

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE, AGROALIMENTAIRE
ET DE L'ALIMENTATION NANTES ATLANTIQUE - ONIRIS

ANNÉE 2018

RECHERCHE DE CAUSES GÉNÉTIQUES IMPLIQUÉES DANS LA GLOMÉRULOPATHIE FAMILIALE DU DOGUE DE BORDEAUX

THÈSE
pour le
diplôme d'État
de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

présentée et soutenue publiquement
le 19 novembre 2018
devant
la Faculté de Médecine de Nantes
par

Marina, Gisèle, Elodie MARQUIS

Née le 13 juillet 1989 à Saint-Cloud (92)

JURY

Président : Monsieur Cédric LE CAIGNEC, Professeur à la Faculté de Médecine, Nantes
Rapporteur : Monsieur Jean-Claude DESFONTIS, Professeur à ONIRIS, Nantes
Assesseur : Monsieur Lionel MARTIGNAT, Professeur à ONIRIS, Nantes
Membre invité : Madame Pascale QUIGNON, Maître de conférence à
l'Université de Rennes 1, UMR6290

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE, AGROALIMENTAIRE
ET DE L'ALIMENTATION NANTES ATLANTIQUE - ONIRIS

ANNÉE 2018

RECHERCHE DE CAUSES GÉNÉTIQUES IMPLIQUÉES DANS LA GLOMÉRULOPATHIE FAMILIALE DU DOGUE DE BORDEAUX

THÈSE
pour le
diplôme d'État
de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

présentée et soutenue publiquement
le 19 novembre 2018
devant
la Faculté de Médecine de Nantes
par

Marina, Gisèle, Elodie MARQUIS

Née le 13 juillet 1989 à Saint-Cloud (92)

JURY

Président : Monsieur Cédric LE CAIGNEC, Professeur à la Faculté de Médecine, Nantes
Rapporteur : Monsieur Jean-Claude DESFONTIS, Professeur à ONIRIS, Nantes
Assesseur : Monsieur Lionel MARTIGNAT, Professeur à ONIRIS, Nantes
Membre invité : Madame Pascale QUIGNON, Maître de conférence à
l'Université de Rennes 1, UMR6290

Département BPSA Biologie, Pathologie et Sciences de l'Aliment

Responsable : **Carole PROST** - Adjoint : **Jean-Claude DESFONTIS**

Nutrition et Endocrinologie	Patrick NGUYEN* (Pr) Henri DUMON (Pr)	Lucile MARTIN (Pr)
Pharmacologie et Toxicologie	Hervé POULIQUEN* (Pr) Martine KAMMERER (Pr) Julie DUVAL (MCC)	Yassine MALLEM (MC HDR) Jean-Claude DESFONTIS (Pr)
Physiologie fonctionnelle, cellulaire et moléculaire	Lionel MARTIGNAT (Pr) Jean-Marie BACH (Pr)	Grégoire MIGNOT (MC) Julie HERVE (MC)
Histologie et anatomie pathologique	Jérôme ABADIE* (MC) Frédérique NGUYEN* (MC) Laetitia JAILLARDON* (MC)	Marie-Anne COLLE* (Pr)
Pathologie générale, microbiologie et immunologie	Jean-Louis PELLERIN (Pr) Hervé SEBBAG (MC)	Emmanuelle MOREAU (MC) François MEURENS (Pr)
Biochimie alimentaire industrielle	Thierry SEROT (Pr) Joëlle GRUA (MC) Laurent LE THUAUT (MC) Clément CATANEO (MC)	Carole PROST (Pr) Florence TEXIER (MC) Mathilde MOSSER (MC)
Microbiologie alimentaire industrielle	Nabila BERREHRAH (MC) Bernard ONNO (MC) Emmanuel JAFFRES (MC)	Hervé PREVOST (Pr) Bénédicte SORIN (IE) Géraldine BOUE (MCC)

