

RECHERCHE DE GÈNES RESPONSABLES DE GÉNODERMATOSES : EXEMPLE DE LA KÉRATODERMIE NASO-PLANTAIRE CHEZ LE DOGUE DE BORDEAUX

IDENTIFICATION OF GENES INVOLVED IN GENODERMATOSES: EXAMPLE OF NASO-PLANTAR KERATODERMIA IN THE FRENCH BREED DOGUE DE BORDEAUX

Par Catherine ANDRÉ⁽¹⁾, Éric GUAGUÈRE⁽²⁾, Anne THOMAS⁽³⁾, Emmanuel BENSIGNOR⁽⁴⁾ et Guillaume QUENEY
(communication présentée le 22 mars 2007)

RÉSUMÉ

Compte tenu de la structure génétique de l'espèce canine, avec plus de 300 races construites et façonnées par l'homme, le chien présente un intérêt tout à fait particulier pour identifier les gènes et les allèles responsables de maladies génétiques. Notre laboratoire travaille depuis plus de 10 ans à produire les connaissances génomiques nécessaires à la compréhension des bases génétiques de traits particuliers ou de maladies génétiques chez le chien, afin de les utiliser comme modèles des mêmes traits chez l'homme. Nous exposerons ici les travaux déjà effectués sur le positionnement sur les chromosomes canins de gènes candidats ou impliqués dans des génodermatoses, ainsi que le travail de génétique moléculaire en cours sur la kératodermie naso-plantaire, chez le Dogue de Bordeaux.

Mots-clés : chien, génétique, génodermatoses, keratodermie, gènes.

SUMMARY

The genetic structure of the canine species, with over 300 breeds created and modified by man, provides a unique model to identify genes and alleles responsible for genetic diseases. Our laboratory has been working for over ten years to deliver genomic resources to further our understanding of the genetic bases of particular traits or of genetic diseases in dogs, with a view to using them as models for the same traits in humans. We present here our chromosome mapping studies carried out on candidate genes or genes involved in genodermatoses, as well as our on-going molecular genetics study on naso-plantar keratodermia in the French breed Dogue de Bordeaux.

Key-words: dog, genetics, genodermatosis, keratodermia, genes.

(1) Laboratoire de Génétique et Développement CNRS, UMR 6061, 2 Avenue du Pr. Léon Bernard, 35043 Rennes.

(2) Clinique Vétérinaire Saint Bernard, 598 avenue de Dunkerque, 59130 Lomme.

(3) ANTAGÈNE « Laboratoire de Génétique Animale », Immeuble Le Meltem, 2 allée des séquoïas, 69760 Limonest.

(4) Clinique Vétérinaire, 6 rue Mare Pavée, 35510 Cesson-Sevigné.

CONTEXTE DES RECHERCHES GÉNÉTIQUES CHEZ LE CHIEN

Le groupe de « Génétique du chien » de l'UMR 6061 CNRS/Université, à Rennes, travaille depuis plus de dix ans sur la génomique et la génétique chez le chien. Celui-ci constitue un modèle génétique, en émergence, dont la reconnaissance commence à se faire, notamment aux États-Unis, et pour lequel ce groupe a apporté une forte contribution. Du fait de l'histoire de l'espèce canine, les nombreuses races, créées par l'homme, constituent autant d'isolats génétiques dans lesquels ségrègent des traits spécifiques (phénotypiques, comportementaux ou déterminants des maladies héréditaires). Ces traits sont bien souvent homologues de phénotypes décrits chez l'homme, pour lesquels les bases génétiques restent encore inconnues, comme les gènes gouvernant la taille par exemple. Le chien représente alors un modèle unique pour rechercher les bases génétiques des maladies homologues humaines car les méthodes génétiques de recherche de gènes sont plus faciles à aborder dans des « isolats génétiques », qui représentent les races de chien, plutôt que dans des populations panmictiques comme l'Homme. D'autre part, la médecine vétérinaire donne une place de plus en plus importante aux maladies génétiques et s'ouvre la possibilité nouvelle de proposer des tests génétiques de diagnostic ou de dépistage. Les travaux rennais sur le génome du chien, par la cartographie de plus de 10 000 marqueurs sur les chromosomes canins, ont constitué les bases de la connaissance de ce génome et, grâce à ces acquis, le séquençage de ce génome vient d'être achevé aux États-Unis (Galibert *et al.* 2004, Sutter *et al.* 2004; André & Galibert, 2005; Galibert & André, 2006a, b, c). Après un tel investissement dans ces études génomiques, importantes en médecine vétérinaire, mais aussi très prometteuses pour les maladies génétiques humaines, nous développons plusieurs sujets de recherche pour identifier de nouveaux gènes impliqués dans des maladies génétiques canines et humaines. Différents projets de recherche génétique sont en cours :

