

Trois cent quatre vingt sept chevaux ont été inclus dans l'étude phénotypique et génétique, dont :

- neuf chevaux polydactyles ;
- trois cent soixante dix huit chevaux et poneys contrôles indemnes de polydactylie de 15 races différentes, dont 34 étaient apparentés aux individus polydactyles et 344 étaient non apparentés.

Remarque : Les données de généalogie de chevaux supplémentaires ont été utilisées pour la réalisation de l'arbre généalogique, sans que des données phénotypiques ou génétiques aient été collectées pour ces animaux. Ils n'ont pas été comptés dans les animaux inclus dans l'étude.

#### 1.2 Méthode de recrutement

Les chevaux ont été recrutés :

- grâce aux éleveurs et propriétaires participant au programme de recherche et ayant sollicité cette recherche ;
- grâce au club de race Allemand et Autrichien du cheval Barbe ;
- grâce à Jean-Claude Mériaux du laboratoire Labogena.

#### 1.3 Critères d'inclusion

Les individus atteints inclus dans l'étude étaient des chevaux polydactyles. Les individus indemnes inclus dans l'étude étaient :

- des chevaux non polydactyles mais apparentés aux polydactyles ;
- des chevaux et poneys contrôles non polydactyles et non apparentés, de race Barbe, Arabe-Barbe, Arabe et de différentes autres races.

#### 1.4 Fiche de prélèvement, consentement et éthique

Les chevaux polydactyles et apparentés aux chevaux polydactyles du programme de recherche ont été inclus dans l'étude à la demande de leur propriétaire, après signature de la fiche de prélèvement et de consentement à l'utilisation des prélèvements pour des recherches en génétique (Annexe 2). Les ADN de 344 chevaux contrôles ont été envoyés directement par les propriétaires sous forme de crins ou étaient issus du laboratoire Labogena qui les avait collectés à la demande des propriétaires des animaux, dans le cadre de l'identification ADN et de contrôles de filiation. Tous les animaux étaient des animaux de propriétaires. Aucune procédure invasive n'a été réalisée sur les animaux inclus dans l'étude. Il n'y a pas d'expérimentation animale au sens de la Directive Européenne (*Subject 5f of Article 1, Chapter I of the Directive 2010/63/UE of the European Parliament and of the Council*). L'étude a reçu l'avis favorable du Comité d'éthique de VetAgro Sup n°2152.

## **2. Examens cliniques**

Les examens cliniques des animaux ont été réalisés par les vétérinaires traitants, qui ont également réalisé une palpation externe des membres. Des photos des membres et des chevaux en entier ont été envoyées directement par les propriétaires au Dr Marie Abitbol.

## **3. Examens complémentaires : radiographies et caryotypes**

Les radiographies des membres ont été réalisées par les vétérinaires traitants, à la demande des propriétaires des chevaux. Elles ont été transmises à Marie Abitbol.

Les caryotypes ont été effectués à la demande des propriétaires des chevaux, par le laboratoire de Cytogénétique de Toulouse (UMR INRA ENVT de Cytogénétique des Populations Animales, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Dr Ducos et Dr Pinton). Les résultats ont été transmis à Marie Abitbol sous forme de compte-rendu et de photographies annotées des chromosomes.

## **4. Arbres généalogiques**

Les données de pedigree ont été collectées auprès des propriétaires en même temps que les échantillons d'ADN. Les arbres généalogiques, constitués à partir des pedigrees des chevaux inclus dans l'étude ont été dessinés à l'aide du logiciel Genopro (<http://www.genopro.com/fr/>).

## **5. Extractions des ADN**

Les prélèvements des chevaux inclus dans l'étude ont été envoyés directement par les propriétaires (crins) ou collectés par le vétérinaire traitant du cheval, dans le cadre d'une visite médicale vétérinaire lors du parcours de soins de l'animal (sang).

### 5.1 Extraction de l'ADN à partir des échantillons sanguins

Le sang a été prélevé dans des tubes avec anticoagulant EDTA (Éthylène Diamine Tétra-Acétique) et l'extraction de l'ADN a été réalisée à l'aide de l'automate Maxwell16 de Promega (Madison, Wisconsin, USA) en se conformant aux recommandations du fabricant. Les ADN en solutions ont ensuite été conservés au réfrigérateur à +4°C.

### 5.2 Extraction de l'ADN à partir de crins

L'ADN a été extrait à l'aide de l'automate Maxwell16 de Promega (Madison, Wisconsin, USA) en suivant les recommandations du fabricant. La technique suivie a été la même que celle décrite par le fabricant pour des prélèvements buccaux. Les ADN en solutions ont ensuite été conservés au réfrigérateur à +4°C.

### 5.3 Concentration des ADN

La concentration des ADN a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Nanodrop 2000).

## **6. Génotypage sur puce**

Les chevaux ont été génotypés à l'aide de la puce équine à marqueurs SNP Illumina (puce Illumina® *Equine SNP70 BeadChip* ; [www.illumina.com](http://www.illumina.com)), en se conformant aux recommandations du fabricant. Après extraction et mesure de la concentration des ADN, ces derniers ont été envoyés au laboratoire Labogena ([www.labogena.fr](http://www.labogena.fr)) pour génotypage.

## 7. Séquençage du génome entier

Le séquençage complet du génome d'un cheval polydactyle a été effectué par le laboratoire Integrigen (Evry, France). Le séquençage a été réalisé sur une plateforme Illumina HiSeq3000 ([www.illumina.com](http://www.illumina.com)), avec la technologie *paired-end* (fragments de 150 paires de bases) et une profondeur de 30 X. Les alignements sur le génome de référence du cheval ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) et l'extraction des variants génomiques de type SNV (*single nucleotide variant*) et Indel (insertions et délétions) ont été réalisés par Integrigen. ([www.integrigen.com](http://www.integrigen.com))

## 8. Amplification PCR (*polymerase chain reaction*) et séquençage Sanger

Les locus ZRS et pZRS équins ont été amplifiés par PCR et séquencés en séquençage Sanger. Les PCR ont été réalisées dans un volume total de 25 µl avec 100 ng d'ADN génomique, à l'aide de la Taq polymérase QBiogen (QBiogen S.A. France, Courtaboeuf, France) ou GoTaq G2 Hot Start (Promega Corporation, Madison, USA), en se conformant aux recommandations des fabricants. Nous avons réalisé 35 cycles d'amplification à l'aide de thermocycleurs Biorad (Bio Rad France, France) ou Eppendorf (Eppendorf France SAS, Montesson, France). La qualité des amplifications par PCR a été vérifiée par une électrophorèse dans un gel d'agarose. Les séquences de ZRS et de pZRS ont été obtenues après envoi de 10µl de produit de PCR et des amorces de PCR au laboratoire GATC (GATC Biotech, Constance, Allemagne). Les amorces utilisées pour amplifier par PCR et séquencer les locus ZRS et pZRS équins sont présentées dans le tableau II.

Tableau II : Amorces de PCR et de séquençage Sanger

Nom	Séquence	Orientation	Tm (en °C)	Amplicon (en pb)
ZRSpartie1F	tttgggatgatgtcagaagatg	Sens	60	441
ZRSpartie1R	cctcaaatttgtacttttgcttt	Antisens	60	
ZRSpartie2F	aaccaaagatgtttctgggagt	Sens	60	417
ZRSpartie2R	gccaaaaggacataaaccag	Antisens	60	
ZRSpartie3F	aacttcaaacgaagtgttggat	Sens	58	414
ZRSpartie3R	atgatcagtggcaaaaacgag	Antisens	58	
ZRSpartie4F	gtccctttggcaaacttaca	Sens	60	516
ZRSpartie4R	ttccacagaaaaacgagtgtct	Antisens	60	
pZRSpartie1F	gccttctgttacctgtcttgg	Sens	60	401
pZRSpartie1R	tgccacttagggactctacca	Antisens	60	
pZRSpartie2F	gggcaatattgacgagatctta	Sens	58	399
pZRSpartie2R	ggcctttaaaggacatggt	Antisens	58	
pZRSpartie3F	aaattggccactagccacag	Sens	60	428
pZRSpartie3R	taagcatgggttcaggttca	Antisens	60	

*Tm* : melting temperature

Les chevaux ont été génotypés pour le SNP de pZRS par PCR et séquençage comme décrit ci-dessus, à l'aide des amorces pZRSpartie2 F et R.

Pour le variant du gène *GLI1*, les séquences équines ont été amplifiées par PCR et séquencées en séquençage Sanger. La méthode était identique à celle utilisée pour les locus ZRS et pZRS.

Les amorces suivantes ont été utilisées : 5'-ATCCTGCAGCAGTGACCAC-3' et 5'-AGTGTCTTAAGGAATGGGCAC-3', à une température d'hybridation (T<sub>m</sub>) de 58°C. La taille attendue de l'amplicon était de 377 pb.

### **9. Analyses statistiques**

Les fréquences alléliques des SNP des chevaux polydactyles et contrôles ont été comparées à l'aide du logiciel PLINK dédié aux études d'associations (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>).

La comparaison des effectifs de mâles et femelles polydactyles a été effectuée avec un test de Fischer au seuil de signification statistique de 0,05 %.

Les comparaisons des fréquences génotypiques ont été effectuées à l'aide d'un test du khi 2 au seuil de signification statistique de 0,05%.

### **10. Bases de données et outils génomiques**

Les données de séquence du génome de référence du cheval ainsi que la séquence de l'intron 5 du gène *LMBR1* équin, toutes les séquences de l'intron 5 de *LMBR1* de chien, de chat, de souris, de vache, de rat, de chimpanzé et d'Homme, et la séquence équine du gène *GLI1* ont été extraites de la base de données Ensembl : <http://www.ensembl.org>.

Les comparaisons et alignements de séquences ont été effectuées avec l'outil en ligne Multalin : <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin>.

La recherche de régions conservées et homologues entre espèces a été effectuée à l'aide de l'outil en ligne VISTA : <https://genome.lbl.gov/vista/index.shtml>.

Les amorces de PCR et de séquençage Sanger ont été dessinées à l'aide de logiciel en ligne Primer3 : <https://primer3.ut.ee>.

L'analyse des résultats de séquençage Sanger a été réalisée à l'aide du logiciel Chromaslite 2.01 (Technelysium Pty Ltd : [www.technelysium.com.au](http://www.technelysium.com.au)).

L'impact des SNP codants a été évalué à l'aide des outils en ligne PROVEAN (<http://provean.jcvi.org/index.php>) et SIFT (<https://sift.bii.a-star.edu.sg/>).

### III. Résultats

#### 1. Une polydactylie pré-axiale non syndromique chez le cheval Barbe

##### 1.1 Examens cliniques

Les examens cliniques ont consisté en une inspection et une palpation des membres, réalisées par le vétérinaire traitant ou par le propriétaire du cheval pour les chevaux polydactyles et leurs apparentés.

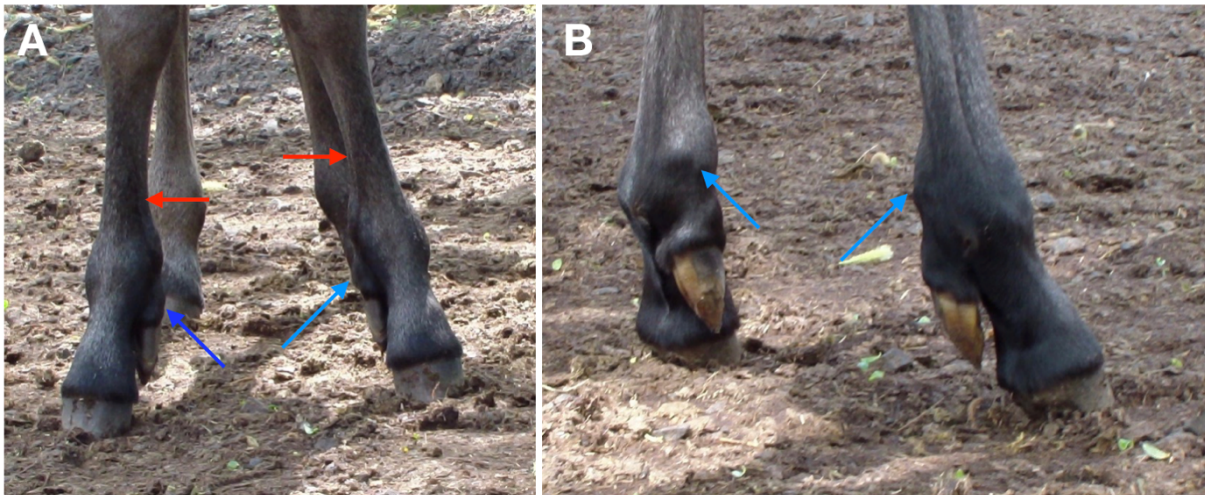
Nous avons obtenu des photos des membres ou du cheval en entier pour quatre chevaux de la famille étudiée. Les photographies de ces quatre individus, tous polydactyles, sont présentées dans les Figures 40 à 43.

Remarque : les identifiants des chevaux ont été attribués de manière unique et ont été indiqués sur les arbres généalogiques présentés après.



*Figure 40* : Photographie de la pouliche III4, vue de face

La polydactylie apparaît bilatérale et pré-axiale. On note une déformation des boulets en région médiale. Chaque doigt surnuméraire (flèches rouges) est accompagné d'une production cornée.



**Figure 41** : Photographies des membres antérieurs de la pouliche III7

**A** : vue de face / **B** : vue palmaire

On note une polydactylie bilatérale et pré-axiale. Chaque doigt surnuméraire (flèches bleues) est accompagné d'une production cornée. On note une déformation bilatérale et médiale au niveau du boulet. Un élargissement médial au niveau des canons est visible également sur chaque membre antérieur (flèches rouges).



**Figure 42** : Photographie des membres antérieurs du poulain III11

Sur le membre antérieur droit, un doigt surnuméraire bien individualisé et prolongé par une production cornée est visible (flèche bleue). Il est associé à une déformation médiale du boulet. Un os métacarpien rudimentaire est élargi au niveau du canon (flèche rouge). Le membre antérieur gauche présentait une petite excroissance médiale au niveau du boulet (non visible sur la photo). Le poulain présentait une polydactylie pré-axiale bilatérale.



**Figure 43** : Photographie des membres antérieurs du poulain II4, à l'âge de sept mois, vue de face

L'inspection et la palpation des deux membres antérieurs ont révélé la présence d'un doigt supplémentaire mobile au niveau de l'os métacarpien II sur l'antérieur droit (flèche noire) et suggérait un doigt supplémentaire non individualisé extérieurement sur l'antérieur gauche, sous une petite zone cornifiée de 0,5 cm x 0,3 cm (flèche blanche).

(Source : Bianca Carstanjen)

Pour les quatre chevaux pour lesquels nous disposons de photographies, nous avons pu mettre en évidence une **polydactylie pré-axiale bilatérale touchant les membres antérieurs**, avec une variabilité dans l'expressivité de la polydactylie attestée par des tailles de doigts surnuméraires variables.

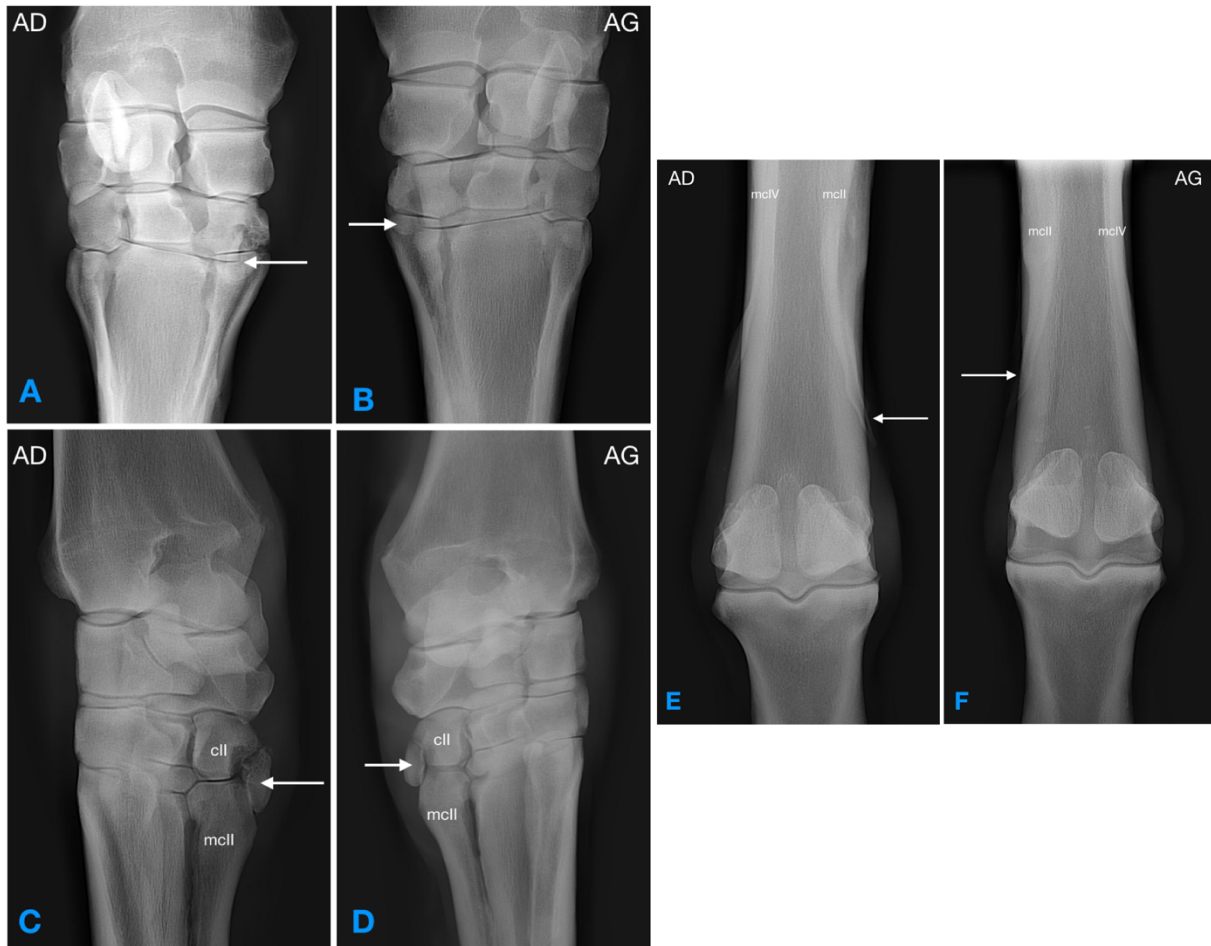
L'analyse des **données cliniques** envoyées par les vétérinaires traitants et les propriétaires pour les autres membres de la famille étudiée, nous a permis de compter un total de **huit chevaux polydactyles** parmi les chevaux de la famille étudiée.

Pour huit chevaux de la famille, l'examen clinique a été complété par un examen radiographique des membres réalisé par le vétérinaire traitant.

## 1.2 Radiographies des membres

Les radiographies des membres de huit chevaux de la famille étudiée ont été réalisées par les vétérinaires traitants et nous les avons analysées afin de rechercher des anomalies non visibles par un simple examen clinique et palpation des membres.

Les radiographies des huit chevaux sont présentées dans les Figures 44 à 51.



**Figure 44 :** Radiographies des membres antérieurs du cheval I1, extérieurement non polydactyle

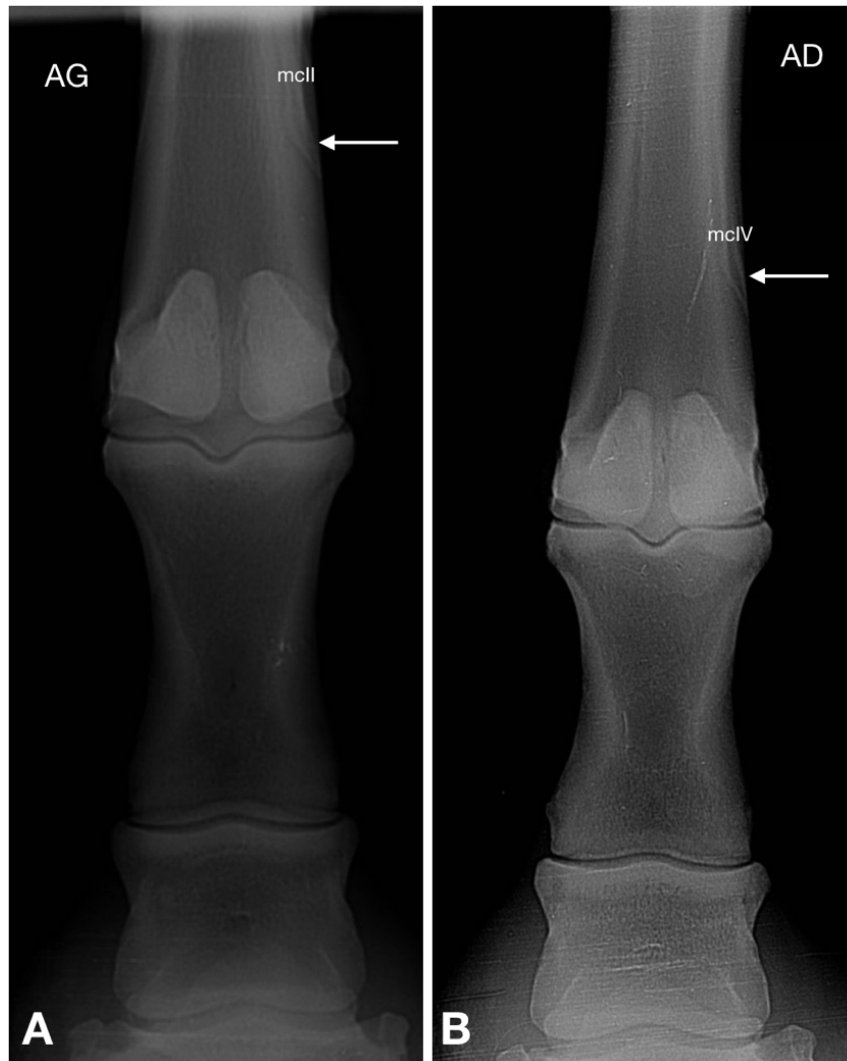
AG : membre antérieur gauche / AD : membre antérieur droit. Les marqueurs « AG » et « AD » sont placés côté face latérale.

cII : os carpal II / mclI : os métacarpal II / mclIV : os métacarpal IV

**A et B :** incidence dorso-palmaire des carpes droit et gauche. Présence bilatérale d'un os carpal I (flèche blanche).

**C et D :** incidence oblique dorso-médiale palmaro-latérale des carpes droit et gauche. Présence bilatérale de l'os carpal I (flèche blanche), de taille importante et de forme rectangulaire. Sur chaque membre, des zones radio-transparentes sont présentes sur les os carpal II et métacarpal II, en regard de l'articulation avec l'os carpal I (plus marquées sur l'antérieur droit).