Département SAESP Santé des Animaux d'Élevage et Santé Publique

Responsable : **Alain CHAUVIN** - Adjoint : **Raphaël GUATTEO**

Hygiène et qualité des aliments	Michel FEDERIGHI (Pr) Bruno LE BIZEC (Pr) Catherine MAGRAS* (Pr) Fanny RENOIS -MEURENS (MC)	Eric DROMIGNY (MC HDR) Marie-France PILET (Pr) Jean-Michel CAPPELIER* (Pr)
Médecine des animaux d'élevage	Alain DOUART (MC) Catherine BELLOC* (Pr) Isabelle BREYTON (MC) Mily LEBLANC MALIDOR (MCC)	Christophe CHARTIER* (Pr) Sébastien ASSIE* (MC) Raphaël GUATTEO* (Pr)
Parasitologie, Aquaculture, Faune Sauvage	Alain CHAUVIN* (Pr) Albert AGOULON (MC) Suzanne BASTIAN (MC)	Guillaume BLANC (MC) Ségolène CALVEZ (MC)
Maladies réglementées, zoonoses et réglementation sanitaire	Nathalie RUVOEN* (Pr) Carole PEREZ (MC)	
Zootecnie	Aurélien MADOUASSE (MC) Nora NAVARRO-GONZALES (MCC) François BEAUDEAU* (Pr)	Christine FOURICHON* (MC HDR) Nathalie BAREILLE* (Pr)

Département DSC Sciences cliniques

Responsable : **Anne COUROUCE-MALBLANC** - Adjoint : **Olivier GAUTHIER**

Anatomie comparée	Claire DOUART (MC) Eric BETTI (MC)	Claude GUINTARD (MC)
Pathologie chirurgicale et anesthésiologie	Olivier GAUTHIER (Pr) Caroline TESSIER* (MC) Eric GOYENVALLE (MC)	Béatrice LIJOUR (MC) Eric AGUADO (MC HDR) Gwénola TOUZOT-JOURDE* (MC)
Dermatologie, parasitologie des carnivores et des équidés, mycologie	Patrick BOURDEAU* (Pr)	Vincent BRUET* (MC)
Médecine interne, imagerie médicale et législation professionnelle vétérinaire	Marion FUSELLIER (MC) Dominique FANUEL (Pr) Catherine IBISCH (MC) Françoise ROUX* (MC HDR) Anne COUROUCE* (Pr)	Jack-Yves DESCHAMPS (Pr) Odile SENECA (MC) Nicolas CHOUIN (MC) Amandine DRUT (MCC)
Biotechnologies et pathologie de la reproduction	Jean-François BRUYAS* (Pr) Francis FIENI* (Pr)	Lamia BRIAND (MC HDR) Djemil BENCHARIF (MC HDR)

Département GPA Génie des procédés alimentaires

Responsable : **Olivier ROUAUD** - Adjoint : **Sébastien CURET-PLOQUIN**

Lionel BOILLEREAUX (Pr) Sébastien CURET PLOQUIN (MC) Marie DE LAMBALLERIE (Pr) Dominique DELLA VALLE (MC) Francine FAYOLLE (Pr) Michel HAVET (Pr) Vanessa JURY (MC)	Alain LEBAIL (Pr) Catherine LOISEL (MC) Jean-Yves MONTEAU (MC) Denis PONCELET (Pr) Laurence POTTIER (MC) Olivier ROUAUD (MC HDR) Cyril TOUBLANC (MC) Emilie KORBEL (MCC)
---	---

Département MSC Management, statistiques et communication

Responsable : **Sibylle DUCHAINE** - Adjointe : **Samira ROUSSELIERE**

Mathématiques, Statistiques, Informatique	Véronique CARIOU (MC) Philippe COURCOUX (MC) El Mostafa QANNARI (Pr)	Michel SEMENOU (MC) Chantal THORIN (Pr Ag.) Evelyne VIGNEAU (Pr)
Economie, gestion	Pascal BARILLOT (MC) Florence BEAUGRAND (MC) Sibylle DUCHAINE (MC)	Jean-Marc FERRANDI (Pr) Samira ROUSSELIERE (MC) Sonia EL MAHJOUB (MC)
Langues et communication	Franck INSIGNARES (IE) Linda MORRIS (PCEA) David GUYLER (Ens. cont.)	Marc BRIDOU (PLPA) Fabiola ASENSIO (PCEA) Shaun MEEHAN (Ens. cont.)