- cancers : histiocytose maligne (J. Abadie *et al.* communication personnelle; B. Hédan *et al.* soumis pour publication), mélanomes...
- rétinopathies, (André *et al.* 2005, T. Vilboux *et al.* soumis pour publication),
- anomalies du développement : anourie, robe Merle (Hédan *et al.* 2006),
- épilepsie,
- gnodermatoses : kératodermie naso-plantaire chez le dogue de Bordeaux, ichtyose...
- dysplasie coxo-fémorale dans différentes races françaises.

De plus, nous constituons une banque d'ADN avec base de données associée, comportant les ADN de chiens sains ou atteints de maladies génétiques, afin de mettre cette ressource, à des fins de recherche, à la disposition de la communauté vétérinaire et scientifique.

RECHERCHES EN GÉNÉTIQUE : QUELQUES DÉFINITIONS

La recherche des causes génétiques d'une affection héréditaire consiste tout d'abord à déterminer si la transmission est familiale (héréditaire) ou non, à définir le mode de transmission de la maladie, grâce à l'analyse des pedigrees : arbres généalogiques avec mention des chiens atteints, porteurs présumés, sains ou chiens dont le statut clinique est inconnu. Dans le cas d'une transmission familiale, elle peut être :

- (1) monogénique : un seul gène est responsable de l'affection et la ségrégation est dite mendélienne (proportions données de chiens indemnes et atteints) ;
- (2) polygénique : plusieurs gènes sont responsables, la ségrégation est non mendélienne (on ne peut pas prévoir les proportions de chiens indemnes et atteints) ;
- (3) liée au sexe : le gène responsable est sur le chromosome X ; un plus grand nombre de mâles sont atteints, les femelles peuvent être porteuses, voire atteintes, dans un petit nombre de cas.

Ces types de transmission sont les plus fréquents, mais on observe aussi des transmissions maternelles (le gène responsable est sur le génome mitochondrial), des transmissions dont la pénétrance (fraction des individus qui expriment le phénotype) n'est pas complète ou des co-dominances (co-expression de deux gènes mutés donnant un phénotype intermédiaire). De nombreuses maladies génétiques sont aussi multifactorielles, associant une base génétique simple ou complexe et une composante environnementale plus ou moins forte (exemple de facteurs environnementaux récurrents intervenant dans l'apparition de certains cancers).

Chez le chien, on observe beaucoup de maladies génétiques récessives ; en effet, compte tenu de la consanguinité importante, les mutations se retrouvent souvent à l'état homozygote et donc, les maladies récessives qui s'expriment peu dans des populations brassées, s'expriment plus fréquemment dans des isolats génétiques. Avec un mode de transmission monogénique, la maladie peut être dominante (un seul des deux allèles du gène responsable est muté et le chien est atteint, il n'y a donc pas de porteurs sains). La maladie peut être récessive (les deux allèles du gène responsable doivent porter la mutation pour que le chien soit atteint, les chiens ayant un seul allèle muté sont dits « porteurs »).

Après cette étape, les expériences génétiques visant à rechercher le gène responsable d'une affection héréditaire sont nombreuses et le choix de l'une ou de l'autre se fera en fonction du mode de transmission de la maladie, de l'accès ou non à des pedigrees complets ou à des chiens atteints et sains non apparentés, ou encore de la physiopathologie de la maladie, de la connaissance ou non de gènes candidats... Ainsi, avant de prévoir une étude génétique, il faut avoir une bonne connaissance de la clinique et de la physiopathologie de la maladie, ainsi

Protocole des prélèvements nécessaires pour les recherches génétiques sur la kératodermie naso-plantaire. Il est à noter que ce protocole (prélèvement sanguin et copie du pedigree) peut être envoyé pour la recherche génétique d'autres maladies héréditaires.