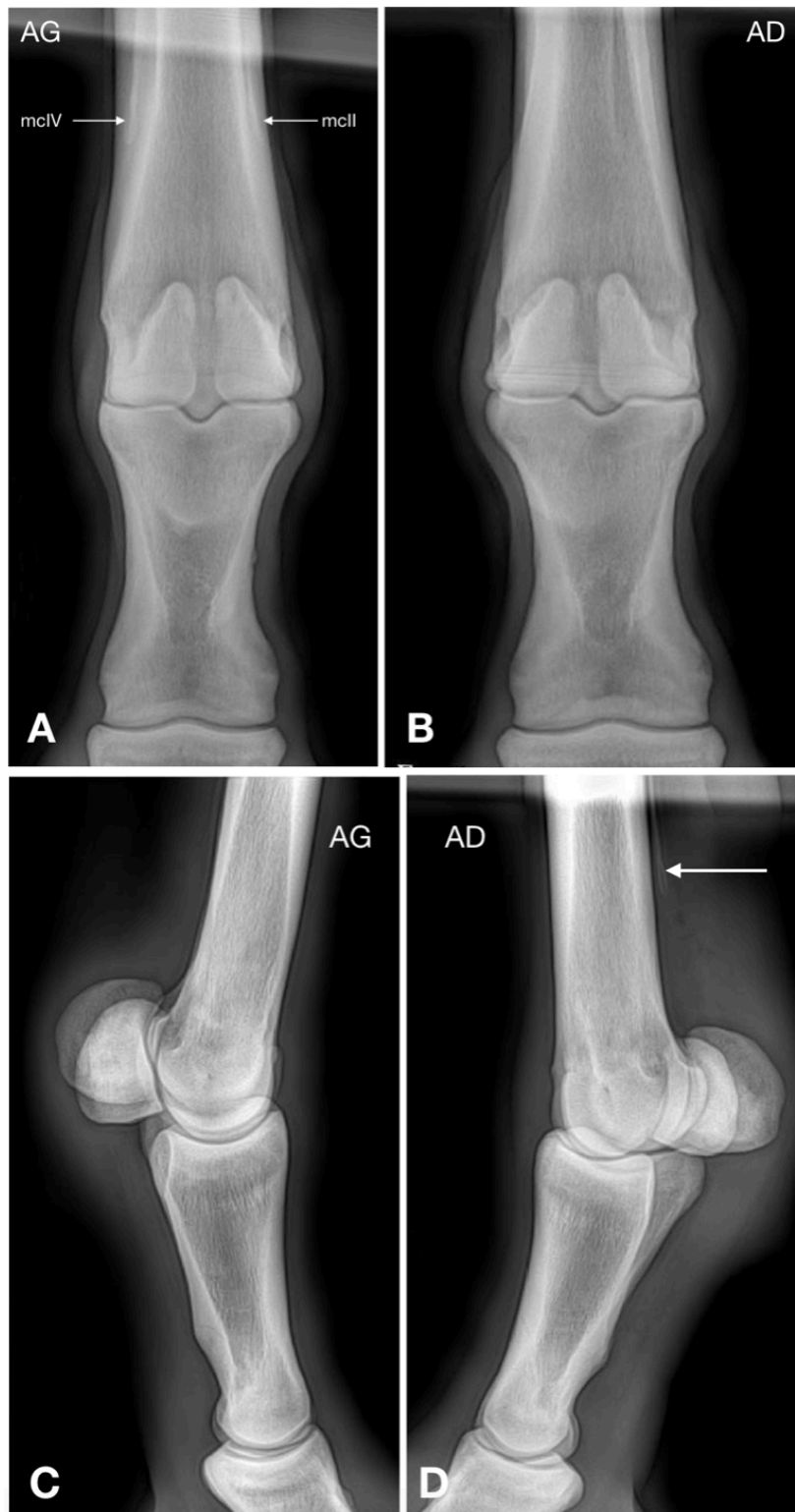
**E et F :** incidences dorso-palmaires des métarpes droit et gauche. Bilatéralement, l'os métarpien rudimentaire médial (os métacarpal II) est élargi et prolongé distalement (flèches blanches) par rapport à l'os métacarpal IV.



**Figure 45 :** Radiographies de la région du boulet des membres antérieurs de la jument II13, extérieurement non polydactyle

AG : membre antérieur gauche / AD : membre antérieur droit. Les marqueurs « AG » et « AD » sont placés côté face latérale. mcll : os métacarpal II / mclV : os métacarpal IV

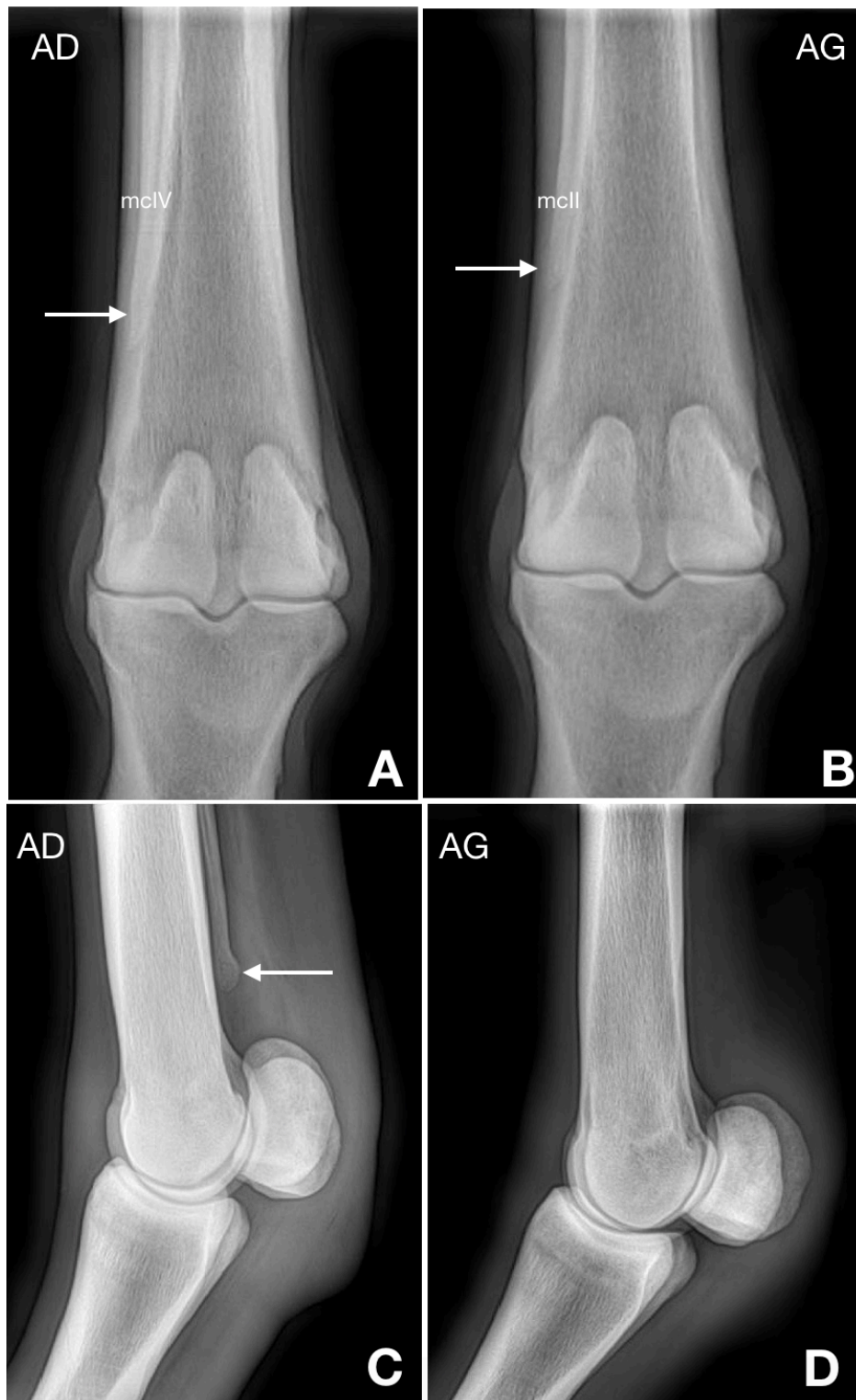
**A et B :** incidence dorso-palmaire des boulets gauche et droit. Les os métacarpiens rudimentaires (os métacarpal II et os métacarpal IV) sont peu visibles. **A :** le bouton terminal de l'os métacarpal II est légèrement élargi. **B :** le bouton terminal de l'os métacarpal IV est légèrement élargi



**Figure 46** : Radiographies de la région du boulet des membres antérieurs de la jument III12, extérieurement non polydactyle

AG : membre antérieur gauche / AD : membre antérieur droit. Les marqueurs « AG » et « AD » sont placés côté face latérale (incidence dorso-palmaire) ou face dorsale (incidence latéro-médiale). mclII : os métacarpal II / mclIV : os métacarpal IV.

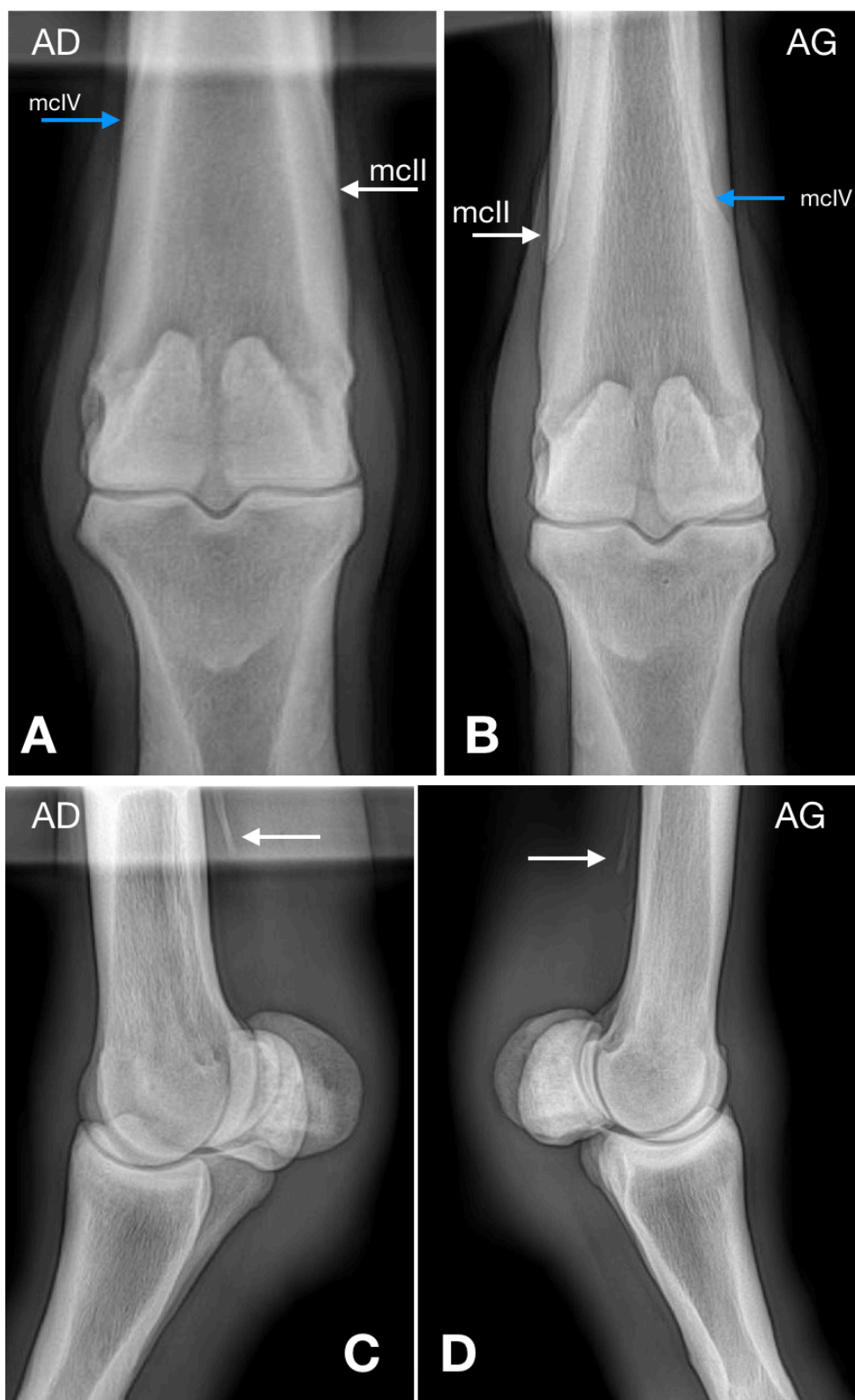
**A et B** : incidences dorso-palmaires des boulets gauche et droit. Aucune anomalie de conformation osseuse n'est visible. **A** : Les os métacarpal II et IV sont visibles, leur extrémité est fine (flèches blanches). **B** : les os métacarpal II et métacarpal IV sont peu visibles. **C et D** : incidence latéro-médiale des boulets gauche et droit. Aucune anomalie de conformation osseuse n'est visible. **C** : les os métacarpiens rudimentaires ne sont pas visibles. **D** : un os métacarpien rudimentaire est visible et son extrémité est fine (flèche blanche).



**Figure 47 :** Radiographies de la région du boulet des membres antérieurs de la jument III13, extérieurement non polydactyle

AG : membre antérieur gauche / AD : membre antérieur droit. Les marqueurs « AG » et « AD » sont placés côté face latérale (incidence dorso-palmaire) ou face dorsale (incidence latéro-médiale). mclII : os métacarpien II / mclIV : os métacarpien IV.

**A et B :** incidence dorso-palmaire des boulets droit et gauche. Aucune anomalie de conformation osseuse n'est visible. **A :** L'extrémité de l'os métacarpien IV s'étend distalement et est légèrement épaissie (flèche blanche). **B :** L'extrémité distale de l'os métacarpien II est légèrement élargie (flèche blanche). **C et D :** incidence latéro-médiale des boulets droit et gauche. Aucune anomalie de conformation osseuse n'est visible **C :** un métacarpien rudimentaire (os métacarpien II ou os métacarpien IV) est bien visible et présente un bouton terminal légèrement élargi (flèche blanche). **D :** les os métacarpiens rudimentaires ne sont pas visibles



**Figure 48 :** Radiographies de la région du boulet des membres antérieurs de la jument I120, extérieurement non polydactyle

AG : membre antérieur gauche / AD : membre antérieur droit. Les marqueurs « AG » et « AD » sont placés côté face latérale (incidence dorso-palmaire) et face dorsale (incidence latéro-médiale). mclI : os métacarpal II / mclIV : os métacarpal IV.

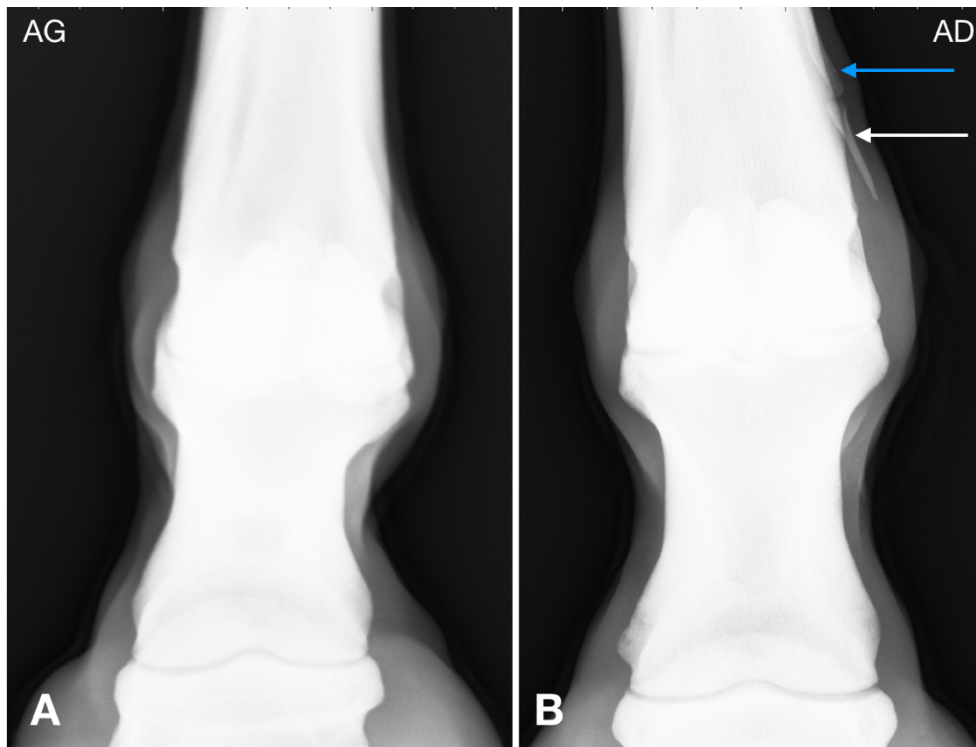
**A et B :** incidence dorso-palmaire des boulets droit et gauche. Sur chaque membre, l'os métacarpal II (flèche blanche) semble plus allongé distalement et légèrement plus large que l'os métacarpal IV (flèche bleue) (mieux visibles sur l'AG). **C et D :** incidence latéro-médiale des boulets droit et gauche. Sur chaque membre, un os métacarpien rudimentaire (os métacarpal II ou os métacarpal IV) est visible (flèches blanches).



**Figure 49 :** Radiographies des membres antérieurs de la jument II5, extérieurement non polydactyle

AG : membre antérieur gauche / AD : membre antérieur droit. Les marqueurs « AG » et « AD » sont placés côté face latérale. cII : os carpal II / mclI : os métacarpe II / mclIV : os métacarpe IV.

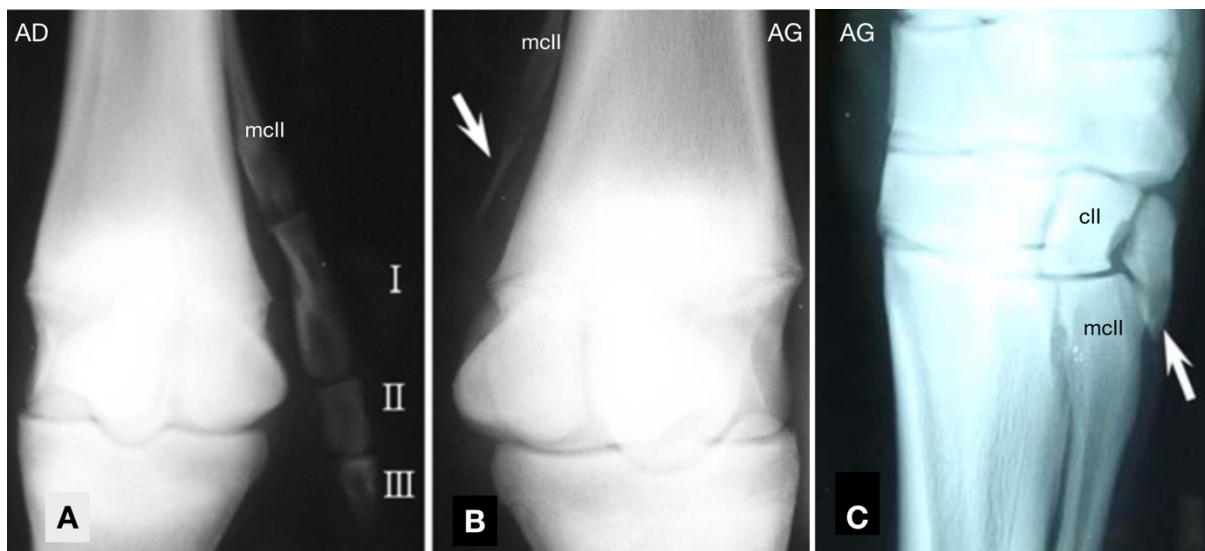
**A et B :** incidence dorso-palmaire des carpes droit et gauche. Présence bilatérale d'un os carpal I (flèche blanche), de forme arrondie, de taille plus importante sur l'AG. Sur chaque membre, des zones radio-transparentes sont présentes sur les os carpal II et métacarpe II, en regard de l'articulation avec l'os carpal I. **C et D :** incidence latéro-médiale des carpes droit et gauche. On retrouve sur chaque membre la présence d'un os carpal I (flèches blanches), de taille plus importante sur l'AG. Les zones radiotransparentes sur les os en regard sont également observées. **E et F :** incidence dorso-palmaire de la région du boulet des membres antérieurs droit et gauche. Les os métacarpiens rudimentaires sont bien visibles sur chaque membre. Ils présentent tous une extrémité légèrement élargie une longueur d'extension distale similaire.