Enseignants BTS: Françoise BRICHET, Christophe CARON, Aurélie DENYS, Pascale FLEURY, Laurence FRERET, Virginie MAGIN Pr émérite : Xavier DOUSSET

En date du 25 janvier 2018

Guide de lecture des tableaux :

Pr : Professeur, Pr. Ag: Professeur agrégé. MC : Maître de Conférences, MCC : Maître de Conférences contractuel PLEA : Professeur Lycée Enseignement Agricole, PCEA : Professeur certifié enseignement agricole, HDR : Habilité à diriger des recherches, IE : Ingénieur d'études; Ens.cont.:enseignant contractuel;

* Vétérinaire spécialiste d'une spécialité européenne, américaine ou française.

La reproduction d'extraits de cette thèse est autorisée avec mention de la source. Toute reproduction partielle doit être fidèle au texte utilisé. Cette thèse devra donc être citée comme suit :

MARQUIS M. (2018). Recherche de causes génétiques impliquées dans la glomérulopathie familiale du Dogue de Bordeaux. Thèse de doctorat vétérinaire, Faculté de Nantes. Oniris : Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'alimentation Nantes Atlantique, 142p.

REMERCIEMENTS

A Monsieur Cédric Le Caignec

Professeur de la Faculté de Médecine de Nantes,

Qui nous fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,
Hommages respectueux.

A Monsieur Jean-Claude Desfontis

Professeur à ONIRIS, Nantes

Qui nous a fait l'honneur d'encadrer ce travail et de participer à notre jury de thèse,
Pour ses conseils,
Sincères remerciements.

A Monsieur Lionel Martignat

Professeur à ONIRIS, Nantes

Pour avoir accepté de participer au jury de cette thèse,
Sincères remerciements.

A Madame Pascale Quignon

Maître de conférence à l'Université de Rennes 1, UMR6290

Pour les explications sur les outils génétiques, les nombreuses corrections et le temps passé à l'élaboration de ce travail.
Mes plus vifs remerciements et profonde reconnaissance.

A Catherine André

Pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse.

A Maud

Pour le temps que tu as consacré à m'aider, pour ta disponibilité et ta gentillesse.

A Céline

Pour ton accueil chaleureux, ta générosité et tes délicieux gâteaux.

A Nadine

Pour ta bonne humeur perpétuelle, et pour m'avoir fait découvrir Cani-DNA.

A Aline

Pour nos moments de partage.

A Edouard

Pour tes conseils en informatique.

**Aux Stéphanes, à Benoît, Stéphanie, Solenne, Anaïs et l'ensemble de l'équipe
« Génétique du chien »**

Qui m'ont accueillie si chaleureusement au sein de l'unité.

A Cynthia, Caroline et toute la famille Adjanooun

Pour votre accueil au sein de votre foyer. Vous m'avez permis de me loger sereinement sur Rennes.

A Catherine Belloc

Pour m'avoir accompagnée en tant que tutrice tout au long de ma scolarité à ONIRIS,
Pour votre disponibilité et votre soutien lorsque j'étais en difficulté.

A Manuel Comte

Pour ta bonne humeur et ta générosité.

A Philippe Maroille

Pour m'avoir fait découvrir le métier de vétérinaire.

Aux Sexcas/ Piñatas

Pour tous ces bons moments passés ensemble.

A Bérengère

Pour ces soirées entre copines chez toi, et pour ta merveilleuse coque de portable.