Travail de recherche :

- Dr Catherine André, CNRS Rennes, Tél. : 02 23 23 45 09, Fax : 02 23 23 44 78, catherine.andre@univ-rennes1.fr
Laboratoire de "Génétique et Développement", UMR 6061 CNRS/Université de Rennes1, Faculté de Médecine, 2, avenue du Professeur Léon Bernard, 35043 RENNES Cedex.
- Dr Emmanuel Bensignor, Dr Éric Guaguère, vétérinaires dermatologues,
- Dr Anne Thomas, Laboratoire ANTAGENE, Lyon, Club du Dogue de Bordeaux.

Dans le cadre du travail de recherche sur les causes génétiques de la kératodermie naso-plantaire chez le Dogue de Bordeaux, nous souhaiterions recueillir :

- une copie du pedigree du chien,
- cinq ml de sang sur anticoagulant (EDTA K3-tube à bouchon mauve) (bien mélanger le tube par retournement pour éviter la coagulation du sang). Noter le nom du chien,
- des biopsies de coussinets (et truffe si possible) atteints et normaux pour étudier l'expression anormale de la kératine (au niveau de l'ARN), lors de la taille de l'excès de corne :
 1. effectuer un prélèvement de peau atteinte, juste en dessous de l'excès de corne (< 1 cm³). Couper en deux fragments et mettre l'un dans un tube contenant la solution RNA-later, l'autre dans le formol comme pour les analyses histologiques ;
 2. effectuer un prélèvement de peau saine, dans les mêmes conditions.

Noter sur les tubes le type de prélèvement (normal, atteint), le nom du chien et la date.

LA SOLUTION PEUT ÊTRE STOCKÉE À TEMPÉRATURE AMBIANTE PLUSIEURS MOIS ; DÈS LE PRÉLÈVEMENT EFFECTUÉ, L'ENVOYER LE PLUS VITE POSSIBLE ; MANIPULER AVEC DES GANTS.

Dès les prélèvements effectués, envoyer rapidement :

- les tubes « RNA-later » au CNRS à température ambiante, par la poste (colissimo ou distingo),
- les tubes « formol » à votre laboratoire d'histopathologie habituel.

Les frais d'envois et/ou de prélèvement peuvent être à la charge du CNRS ; dans ce cas, veuillez établir une facture au nom du CNRS UMR 6061 et fournir un RIB du vétérinaire.

Nous vous remercions beaucoup de votre collaboration. N'hésitez pas à nous contacter pour tout renseignement complémentaire.

toses acquises lors du développement fœtal. Les génodermatoses héréditaires, en général spécifiques d'une ou plusieurs races, constituent de bons modèles de pathologie comparés en dermatologie humaine.

Nous avons localisé de nombreux gènes impliqués dans le développement de la peau sur les chromosomes canins, ceux codant les kératines, laminines, collagènes... Ils appartiennent à de grandes familles de gènes souvent rassemblés en groupe sur les chromosomes. Ainsi par exemple, une vingtaine de gènes codent les kératines (kératines acides, neutres et basiques), ils sont répartis en deux groupes situés sur les chromosomes CFA9 et CFA27 (CFA pour *Canis Familiaris*) (Guyon *et al.* 2003 ; Crédille *et al.* 2005). Ils constituent autant de candidats pour différentes génodermatoses et la connaissance de leur localisation chromosomique est importante dans le processus d'identification des gènes responsables des génodermatoses. Nous avons aussi localisé les gènes des laminines 5 (LAMA3, LAMB3 et LAMC2) sur le chromosome CFA7 (**figure 1**) (Capt *et al.* 2003), ainsi que ceux des collagènes (Lowe *et al.* 2003). Une mutation du gène LAMA3 a été montrée responsable de l'épidermolyse bulleuse jonctionnelle (EBJ) chez le Braque allemand (Spirito *et al.* 2006) et un test génétique a été mis au point et est proposé par le Laboratoire Labogena. Chez l'Homme, cette génodermatose est due, dans la plupart des cas examinés, à des mutations dans le gène LAMC2 (Nakano *et al.* 2002).