**Figure 50 :** Radiographies de la région du boulet des membres antérieurs de la jument II1, extérieurement non polydactyle

AG : membre antérieur gauche / AD : membre antérieur droit. Les marqueurs « AG » et « AD » sont placés côté face médiale.

**A et B :** incidence dorso-palmaire des boulets gauche et droit. **A :** les os métacarpiens rudimentaires ne sont pas visualisables. Pas d'anomalie osseuse radiographiquement visible. **B :** l'os métacarpien II est allongé et élargi distalement (flèche bleue). Il s'articule distalement avec une phalange surnuméraire de forme triangulaire (flèche blanche). L'os métacarpien IV n'est pas visualisable. La jument présente une polydactylie pré-axiale unilatérale à droite.



**Figure 51** : Radiographies des membres antérieurs du poulain II4, à l'âge de sept mois

AG : membre antérieur gauche / AD : membre antérieur droit. Les marqueurs « AG » et « AD » sont placés côté face latérale. cII : os carpal II / mcll : os métacarpal II.

**A** : incidence dorso-médiale palmaro-latérale de la région du boulet du membre antérieur droit. L'os métacarpal II est hypertrophié et allongé. Il s'articule distalement avec trois phalanges (I, II et III) constituant un doigt surnuméraire. **B** : incidence dorso-médiale palmaro-latérale de la région du boulet du membre antérieur droit. L'os métacarpal II est allongé distalement et légèrement hypertrophié. Il s'articule avec une unique phalange surnuméraire (flèche blanche). **C** : incidence dorso-médiale palmaro-latérale du carpe du membre antérieur gauche. Présence d'un os carpal I (flèche blanche) bien développé, de forme rectangulaire, allongé distalement. Il s'articule avec les os carpal II et l'os métacarpal II.

Remarque : un os carpal I bien développé était aussi présent sur le carpe droit (radiographie non communiquée).

Ainsi :

- la jument II1 présentait sur le membre antérieur droit une anomalie osseuse au niveau de l'os métacarpal II et de son prolongement, caractéristique d'une polydactylie pré-axiale. Cette anomalie n'était pas visible extérieurement, ni détectable par palpation du membre. Aucune anomalie n'a été notée sur le membre antérieur gauche (tableau III) ;
- le poulain polydactyle II4 présentait des anomalies osseuses différentes sur chaque membre antérieur (tableau III) ;
- les juments II5, II13, II20, III12, III13 et l'étalon I1, non polydactyles extérieurement, ne présentaient pas de doigt supplémentaire visible à l'examen radiographique. En revanche, nous avons observé des particularités chez ces individus (tableau III).

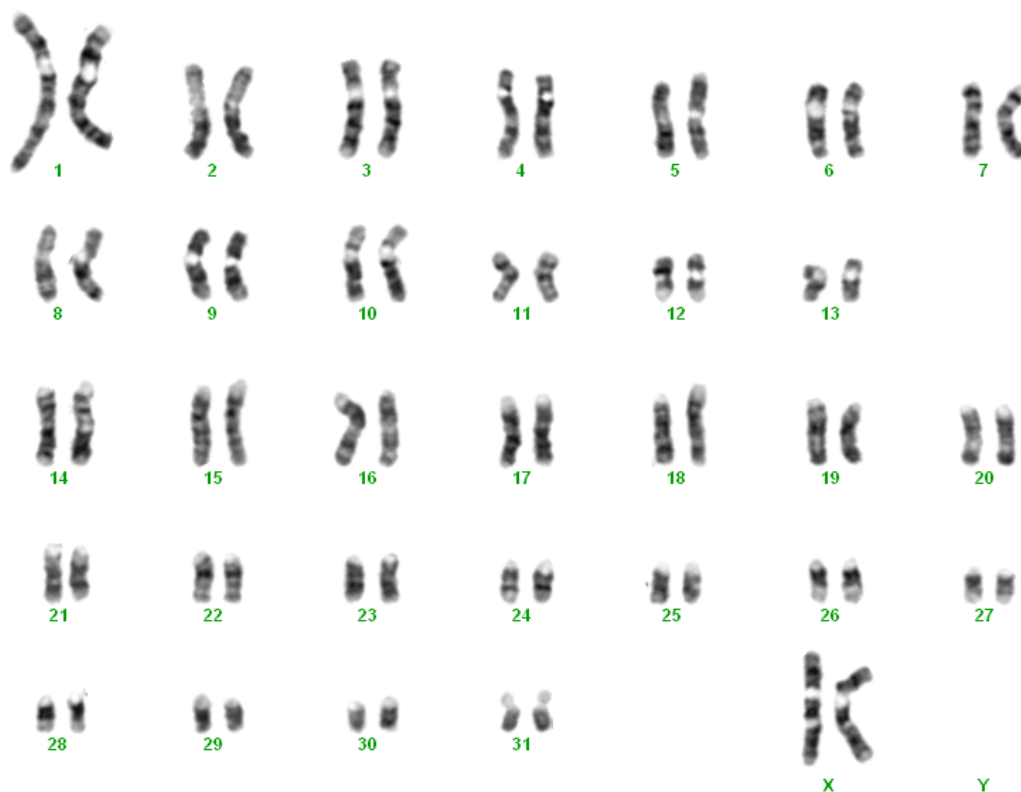
Tableau III : Caractéristiques radiographiques des membres des huit chevaux radiographiés

Cheval	Phénotype	Radiographie de la région du carpe	Radiographie de la région du métacarpe
I1	Extérieurement non polydactyle	Présence bilatérale d'un os carpal I, de taille augmentée et de forme rectangulaire. Présence de zones radio-transparentes sur les os carpal II et métacarpal II, en regard de l'articulation avec l'os carpal I	Prolongement et élargissement distaux des os métacarpiens II par rapport aux os métacarpiens IV, bilatéralement
III3	Extérieurement non polydactyle	<i>Radiographies non réalisées</i>	Élargissement distal du bouton terminal de l'os métacarpal II de l'antérieur gauche et de l'os métacarpal IV de l'antérieur droit
III12	Extérieurement non polydactyle	Aucune anomalie visible	Aucune anomalie visible
III13	Extérieurement non polydactyle	<i>Radiographies non réalisées</i>	Léger élargissement du bouton terminal des os métacarpal IV de l'antérieur droit et métacarpal II de l'antérieur gauche
II20	Extérieurement non polydactyle	<i>Radiographies non réalisées</i>	Allongement et épaississement distal de l'os métacarpal II, bilatéralement
II5	Extérieurement non polydactyle	Présence bilatérale d'un os carpal I, de forme arrondie, de taille supérieure sur l'antérieur gauche que sur l'antérieur droit. Présence de zones radio-transparentes sur les os carpal II et métacarpal II, en regard de l'articulation avec l'os carpal I	Léger élargissement du bouton terminal des os métacarpiens II et IV, bilatéralement
II1	Extérieurement non polydactyle mais radiographiquement polydactyle, unilatéralement à droite	<i>Radiographies non réalisées</i>	Élargissement distal de l'os métacarpal II du membre antérieur droit, qui s'articule avec une phalange surnuméraire de forme triangulaire
II4	Polydactylie pré-axiale bilatérale. Extérieurement, à droite : un doigt individualisé accompagné d'une production cornée / à gauche : une zone cornifiée en face médiale du boulet, sans doigt supplémentaire individualisé.	Présence d'un os carpal I bilatéral, de forme rectangulaire, allongé distalement.	Allongement et hypertrophie distale bilatérale des os métacarpiens II, qui s'articulent avec trois phalanges surnuméraires à l'antérieur droit et avec une phalange surnuméraire à l'antérieur gauche.

L'étude des radiographies a mis en évidence l'**expressivité variable de la polydactylie** chez les chevaux Barbe et croisés Barbe de la famille étudiée. Les variations concernaient le nombre de phalanges surnuméraires présentes, le développement plus ou moins important d'un os métacarpien rudimentaire, l'individualisation du doigt surnuméraire et l'existence d'une zone cornifiée. De plus, les radiographies ont permis de détecter une polydactylie unilatérale chez un individu chez qui aucun signe extérieur n'était visible. La famille étudiée comptait ainsi **neuf individus polydactyles** (huit chevaux polydactyles extérieurement et **un cheval polydactyle à l'examen radiographique**). De plus, nous avons mis en évidence que la **polydactylie pré-axiale des membres antérieurs** observée dans la famille pouvait être **bilatérale** (n = 8) ou **unilatérale** (n = 1).

### 1.3 Caryotypes

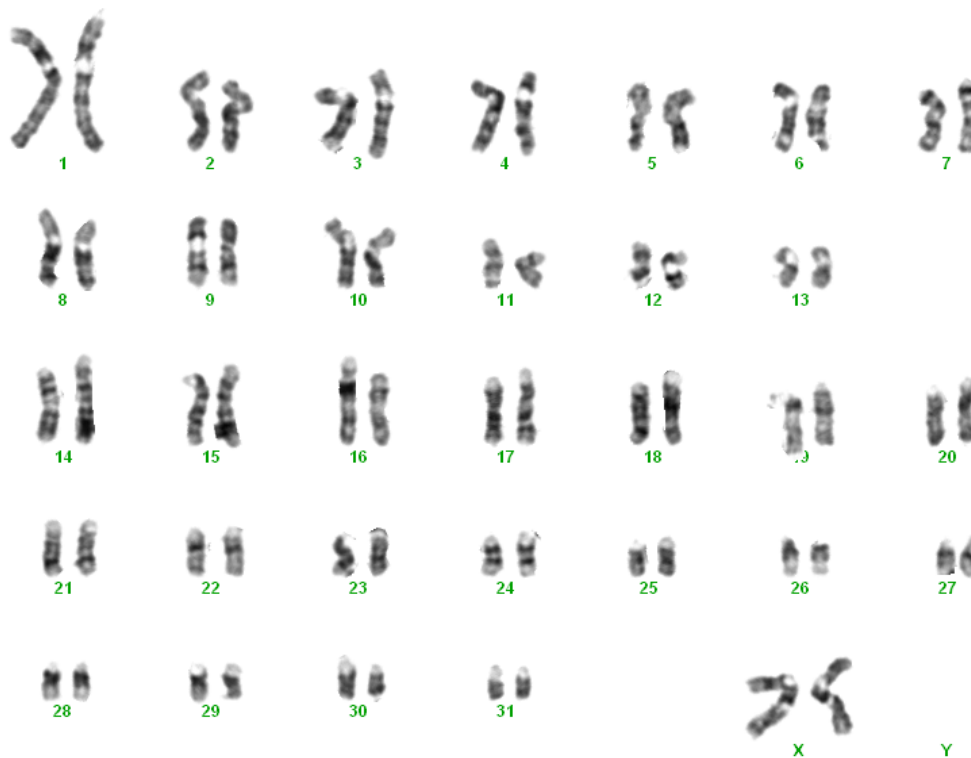
Les caryotypes de trois chevaux de la famille sont présentés dans les Figure 52 à 54. Le premier caryotype était celui d'un individu phénotypiquement non polydactyle (à l'examen clinique et sur les radiographies) et les deux seconds étaient ceux de deux individus polydactyles.



*Figure 52* : Caryotype de l'individu II13, phénotypiquement non polydactyle.  
Caryotype 64 XX.



*Figure 53* : Caryotype de l'individu II2, polydactyle  
Caryotype 64 XY

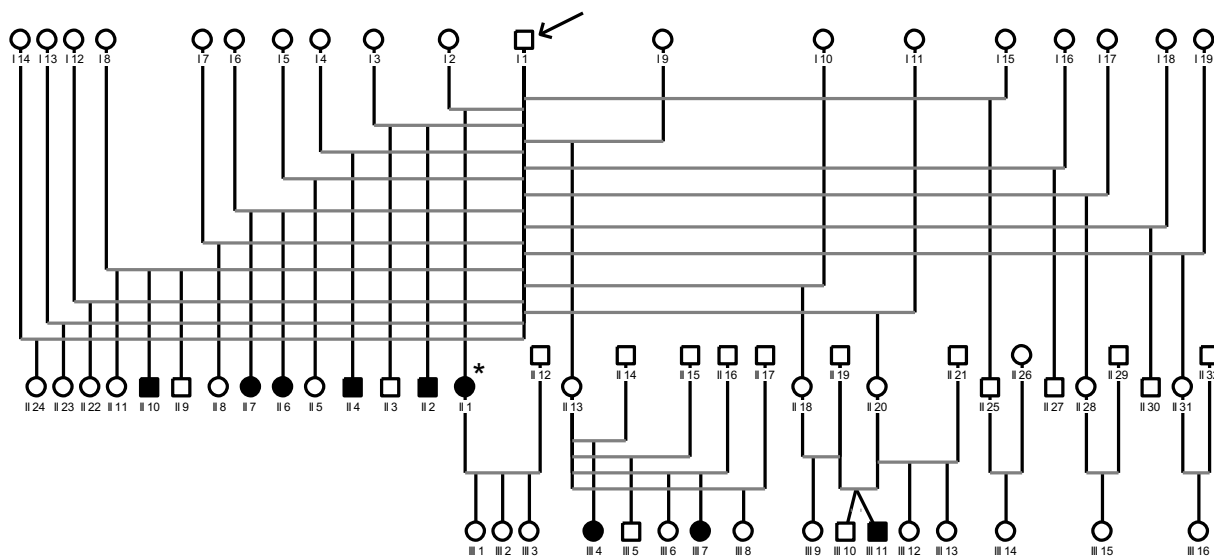


*Figure 54* : Caryotype de l'individu III4, polydactyle  
Caryotype 64 XX

Nous n'avons identifié **aucune anomalie structurale ou aneuploïdie** sur les caryotypes des deux individus polydactyles et de l'individu non polydactyle.

## 2. Une polydactylie héréditaire

L'arbre généalogique de la famille de chevaux étudiée a été réalisé (Figure 55). Les générations ont été remontées jusqu'à l'ancêtre commun aux neuf individus polydactyles : l'individu identifié I1 sur l'arbre généalogique de la figure 55.



**Figure 55 :** Arbre généalogique de 67 membres de la famille de chevaux étudiée.

Carré : individu mâle. Rond : individu femelle. En noir : individu phénotypiquement polydactyle. En blanc : individu indemne phénotypiquement. Etoile : individu dont la polydactylie a été détectée grâce à des radiographies des membres. Flèche : ancêtre commun le plus proche à tous les individus polydactyles. Les individus III10 et III11 étaient jumeaux.

L'analyse de cet arbre incluant 67 individus nous a indiqué que :

- les neuf individus polydactyles étaient issus de croisements entre deux individus phénotypiquement indemnes ;
- parmi les neuf individus polydactyles, cinq étaient des femelles et quatre étaient des mâles ;
- six individus atteints étaient des fils ou filles (II10, II7, II6, II4, II2, II1) de l'ancêtre commun I1 et trois individus (III4, III7, III11) étaient des petits-fils ou petites-filles de l'ancêtre commun I1 ;
- deux individus atteints (II6 et II7) étaient issus du même père (I1) et de la même mère (I6) ;
- deux individus atteints (III4 et III7) avaient en commun leur mère (II13) ;
- une jument polydactyle (II1) avait donné naissance à des individus phénotypiquement indemnes (III1, III2 et III3) ;
- une jument phénotypiquement indemne (II13) avait donné naissance à deux individus polydactyles (III4 et III7), issus de deux pères différents (II14 et II16).

L'étude de l'arbre généalogique suggérait fortement un mode de transmission autosomique dominant à pénétrance incomplète. Ainsi, les individus I1, II13 et II20 auraient été porteurs de la mutation mais sans exprimer phénotypiquement la polydactylie. Tous les individus polydactyles étant issus directement ou indirectement d'un unique étalon I1, il est probable que cet individu ait pu être à l'origine de la polydactylie et qu'il ait présenté une néo-mutation.

Les modes de transmission liés au sexe (dominant lié à l'X, récessif lié à l'X, lié à l'Y) ont été écartés du fait des proportions non significativement différentes de mâles et de femelles polydactyles (*Tableau IV*).

*Tableau IV* : Effectifs des descendants mâles et femelles polydactyles et non polydactyles des générations II et III de la famille étudiée

	Polydactyles	Non polydactyles	Total
Mâles	4	7	11
Femelles	5	22	27
Total	9	29	38

Un test exact de Fisher a été réalisé à partir du tableau IV. La différence entre le nombre de mâles et de femelles polydactyles n'était pas significative au risque  $\alpha = 5\%$  (*p-value* calculée = 0,40 > 0,05).

Le mode de transmission autosomique récessif a été écarté. Les six individus polydactyles de la génération II étaient issus du même père (l'étalon I1) mais de cinq mères différentes. Il était très peu probable que chacune des cinq mères, non apparentées et parfois de races différentes (Barbe, Arabe, Selle Français), ait été porteuse d'un même allèle récessif muté. Les trois individus polydactyles de la génération III étaient issus de deux filles de l'étalon I1 et de trois pères différents. Là aussi il semblait très peu probable que les trois pères, non apparentés, aient chacun été porteur d'un même allèle muté récessif.

Nous n'avons pas pu écarter un mode de transmission polygénique pour la polydactylie.

Ainsi, nous avons retenu **deux modes de transmission probables : autosomique dominant à pénétrance incomplète et polygénique.**

### 3. Des mutations candidates

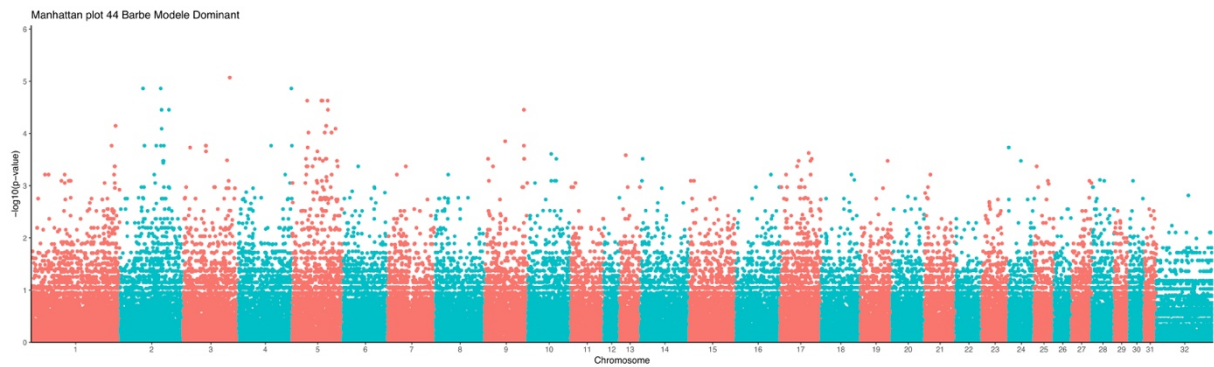
Afin de rechercher des mutations candidates pour la polydactylie du cheval Barbe, nous avons utilisé plusieurs approches en parallèle :

- une étude d'association pour cartographier le/les locus en cause ;
- une approche gène candidat à partir des données connues concernant la polydactylie chez l'Homme et les animaux (souris, chien, chat) ;
- un séquençage de génome entier.

#### 3.1 Etude d'association

Une étude d'association a été réalisée. L'objectif était de rechercher une/des région(s) candidate(s), délimitée(s) par des marqueurs associés au caractère polydactyle. Le génotypage a été réalisé grâce à la puce équine Illumina® Equine SNP70. Au total, 44 chevaux ont été génotypés, dont huit chevaux polydactyles de la famille étudiée et 36 chevaux contrôles non polydactyles (13 individus de la famille étudiée et 22 individus non apparentés). L'analyse statistique des génotypes a été réalisée avec le logiciel PLINK. Les génotypes ont été analysés en recherchant un allèle mineur identifié à l'état hétérozygote ou homozygote chez les individus atteints et à l'état homozygote pour l'allèle majeur chez les individus contrôles. PLINK utilise un test statistique du Chi2 pour comparer les génotypes des deux groupes cas et

contrôles. Les résultats ont été représentés graphiquement sous la forme d'un Manhattan plot (*Figure 56*).



**Figure 56 :** Manhattan plot de l'étude d'association

Le graphique représente en ordonnée le  $-\log_{10}$  de la p-value de l'association entre chaque marqueur SNP et le locus de la polydactylie. L'axe des abscisses indique la position de chaque marqueur sur chaque chromosome.