A Aurélie

Pour nos fous-rires, nos délires, nos soirées Monopoly, nos virées Ikea, et pour ton aide lorsque mon vélo était au plus mal.

A Marjolaine

Pour notre amitié qui perdure.

Aux Thrombis, pour votre soutien et votre amitié, pour ces moments inoubliables passés ensemble, et sans qui ces années en clinique n'auraient pas été les mêmes.

A Marion, Justine, et Fiona

Pour cette quatrième année et ces bons souvenirs que l'on a partagés.

A Laure

Pour ton rire communicatif et nos regards complices.

A Manon

Pour ton sourire lumineux, et pour m'avoir fait redécouvrir le plaisir des jeux de société.

A Sophie

Pour toutes ces années traversées ensemble, ces séances de révisions à la B.U., chez toi ou chez moi, ces noëls canadiens, ces soirées jeux, et pour tous ces moments forts que l'on a partagé. On a commencé l'école ensemble et on la finira ensemble.

A Perrine, Marie, Maud, et tout le groupe d'équie

Pour cette cohésion lors de ce mois infernal.

A Célia

Pour toutes ces années d'amitié, et pour nos séances de révision ensemble à la médiathèque de Saint-Cloud (ou dans ta cuisine). Together From Appart !

A Pierre

Pour ton indéfectible amitié malgré tout ce que l'on a traversé, pour nos moments de complicité, pour toutes ces choses que l'on a partagées et que nous sommes les seuls à comprendre.

A mes parents

Pour votre amour, et votre soutien indéfectible depuis le début, sans lesquels je n'aurai pu aller jusqu'au bout. Très tôt, j'ai su que je voulais devenir vétérinaire, et vous m'avez suivie dans cette aventure. La route a été longue et parsemée d'embûches, les obstacles ont été nombreux et difficiles à franchir et pourtant, vous avez continué à m'encourager dans cette voie et à me soutenir en toute circonstance.

A Mélanie

Pour être la sœur exceptionnelle que tu es, pour être toujours là quand il le faut, pour ta fidélité et ton amour, et pour ton petit coup de pouce pour le sommaire.

A Billy et Nicky

Pour avoir égayé ma jeunesse, et renforcé ma vocation.

A mes grand-parents : Granny, Papy, Mamie

Pour tout l'amour que vous m'avez donné.

A Thierry et Françoise, à Olivier et Julie

Pour votre soutien lors de la rédaction de ce manuscrit, pour votre générosité et tous ces bons moments passés ensemble.

A Loïc

Pour ton soutien permanent, qui m'a permis d'aller jusqu'au bout lorsque j'avais envie de baisser les bras, pour être ma bonne conscience qui me rappelle à l'ordre quand je m'égare et le pilier qui me pousse vers le haut quand je tombe, pour ton amour au quotidien, pour ces petits riens qui, sans en avoir l'air, veulent tout dire.

A Mamie
Partie juste avant la fin.

Table des matières

LISTE DES ANNEXES	17
LISTE DES FIGURES	19
LISTE DES TABLEAUX	21
LISTE DES ABREVIATIONS	23
INTRODUCTION	27
PARTIE A : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	29
1. MONOGRAPHIE DE LA RACE DOGUE DE BORDEAUX	30
1.1. <i>Historique</i>	30
1.2. <i>Standard de la race</i>	31
1.3. <i>Dominantes pathologiques</i>	31
1.3.1. Affections dermatologiques	32
1.3.2. Affections ostéo-articulaires	32
1.3.2.1. Dysplasie coxo-fémorale	32
1.3.2.2. Dysplasie du coude	33
1.3.2.3. Polyarthrite	34
1.3.3. Affections cardiaques	34
1.3.3.1. Cardiomyopathie dilatée	35
1.3.3.2. Sténose sous-aortique	35
1.3.4. Affections oculaires	36
1.3.5. Affection rénale	36
2. PHYSIOLOGIE ET PHYSIOPATHOLOGIE RENALE CHEZ LE CHIEN	37
2.1. <i>Rappels d'anatomie</i>	37
2.1.1. Le néphron : unité fonctionnelle du rein	39
2.1.2. Unité de filtration rénale : le glomérule rénal	40
2.1.2.1. Le réseau de capillaires et le mésangium	40
2.1.2.2. La capsule de Bowman	41
2.1.2.2.1. La membrane basale	42
2.1.2.2.2. Les podocytes	43
2.1.2.2.3. Le diaphragme de fente	45
2.2. <i>Physiologie rénale et filtration</i>	46
2.2.1. Mécanismes de la filtration glomérulaire	46
2.2.2. Composition du filtrat glomérulaire	47
2.2.3. Notion de débit de filtration glomérulaire	47
2.2.4. Régulation de la filtration	49
2.2.4.1. Autorégulation du DFG	49
2.2.4.2. Régulation hormonale	50
2.2.5. Exploration fonctionnelle rénale	50
2.2.5.1. Mesure du DFG	50
2.2.5.2. Physiopathologie	51

3. LA GLOMERULOPATHIE FAMILIALE DU DOGUE DE BORDEAUX -----	52
3.1. <i>Etiologie</i> -----	52
3.2. <i>Physiopathologie</i> -----	52
3.3. <i>Formes et signes cliniques</i> -----	52
3.3.1. <i>Forme juvénile</i> -----	53
3.3.2. <i>Forme intermédiaire</i> -----	53
3.3.3. <i>Forme dite « silencieuse » ou asymptomatique</i> -----	53
3.4. <i>Diagnostic</i> -----	53
3.4.1. <i>Paramètres sanguins</i> -----	54
3.4.2. <i>Analyse urinaire</i> -----	54
3.4.3. <i>Echographie rénale</i> -----	54
3.4.4. <i>Aspect macroscopique</i> -----	55
3.4.5. <i>Histologie</i> -----	55
3.4.6. <i>Microscopie électronique</i> -----	57
3.5. <i>Traitement</i> -----	58
3.6. <i>Pronostic</i> -----	59
4. INTÉRÊT DE LA GÉNÉTIQUE CHEZ LE CHIEN -----	60
4.1. <i>Domestication, sélection, structure de l'espèce</i> -----	60
4.2. <i>Intérêt du chien dans la recherche génétique chez l'homme</i> -----	62
4.3. <i>Exemples de maladies canines/humaines</i> -----	66
PARTIE B : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE -----	71
1. PRÉAMBULE -----	72
1.1. <i>Collecte des échantillons</i> -----	72
1.2. <i>Exploitation des prélèvements et synthèse des données récoltées</i> -----	77
1.3. <i>Critères d'inclusion dans l'étude</i> -----	78
1.4. <i>Comparaison des génomes de chiens indemnes et atteints</i> -----	79
1.4.1. <i>Marqueurs SNP ou « Single Nucleotide Polymorphism »</i> -----	79
1.4.2. <i>Puces à ADN</i> -----	79
1.5. <i>Sélection de gènes candidats</i> -----	80
1.6. <i>Exploitation des résultats</i> -----	82
1.6.1. <i>Association génétique : GWAS</i> -----	82
1.6.1.1. <i>Principe et méthode</i> -----	82
1.6.1.2. <i>Représentation des données : le Manhattan plot</i> -----	82
1.6.2. <i>Cartographie par homozygotie ou « homozygosity mapping »</i> -----	83
2. RÉSULTATS -----	86
2.1. <i>Analyse d'un pedigree</i> -----	86
2.2. <i>Etude d'association pangénomique (GWAS)</i> -----	88
2.3. <i>Stratégie des gènes candidats</i> -----	89
2.3.1. <i>Introduction</i> -----	89