LA KÉRATODERMIE NASO-PLANTAIRE DU DOGUE DE BORDEAUX

Dans la suite de ce texte, nous exposerons les méthodes génétiques d'identification de gènes en nous focalisant sur la kératodermie naso-plantaire chez le Dogue de Bordeaux. On trouvera, dans l'encadré, le protocole de prélèvements pour les recherches génétiques sur cette génodermatose.

La mise en évidence du gène et des mutations impliquées dans cette affection génétique revêt plusieurs aspects qui sont : la caractérisation clinique précise de la maladie, une approche histologique pour mieux définir la physiopathologie et une approche génétique pour identifier le mode de transmission, le ou les gènes impliqués et les mutations causales.

Diagnostic clinique de la kératodermie naso-plantaire du Dogue de Bordeaux (KNP)

Cette affection dermatologique touche de façon spécifique le Dogue de Bordeaux ; le nombre de chiens atteints est estimé à plus de 1 % de l'effectif de la race. Il risque d'augmenter rapidement compte tenu des pratiques d'élevage et de la popularité de la race. Le chiot présente les premiers symptômes entre quatre et neuf mois, qui sont une hyper-kératinisation des coussinets et/ou de la truffe. Le traitement est symptomatique et consiste à couper l'excès de corne (**figure 2**).



Figure 2 : Clichés de coussinets (A) et de truffes (B et C) de Dogues de Bordeaux atteints de kératodermie naso-plantaire (Clichés Dr Éric Guaguère).

Physiopathologie

Des analyses histopathologiques avec immuno-marquages sont prévues pour déterminer les protéines sur-exprimées dans cet excès de corne; ces travaux permettront de mieux caractériser l'affection sur le plan physiopathologique et pourront orienter la recherche des gènes en cause, en indiquant des gènes candidats et/ou des voies métaboliques à explorer.

Recherches génétiques

Un pedigree de plus de 100 chiens, contenant une vingtaine de chiens atteints de KNP et leurs apparentés, sains, atteints ou porteurs, a été constitué grâce à l'implication du Club SADB (Société des Amateurs des Dogues de Bordeaux) et de nombreux éleveurs. Son analyse montre une transmission familiale de type récessif, probablement monogénique et autosomique. La collecte des prélèvements (frottis buccaux ou prélèvements sanguins) est encore en cours, afin d'obtenir une grande famille apportant le plus possible d'informations sur le plan généalogique et clinique. Les ADN ont été extraits à partir des prélèvements sanguins ou buccaux fournis et les analyses génétiques sont commencées pour rechercher la région du génome contenant le gène défectueux.

Deux approches complémentaires de biologie moléculaire seront effectuées: d'une part, l'analyse d'un ensemble de marqueurs microsatellites polymorphes bien répartis sur tous les chromosomes, d'autre part, l'analyse de gènes candidats précédemment définis. Lors de travaux préliminaires, la kératine 9 avait été suspectée, puis éliminée; d'autres gènes candidats sont à l'étude, soit ceux codant des kératines, soit des gènes régulateurs de l'expression de ces kératines ou encore, des gènes impliqués dans des kératodermies humaines.

CONCLUSION

Cette affection chez le Dogue de Bordeaux pourrait représenter un bon modèle en dermatologie comparée pour les kératodermies palmo-plantaire humaines. Si les bases génétiques identifiées chez le chien sont nouvelles, nous aurons découvert des gènes candidats nouveaux pour les kératodermies homologues humaines. Si elles concernent des gènes déjà identifiés chez l'homme, ces travaux permettront de mettre en place rapidement un test génétique de diagnostic et de dépistage chez le chien, mais également d'envisager des recherches thérapeutiques communes chez le chien et l'homme (médicamenteuses, cellulaires ou géniques).

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient la Société des Amateurs de Dogues de Bordeaux (SADB) pour son implication et son aide importante dans le projet, ainsi que les nombreux éleveurs et vétérinaires ayant fourni des prélèvements et les informations cliniques. Ce projet de recherche est financé par le CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique) et par la SCC (Société Centrale Canine).