L'étude d'association n'a pas révélé de région candidate fortement associée au caractère polydactyle. Cependant, plusieurs régions candidates associées ont pu être repérées sur les chromosomes 1, 2, 3, 4, 5 et 9. Les positions des marqueurs les plus associés à la polydactylie sont présentées dans le tableau V.

*Tableau V* : Quarante marqueurs les plus associés à la polydactylie

<b>Chromosome</b>	<b>Marqueur</b>	<b>Position</b>	<b>p-value</b>
3	BIEC2_806926_3:101331491	101331491	8,49E-06
2	BIEC2_476611_2:45372346	45372346	1,38E-05
2	BIEC2_491396_2:78265153	78265153	1,38E-05
4	BIEC2_930381_4:106795174	106795174	1,38E-05
5	BIEC2_917569_5:71069269	71069269	2,35E-05
5	BIEC2_899194_5:29358596	29358596	2,35E-05
5	BIEC2_912102_5:59833356	59833356	2,35E-05
5	BIEC2_912106_5:59843588	59843588	2,35E-05
5	BIEC2_912592_5:61566834	61566834	2,35E-05
2	BIEC2_517124_2:79883052	79883052	3,53E-05
2	BIEC2_492057_2:80197761	80197761	3,53E-05
2	BIEC2_498711_2:93374075	93374075	3,53E-05
5	BIEC2_917777_5:71271601	71271601	3,53E-05
9	BIEC2_1105865_9:76319675	76319675	3,53E-05
1	BIEC2-85816_1:177207310	177207310	7,13E-05
5	BIEC2_915861_5:68454707	68454707	7,13E-05
5	BIEC2_915862_5:68454996	68454996	7,13E-05
2	BIEC2_492054_2:80197359	80197359	8,12E-05
5	BIEC2_926196_5:86212606	86212606	8,12E-05
5	UKUL1124_5:31953565	31953565	9,60E-05
5	UKUL1292_5:65696599	65696599	9,60E-05
5	BIEC2_921110_5:78387255	78387255	9,60E-05
5	BIEC2_968526_5:78410027	78410027	9,60E-05
9	TBIEC2_1150154_9:41723565	41723565	0,0001411
1	BIEC2_81254_1:170009442	170009442	0,0001712
2	BIEC2_477246_2:48510917	48510917	0,0001712
2	CUHNSNP00018477_2:49090124	49090124	0,0001712
2	TBIEC2_511873_2:70269319	70269319	0,0001712
2	BIEC2_516731_2:78453258	78453258	0,0001712
2	BIEC2-493897_2:84247510	84247510	0,0001712
3	BIEC2-779490_3:47684860	47684860	0,0001712
3	BIEC2_779517_3:47797384	47797384	0,0001712
3	BIEC2-779525_3:47807890	47807890	0,0001712
3	BIEC2_779548_3:47915872	47915872	0,0001712
4	BIEC2_914204_4:67128752	67128752	0,0001712
4	BIEC2_931170_4:107774641	107774641	0,0001712
9	BIEC2_1105840_9:76254733	76254733	0,0001712
3	BIEC2_812382_3:14285345	14285345	0,0001853
5	BIEC2_899404_5:30035749	30035749	0,0001853
3	BIEC2_806926_3:101331491	101331491	0,0001853

L'étude d'association n'ayant pas permis de mettre en évidence une région candidate clairement associée au caractère polydactyle, nous avons décidé de combiner nos travaux à une **étude gène candidat**. La liste de gènes candidats pour une polydactylie pré-axiale non syndromique a été établie suite à l'étude bibliographique (Tableau VI).

Tableau VI : Gènes candidats pour une polydactylie pré-axiale non syndromique

Gène	Nom	Espèce	Chromosome espèce	Chromosome équin homologue
<i>ALX4</i>	<i>Aristaless-like homebox 4</i>	Souris	Chr 2	Chr 12
		Chien	Chr 18	
<i>DISP1</i>	<i>Dispatched 1</i>	Souris	Chr 1	Chr 30
<i>ETV4</i>	<i>Ets variant 4</i>	Souris	Chr 11	Chr 11
<i>ETV5</i>	<i>Ets variant 5</i>	Souris	Chr 16	Chr 19
<i>GLI1</i>	<i>Glioma-associated oncogen 1</i>	Homme	Chr 12	Chr 6
<i>GLI3</i>	<i>Glioma-associated oncogen 3</i>	Souris	Chr 13	Chr 4
		Homme	Chr 7	
<i>HAND2</i>	<i>Heart and neural crest derivatives expressed transcript 2</i>	Souris	Chr 8	Chr 2
<i>HOXD12</i>	<i>Homeobox D12</i>	Souris	Chr 2	Chr 18
<i>LMBR1</i>	<i>Limb region 1</i>	Souris	Chr 5	Chr 4
		Homme	Chr 7	
		Chat	Chr A2	
		Poulet	Chr 2	
		Chien	Chr 16	
<i>SHH</i>	<i>Sonic hedgehog</i>	Souris	Chr 5	Chr 4
<i>TULP3</i>	<i>Tubby-like protein 3</i>	Souris	Chr 6	Chr 6

Les chromosomes homologues équins ont été obtenus grâce à la base de données Ensembl.  
Chr : chromosome.

En croisant les données des tableaux V et VI nous avons pu **retenir prioritairement les gènes candidats *GLI3*, *HAND2*, *LMBR1* et *SHH***.

### 3.2 Séquençage de génome entier

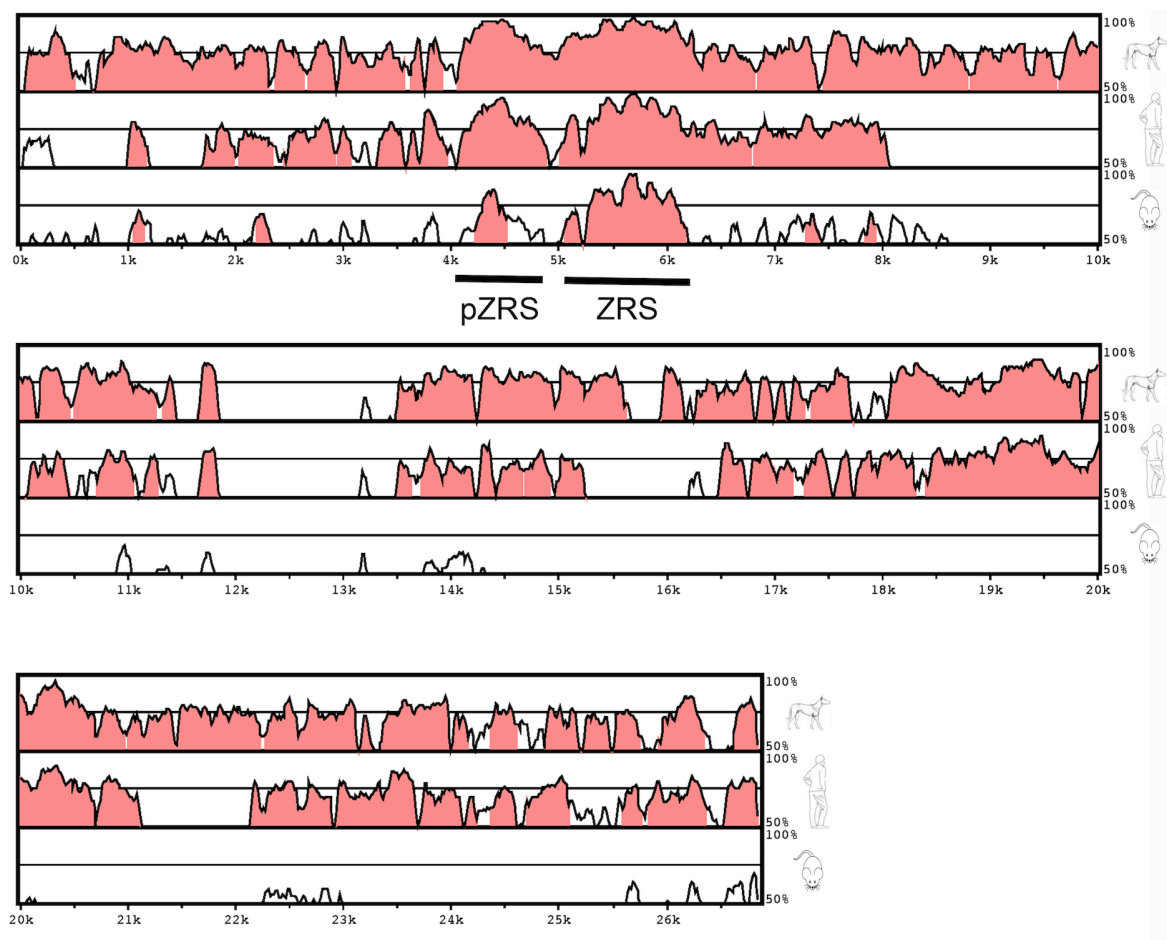
Le génome entier d'un individu polydactyle (l'individu II2) a été séquencé et nous avons recherché, par comparaison au génome équin de référence (EquCab3.0, www.ensembl.org) les variants présents à l'état hétérozygote chez l'individu II2 au sein des gènes candidats identifiés (Tableau VI). Nous avons restreint notre recherche aux variants présents dans les séquences codantes (exons) et les sites d'épissage pour tous les gènes candidats du tableau VI, hormis *LMBR1* dont la candidature reposait sur la présence au sein de son intron 5 des

deux séquences régulatrices de *SHH* appelée ZRS et pZRS. Pour *LMBR1* nous avons effectué une recherche spécifique des séquences ZRS et pZRS (voir partie 3.3 juste après).

Nous avons identifié **un unique variant candidat dans l'exon 11 du gène *GLI1***, en position génomique 75994946 sur le chromosome 6, et présent à l'état hétérozygote chez le cheval polydactyle séquencé. Il s'agissait d'un SNP faux-sens C>T, appelé dans la nomenclature internationale *GLI1:c.1528C>T* ou *6:g.75994946C>T* et référencé dans la base de données Ensembl sous le nom rs68704537 ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)).

### 3.3 Recherche des régions ZRS et pZRS dans *LMBR1* chez le cheval

La candidature du gène *LMBR1* reposant sur la présence au sein de son intron 5 des deux séquences régulatrices ZRS et pZRS de *SHH*, nous avons recherché si les régions ZRS et pZRS existaient chez le cheval. Ces deux régions ont été recherchées par alignement de l'intron 5 de *LMBR1* contenant les séquences ZRS et pZRS connues de l'Homme, de la souris et du chien, avec la séquence de l'intron 5 du gène *LMBR1* équin (*Figure 57*).



**Figure 57 :** Recherche des régions ZRS et pZRS équines par comparaison de la séquence de l'intron 5 de *LMBR1* dans différentes espèces

Recherche des séquences hautement conservées entre le cheval (utilisé comme référence), le chien (en haut), l'Homme (au milieu) et la souris (en bas) de l'intron 5 de *LMBR1*, analysées avec VISTA (<http://genome.lbl.gov/vista>). Les régions présentant plus de 50 % d'homologie entre le cheval et l'une des trois autres espèces, analysées avec une fenêtre de 100 paires de bases, apparaissent sur le graphique. Les séquences avec une homologie supérieure à 70 % sont colorées en rose. ZRS et pZRS apparaissent comme des séquences conservées entre le cheval, le chien, l'Homme et la souris.

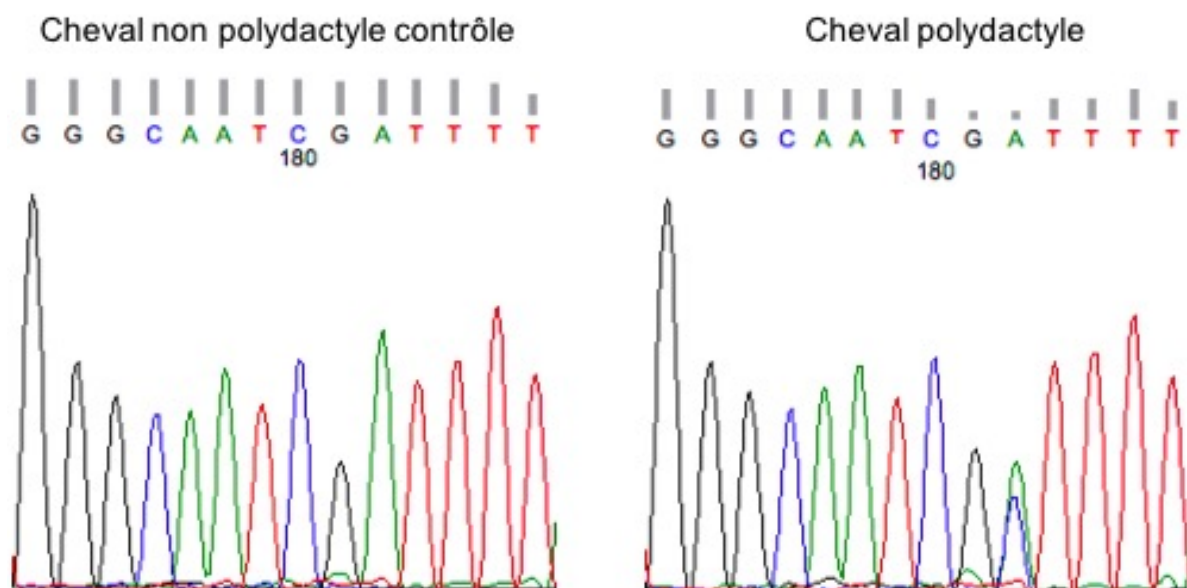
La comparaison des séquences de l'intron 5 de *LMBR1* entre le cheval et l'Homme, le chien et la souris nous a permis de mettre en évidence **deux régions hautement conservées correspondant à ZRS et pZRS dans la séquence équine.**

#### i. Séquençage de ZRS équin

Une fois la séquence ZRS équine identifiée, nous l'avons amplifiée par PCR puis séquencée chez quatre chevaux (deux chevaux polydactyles et deux chevaux contrôles indemnes). Aucune variation de la séquence dans ZRS n'a été identifiée entre les quatre individus comparés entre eux et comparés à la séquence du génome équin de référence (EquCab3.0, [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)).

#### ii. Séquençage de pZRS équin

La séquence pZRS a également été amplifiée par PCR et séquencée chez quatre chevaux (deux chevaux polydactyles et deux chevaux contrôles indemnes). L'alignement des quatre séquences obtenues entre elles et avec la séquence du génome équin de référence a permis d'identifier un SNP A>C situé en position 443 dans pZRS. Les deux individus polydactyles étaient hétérozygotes A/C, les deux individus contrôles étaient homozygote A/A et la séquence de référence du génome équin était un A à cette position (*Figure 58*).



**Figure 58 :** Chromatogrammes de séquençage montrant un SNP A>C dans la séquence pZRS

Le cheval contrôle non polydactyle (individu I3) possède un seul pic vert en position 182 correspondant à un génotype A/A alors que le cheval polydactyle (individu II2) possède deux pics superposés vert et bleu en position 182 correspondant à un génotype A/C.

Ce SNP a aussi été retrouvé dans le séquençage du génome entier de l'individu II2 qui était hétérozygote A/C.

Le séquençage de ZRS et pZRS chez des chevaux polydactyles et non polydactyles contrôles a permis de mettre en évidence **un variant candidat de type SNP A>C en position 443 dans pZRS.**

### 3.4 Variants candidats retenus

Nous avons donc identifié **deux variants candidats pour la polydactylie chez le cheval Barbe** :

- le SNP rs68704537 du gène *GLI1* ;
- le SNP A>C dans la séquence pZRS.

Nous avons poursuivi nos investigations concernant ces deux variants afin de tester la corrélation génotype-phénotype et d'analyser l'impact fonctionnel potentiel de ces deux variants.

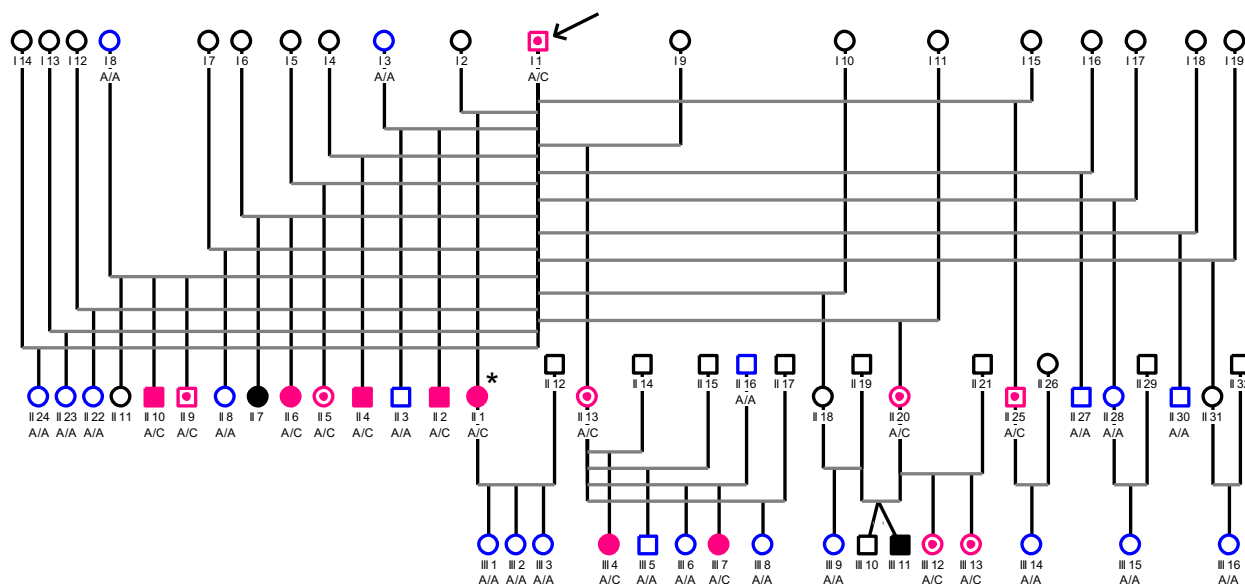
### 3.5 Validation des variants candidats : corrélation génotype-phénotype et étude fonctionnelle

#### i. Génotypage de la famille étudiée pour le variant de pZRS

Nous avons génotypé pour le variant A>C de pZRS les autres chevaux de la famille Barbe et croisés Barbe, pour lesquels nous disposons d'ADN (n = 36, *Tableau VII, Figure 59*).

*Tableau VII* : Résultats du génotypage des chevaux polydactyles et non polydactyles de la famille étudiée pour le variant A>C de pZRS

	<i>A/A</i>	<i>A/C</i>	<i>C/C</i>	Total
Polydactyle	0	7	0	7
Non polydactyle	21	8	0	29
Total	21	15	0	36



*Figure 59* : Arbre généalogique de la famille étudiée complété avec les résultats du génotypage de 36 individus pour le SNP A>C de pZRS

Les individus représentés en noir sont ceux qui n'ont pas été génotypés, faute d'ADN disponible. Les génotypes sont indiqués sous les identifiants. Les individus représentés en bleu sont homozygotes *A/A* pour le SNP de pZRS. Les individus représentés en rose sont hétérozygotes *A/C*. Carré : individu mâle. Rond : individu femelle. Figure pleine : individu hétérozygote *A/C* et polydactyle. Figure avec un point central : individu hétérozygote *A/C* et non polydactyle.

Au total nous avons pu génotyper 36 chevaux de la famille pour lesquels un prélèvement ADN nous avait été envoyé.

**Les sept chevaux polydactyles génotypés étaient tous hétérozygotes A/C.** Pour deux chevaux polydactyles nous ne disposons pas d'ADN (les individus II7 et III11).

**Les chevaux non polydactyles étaient soit homozygotes A/A (n = 21), soit hétérozygotes A/C (n = 8).**

## ii. Génotypage d'une large cohorte de chevaux pour le variant de pZRS

Nous avons ensuite génotypé une large cohorte constituée de 344 chevaux et poneys de différentes races pour le SNP A>C de pZRS (*Tableau VIII*).

*Tableau VIII* : Résultats du génotypage du SNP A>C de pZRS chez 344 chevaux et poneys

Race	Nombre	A/A	A/C	C/C
Barbe contrôle	58	100 %	0 %	0 %
Arabe-Barbe	17	100 %	0 %	0 %
Pur-sang Arabe	48	100 %	0 %	0 %
Camargue	11	100 %	0 %	0 %
Lippizan	3	100 %	0 %	0 %
Frison	11	100 %	0 %	0 %
Akhal Teke	3	100 %	0 %	0 %
Demi-sang Arabe	51	100 %	0 %	0 %
Selle Français	48	100 %	0 %	0 %
Islandais	5	100 %	0 %	0 %
Pottock	8	100 %	0 %	0 %
Shetland	7	100 %	0 %	0 %
Connemara	10	100 %	0 %	0 %
Haflinger	7	100 %	0 %	0 %
Poney français de selle	9	100 %	0 %	0 %
Pur-sang	48	100 %	0 %	0 %
<b>Total</b>	<b>344</b>	<b>100 %</b>	<b>0 %</b>	<b>0 %</b>

**Tous les 344 chevaux et poneys contrôles génotypés étaient homozygotes A/A pour le SNP de pZRS.** Aucun ne présentait l'allèle C identifié chez les individus polydactyles de la famille étudiée.

Nous avons alors évalué la **corrélation génotype phénotype** pour le SNP A>C de pZRS. Elle **n'était pas parfaite** (*Tableau IX*).

Tableau IX : Corrélation génotype-phénotype de 380 chevaux pour le variant de pZRS

	A/A	A/C	C/C	Total	Corrélation génotype-phénotype
Polydactyle de la famille	0	7	0	7	Parfaite
Non polydactyle diverses races	344	0	0	344	Parfaite
Non polydactyle de la famille	21	8	0	29	Imparfaite
Total	365	15	0	380	

Grâce aux données du tableau IX, nous avons pu évaluer la pénétrance du variant A>C de pZRS dans la famille étudiée à 7/15 soit 47 %.

### iii. Impact fonctionnel potentiel du variant de pZRS

Le variant de pZRS siégeait dans une séquence fonctionnelle conservée (Figure 57) mais non codante. Il a donc été impossible d'étudier son impact fonctionnel à partir des outils de prédiction de l'impact des SNP codants usuels. Nous avons donc effectué un alignement des séquences de pZRS chez différentes espèces, pour étudier la conservation du nucléotide impacté par le variant (Figure 60).

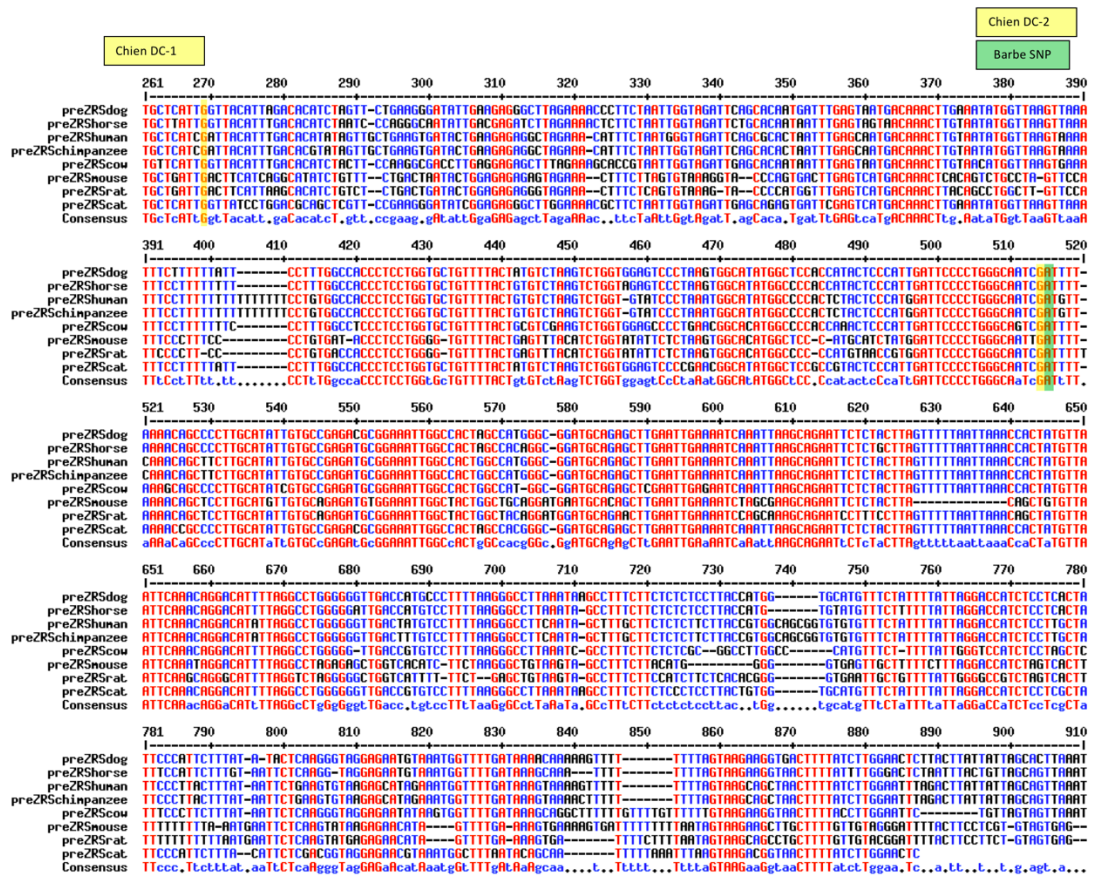


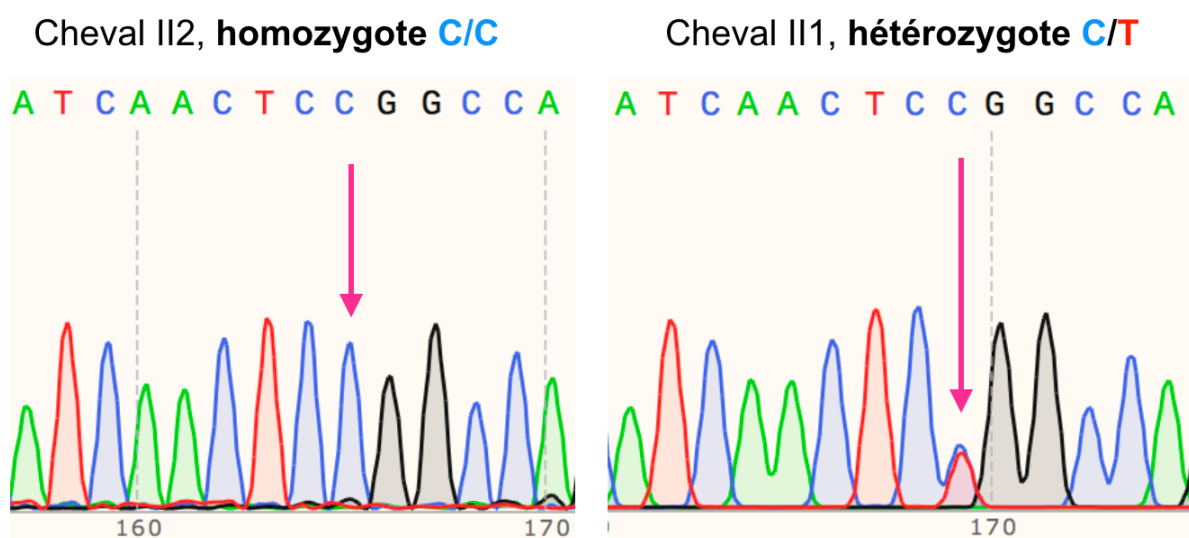
Figure 60 : Alignement des séquences de pZRS de différentes espèces

Alignement des séquences de pZRS du chien (preZRSdog), du cheval (preZRShorse), de l'homme (preZRShuman), du chimpanzé (preZRSchimpanzee), de la vache (preZRScow), de la souris (preZRSmouse), du rat (preZRSrat) et du chat (preZRScat), montrant la haute conservation de la séquence pZRS entre ces différentes espèces. Les nucléotides 100 % conservés sont indiqués en rouge. Les nucléotides non conservés sont indiqués en noir ou bleu. Les tirets indiquent les délétions. La séquence consensus est présentée. Les positions des mutations DC-1 et DC-2 du chien ont été annotées en orange (position 269 et 514 respectivement). La position du SNP A>C du cheval Barbe a été représentée en vert (en position 515 sur l'alignement).

L'alignement des séquences de pZRS de différentes espèces a montré la **conservation du nucléotide A impacté par le variant A>C identifié chez nos chevaux Barbe polydactyles**. Aucune séquence alignée ne présentait l'allèle C. De plus, le variant touchait une position adjacente à celle identifiée chez des chiens polydactyles.

#### iv. Génotypage de la famille étudiée pour le variant de *GLI1*

Nous avons génotypé, pour le variant rs68704537 de *GLI1*, 31 chevaux de la famille Barbe et croisés Barbe pour lesquels nous disposions d'ADN (*Tableau X, Figures 61 et 62*).

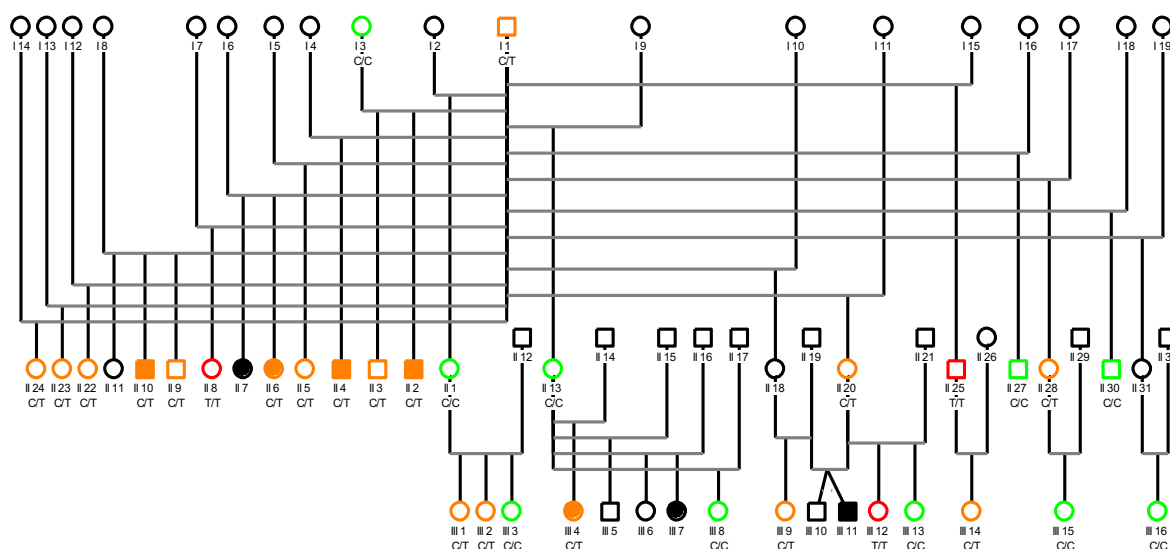


**Figure 61 :** Chromatogrammes de séquence montrant un SNP C>T dans la séquence de *GLI1*. Le cheval II2 possède un seul pic bleu en position 165 correspondant à un génotype homozygote C/C. Le cheval II1 possède deux pics superposés bleu et rouge en position 169 correspondant à un génotype hétérozygote C/T. La position du SNP diffère légèrement entre chaque individu. Cela est lié à la position du début du séquençage.

**Tableau X :** Résultats du génotypage des chevaux polydactyles et non polydactyles de la famille étudiée pour le variant rs68704537 de *GLI1*

	C/C	C/T	T/T	Total
Polydactyle	1	5	0	6
Non polydactyle	9	13	3	25
Total	10	18	3	31

Grâce aux données du tableau X, nous avons pu évaluer la pénétrance du SNP rs68704537 de *GLI1* dans la famille étudiée. Elle était égale à 5/21 soit 24%.



**Figure 62 :** Arbre généalogique de la famille étudiée complété avec les résultats du génotypage de 31 individus pour le variant rs68704537 de *GLI1*

Les individus représentés en noir sont ceux qui n'ont pas été génotypés, faute d'ADN disponible. Les génotypes sont indiqués sous les identifiants. Les individus représentés en vert sont homozygotes *C/C* pour le SNP de *GLI1*. Les individus représentés en orange sont hétérozygotes *C/T*. Les individus représentés en rouge sont homozygotes *T/T*. Carré : individu mâle. Rond : individu femelle. Figure pleine : individu polydactyle.

Au total nous avons pu génotyper 31 chevaux de la famille pour le variant de *GLI1*, dont six chevaux polydactyles et 25 chevaux non polydactyles.

Les **six chevaux polydactyles** génotypés étaient soit **homozygotes *C/C*** (n=1) soit **hétérozygotes *C/T*** (n=5). Pour deux chevaux polydactyles nous ne disposions pas d'ADN (II7 et III11) et pour un cheval polydactyle (III7) le séquençage n'a pas permis de déterminer son génotype.

Les **chevaux non polydactyles** étaient soit **homozygotes *C/C*** (n = 9), soit **hétérozygotes *C/T*** (n = 13), soit **homozygotes *T/T*** (n=3).

#### v. Génotypage d'une large cohorte pour le variant de *GLI1*

Nous avons ensuite génotypé une cohorte de chevaux de race Barbe et Arabe-Barbe contrôles non polydactyles, pour le variant rs68704537 de *GLI1* (*Tableau XI*).

**Tableau XI :** Résultats du génotypage du variant rs68704537 de *GLI1* chez 69 chevaux de race Barbe et Arabe-Barbe

	<i>C/C</i>	<i>C/T</i>	<i>T/T</i>	Total
Arabe-Barbe	3	4	0	9
Barbe	34	23	3	60
Total	<b>39</b>	<b>27</b>	<b>3</b>	<b>69</b>

Les 69 chevaux génotypés pour le variant de *GLI1* étaient soit **homozygotes *C/C*** (n=39), soit **hétérozygotes *C/T*** (n=27), soit **homozygotes *T/T*** (n=3).

Pour rappel, ces chevaux étaient tous **homozygotes *A/A*** pour le SNP de *pZRS*.

Grâce aux données du tableau XI, nous avons pu déterminer la fréquence de l'allèle T du variant rs68704537 de *GLI1* dans notre cohorte de chevaux contrôles non polydactyles. Elle était égale à 29%.

Nous avons évalué la **corrélation génotype-phénotype** pour le variant rs68704537 de *GLI1*. Elle n'était pas parfaite (Tableau XII).

**Tableau XII :** Corrélation génotype-phénotype chez 100 chevaux, pour le variant rs68704537 de *GLI1*

	C/C	C/T	T/T	Total	Corrélation génotype-phénotype
Polydactyle de la famille	1	5	0	6	Imparfaite
Non polydactyle de races Barbe et Arabe-Barbe	39	27	3	69	Imparfaite
Non polydactyle de la famille	9	13	3	25	Imparfaite
<b>Total</b>	<b>49</b>	<b>45</b>	<b>6</b>	<b>100</b>	

#### vi. Prédiction de l'effet du variant de *GLI1*

L'impact fonctionnel du variant rs68704537 identifié dans *GLI1* a pu être évalué *in silico*, grâce à l'outil PROVEAN (*Protein Variation Effect Analyzer*). Il était prédit sans effet délétère (Figure 63).

The screenshot shows the PROVEAN web interface. The main content area displays the 'PROVEAN Result (Download)' for Job ID: 1041489466026730. The prediction for variant R510W is 'Neutral' with a score of -2.271. The interface includes a navigation menu on the left and a status bar at the bottom indicating the job was completed on Thursday, Jan 6, 2022.

Variant	PROVEAN score	Prediction (cutoff= -2.5)
R510W	-2.271	Neutral

**Figure 63 :** Prédiction de l'effet du variant rs68704537 de *GLI1*, copie d'écran du résultat de PROVEAN

PROVEAN prédisait un effet neutre (score = -2,271 > seuil de -2,5 du variant génomique rs68704537 (également appelé *GLI1:c.1528C>T*) engendrant un changement d'acide aminé arginine vers tryptophane en position 510 dans la protéine *GLI1* équine (variant protéique appelé R510W).

Enfin, la recherche d'informations sur le variant rs68704537 dans la base de données Ensembl nous a permis d'identifier qu'un autre outil de prédiction de l'effet des SNP codants, appelé SIFT (*Sorting Intolerant From Tolerant*), prédisait un effet délétère pour ce variant (Figure 64).

**rs68704537** SNP

Most severe consequence: missense variant | See all predicted consequences

Alleles: C/T | Highest population MAF: 0.92

Change tolerance: GERP: 1.66

Location: Primary\_assembly 6:75994946 (forward strand) | VCF: 6 75994946 rs68704537 C T

Evidence status: [Icons]

HGVS names: This variant has 5 HGVS names - Hide [x]

- NC\_009149.3:g.75994946C>T
- ENSECAT00000011718.2:c.1528C>T
- ENSECAP00000009169.2:p.Arg510Trp
- ENSECAT00000044885.2:c.1405C>T
- ENSECAP000000037006.2:p.Arg469Trp

Original source: Variants (including SNPs and indels) imported from dbSNP [remapped to EquCab3.0] (release 151)

About this variant: This variant overlaps 4 transcripts and has 7 sample genotypes.

**Genes and regulation**

Gene and Transcript consequences

Gene	Transcript (strand)	Allele (Tr. allele)	Consequence Type	Position in transcript	Position in CDS	Position in protein	AA	Codons	SIFT	Detail
ENSECAG00000011246	ENSECAT00000011718.2 (+)	T (T)	missense variant	1606 (out of 3598)	1528 (out of 3321)	510 (out of 1106)	R/W	CGG/TGG	0.01	Hide

**Figure 64 :** Prédiction de l'effet du variant rs68704537 de *GLI1*, copie d'écran de la base de données Ensembl

L'outil SIFT (flèche) intégré à la base de données Ensembl ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) prédisait un effet délétère (score 0,01 < seuil de 0,05) du variant génomique rs68704537 (également appelé *GLI1:c.1528C>T*) engendrant un changement d'acide aminé arginine vers tryptophane en position 510 dans la protéine *GLI1* équine (variant protéique appelé *R510W*).

Les deux outils de prédiction de l'effet des SNP codants prédisaient un **effet opposé** du variant rs68704537 de *GLI1*.

#### vii. Vérification statistique de l'implication des deux variants retenus

Afin d'évaluer la corrélation entre la présence respective des allèles C et T des SNP de pZRS et de *GLI1* et la polydactylie, nous avons réalisé une analyse statistique (*Tableaux XIII et XIV*).

**Tableau XIII :** Effectifs des individus polydactyles et non polydactyles de la famille étudiée et de la cohorte de chevaux génotypés pour l'allèle C du SNP de pZRS

	Polydactyles	Non polydactyles	Total
<b>Présence de l'allèle C*</b>	7	8	15
<b>Absence de l'allèle C**</b>	0	365	365
<b>Total</b>	7	373	380

\*individus hétérozygotes A/C et homozygotes C/C

\*\* individus homozygotes A/A

Un test exact de Fisher a été réalisé à partir des données du *Tableau XIII*. La *p-value* calculée (*p-value* < 0,0001) était inférieure au seuil de signification  $\alpha=0,05$ . La déviation était statistiquement significative. Nous avons rejeté l'hypothèse d'indépendance entre la présence de l'allèle C et le phénotype polydactyle.

Tableau XIV : Effectifs des individus polydactyles et non polydactyles de la famille étudiée et de la cohorte de chevaux génotypés pour l'allèle T du SNP rs68704537 de *GLI1*

	<b>Polydactyles</b>	<b>Non polydactyles</b>	<b>Total</b>
<b>Présence de l'allèle T*</b>	5	46	51
<b>Absence de l'allèle T**</b>	1	48	49
<b>Total</b>	6	94	100

\*individus hétérozygotes C/T ou homozygotes T/T

\*\*individus homozygotes C/C

Un test exact de Fisher a été réalisé à partir des données du *Tableau XIV*. La *p-value* calculée était supérieure au seuil de signification  $\alpha=5\%$  (*p-value* = 0,205). La déviation n'était pas statistiquement significative. Nous n'avons donc pas pu rejeter l'hypothèse d'indépendance entre la présence de l'allèle T et le phénotype polydactyle.



## IV. Discussion

### 1. Biais et limites de l'étude

#### 1.1 Recrutement des animaux

Le recrutement des chevaux inclus dans l'étude a eu pour point de départ l'individu polydactyle I14, présenté en 2005 en consultation de chirurgie équine à l'EnvA. D'autres poulains polydactyles nés dans le même élevage, étaient des produits du même père : l'étalon I1. Une collaboration avait alors été mise en place avec l'éleveur afin de répertorier les descendants de cet étalon. Le recrutement de l'ensemble des produits a été impossible du fait :

- du très grand nombre de descendants, dont beaucoup avaient été vendus à l'étranger (notamment en Allemagne ou aux Pays-Bas) ;
- de la naissance à l'étranger des descendants, qui n'ont pas été répertoriés dans la base française de l'IFCE (Institut Français du Cheval et de l'Equitation) appelée le SIRE (Système d'Information Relatif aux Equidés) ;
- des contraintes de confidentialité nous empêchant d'avoir accès aux coordonnées des propriétaires des produits de l'étalon.

De plus, le pedigree de certains individus non répertoriés dans la base de données SIRE a été obtenu sur une base purement déclarative de la part de l'éleveur ou des propriétaires et n'a pas pu être vérifié.

L'étalon I1 avait été acheté au Maroc. Nous n'avons pas d'information sur le statut de ses ascendants, ni de ses collatéraux, vis-à-vis de la polydactylie, ni sur son propre statut avant son achat. La possibilité qu'il soit né polydactyle et qu'il ait été opéré n'a pas pu être exclue.

#### 1.2 Difficultés d'exploitation des clichés radiographiques

De nombreux éléments ont rendu difficile l'exploitation des clichés radiographiques. En effet, le cadrage du cliché a pu se révéler inadéquate pour l'évaluation des structures qui nous intéressaient. Par exemple, un centrage sur la région du boulet ne permettait pas d'évaluer les os métacarpiens rudimentaires sur toute leur longueur, mais seulement sur leurs extrémités distales.

Pour chaque cheval radiographié, nous ne disposions pas des mêmes incidences ni des mêmes régions radiographiées, ce qui a rendu difficile la comparaison des images entre individus. En effet les carpes n'ont été étudiés de manière bilatérale que pour deux chevaux et un seul carpe nous a été communiqué pour un poulain. Pour trois chevaux, nous disposions uniquement des radiographies de face des boulets.

Le contraste de l'image n'était pas modifiable grâce à un logiciel de radiographie car les images nous ont été transmises en format pdf.

Il est important de noter que suivant de subtiles différences d'angle de prise de vue et de position du membre, les structures visualisées sont différentes. Ainsi, les deux os métacarpiens rudimentaires n'ont pas été visualisables ni examinables pour chaque membre de chaque cheval. L'interprétation radiographique du carpe a été rendue difficile par la superposition des os le constituant et par les nombreuses variations anatomiques possibles de cette région. Tous ces éléments étaient des sources d'erreurs d'appréciation et d'interprétation des radiographies.

## 2. Phénotype de la polydactylie

### 2.1 Palpation des membres

La palpation des membres était un critère intéressant pour détecter une possible malformation. Cependant ce critère était assez subjectif, surtout quand cette palpation avait été réalisée par les propriétaires des chevaux et non par un vétérinaire. De plus, cette étape avait été réalisée par des personnes différentes pour chaque cheval. Ce critère d'évaluation n'était donc pas reproductible.

### 2.2 L'apport des clichés radiographiques

La réalisation et l'étude des clichés radiographiques a été un élément majeur de l'étude, à la fois pour la détection de polydactylie, mais aussi pour sa caractérisation anatomique. En effet, la polydactylie de l'individu II1 a été détectée grâce aux radiographies uniquement.

**A la suite de notre étude, nous avons pu lister les clichés les plus pertinents qu'il faudrait réaliser pour le dépistage radiographique et/ou la caractérisation anatomique d'une polydactylie pré-axiale équine :**

- des incidences dorso-médiales palmaro(plantaro)-latérales obliques des métacarpes, afin de dégager les os métacarpiens rudimentaires médiaux. Des incidences plus basses centrées sur le boulet peuvent être nécessaires si les phalanges surnuméraires se prolongent plus distalement ;
- des incidences dorso-médiales palmaro-latérales obliques des carpes, afin de dégager l'origine de l'os métacarpien rudimentaire médial, d'évaluer des anomalies osseuses possiblement associées comme la déformation des os radial du carpe et de l'os carpal II, et de détecter la présence d'un os carpal I ;
- des incidences dorso-palmaires(plantaires) des métacarpes et/ou des boulets, afin de détecter des déviations angulaires en varus ou en valgus possiblement associées.

### 2.3 Expressivité variable de la polydactylie

i. Une polydactylie pré-axiale unilatérale ou bilatérale touchant les membres antérieurs

La polydactylie touchant la famille étudiée présentait des caractéristiques phénotypiques différentes selon les individus. Cela a mis en évidence l'expressivité **phénotypique** variable de la polydactylie, **inter et intra-individus**. Il s'agissait dans tous les cas d'une polydactylie pré-axiale qui touchait uniquement les membres antérieurs. Les éléments qui différaient étaient les suivants : l'unilatéralité ou la bilatéralité, la présence d'un doigt individualisé extérieurement et la présence d'une production cornée associée. Par exemple, les individus III4 et III7 présentaient chacun deux doigts individualisés prolongés par une production cornée, alors que les individus II4 et III11 présentaient un doigt individualisé prolongé par une production cornée sur un membre et seulement une petite zone cornifiée sur le membre opposé, sans doigt individualisé. L'individu II1, le seul polydactyle unilatéralement, ne présentait pas de doigt individualisé ni de zone cornifiée.

## ii. Les anomalies osseuses détectées

L'étude des clichés radiographiques chez les individus polydactyles a mis en évidence la variabilité **inter et intra-individus** des **anomalies osseuses**. Les variations concernaient le nombre de phalanges surnuméraires et le développement plus ou moins important d'un os métacarpien rudimentaire. Par exemple, le poulain I14 présentait un nombre de phalanges surnuméraires différent sur chacun des membres antérieurs et la jument I11 possédait une phalange surnuméraire unilatéralement. Il est cependant utile de noter que la qualité du cliché radiographique du membre antérieur gauche de cette dernière ne permettait pas une bonne analyse des structures osseuses présentes.

Certaines anomalies osseuses décrites dans la littérature, telles que la présence d'os métacarpiens rudimentaires supplémentaires, l'hypertrophie de l'os radial du carpe ou une forme inhabituelle de cet os, n'ont pas été retrouvées sur nos clichés radiographiques (Barber, 1990; Colbourne *et al.*, 1991; Gray *et al.*, 2019; Novales Durán *et al.*, 2013).

Chez les individus polydactyles, nous avons constaté un allongement distal de l'os métacarpien II qui s'articulait avec les phalanges surnuméraires. Cela a également été décrit dans d'autres polydactylie équine (Gray *et al.*, 2019; Stanek et Hantak, 1986).

Nous avons constaté chez cinq des chevaux polydactyles et non polydactyles radiographiés la présence d'un allongement et/ou d'un élargissement distal de l'os métacarpien rudimentaire médial et/ou latéral. Cela pourrait être relié à une forme de polydactylie fruste (expression très faible du phénotype). Cette hypothèse était peu probable, car cette conformation a été retrouvée de manière aléatoire entre la face médiale et la face latérale pour chaque membre. Par exemple l'individu I13 présentait un élargissement du métacarpien rudimentaire médial sur le membre antérieur gauche et un élargissement du métacarpien rudimentaire latéral sur le membre antérieur droit. De plus, ces épaissements pourraient être secondaires à un traumatisme ou à une fracture ancienne.

Chez le poulain polydactyle I14, nous n'avons pas détecté d'os sésamoïdiens surnuméraires, comme cela a été rapporté pour certaines polydactylies (Colbourne *et al.*, 1991; Gray *et al.*, 2019; Novales Durán *et al.*, 2013; Sepúlveda *et al.*, 2011; Stanek et Hantak, 1986). Pour la jument I11, la qualité des clichés radiographiques n'a pas permis d'évaluer la présence d'os sésamoïdiens surnuméraires.

### 2.4 La présence de l'os carpal I

Les trois chevaux pour lesquels nous disposions de radiographies du carpe possédaient un os carpal I présent bilatéralement. L'os carpal I du cheval I1 non polydactyle présentait une taille augmentée et une forme rectangulaire inhabituelle. L'os carpal I du membre antérieur gauche du poulain I14 polydactyle présentait les mêmes caractéristiques. Ceux de la jument I15 non polydactyle étaient comparativement plus petits et de forme plus arrondie. Notons que ces trois chevaux étaient hétérozygotes A/C pour le SNP de pZRS étudié.

La présence d'un os carpal I chez des individus polydactyles a été rapportée par différents auteurs (Barber, 1990; Colbourne *et al.*, 1991; Gray *et al.*, 2019; Novales Durán *et al.*, 2013). De plus, Colbourne *et al.*, (1991) et Novales Durán *et al.*, (2013) avaient constaté une taille augmentée de cet os. Il a été montré que l'os carpal I était présent chez environ 30% des chevaux et de manière bilatérale dans 20 à 25% des cas. La présence de cet os n'était pas associée au sexe mais aurait été plus fréquente chez les chevaux croisés pur-sang (Losonsky *et al.*, 1988; Simon et Dyson, 2010). Sa taille était très variable. Simon et Dyson, en 2010, ont rapporté une moyenne de 9,7 mm avec une étendue allant de 2,3 à 20,2 mm. Une étude

comparant les variations morphologiques des os du carpe a montré que l'os carpal I était de taille significativement plus grande chez les poneys que chez les chevaux de race pur-sang (Abdunnabi *et al.*, 2011). Nous n'avons pas pu mesurer la taille de cet os sur nos clichés radiographiques car nous n'avions pas d'échelle de taille accompagnant les clichés. Afin d'étudier la corrélation entre la présence de l'os carpal I, sa forme et sa taille avec le caractère polydactyle, il aurait été intéressant de réaliser des clichés radiographiques des carpes des autres individus de la famille étudiée.

Les zones radiotransparentes au sein de l'os carpal II et de l'os métacarpal II visibles sur les radiographies des chevaux non polydactyles I1 et II5 ont été décrites comme normales et significativement associées à la présence de l'os carpal I. Notons que la présence de l'os carpal I et des zones radio-transparentes sur les os adjacents n'a pas été associée à des boiteries dans l'étude de Simon et Dyson publiée en 2010 (Simon et Dyson, 2010).

### 3. Mode de transmission de la polydactylie et origine

L'analyse de l'arbre généalogique suggérait deux modes de transmission possibles pour la polydactylie observée dans notre famille : polygénique ou **autosomique dominant à pénétrance incomplète**. Ce dernier mode était le plus probable compte tenu de la transmission de la polydactylie dans la famille et il était cohérent avec le mode de transmission autosomique dominant à pénétrance parfois incomplète rapporté dans la littérature scientifique pour la polydactylie de l'homme, de la souris, du chat et du chien (voir première partie ; <https://www.omim.org>, <http://www.informatics.jax.org>, <https://omia.org>).

Sous l'hypothèse d'une transmission autosomique dominante à pénétrance incomplète, l'individu I1, ancêtre commun à tous les individus polydactyles de la famille, aurait :

- soit présenté une néo-mutation qu'il aurait ensuite transmise à sa descendance ;
- soit hérité d'une néo-mutation apparue chez un de ses ascendants, et l'aurait ensuite transmise à sa descendance.

### 4. Identification de deux variants candidats dans pZRS et *GLI1*

La combinaison de trois stratégies de recherche de mutations (l'approche gène candidat, l'étude d'association et le séquençage du génome entier) nous a permis d'identifier deux variants candidats potentiels : un variant A>C dans la séquence pZRS et un variant C>T dans le gène *GLI1*. Le croisement de ces approches a été essentiel dans notre étude. En effet, le clonage positionnel à l'aide d'une étude d'association est une stratégie puissante en génétique équine, canine et féline, qui est utilisable avec un nombre modéré d'animaux atteints, comme c'était le cas dans notre étude. Mais elle est bien mieux adaptée à la recherche d'une mutation récessive qu'à une mutation dominante et à pénétrance incomplète. Dans le cas d'une mutation dominante, les nombres d'individus atteints et contrôles nécessaires augmentent par rapport à ceux nécessaires pour l'étude d'une mutation récessive. De plus, dans le cas d'une pénétrance incomplète, la mauvaise classification des individus dans les groupes atteints et contrôles diminue fortement la puissance de l'analyse (Karlsson *et al.*, 2007)

Le séquençage du génome entier n'a été réalisé que pour un seul individu polydactyle, compte tenu du coût de cette analyse. Nous avons filtré les variants en restreignant nos recherches aux variants des séquences codantes et des sites d'épissage pour les gènes

candidats retenus (*Tableau VI*). Le seul intron que nous avons retenu pour le filtrage était l'intron 5 du gène *LMBR1*, du fait de ses multiples implications dans la polydactylie chez d'autres espèces. La restriction de notre analyse à ces portions génomiques a constitué un biais de sélection dans notre étude. Nous avons peut-être ainsi écarté des variants potentiels présents dans d'autres séquences régulatrices non codantes.

## 5. Un variant candidat non retenu dans *GLI1*

Suite à l'étude des séquences des gènes candidats chez l'individu II2 séquencé, nous avons identifié un variant candidat présent à l'état hétérozygote, dans l'exon 11 du gène *GLI1*. Il s'agissait d'un SNP faux-sens C>T, référencé dans la base de données Ensembl sous le nom rs68704537 (ou *GLI1:c.1528C>T*). Le gène *GLI1* était un bon candidat pour la polydactylie de nos chevaux Barbe car il avait été montré qu'il :

- codait un facteur de transcription qui était activé suite à l'expression de *SHH* et régulait la prolifération des cellules souches (<https://www.genecards.org>) ;
- existait des mutations ponctuelles récessives dans la séquence du gène *GLI1* pouvant être à l'origine de polydactylie pré-axiale (Ullah *et al.*, 2019) et post-axiale (Palencia-Campos *et al.*, 2017) chez l'homme.

Nous avons utilisé deux outils de prédiction *in silico* afin d'étudier l'impact fonctionnel de ce variant. Les deux outils que nous avons utilisés étaient PROVEAN et SIFT, qui sont basés sur l'analyse de la séquence des nucléotides (*sequence-based tools*). Leurs prédictions étaient contradictoires, ce qui ne nous a pas permis de faire la différence entre un polymorphisme non causal ou une mutation potentiellement pathogène. Il a été montré que la combinaison de plusieurs outils de prédiction, utilisant des approches différentes (basées sur la séquence nucléotidique ou sur la structure protéique), améliorerait significativement la puissance de prédiction (Choudhury *et al.*, 2022). De plus, la meilleure combinaison d'outils de prédiction pour obtenir le plus de précision était gène-dépendante. Il a été montré que parmi les outils disponibles, PROVEAN faisait partie de ceux qui apportaient le plus de précision pour une évaluation basée sur la séquence nucléotidique (Leong *et al.*, 2015). Nous avons donc considéré que la prédiction de PROVEAN était la plus pertinente.

La base de données Ensembl référençait sept chevaux génotypés pour le SNP de *GLI1* de différentes races ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org) ; Al Abri *et al.*, 2020). Cinq chevaux étaient homozygotes C/C : le Percheron, le Cheval Miniature Américain (*American Miniature Horse*), le Pur-sang Arabe, le Tennessee Walker (*Tennessee Walking Horse*) et le Cheval Natif Mongolien Chakouyi (*Native Mongolian Chakouyi*). Deux chevaux étaient hétérozygotes C/T : le Trotteur Américain et le Mangalarga Marchador. Cette dernière race est la race brésilienne officielle. Elle a été créée à partir d'étalons de race Alter Real et de juments brésiliennes, descendantes des premiers chevaux importés en Amérique du Sud par les colons. Les étalons Alter Real, tout comme les juments importées, avaient été croisés avec des chevaux de races ibériques et des chevaux Barbe (Baena *et al.*, 2020). Nous avons donc pensé que ce variant pouvait ségréger naturellement parmi des chevaux apparentés aux chevaux Barbe.

Afin d'évaluer si le variant identifié pouvait satisfaire notre hypothèse de support de la polydactylie observée, selon un mode de transmission autosomique dominant à pénétrance incomplète, nous avons génotypé 31 chevaux de la famille étudiée. Parmi eux :

- trois individus non polydactyles étaient hétérozygotes T/T. Or :
  - o sous l'hypothèse que l'allèle T soit un allèle dominant, ces trois individus auraient dû être polydactyles,

- sous l'hypothèse que l'allèle T soit un allèle muté spécifique de la famille étudiée, il n'aurait pas dû y avoir d'individu homozygotes *T/T* dans la famille. En effet, chaque individu *T/T* était issu du croisement entre le cheval I1 ou un de ses descendants directs (donneur du premier allèle T) et un individu extérieur à la famille (donneur du second allèle T). Cet allèle était donc retrouvé chez trois individus différents et extérieurs à la famille et ne pouvait donc pas être spécifique de la famille,
- un individu polydactyle était homozygote *C/C*. Dans ce cas on ne pouvait pas envisager une polydactylie gouvernée par l'allèle T.

Afin d'évaluer la prévalence de l'allèle T, nous avons également génotypé 69 chevaux de race Barbe et Arabe-Barbe non apparentés. La prévalence était égale à 29% dans cette cohorte. Cette fréquence élevée était un élément de plus confirmant que ce variant était non spécifique de notre famille (et sûrement non spécifique des chevaux apparentés aux Barbés puisqu'il avait été retrouvé chez un Trotteur Américain) et très probablement sans rapport avec la polydactylie. Enfin, nous avons montré que la corrélation génotype-phénotype entre ce variant et la polydactylie était très imparfaite pour l'ensemble des chevaux génotypés et que le test statistique exact de Fisher avait conclu à une différence non significative de la fréquence du variant entre les chevaux polydactyles et non polydactyles (Tableau XIV).

**Toutes ces considérations nous ont conduits à écarter le variant rs68704537 de *GLI1* comme candidat à la polydactylie observée dans notre famille de chevaux Barbe et croisés Barbe.**

## 6. Un variant candidat préférentiel dans pZRS

### 6.1 Comparaison avec les autres espèces

La séquence pZRS a été identifiée dans l'intron 5 du gène *LMBR1*. Des mutations présentes dans cette séquence ont été mises en évidence comme responsables de polydactylie chez l'homme et chez le chien (Park *et al.*, 2008; Potuijt *et al.*, 2018; Xiang *et al.*, 2017). Rappelons que la séquence pZRS a été identifiée en amont de la séquence ZRS, une séquence non codante très bien conservée, qui agit comme régulateur en *cis* de l'expression de *SHH* dans le bourgeon du membre. Il a été montré que des mutations dans ZRS étaient également à l'origine de polydactylie chez l'homme, la souris et le chat (voir première partie ; Lettice *et al.*, 2008, 2003)

Nous avons montré, grâce à l'alignement de séquences de pZRS de différentes espèces, que le variant A>C de pZRS identifié chez nos chevaux Barbe polydactyles n'était présent dans aucune autre séquence et que le nucléotide A était conservé au sein des différentes espèces. De plus, il touchait une position adjacente à celle identifiée chez des chiens polydactyles (Park *et al.*, 2008).

La connaissance de l'implication des séquences pZRS et ZRS dans des cas de polydactylie chez d'autres espèces et la proximité immédiate de notre variant avec la mutation canine dans pZRS étaient des éléments forts en faveur de la candidature de ce variant pour la polydactylie de nos chevaux Barbe.

## 6.2 Corrélation génotype-phénotype et pénétrance

Les 21 chevaux homozygotes A/A pour le variant A>C de pZRS de la famille de chevaux Barbe étudiée étaient tous non polydactyles. Les 344 chevaux contrôles de différentes races étaient tous homozygotes A/A. Nous n'avons identifié aucun individu homozygote C/C. Sous l'hypothèse d'une polydactylie autosomique dominante, l'absence d'homozygote C/C était attendue, du fait de l'absence d'accouplement entre individus polydactyles. L'absence de l'allèle C parmi les génotypes des 344 chevaux et poneys contrôles a de plus montré que le variant A>C de pZRS semblait race-spécifique et même famille-spécifique, car aucun des 58 chevaux Barbe contrôle n'était porteur de l'allèle C.

Parmi les 15 chevaux hétérozygotes de la famille, sept chevaux étaient polydactyles et huit chevaux étaient non polydactyles. La corrélation génotype-phénotype était donc faible pour le variant de pZRS (47 %). Mais nous avons observé que trois individus polydactyles (chevaux III4, III7 et III11, Figure 59), dont deux ont pu être génotypés et étaient hétérozygotes A/C (chevaux III4 et III7, Figure 59), étaient issus d'étalons non polydactyles extérieurs à la famille (chevaux II14, II16 et II19 respectivement, Figure 59) et des juments II13 et II20 respectivement (Figure 59), non polydactyles (confirmation par des radiographies pour II13), toutes deux hétérozygotes A/C et filles de l'étalon ancêtre commun de tous les chevaux polydactyles (cheval I1, Figure 59). Le portage de l'allèle C, sans exprimer la polydactylie, mais avec transmission à une descendance qui exprimait la polydactylie **renforçait l'hypothèse d'un variant à pénétrance incomplète** plutôt que l'hypothèse d'un variant présentant une association fortuite avec la polydactylie. De plus, des cas de polydactylie à pénétrance incomplète ont été rapportés chez des chats Maine Coon (Hamelin *et al.*, 2020). Cela concernait des individus hétérozygotes pour la mutation *Hw*, identifiée dans ZRS, chez des chats issus de lignées américaines (voir première partie, Hamelin *et al.*, 2020). Récemment une équipe a rapporté des cas de polydactylie chez des cochons-nains, sans avoir identifié la mutation en cause. Les types pré-axial et post-axial pouvaient être observés conjointement. Le mode de transmission était très probablement récessif, à expressivité variable et pénétrance incomplète (Nikitin *et al.*, 2021). Des cas de polydactylie s'exprimant selon un mode autosomique dominant à pénétrance incomplète ont également été décrit chez l'homme, comme pour un variant de *GLI1* responsable de polydactylie post-axiale de type A ou B (Palencia-Campos *et al.*, 2020). La pénétrance incomplète ne semble donc pas rare pour la polydactylie héréditaire, quels que soient l'espèce concernée, le mode de transmission ou le locus en cause.

## 6.3 Mécanisme moléculaire

Les mécanismes moléculaires expliquant qu'une mutation dans pZRS puisse être à l'origine de polydactylie restent largement non élucidés à ce jour (Potuijt *et al.*, 2018). Cependant, la proximité des séquences ZRS et pZRS, leur rôle commun d'*enhancer* et les formes de polydactylie que leurs mutations engendrent nous laissent supposer qu'elles agissent de manière similaire. Les mutations de pZRS engendreraient, comme cela l'a été montré pour les mutations de ZRS, des modifications des sites de liaison des facteurs de transcription régulant l'activation du gène *SHH*. L'expression ectopique de *SHH* dans le bourgeon du membre pourrait être la conséquence soit de la perte d'un motif de liaison en *cis* auquel se liait normalement un facteur de transcription répresseur soit elle ferait apparaître un nouveau motif de liaison en *cis* auquel se lierait un facteur de transcription

activateur. Deux mécanismes différents, de perte de la fonction répresseur et gain de la fonction activatrice, pourraient être en cause (Lettice *et al.*, 2017).

Les mécanismes moléculaires expliquant les phénomènes de pénétrance incomplète et d'expressivité variable de la polydactylie observée chez différentes espèces n'ont pas été décrits à notre connaissance. Nous avons émis les hypothèses suivantes :

- l'implication de **variants modificateurs à effet faible** (dans les séquences ZRS ou pZRS, ou à d'autres locus), venant moduler finement les effets de l'expression de *SHH* et plus largement des gènes du développement du membre durant la période embryonnaire ;
- l'influence de **l'épigénétique**, qui correspond à une expression différentielle des gènes entre deux individus, sans modification de leur séquence nucléotidique. Les modifications épigénétiques consistent en des profils de méthylation ou d'acétylation des histones (les protéines qui compactent l'ADN), masquant ou dévoilant les portions d'ADN à exprimer. Ainsi, nous pourrions expliquer pourquoi deux individus porteurs d'une même mutation pourraient avoir des phénotypes différents : l'un exprimerait la mutation alors que chez l'autre l'expression de la séquence mutée ou l'expression d'un gène modificateur ne se ferait pas, car elle serait réprimée par des modifications épigénétiques ;
- l'influence possible de **facteurs environnementaux** non génétiques, qui conditionneraient l'expression phénotypique de la polydactylie tels que : le poids du poulain à la naissance, la vitesse de croissance et donc la vitesse de développement des os des membres, les facteurs nutritionnels chez la mère et chez le poulain.

#### 6.4 Impact fonctionnel du variant équin de pZRS

Bien que le variant A>C identifié dans la séquence pZRS équine soit probablement la cause de la polydactylie observée dans notre famille de chevaux Barbe et croisés Barbe, il serait nécessaire de confirmer l'impact fonctionnel de ce variant. Or, il est difficile d'évaluer l'impact fonctionnel d'un variant présent dans une séquence non-codante. En nous appuyant sur les données publiées dans la littérature (Lettice *et al.*, 2008; Potuijt *et al.*, 2018), nous proposons le protocole suivant :

- la construction d'un transgène constitué du gène rapporteur *LacZ*, placé sous le contrôle des séquences équines ZRS et pZRS sauvages ou des séquences équines ZRS sauvage et pZRS mutée avec le variant A>C identifié ;
- la création de lignées de souris transgéniques avec ces deux constructions : obtention d'embryons témoins avec le transgène contenant la séquence pZRS sauvage et d'embryons contenant la séquence pZRS mutée ;
- l'observation sur ces embryons des zones qui apparaissent colorées en bleue. En effet le gène *LacZ* code une enzyme (la beta-galactosidase). L'activité de cette enzyme, et donc l'activité des gènes placés sous le contrôle de la séquence pZRS, peut être révélée par la coloration bleue qui apparait en présence du substrat de la réaction (appelé X-gal).

Cette expérience de transgénèse classique chez la souris reste cependant coûteuse, il est probable qu'elle ne soit jamais mise en œuvre pour le seul variant équin de pZRS. Elle pourrait cependant être entreprise dans le cadre de l'analyse fonctionnelle de plusieurs variants de ZRS et pZRS chez différentes espèces, notamment chez l'Homme, pour confirmer leur implication dans la polydactylie.

## 7. Perspectives

Notre étude portait sur une polydactylie ségrégeant dans une famille de chevaux de race Barbe et croisés Barbe. Il serait cependant intéressant de séquencer l'intron 5 du gène *LMBR1*, et plus particulièrement les régions ZRS et pZRS chez des chevaux polydactyles issus de races différentes. Ces séquences étant impliquées dans la polydactylie chez l'Homme, le chien, le chat et la souris, il semble pertinent d'y rechercher une mutation causale de polydactylie chez tout cheval ou poney polydactyle.

Concernant les chevaux descendants de l'étalon I1, un dépistage de la polydactylie dès les premières semaines de vie serait préconisé, via la réalisation de **clichés radiographiques** des membres, selon les recommandations décrites précédemment. La pénétrance étant incomplète, ce dépistage devrait être associé à un **génotypage pour le variant A>C de la séquence pZRS**, afin de détecter les individus hétérozygotes non polydactyles. Il est ensuite conseillé **d'écarter de la reproduction les individus hétérozygotes**, polydactyles ou non.

La gestion d'un individu polydactyle doit prendre en compte différents critères dont notamment les projets d'utilisation sportive de l'équidé. L'**exérèse chirurgicale** du/des doigt(s) surnuméraires est envisageable pour des raisons esthétiques et est recommandée afin d'éviter d'éventuelles boiteries ou blessures suite à des traumatismes générés par le membre controlatéral. La technique chirurgicale de choix serait l'ostéotomie et l'amputation de la partie distale du métacarpe impliqué (voir première partie). Cependant, la décision d'une correction chirurgicale de la polydactylie ne doit pas être systématique. Elle doit être considérée au cas par cas, après évaluation de la **balance bénéfices/risques, prenant en compte les critères anatomiques, sportifs, éthiques et financiers**.



## CONCLUSION

Notre travail sur la polydactylie du cheval Barbe avait pour but de caractériser le phénotype de polydactylie ségrégeant dans une large famille de chevaux, de rechercher le mode de transmission de cette anomalie et d'initier la recherche de mutations qui pourraient être responsables de cette polydactylie équine.

Nous avons recruté au total 387 chevaux pour notre étude phénotypique et génétique. : 344 chevaux et poneys contrôles indemnes de polydactylie et non apparentés à la famille étudiée et 43 chevaux Barbe et croisés Barbe de la famille étudiée dont neuf individus étaient polydactyles. Ces 43 chevaux représentaient tous les chevaux apparentés que nous avons pu recenser et qui ont été inclus dans l'étude, sans discrimination.

L'étude phénotypique nous a permis de mettre en évidence une polydactylie pré-axiale touchant les membres antérieurs, avec une variabilité d'expression phénotypique attestée par des tailles et des nombres de doigts surnuméraires variables.

L'étude radiographique nous a permis de caractériser au niveau osseux cette expressivité variable, dans la famille étudiée, et de détecter une polydactylie unilatérale chez un individu chez qui aucun signe extérieur n'était visible.

L'étude cytogénétique n'a révélé aucune anomalie de caryotype chez les individus polydactyles et non polydactyles testés.

L'étude des données généalogiques des chevaux de notre étude a permis de suggérer deux hypothèses pour le mode de transmission de la polydactylie : un mode polygénique ou un mode autosomique dominant à pénétrance incomplète.

Les analyses génétiques nous ont permis d'identifier un variant candidat à la polydactylie chez les chevaux étudiés, dans la séquence régulatrice appelée pZRS et situées dans l'intron 5 du gène *LMBR1*. Ce variant, situé dans une séquence hautement conservée entre espèces, touchait une position adjacente à celle identifiée chez des chiens polydactyles.

Nous n'avons pas pu démontrer l'impact fonctionnel de cette mutation. Cela pourrait constituer une suite à notre travail, en utilisant par exemple la technique des gènes rapporteurs dans un modèle de souris. Une autre perspective ouverte par notre étude serait le séquençage de la séquence pZRS chez des individus polydactyles d'autres races équines, afin d'y rechercher la présence d'un variant. Enfin, le variant identifié pourra être utilisé pour mettre au point un test ADN de dépistage et diagnostic de la polydactylie, chez les descendants des chevaux de la grande famille Barbe et croisés Barbe que nous avons étudiée.



## BIBLIOGRAPHIE

- Abdunnabi, A., Ahmed, Y., Philip, C., Davies, H., 2011. Morphometrical Variations of the Carpal Bones in Thoroughbreds and Ponies. *Anatomia, histologia, embryologia* 41, 139–48. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.2011.01114.x>
- Al Abri, M.A., Holl, H.M., Kalla, S.E., Sutter, N.B., Brooks, S.A., 2020. Whole genome detection of sequence and structural polymorphism in six diverse horses. *PLoS One* 15, e0230899. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230899>
- Al Amin, A.S.M., Carter, K.R., 2021. Polydactyly, in: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Amano, T., Sagai, T., Seki, R., Shiroishi, T., 2017. Two Types of Etiological Mutation in the Limb-Specific Enhancer of *Shh*. *G3 Genes|Genomes|Genetics* 7, 2991–2998. <https://doi.org/10.1534/g3.117.044669>
- Anderson, E., Peluso, S., Lettice, L.A., Hill, R.E., 2012. Human limb abnormalities caused by disruption of hedgehog signaling. *Trends Genet* 28, 364–373. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.03.012>
- Artigas, R., Vazquez, N., Mirazo, J., Llambi, S., König, H.-E., Victoria, S., Pérez, W., 2020. Description and surgical resolution of a case of lateral polydactyly in a horse. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*.
- Babbs, C., Furniss, D., Morriss-Kay, G.M., Wilkie, A.O.M., 2008. Polydactyly in the mouse mutant Doublefoot involves altered Gli3 processing and is caused by a large deletion in cis to Indian hedgehog. *Mech Dev* 125, 517–526. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2008.01.001>
- Baena, M.M., Diaz, S., Moura, R.S., Meirelles, S.L.C., 2020. Genetic Characterization of Mangalarga Marchador Breed Horses Based on Microsatellite Molecular Markers. *J Equine Vet Sci* 95, 103231. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.103231>
- Barber, S.M., 1990. Unusual Polydactylism in a Foal: A Case Report. *Veterinary Surgery* 19, 203–207. <https://doi.org/10.1111/j.1532-950X.1990.tb01169.x>
- Barone, R., 1976. *Anatomie comparée des Mammifères domestiques, Tome 1 : Atlas d'ostéologie.*, 2ème Edition. ed. VIGOT Edition, Paris, 428p
- Bauer, A., Hiemesch, T., Jagannathan, V., Neuditschko, M., Bachmann, I., Rieder, S., Mikko, S., Penedo, M.C., Tarasova, N., Vitková, M., Sirtori, N., Roccabianca, P., Leeb, T., Welle, M.M., 2017. A Nonsense Variant in the *ST14* Gene in Akhal-Teke Horses with Naked Foal Syndrome. *G3 Genes|Genomes|Genetics* 7, 1315–1321. <https://doi.org/10.1534/g3.117.039511>
- Beste, K.J., Whitfield-Cargile, C.M., 2019. Considerations for surgical correction of polydactyly in horses. *Equine Vet Educ* 31, 468–471. <https://doi.org/10.1111/eve.12866>

Biesecker, L.G., 2011. Polydactyly: How many disorders and how many genes: 2010 update. *Dev Dyn* 240, 931–942. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22609>

Bowling, A.T., Millon, L.V., 1990. Two autosomal trisomies in the horse: 64,XX,-26,+t(26q26q) and 65,XX,+30. *Genome* 33, 679–682. <https://doi.org/10.1139/g90-101>

Carstanjen, B., Abitbol, M., Desbois, C., 2007. Bilateral Polydactyly in a foal. *J Vet Sci* 8, 201–203. <https://doi.org/10.4142/jvs.2007.8.2.201>

Chan, C.C.-H., Munroe, G.A., 1996. Congenital defects of the equine musculoskeletal system. *Equine Veterinary Education* 8, 157–163. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3292.1996.tb01677.x>

Chassier, M., Barrey, E., Robert, C., Duluard, A., Danvy, S., Ricard, A., 2018. Genotype imputation accuracy in multiple equine breeds from medium- to high-density genotypes. *J Anim Breed Genet* 135, 420–431. <https://doi.org/10.1111/jbg.12358>

Choudhury, A., Mohammad, T., Anjum, F., Shafie, A., Singh, I.K., Abdullaev, B., Pasupuleti, V.R., Adnan, M., Yadav, D.K., Hassan, M.I., 2022. Comparative analysis of web-based programs for single amino acid substitutions in proteins. *PLOS ONE* 17, e0267084. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267084>

Colbourne, Jv, Y., Kj, E., 1991. Surgical treatment of polydactylism and long term follow up in five horses ,9, 4.

Danforth, C.H., 1947. Morphology of the feet in polydactyl cats. *American Journal of Anatomy* 80, 143–171. <https://doi.org/10.1002/aja.1000800202>

Delgado, I., Torres, M., 2016. Gradients, waves and timers, an overview of limb patterning models. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 49, 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.12.016>

Eberth, J.E., Graves, K.T., MacLeod, J.N., Bailey, E., 2018. Multiple alleles of *ACAN* associated with chondrodysplastic dwarfism in Miniature horses. *Anim Genet* 49, 413–420. <https://doi.org/10.1111/age.12682>

Encyclopedia Britannica. *Britannica* [en ligne], URL : <https://www.britannica.com/animal/horse/Evolution-of-the-horse> [consulté le 19 mars 2021]

Fondon, J.W., Garner, H.R., 2004. Molecular origins of rapid and continuous morphological evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 18058–18063. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408118101>

GeneCards® The Human Gene Database [en ligne], URL : <https://www.genecards.org> [consulté le 10 mai 2022]

Giofré, F., Caracciolo, V., Zanotti, M., Polli, M., De Giovanni, A.M., 2004. Polydactyly in a Murgesse horse: a case report. *Journal of Equine Veterinary Science* 24, 248–250. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2004.05.003>

Gray, A., Marcos, S., Thomas, A., Lepage, O.M., 2019. Unilateral polydactyly in two foals. *Equine Vet Educ* 31, 462–467. <https://doi.org/10.1111/eve.12838>

Guéro, S., 2018. Developmental biology of the upper limb. *Hand Surgery and Rehabilitation* 37, 265–274. <https://doi.org/10.1016/j.hansur.2018.03.007>

Guo, B., Lee, S.K., Paksima, N., 2013. Polydactyly: a review. *Bull Hosp Jt Dis* (2013) 71, 17–23.

Gurnett, C.A., Alaei, F., Kruse, L.M., Desruisseau, D.M., Hecht, J.T., Wise, C.A., Bowcock, A.M., Dobbs, M.B., 2008. Asymmetric Lower-Limb Malformations in Individuals with Homeobox PITX1 Gene Mutation. *The American Journal of Human Genetics* 83, 616–622. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.10.004>

Hack, Y.L., Crabtree, E.E., Avila, F., Sutton, R.B., Grahn, R., Oh, A., Gilger, B., Bellone, R.R., 2021. Whole-genome sequencing identifies missense mutation in *GRM6* as the likely cause of congenital stationary night blindness in a Tennessee Walking Horse. *Equine Vet J* 53, 316–323. <https://doi.org/10.1111/evj.13318>

Hamelin, A. (2011). La polydactylie du Maine Coon. Thèse de doctorat vétérinaire, Faculté de médecine, Créteil, 178p.

Hamelin, A., Begon, D., Conchou, F., Fusellier, M., Abitbol, M., 2016. Clinical characterisation of polydactyly in Maine Coon cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 19. <https://doi.org/10.1177/1098612X16628920>

Hamelin, A., Conchou, F., Fusellier, M., Duchenij, B., Vieira, I., Filhol, E., Dufaure de Citres, C., Tiret, L., Gache, V., Abitbol, M., 2020. Genetic heterogeneity of polydactyly in Maine Coon cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 22, 1103–1113. <https://doi.org/10.1177/1098612X20905061>

Hemingway Home. *The hemingway home and museum* [en ligne], URL : <https://www.hemingwayhome.com> [consulté le 21 mars 2021]

Hill, R.E., 2007. How to make a zone of polarizing activity: Insights into limb development via the abnormality preaxial polydactyly. *Development, Growth & Differentiation* 49, 439–448. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2007.00943.x>

Illumina. *Illumina*. [en ligne], URL : <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/plan-experiments/paired-end-vs-single-read.html> [consulté le 15 mars 2020]

Kalsoom, U., Klopocki, E., Wasif, N., Tariq, M., Khan, S., Hecht, J., Krawitz, P., Mundlos, S., Ahmad, W., 2013. Whole exome sequencing identified a novel zinc-finger gene *ZNF141* associated with autosomal recessive postaxial polydactyly type A. *J Med Genet* 50, 47–53. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2012-101219>

Karlsson, E.K., Baranowska, I., Wade, C.M., Salmon Hillbertz, N.H.C., Zody, M.C., Anderson, N., Biagi, T.M., Patterson, N., Pielberg, G.R., Kulbokas, E.J., Comstock, K.E., Keller, E.T., Mesirov,

J.P., von Euler, H., Kämpe, O., Hedhammar, Å., Lander, E.S., Andersson, G., Andersson, L., Lindblad-Toh, K., 2007. Efficient mapping of mendelian traits in dogs through genome-wide association. *Nat Genet* 39, 1321–1328. <https://doi.org/10.1038/ng.2007.10>

Klopocki, E., Kähler, C., Foulds, N., Shah, H., Joseph, B., Vogel, H., Lüttgen, S., Bald, R., Besoke, R., Held, K., Mundlos, S., Kurth, I., 2012. Deletions in PITX1 cause a spectrum of lower-limb malformations including mirror-image polydactyly. *Eur J Hum Genet* 20, 705–708. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2011.264>

Kondoh, S., Sugawara, H., Harada, N., Matsumoto, N., Ohashi, H., Sato, M., Kantaputra, P.N., Ogino, T., Tomita, H., Ohta, T., Kishino, T., Fukushima, Y., Niikawa, N., Yoshiura, K., 2002. A novel gene is disrupted at a 14q13 breakpoint of t(2;14) in a patient with mirror-image polydactyly of hands and feet. *J Hum Genet* 47, 136–139. <https://doi.org/10.1007/s100380200015>

Kropatsch, R., Melis, C., Stronen, A.V., Jensen, H., Epplen, J.T., 2015. Molecular Genetics of Sex Identification, Breed Ancestry and Polydactyly in the Norwegian Lundehund Breed. *JHERED* 106, 403–406. <https://doi.org/10.1093/jhered/esv031>

Leong, I.U., Stuckey, A., Lai, D., Skinner, J.R., Love, D.R., 2015. Assessment of the predictive accuracy of five in silico prediction tools, alone or in combination, and two metaservers to classify long QT syndrome gene mutations. *BMC Med Genet* 16, 34. <https://doi.org/10.1186/s12881-015-0176-z>

Lettice, L.A., Devenney, P., De Angelis, C., Hill, R.E., 2017. The Conserved Sonic Hedgehog Limb Enhancer Consists of Discrete Functional Elements that Regulate Precise Spatial Expression. *Cell Reports* 20, 1396–1408. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.07.037>

Lettice, L.A., Heaney, S.J.H., Purdie, L.A., Li, L., de Beer, P., Oostra, B.A., Goode, D., Elgar, G., Hill, R.E., de Graaff, E., 2003. A long-range Shh enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly. *Hum Mol Genet* 12, 1725–1735. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg180>

Lettice, L.A., Hill, A.E., Devenney, P.S., Hill, R.E., 2008. Point mutations in a distant sonic hedgehog cis-regulator generate a variable regulatory output responsible for preaxial polydactyly. *Hum Mol Genet* 17, 978–985. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm370>

Lettice, L.A., Horikoshi, T., Heaney, S.J.H., van Baren, M.J., van der Linde, H.C., Breedveld, G.J., Jooose, M., Akarsu, N., Oostra, B.A., Endo, N., Shibata, M., Suzuki, M., Takahashi, E., Shinka, T., Nakahori, Y., Ayusawa, D., Nakabayashi, K., Scherer, S.W., Heutink, P., Hill, R.E., Noji, S., 2002. Disruption of a long-range cis-acting regulator for Shh causes preaxial polydactyly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7548–7553. <https://doi.org/10.1073/pnas.112212199>

Lettice, L.A., Williamson, I., Wiltshire, J.H., Peluso, S., Devenney, P.S., Hill, A.E., Essafi, A., Hagman, J., Mort, R., Grimes, G., DeAngelis, C.L., Hill, R.E., 2012. Opposing Functions of the ETS Factor Family Define Shh Spatial Expression in Limb Buds and Underlie Polydactyly. *Developmental Cell* 22, 459–467. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.12.010>

Losonsky, J.M., Kneller, S.K., Pijanowski, G.J., 1988. Prevalence and Distribution of the First

and Fifth Carpal Bones in Standardbred Horses as Determined by Radiography. *Veterinary Radiology* 29, 236–238. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8261.1988.tb01507.x>

Metzger, J., Gast, A.C., Schrimpf, R., Rau, J., Eikelberg, D., Beineke, A., Hellige, M., Distl, O., 2017. Whole-genome sequencing reveals a potential causal mutation for dwarfism in the Miniature Shetland pony. *Mamm Genome* 28, 143–151. <https://doi.org/10.1007/s00335-016-9673-4>

Metzger, J., Pfahler, S., Distl, O., 2016. Variant detection and runs of homozygosity in next generation sequencing data elucidate the genetic background of Lundehund syndrome. *BMC Genomics* 17. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2844-6>

Milan, D., 2000. Notion de gène candidat. *INRA Prod. Anim.* 13, 119–123. <https://doi.org/10.20870/productions-animales.2000.13.HS.3822>

Monaco, V., 2000. Le thalidomide: histoire et actualité. *Sciences pharmaceutiques*, 138. hal-01733270. <https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01733270>

Nikitin, S.V., Knyazev, S.P., Trifonov, V.A., Proskuryakova, A.A., Shmidt, Yu.D., Shatokhin, K.S., Zaporozhets, V.I., Bashur, D.S., Korshunova, E.V., Ermolaev, V.I., 2021. Unusual congenital polydactyly in mini-pigs from the breeding group of the Institute of Cytology and Genetics (Novosibirsk, Russia). *Vavilovskii Zhurnal Genet Seleksii* 25, 652–660. <https://doi.org/10.18699/VJ21.074>

Novales Durán, M., Hernández Plá, R., Sanchez de Medina, A., Muñoz Palacios, E., 2013. Polidactilia en portros [WWW Document]. *Revista del Colegio de Médicos Veterinarios del Estado Lara*. URL <http://revistacmvl.jimdofree.com/suscripción/volumen-5/polidactilia-en-portros/> (accessed 2.6.21).