2.3.2. Étude des gènes candidats-----	93
2.3.2.1. La néphrine-----	93
2.3.2.2. La podocine -----	95
2.3.2.3. Transient Receptor Potential Channel -----	96
2.3.2.4. CD2-associated Protein (CD2AP) -----	97
2.3.2.5. La phospholipase C epsilon 1-----	97
2.3.2.6. La myosine 1 E -----	98
2.3.2.7. L'α-Actinine 4 (ACTN4/α) -----	98
2.3.2.8. Inverted-Formin 2 (INF2) -----	99
2.3.2.9. La podocalyxine (PODXL) -----	100
2.3.2.10. La laminine β2 (LAMB2) -----	102
2.3.2.11. Wilm Tumor – 1 (WT-1)-----	102
2.3.2.12. Les chaînes α3, 4, et 5 du collagène IV -----	103
2.3.3. Cartographie par recherche d'homozygotie des gènes sélectionnés -----	103
DISCUSSION -----	107
CONCLUSION -----	109
BIBLIOGRAPHIE-----	111
ANNEXES -----	121

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 - Standard de la race présenté tel qu'il a été publié le 4/11/2008 -----	122
Annexe 2 – Valeurs de certains paramètres sanguins chez le Dogue de Bordeaux -----	135
Annexe 3 – Protocole explicatif des prélèvements à faire fourni lors de l'envoi de kits pour inclusion dans l'étude -----	137
Annexe 4 – Questionnaire Clinique fourni lors de l'envoi de kits pour inclusion dans l'étude -----	139

LISTE DES FIGURES

Figure 1 – Illustrations d’un Dogue de Bordeaux-----	31
Figure 2 – Vue latérale droite d’un rein droit entier (A) et en coupe longitudinale (B) de chien -----	38
Figure 3 – Représentation de néphrons en fonction de leur situation dans le rein -----	39
Figure 4 – Représentation d’une coupe longitudinale d’un glomérule rénale -----	40
Figure 5 – Structure d’un capillaire glomérulaire-----	41
Figure 6 – Formation d’un glomérule rénal-----	42
Figure 7 – Observation au microscope électronique au grossissement 80 000 de la membrane basale glomérulaire-----	43
Figure 8 – Observation au microscope électronique de podocytes (en orange), entourant les capillaires glomérulaires (en violet) dans un glomérule rénal humain-----	43
Figure 9 – Représentation 3D d’un podocyte entourant un capillaire glomérulaire -----	44
Figure 10 – Illustration d’un diaphragme de fente-----	45
Figure 11 – Illustration de la barrière de filtration -----	46
Figure 12 – Autorégulation du DFG -----	49
Figure 13 – Aspect macroscopique d’un rein appartenant à un Dogue de Bordeaux atteint de la forme juvénile de la glomérulopathie familiale -----	55
Figure 14 – Aspect histologique (coloration PAS) du cortex rénal (A et B) et d’un glomérule rénal d’un Dogue de Bordeaux atteint de la forme juvénile de la glomérulopathie familiale (C), ainsi que d’un glomérule de chien sain (D) -----	56
Figure 15 – Clichés de microscopie électronique d’une portion de glomérule appartenant à un Dogue de Bordeaux atteint de la forme juvénile de la glomérulopathie familiale (A) comparé à celui d’un chien sain (B)-----	57
Figure 16 – Structure haplotypique du génome canin-----	61
Figure 17 – Caryotype du chien, CFA (<i>Canis Familiaris</i>) -----	63
Figure 18 – Illustration de l’utilisation d’étalons champions dans la population des Bouviers Bernois français-----	64
Figure 19 – Homologie clinique et génétique de l’ichtyose du Golden retriever et de l’ichtyose humaine de type ARCI (Autosomal Recessive Congenital Ichthyosis) -----	67
Figure 20 – Comparaison de l’ichtyose humaine et canine au niveau génétique-----	68
Figure 21 – Tube EDTA pour kit-----	73
Figure 22 – Tubes hépariné et type « Eppendorf » pour kit -----	73
Figure 23 – Tubes sec et type « Eppendorf » pour kit-----	74
Figure 24 – Tubes type « Eppendorf » pour kit -----	74
Figure 25 – