

COMMUNICATION

Modèles spontanés de maladies humaines chez le chien : exemple des ichtyoses

Spontaneous models of human diseases in dogs: ichthyoses' example

Catherine ANDRÉ *, Anaïs GRALL *, Éric GUAGUERE **,
Anne THOMAS ***, Francis GALIBERT *.

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêt en relation avec le contenu de cet article.

RÉSUMÉ

Les ichtyoses sont des troubles génétiques de la cornéogénèse caractérisés par la présence de squames sur la totalité du corps et par la précocité de leur apparition. Pour ce groupe hétérogène de maladies de la différenciation des kératinocytes, une quarantaine de gènes a déjà été identifiée, mais ne rendent pas compte de toutes les formes cliniques d'ichtyose. Cette maladie est observée chez l'Homme et le Chien. Certaines formes, comme l'ichtyose vulgaire, sont fréquentes chez l'Homme alors que d'autres sont rares ; toutes ces formes présentent des causes génétiques variées, difficiles à mettre en évidence chez l'Homme. En revanche, chez le chien, chaque forme atteint de façon quasi-spécifique, une race canine, et présente des caractéristiques cliniques et histologiques spécifiques. Nous nous sommes intéressés à l'ichtyose du Golden retriever, forme caractérisée récemment sur les plans clinique et histopathologique. Après avoir déterminé le mode de transmission de la maladie, et réalisé une analyse génétique d'association, par comparaison des génomes de 20 chiens atteints et de 20 chiens indemnes, grâce à l'utilisation de puces de génotypage 49.000 SNPs (Affymetrix v2), nous avons pu mettre en évidence une mutation dans un nouveau gène codant une lipase PNPLA1. Après nous être assurés de la causalité de l'altération de ce gène dans l'ichtyose du Golden retriever, nous avons démontré que ce nouveau gène était

* CNRS, UMR 6061, Institut de Génétique et Développement de Rennes ; Université Rennes 1, UEB, IFR 140, Faculté de Médecine, Rennes.

** Clinique vétérinaire Saint Bernard, Lomme, France.

*** Antagene, Animal Genetics Laboratory, La Tour de Salvagny, France.

Tirés à part : Professeur Catherine ANDRÉ, Equipe génétique du Chien — Institut de génétique et développement de Rennes (IGDR), UMR 6290 CNRS/Université Rennes 1-2 avenue Léon Bernard — 35043 Rennes Cedex.

Article reçu le 27 juillet 2014

également muté dans l'ichtyose lamellaire humaine (de type ARCI — Icthyose Autosomique Congénitale Récessive), par la mise en évidence de mutations de PNPLA1 dans deux familles humaines atteintes d'ARCI, sur les 10 familles analysées. La collaboration entre généticiens, médecins, histopathologistes humains et vétérinaires biochimistes et structuralistes a ensuite permis de décrypter la fonction de PNPLA1 dans les kératinocytes de l'épiderme. L'étude de la maladie spontanée chez le Chien, a permis, non seulement de découvrir un huitième gène d'ichtyose de type ARCI chez l'Homme, mais aussi de dévoiler le rôle d'une enzyme spécifique de la barrière cutanée, inconnue à ce jour. Pour la médecine vétérinaire et l'élevage, cette découverte a également permis le développement d'un test génétique pour le diagnostic et le dépistage de cette affection chez le Golden retriever.

Ces travaux montrent donc que l'altération d'un même gène peut provoquer des maladies identiques chez l'Homme et le Chien, dont l'identification est plus aisée chez le Chien, car les races canines représentent de véritables isolats génétiques. Ces travaux démontrent la pertinence de la pathologie comparée pour décrypter les causes génétiques et les mécanismes physiopathologiques de maladies dermatologiques rares ou complexes chez l'Homme mais qui peuvent être fréquentes chez le Chien.

SUMMARY

Ichthyoses encompass a heterogeneous group of genodermatoses characterized by abnormal desquamation over the entire body due to defects of the terminal differentiation of keratinocytes and desquamation, which occur in the upper layer of the epidermis. Even though in humans more than 40 genes have already been identified, the genetic causes of several forms remain unknown and are difficult to identify in Humans. Strikingly, several purebred dogs are also affected by specific forms of ichthyoses. In the Golden retriever dog breed, an autosomal recessive form of ichthyosis, resembling human autosomal recessive congenital ichthyoses, has recently been diagnosed with a high incidence. We first characterized the disease occurring in the golden retriever breed and collected cases and controls. A genome-wide association study on 40 unrelated Golden retriever dogs, using the canine 49.000 SNPs (single nucleotide polymorphisms) array (Affymetrix v2), followed by statistical analyses and candidate gene sequencing, allowed to identify the causal mutation in the lipase coding PNPLA1 gene (patatin-like phospholipase domain-containing protein). Screening for alterations in the human ortholog gene in 10 autosomal recessive congenital ichthyoses families, for which no genetic cause has been identified thus far, allowed to identify two recessive mutations in the PNPLA1 protein in two families. This collaborative work between « human » and « canine » geneticists, practitioners, histopathologists, biochemists and electron microscopy experts not only allowed to identify, in humans, an eighth gene for autosomal recessive congenital ichthyoses, but also allowed to highlight the function of this as-yet-unknown skin specific lipase in the lipid metabolism of the skin barrier. For veterinary medicine and breeding practices, a genetic test has been developed. These findings illustrate the importance of the discovery of relevant human orthologous canine genetic diseases, whose causes can be tracked in dog breeds more easily than in humans. Indeed, due to the selection and breeding practices applied to purebred dogs, the dog constitutes a unique species for unravelling phenotyp/genotype relationships and providing new insights into human genetic diseases. This work paves the way for the identification of rare gene variants in humans that may be responsible for other keratinisation and epidermal barrier defects.

Le projet de recherche « Génétique du chien » a été initié en 1995 par le Professeur Francis Galibert. Ce projet, nouveau dans le laboratoire, nouveau en France et à son tout début aux États-Unis avait pour but de mettre à profit l'histoire génétique unique de l'espèce canine pour identifier les relations phénotype / génotype plus aisément que chez l'Homme et travailler avec le Chien comme un modèle de maladies spontanées pour le Chien lui-même et pour l'Homme. Un travail de dix ans pour acquérir les connaissances nécessaires sur le génome canin — production de marqueurs, cartographie et séquençage — dans lequel notre équipe a été fortement impliqué [13], a permis de faire reconnaître le Chien comme un nouveau modèle génétique, avec maintenant un intérêt tout particulier de cette espèce comme modèle spontané de maladies génétiques humaines [9]. Ainsi depuis les années 2000, nous nous sommes attachés à développer une bio-banque de prélèvements de sang et tissus de chiens, qui soit accessible à tous et corresponde à toutes les maladies génétiques reconnues dans toutes les races de chien (Lagoutte *et al.*, à paraître.). Cette bio-banque a pour objectif de caractériser de nombreux modèles de cancers, de maladies dermatologiques, neuro-sensorielles ou encore d'anomalies du développement, homologues entre le Chien et l'Homme. Les objectifs à court terme sont d'identifier de nouveaux gènes chez les chiens, plus facilement que chez l'Homme, compte tenu du fait que la population canine est organisée en isolats génétiques, et de transférer les connaissances acquises en médecine et génétique humaines pour rechercher si les mêmes voies métaboliques, voire les mêmes gènes sont altérés, pour, à plus long terme, tester des thérapies ciblées et personnalisées.

Exemple de l'ichtyose : pour une forme d'ichtyose touchant spécifiquement les Golden retrievers avec une forte fréquence [12], les études génétiques classiques ont donné rapidement et de manière fiable d'excellents résultats, avec une collaboration tripartite entre le vétérinaire dermatologue (Docteur E. Guaguère), notre équipe et celle du Docteur. J. Fischer (généticienne des ichtyoses humaines). Ce travail collaboratif a permis non seulement l'identification, grâce au Chien, d'un nouveau gène dont des mutations chez l'Homme et chez le Chien sont responsables d'ichtyose, mais encore, la découverte d'un gène (identique chez l'Homme et le Chien) dont la fonction était à ce jour inconnue, et qui apporte de nouvelles connaissances dans la régulation de la barrière cutanée [10].

1. Identification d'une cause génétique de l'ichtyose chez le chien : suite à la description de la maladie apparue récemment chez le Golden retriever [2, 12, 15], la collecte de 150 prélèvements sanguins et d'échantillons de peaux de chiens a été réalisée. La sélection et le génotypage de 40 ADN de chiens (20 atteints d'ichtyose et 20 indemnes), au Centre National de Génotypage, Evry, en vue d'une analyse génétique d'association, a permis l'identification d'une région génomique assez petite, permettant une approche « gène candidat », c'est à dire permettant de sélectionner quelques gènes dans la région d'intérêt qui présentent une fonction, en adéquation avec la pathologie [14, 5, 1]. Les tests statistiques ont montré la puissance du résultat et les marqueurs donnant les valeurs statistiques les plus fortes ont permis de circonscrire une région de 2 Mbases. Un « gène candidat »

PNPLA1, a été séquencé dans ses régions exoniques (méthode Sanger) et une mutation de type insertion/délétion de 5 bases, décalant le cadre de lecture a été identifiée. Cette mutation ségréguant parfaitement selon un mode autosomique récessif chez 260 chiens Golden retrievers, en plus des 40 Golden retrievers analysés au départ. Cette mutation n'ayant jamais été retrouvée chez 250 chiens d'autres races, nous avons émis l'hypothèse que cette mutation était spécifique des Golden retrievers et fortement liée à la maladie [10].

2. Recherche de l'implication de ce gène chez des patients atteints d'ichtyose. En effet, à ce jour un quarantaine de gènes ont été identifiés comme impliqués dans des formes d'ichtyoses humaines différentes, mais tous ces gènes n'expliquent pas toutes les formes cliniques d'ichtyose [5-7]. En collaboration avec le docteur J. Fischer de l'Université de Fribourg, nous avons recherché si ce gène était muté chez des patients atteints d'ichtyose pour lesquels les causes génétiques n'étaient pas encore connues. Suite au séquençage du gène chez des patients, le docteur Fischer a effectivement mis en évidence des familles portant cette mutation soit à l'état hétérozygote chez des personnes non atteintes, soit à l'état homozygote chez les patients. Cette « découverte » chez le Chien, a permis d'identifier un nouveau gène responsable d'ichtyose autosomique récessive congénitale (ARCI) chez l'Homme, mais a également permis l'annotation fonctionnelle (la correspondance entre un gène et sa fonction) d'un gène dont la fonction était encore inconnue et qui s'avère de première importance dans le maintien de la barrière cutanée.
3. Valorisation de ces résultats. Ces travaux ont donné lieu au dépôt d'un brevet international en novembre 2009, par le CNRS et l'Université de Rennes 1, qui a été délivré le 27 juin 2014 (Brevet européen (Euro/PCT) EUROPE No.2501825). Une licence internationale a été octroyée à la société Antagene (Lyon) qui a développé un test génétique de dépistage, mis à la disposition des vétérinaires et des éleveurs soucieux de diminuer l'incidence de la maladie dans la race. D'autres formes d'ichtyose affectant spécifiquement certaines races canines ont déjà été identifiées chez le chien [3, 4, 8] et d'autres sont en cours d'étude, des prélèvements sont actuellement collectés et en cours d'analyse au laboratoire ou en collaboration.

Cet exemple démontre la puissance du modèle canin, dans une situation où une maladie affecte particulièrement une race de chien, conséquence de pratiques d'élevage ayant « amplifié » la fréquence de l'allèle muté et la prévalence de l'affection dans la race. Dans le cas de l'ichtyose, cette maladie non mortelle n'a pas fait l'objet d'une contre-sélection par les éleveurs et l'allèle muté a été largement distribué dans cette race. Homologue d'une maladie humaine rare, cette forme d'ichtyose chez le Chien a permis la découverte d'un nouveau gène d'ichtyose chez l'Homme et d'une nouvelle fonction de la lipase *PNPLA1* dans la barrière cutanée.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BAULANDE S., LANGLOIS C. — Proteins sharing PNPLA domain, a new family of enzymes regulating lipid metabolism. *Med Sci (Paris)*, 2010, 26, 177-84.
- [2] CADIERGUES M.C. *et al.* — Cornification defect in the golden retriever: clinical, histopathological, ultrastructural and genetic characterisation. *Vet. Dermatol.*, 2008, 19, 120-9.
- [3] CREDILLE K.M., BARNHART K.F., MINOR J.S., DUNSTAN R.W. — Mild recessive epidermolytic hyperkeratosis associated with a novel keratin 10 donor splice-site mutation in a family of Norfolk terrier dogs. *Br. J. Dermatol.*, 2005, 153, 51-8.
- [4] CREDILLE K.M. *et al.* — Transglutaminase 1-deficient recessive lamellar ichthyosis associated with a LINE-1 insertion in Jack Russell terrier dogs. *Br. J. Dermatol.*, 2009, 161, 265-72.
- [5] FISCHER J. *et al.* — The gene encoding adipose triglyceride lipase (PNPLA2) is mutated in neutral lipid storage disease with myopathy. *Nat. Genet.*, 2009, 39, 28-30.
- [6] FISCHER J. — Autosomal recessive congenital ichthyosis. *J. Invest. Dermatol.*, 2009, 129, 1319-21.
- [7] OJI V. *et al.* — Revised nomenclature and classification of inherited ichthyoses: results of the First Ichthyosis Consensus Conference in Soreze 2009. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2010, 63, 607-41.
- [8] FORMAN O.P., *et al.* — Parallel mapping and simultaneous sequencing reveals deletions in BCAN and FAM83H associated with discrete inherited disorders in a domestic dog breed. *PLoS Genet.*, 2012, 8(1).
- [9] GALIBERT F., ANDRÉ C. — The dog: A powerful model for studying genotype-phenotype relationships. *Comp. Biochem. Physiol. Part D. Genomics. Proteomics*, 2008, 3, 67-77.
- [10] GRALL A., GYAGUÈRE E., PLANCHAIS S., GROND S., BOURRAT E., HAUSSER I., HITTE C., *et al.* — PNPLA1 mutations cause autosomal recessive congenital ichthyosis in golden retriever dogs and humans. *Nat. Genet.*, 2012, 44, 140-7.
- [11] GUAGUÈRE E., BENSIGNOR E., MULLER A., DEGORCE-RUBIALES F., ANDRÉ C. — Epidemiological, clinical, histopathological and ultrastructural aspects of ichthyosis in golden retrievers: a report of 50 cases. *Veterinary Dermatology*, 2007, 18, 382-383.
- [12] GUAGUÈRE E. *et al.* — Clinical, histopathological and genetic data of ichthyosis in the golden retriever: a prospective study. *J. Small Anim. Pract.*, 2009, 50, 227-35.
- [13] HITTE C., *et al.* — Facilitating genome navigation: survey sequencing and dense radiation-hybrid gene mapping. *Nat. Rev. Genet.*, 2005, 6(8), 643-8.
- [14] LEFEVRE C. *et al.* — Mutations in CGI-58, the gene encoding a new protein of the esterase/lipase/thioesterase subfamily, in Chanarin-Dorfman syndrome. *Am. J. Hum. Genet.*, 2001, 69, 1002-12.
- [15] MAULDIN E.A., CREDILLE K.M., DUNSTAN R.W., CASAL M.L. — The clinical and morphologic features of nonepidermolytic ichthyosis in the golden retriever. *Vet. Pathol.*, 2008, 45, 174-80.

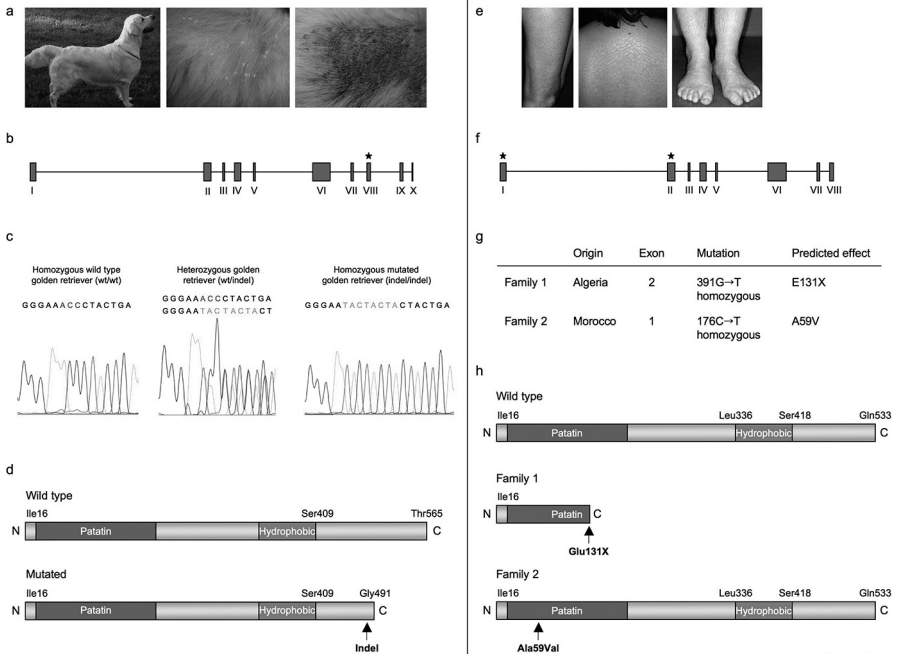


FIG. 1. — Illustration des homologies clinique et génétique de cette forme d'ichtyose (ARCI) chez le golden retriever et chez l'Homme (a, e) desquamation généralisée à tout le corps chez le chien et les patients, avec des squames blanches à grisâtres. (b, f) Structure du gène *PNPLA1* chez le chien et l'Homme (10 exons chez le chien et 8 exons chez l'Homme). (c, g) illustration des mutations trouvées chez le chien (mutation indel complexe dans l'exon 8, indiqué par une étoile) et chez l'Homme (2 mutations ponctuelles différentes, une par famille : l'une dans l'exon 1, entraînant un codon stop dans la famille 1 et l'autre dans l'exon 2, causant un changement d'acide aminé dans la famille 2). (d, h) structure prédite de la protéine normale *PNPLA1* chez le Chien et chez l'Homme indiquant en gris le domaine fonctionnel de cette lipase (domaine patatin) et structure prédite des protéines mutées chez le Golden retriever et dans les 2 familles humaines. Le consentement des patients, chiens et hommes, ont été obtenus pour les individus photographiés.