OMIM. *OMIM Online Mendelian Inheritance in Man* [en ligne], URL : <https://www.omim.org> [consulté le 4 novembre 2021]

Paired-End vs. Single-Read Sequencing Technology [WWW Document], n.d. URL <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/plan-experiments/paired-end-vs-single-read.html> (accessed 3.19.21).

Palencia-Campos, A., Martínez-Fernández, M.-L., Altunoglu, U., Soto-Bielicka, P., Torres, A., Marín, P., Aller, E., Şentürk, L., Berköz, Ö., Yıldırım, M., Kayserili, H., Gil-Camarero, E., Colli-Lista, G., Sanchís-Calvo, A., Carretero, A., Polydactyly, E.W.G. on, Guillén-Navarro, E., López-González, V., Ballesta-Martínez, M., Rosell, J., Aglan, M.S., Temtamy, S., Otaify, G.A., Cuevas-Catalina, L., Torres-Saavedra, M.-N., Nevado, J., Tenorio, J., Lapunzina, P., Bermejo-Sánchez, E., Ruiz-Pérez, V.L., 2020. Heterozygous pathogenic variants in GLI1 are a common finding in isolated postaxial polydactyly A/B. *Human Mutation* 41, 265–276. <https://doi.org/10.1002/humu.23921>

Palencia-Campos, A., Ullah, A., Nevado, J., Yıldırım, R., Unal, E., Ciorraga, M., Barruz, P., Chico, L., Picci-Sparascio, F., Guida, V., De Luca, A., Kayserili, H., Ullah, I., Burmeister, M., Lapunzina, P., Ahmad, W., Morales, A.V., Ruiz-Perez, V.L., 2017. GLI1 inactivation is associated with developmental phenotypes overlapping with Ellis–van Creveld syndrome. *Human Molecular*

Genetics 26, 4556–4571. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx335>

Park, K., Kang, J., Park, S., Ha, J., Park, C., 2004. Linkage of the locus for canine dewclaw to chromosome 16. *Genomics* 83, 216–224. [https://doi.org/10.1016/S0888-7543\(03\)00234-9](https://doi.org/10.1016/S0888-7543(03)00234-9)

Park, K., Kang, J., Subedi, K.P., Ha, J.-H., Park, C., 2008. Canine polydactyl mutations with heterogeneous origin in the conserved intronic sequence of LMBR1. *Genetics* 179, 2163–2172. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.087114>

Perrin, J., Geoffroy-Siraudin, C., Metzler-Guillemain, C., 2008. La main : embryologie et principaux mécanismes malformatifs. *Chirurgie de la Main* 27, S2–S6. <https://doi.org/10.1016/j.main.2008.07.010>

Philip-Sarles, N., 2008. Malformations congénitales de la main et génétique. *Chirurgie de la Main* 27, S7–S20. <https://doi.org/10.1016/j.main.2008.07.011>

Potuijt, J.W.P., Baas, M., Sukenik-Halevy, R., Douben, H., Nguyen, P., Venter, D.J., Gallagher, R., Swagemakers, S.M., Hovius, S.E.R., van Nieuwenhoven, C.A., Galjaard, R.-J.H., van der Spek, P.J., Ahituv, N., de Klein, A., 2018. A point mutation in the pre-ZRS disrupts sonic hedgehog expression in the limb bud and results in triphalangeal thumb–polysyndactyly syndrome. *Genetics in Medicine* 20, 1405–1413. <https://doi.org/10.1038/gim.2018.18>

Raous, A.-S., 2013. Le séquençage haut débit: principe et application en virologie. Thèse de doctorat vétérinaire, Faculté de médecine, Créteil, 136p.

Raudsepp, T., Finno, C.J., Bellone, R.R., Petersen, J.L., 2019. Ten years of the horse reference genome: insights into equine biology, domestication and population dynamics in the post-genome era. *Anim Genet* 50, 569–597. <https://doi.org/10.1111/age.12857>

Read, A., Donnai, D., 2009. Génétique médicale, De la biologie à la pratique clinique, De Boeck. ed, 460p.

Rieder, S., Taourit, S., Mariat, D., Langlois, B., Guérin, G., 2001. Mutations in the agouti (ASIP), the extension (MC1R), and the brown (TYRP1) loci and their association to coat color phenotypes in horses (*Equus caballus*). *Mammalian Genome* 12, 450–455. <https://doi.org/10.1007/s003350020017>

Schimmang, T., Oda, S.-I., Røther, U., 1994. The mouse mutant Polydactyly Nagoya (Pdn) defines a novel allele of the zinc finger gene Gli3. *Mammalian Genome* 5, 384–386. <https://doi.org/10.1007/BF00356560>

Sepúlveda, O.S., V, C.R., R, R.O., A, L.M., 2011. Polidactilia en los cuatro miembros, en una potranca mestiza en Chile. *Revista MVZ Córdoba* 16, 2634–2639. <https://doi.org/10.21897/rmvz.1038>

Sharpe, J., Lettice, L., Hecksher-Sorensen, J., Fox, M., Hill, R., Krumlauf, R., 1999. Identification of sonic hedgehog as a candidate gene responsible for the polydactylous mouse mutant Sasquatch. *Curr Biol* 9, 97–100. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(99\)80022-0](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(99)80022-0)

Simon, V., Dyson, S.J., 2010. Radiologic anatomic variation of the carpus in horses with carpal

lameness and control horses. *Vet Radiol Ultrasound* 51, 601–606. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8261.2010.01716.x>

Stanek, C., Hantak, E., 1986. Bilateral atavistic polydactyly in a colt and its dam. *Equine Veterinary Journal* 18, 76–79. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1986.tb03546.x>

Strachan, T., Read, A., 1998. *Génétique moléculaire humaine*. Paris : Flammarion, Médecine-Sciences, 596p.

Talamillo, A., Bastida, M., Fernandez-Teran, M., Ros, M., 2005. The developing limb and the control of the number of digits: Section Editor: Jacques Michaud, e-mail: [jacques.michaud@recherche-ste-justine.qc.ca](mailto:jacques.michaud@recherche-ste-justine.qc.ca). *Clinical Genetics* 67, 143–153. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2005.00404.x>

Tanaka, J., Leeb, T., Rushton, J., Famula, T.R., Mack, M., Jagannathan, V., Flury, C., Bachmann, I., Eberth, J., McDonnell, S.M., Penedo, M.C.T., Bellone, R.R., 2019. Frameshift Variant in MFSD12 Explains the Mushroom Coat Color Dilution in Shetland Ponies. *Genes* 10, 826. <https://doi.org/10.3390/genes10100826>

Tickle, C., 2015. How the embryo makes a limb: determination, polarity and identity. *J. Anat.* 227, 418–430. <https://doi.org/10.1111/joa.12361>

Tickle, C., Towers, M., 2017. Sonic Hedgehog Signaling in Limb Development. *Front. Cell Dev. Biol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00014>

Tonkin, M.A., 2008. Classification des anomalies congénitales de la main. *Chirurgie de la Main* 27, S27–S34. <https://doi.org/10.1016/j.main.2008.08.001>

Towers, R.E., Murgiano, L., Millar, D.S., Glen, E., Topf, A., Jagannathan, V., Drögemüller, C., Goodship, J.A., Clarke, A.J., Leeb, T., 2013. A Nonsense Mutation in the IKBKG Gene in Mares with Incontinentia Pigmenti. *PLoS ONE* 8, e81625. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081625>

Trumble, T.N., 2005. Orthopedic disorders in neonatal foals. *Vet Clin North Am Equine Pract* 21, 357–385, vi. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2005.04.008>

Ullah, A., Umair, M., Majeed, A.I., Abdullah, Jan, A., Ahmad, W., 2019. A novel homozygous sequence variant in *GLI1* underlies first case of autosomal recessive pre-axial polydactyly. *Clin Genet* 95, 540–541. <https://doi.org/10.1111/cge.13495>

Umair, M., Ahmad, F., Bilal, M., Ahmad, W., Alfadhel, M., 2018. Clinical Genetics of Polydactyly: An Updated Review. *Front. Genet.* 9, 447. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00447>

Umair, M., Shah, K., Alhaddad, B., Haack, T.B., Graf, E., Strom, T.M., Meitinger, T., Ahmad, W., 2017. Exome sequencing revealed a splice site variant in the IQCE gene underlying post-axial polydactyly type A restricted to lower limb. *Eur J Hum Genet* 25, 960–965. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2017.83>

Valloire-Lucot, J., 2012. La polydactylie chez les mammifères. Thèse de doctorat vétérinaire, Faculté de médecine, Créteil, 89p.

Van Dijk, E., Thermes, C., 2021. La révolution de la génomique : les nouvelles méthodes de séquençage et leurs applications [WWW Document]. Planet-Vie. URL <https://planet-vie.ens.fr/thematiques/manipulations-en-laboratoire/la-revolution-de-la-genomique-les-nouvelles-methodes-de> (accessed 3.18.21).

Wieczorek, D., Pawlik, B., Li, Y., Akarsu, N.A., Caliebe, A., May, K.J.W., Schweiger, B., Vargas, F.R., Balci, S., Gillessen-Kaesbach, G., Wollnik, B., 2010. A specific mutation in the distant sonic hedgehog ( *SHH* ) *cis* -regulator (ZRS) causes Werner mesomelic syndrome (WMS) while complete ZRS duplications underlie Haas type polysyndactyly and preaxial polydactyly (PPD) with or without triphalangeal thumb. *Hum. Mutat.* 31, 81–89. <https://doi.org/10.1002/humu.21142>

Wolpert, L., 1999. Biologie du développement, les grands principes. Dunod, 304-307.

Xiang, Y., Jiang, L., Wang, B., Xu, Y., Cai, H., Fu, Q., 2017. Mutational screening of *GLI3*, *SHH*, *preZRS* , and *ZRS* in 102 Chinese children with nonsyndromic polydactyly: Mutational Screening of Children With Nonsyndromic Polydactyly. *Dev. Dyn.* 246, 392–402. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24488>

Zeller, R., López-Ríos, J., Zuniga, A., 2009. Vertebrate limb bud development: moving towards integrative analysis of organogenesis. *Nature Reviews Genetics* 10, 845–858. <https://doi.org/10.1038/nrg2681>

Zhu, J., Mackem, S., 2017. John Saunders' ZPA, Sonic hedgehog and digit identity – How does it really all work ? *Developmental Biology* 429, 391–400. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.02.001>

**Annexe 1** : Cas de polydactylie équine répertoriés à notre connaissance

Cas	Localisation	Origine	Phalanges et os sésamoïdiens du doigt surnuméraire	Autres anomalies	Autres examens réalisés/ remarques	Auteur
Hongre 7ans, Quarter horse	Latéral AG	MC IV	P1	Élargissement dorso-palmaire de MC IV	Analyse de l'articulation MC IV/P1 : de type synoviale. Analyse histologique et microscopie électronique du sabot : désorganisation de la jonction dermo-épidermique (liée à absence de phalange dans la boîte cornée du sabot rudimentaire. Analyse cytogénétique : pas d'anomalie (caryotype 64 XY)	Artigas <i>et al.</i> , 2020
Pouliche 4 mois, Pur sang	Médial AG	MC II	P1 + P2 + P3 1 os sésamoïde proximal			Gray <i>et al.</i> , 2019
Poulain 2 jours, Selle français	Médial AG	MC II	P1 2 os sésamoïdes proximaux	MC II hypertrophié, MC I rudimentaire, os carpal I présent, os radial du carpe hypertrophié Légère déformation angulaire en valgus du boulet	IRM 2 ans après chirurgie : fusion de MC II (partie non excisée) et MC III Echographie 2 ans après chirurgie : appareil fléchisseur complet supplémentaire résiduel	
Poulain 14 mois	AD		Pas d'os surnuméraire mais présence d'un sabot fendu	Boiterie sévère, déviation angulaire marquée	Scanner : taille réduite et déviation latérale de P3, rotation interne de P2 ⇒ « pseudo-polydactylie »	Valbonetti <i>et al.</i> , 2015

Cas	Localisation	Origine	Phalanges et os sésamoïdiens du doigt surnuméraire	Autres anomalies	Autres examens réalisés/ remarques	Auteur
Poulache 6 semaines	Médial AD	MC II	P1 + P2 1 seul os sésamoïde proximal			Sepulveda <i>et al.</i> , 2011
	Médial AG	MC II	P1 + P2 2 os sésamoïdes proximaux  Compatible avec la forme atavique pour les antérieurs	Déviations angulaires sévères en valgus du boulet Fracture Salter Harris de type 2 sur la P2 et ostéomyélite de P3 du doigt III		
	PD  PG	Articulation métatarso-phalangienne	Dédoublement P1, P2 et P3 en deux doigts distincts. P1 partiellement fusionnée à MT III. Présence de l'os sésamoïdien distal  Compatible avec la forme tératogène sur les postérieurs	Luxation complète de l'articulation métatarso-phalangienne (hyperextension)  Luxation complète de l'articulation métatarso-phalangienne (hyperextension) Varus du boulet, perte d'architecture des deux P3, fracture de P1 du doigt latéral avec ostéolyse		
Poulain 2 mois, Anglo-Arabe	Médial AD	MC III				Duran <i>et al.</i> , 2013
Poulain 20 jours, Pure race espagnole	Médial AD	MC II	P1 2 os sésamoïdes proximaux	Valgus du carpe, développement important de l'os carpal II et de l'os radial du carpe, présence d'un os carpal I anormalement grand, présence d'une ébauche de MC I		

Cas	Localisation	Origine	Phalanges et os sésamoïdiens du doigt surnuméraire	Autres anomalies	Autres examens réalisés/ remarques	Auteur
Poulain 7 jours, Pure race espagnole	Médial AG	MC II	P1 + P2 + P3 1 seul os sésamoïde proximal	Hypoplasie marquée de l'épiphyse distale du MC III -> déformation angulaire en <b>varus</b> des articulations métacarpo- phalangienne et interphalangienne proximale		Duran <i>et al.</i> , 2013
	Médial AD	MC II	P1 + P2 + P3 1 seul os sésamoïde proximal			
Poulain 7 mois, Barbe	Médial AD	MC II	P1 + P2 + P3	Présence d'un <b>os carpal I</b>		Carstanjen <i>et al.</i> , 2007
	Médial AG	MC II	P1	Présence d'un <b>os carpal I</b> Doigt supplémentaire non individualisé extérieurement		
Poulain 2 ans, Murguese	Médial AG	MC II	P1		Caryotype : aucune anomalie	Giofré <i>et al.</i> , 2004
Poulain 5 mois, Pur sang	Médial AD	MC II	P1 2 os sésamoïdes proximaux			Colbourne <i>et al.</i> , 1991
Poulain 10 semaines	Médial AD	MC II	P1, 2 os sésamoïdes proximaux fusionnés			
Poulliche 5 mois, Quarter horse	Médial AD	MC II	P1 + P2 + P3 2 os sésamoïdes proximaux et un os sésamoïde distal	Présence de l' <b>os carpal I</b> , <b>os métacarpal I</b> rudimentaire		
Poulain 3 mois, Quarter horse	Médial AG	MC I	P1 1 os sésamoïde proximal	Présence de l' <b>os carpal I</b> hypertrophié, <b>os radial du carpe</b> de forme inhabituelle, déviation angulaire en <b>valgus</b> du carpe		
Poulliche 4 mois, Quarter horse	Médial PD	MT II	P1 + P2 + P3 2 os sésamoïdes proximaux et 1 os sésamoïde distal			

Cas	Localisation	Origine	Phalanges et os sésamoïdiens du doigt surnuméraire	Autres anomalies	Autres examens réalisés/ remarques	Auteur
<b>Poulain 2 mois, Quarter horse</b>	Médial AG	MC I (x2)	Pas d'information	<p>Elargissement médial et forme inhabituelle de l'os radial du carpe qui s'articule avec deux 2 os carpaux supplémentaires, 2 os métacarpiens supplémentaires en région médiale (fracture distale du plus long)</p> <p>Malformations de l'ensemble des os du carpe</p> <p>Déviations angulaires en valgus du carpe</p>		Barber <i>et al.</i> , 1990
<b>Poulain 14 semaines</b>	Médial AG	MC II	P1 + 1 os sésamoïde proximal + présence d'un petit centre d'ossification dans la boîte cornée	MC II élargi médialement	Caryotype : pas d'anomalie	Stanek et Hantak, 1986
<b>Mère : poney 11 ans</b>	Médial AD	MC II	P1 + P2 + P3, 1 seul os sésamoïde proximal et 1 os sésamoïde distal		Mère : 64 XX Poulain : 64 XY	
	AG + AD	MC II	1 os sésamoïde proximal	MC II bien développés et élargis en partie distale		

### Légende :

AG : Membre antérieur gauche / AD : Membre antérieur droit / PG : Membre postérieur gauche / PD : Membre postérieur droit

MC I : Os métacarpien I / MC II : Os métacarpien II / MC III : Os métacarpien III (métacarpien principal) / MC IV : Os métacarpien IV / MT II : os métatarsien II / MT III : os métatarsien III (métatarsien principal)

P1 : première phalange (proximale) / P2 : deuxième phalange (intermédiaire) / P3 : 3<sup>ème</sup> phalange (distale)

**Annexe 2:** Fiche de prélèvement et de consentement à l'utilisation des prélèvements pour des recherches en génétique



Horse Genetics



For each horse:

- Fill in the questionnaire
- Attach a copy of the pedigree, if available
- Include **hairs with roots, sent as a simple letter.**

All veterinarians as well as all the members of the BARB HORSE project are engaged to keep a complete confidentiality on all the received information.

Should you need any further information, please feel free to contact Dr. Marie Abitbol on +33(0)-1-43-96-70-01 or by email sent to: m.abitbol@vet-alfort.fr.

Horse Identity:

**Name:** \_\_\_\_\_ **Birth date:** \_\_\_\_\_

Sex:  male  female

Identification number: \_\_\_\_\_

**Breed:** \_\_\_\_\_ **Coat color:** \_\_\_\_\_

Additional information about the horse or his/her breeding line?

Your postal address:

**Email address:**

I agree that DNA extracted from my horse cells (hair roots) can be used for genetic research programs aiming at improving a better health in horses.

Date

Signature

Please send this questionnaire together with the pedigree and the sample to:

**Dr Marie ABITBOL**  
**UMR955 Génétique**  
**Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort,**  
**7 Avenue du Général de Gaulle**  
**94700 Maisons-Alfort**  
**FRANCE**



# LA POLYDACTYLIE CHEZ LE CHEVAL DE RACE BARBE

---

Auteur

---

BAVILLE Ella

Résumé

---

Chez les animaux, la polydactylie correspond à la présence d'un ou plusieurs doigts supplémentaires, au niveau des membres antérieurs et/ou postérieurs. Il s'agit d'un caractère congénital, héréditaire ou non, syndromique ou isolé. Cette malformation a été rapportée chez l'homme et chez différentes espèces de vertébrés comme le chien, le chat, la souris, le poulet et le cheval. A notre connaissance, aucune étude génétique n'a jusqu'à présent abouti à la publication d'une mutation associée à de la polydactylie chez le cheval. Nous avons identifié une forme familiale de polydactylie non-syndromique, au sein d'une large famille de chevaux de race Barbe et croisés Barbe. Il s'agissait d'une polydactylie pré-axiale touchant les membres antérieurs, dont nous avons pu déterminer le mode de transmission comme autosomique dominant à pénétrance incomplète et expressivité variable. Afin de rechercher la mutation en cause, nous avons effectué une étude d'association combinée à un séquençage du génome entier d'un individu polydactyle. Nous avons mis en évidence deux variants génétiques candidats, dont l'un était très associé à la polydactylie. Ce travail permettra de proposer un test ADN de diagnostic et dépistage de la polydactylie pour les descendants de la large famille de chevaux Barbe et croisés Barbe que nous avons étudiée. Il constitue également la première identification d'un variant génétique associé à de la polydactylie non-syndromique équine.

Mots-clés

---

Membre, Congénital, Héréditaire, Métacarpien, Génétique, ADN, Séquençage, SHH

Jury

---

Président du jury : **Pr SANLAVILLE Damien**  
Directeur de thèse : **Pr ABITBOL Marie**  
1er assesseur : **Pr ABITBOL Marie**  
2ème assesseur : **Pr CADORE Jean-Luc**