BIBLIOGRAPHIE

- André, C. & Galibert F. 2005. La génétique canine: Intérêt en Médecine Vétérinaire et humaine. *Bull Acad Vet France* 158 (4): 467–477.
- André, C., Vilboux, T., Chaudieu, G., Bolze, B., Queney, G., Thomas, A., Mailliet, E., Delattre, D., Galibert, F. 2005. Atrophie progressive de la rétine chez le cocker anglais. *Le Point Vétérinaire*, août–sept 2005 : 258.)
- Capt, A., Spirito, F., Guyon, R., André, C., Ortonne, J.-P., Meneguzzi, G. 2003. Cloning of laminin gamma2 cDNA and chromosome mapping of the genes for the dog adhesion ligand laminin 5. *Biochem Biophys Res Commun.* 312 (4): 1256–1265.
- Credille, K.M., Guyon, R., André, C., Murphy, K., Tucker, K., Barnhart, K.F., Dunstan, R.W. 2005. Comparative sequence analysis and radiation hybrid mapping of two epidermal type II keratin genes in the dog: keratin 1 and keratin 2. *Cytogenet Genome Res.* 108 (4): 328–332.
- Spirito, F., Capt, A., Del Rio, M., Larcher, F., Guaguère, E., Danos, O., Meneguzzi, G. 2006. Sustained phenotypic reversion of junctional epidermolysis dog keratinocytes. establishment of an immunocompetent animal model for cutaneous gene therapy. *Biochemical and Physical Research Communications* 339: 769–778.
- Galibert, F., André, C., Hitte, C. 2004. Le chien, un modèle pour la génétique des mammifères. [Dog as a mammalian genetic model]. *Méd Sci. (Paris)*, 20 (8-9): 761–766.
- Galibert, F. & André, C. 2006a. The dog and its genome. *Méd Sci. (Paris)*. 22 (10): 806–808.
- Galibert, F., & André, C., 2006b. The dog: a powerful model for studying genotype-phenotype relationships. In *Comparative physiology and biochemistry* (ed. P. Prunet), in press. Elsevier, New York.
- Galibert, F. & André, C. 2006c. The dog genome. In *Vertebrate Genome* (ed. J. N. Volff), *Genome dynamics*, Vol 2, pp. 46–59. Karger, Basel.
- Hédan, B., Corre, S., Hitte, C., Dréano, S., Vilboux, T., Derrien, T., Denis, B., Galibert, F., Galibert, M.D., André, C. 2006. Coat colour in dogs: identification of the Merle locus in the Australian shepherd breed. *BMC Vet Res.* 2: 9.
- Hitte, C., Madeoy, J., Kirkness, E. F., Priat, C., Lorentzen, T. D., Senger, F., Thomas, D., Derrien, T., Ramirez, C., Scott, C. et al. 2005. Facilitating Genome Navigation: Survey Sequencing and Dense Radiation Hybrid Gene Mapping, *Nature Reviews Genetics* 6: 643–648.
- Lindblad-Toh, K., Wade, C.M., Mikkelsen, T.S., Karlsson, E.K., Jaffe, D.B., Kamal, M., Clamp, M., Chang, J.-L., Kulbokas, E.J., Zody, M.C. et al. 2005. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the Domestic Dog. *Nature* 438 (7069): 803–819.
- Lowe, J.K., Guyon, R., Cox, M.L., Mitchell, D.C., Lonkar, A.L., Lingaas, F., André, C., Galibert, F., Ostrander, E.A., Murphy, K.E. 2003. Radiation hybrid mapping of the canine type I and type IV collagen gene subfamilies. *Funct Integr Genomics* 3 (3): 112–116.
- Nakano, A., Chao, S.C., Pulkkinen, L., Murrell, D., Bruckner-Tuderman, L., Pfindner, E., Uitto, J. 2002. Lamnin5 mutations in junctional epidermolysis bullosa: molecular basis of Herlitz vs. Non-Herlitz phenotypes. *Hum Genet.* 110: 41–51.
- Spirito, F., Capt, A., Del Rio, M., Larcher, F., Guaguère, E., Danos, O., Meneguzzi, G. 2006. Sustained phenotypic reversion of junctional epidermolysis dog keratinocytes. establishment of an immunocompetent animal model for cutaneous gene therapy. *Biochemical and Physical Research Communications* 339: 769–778.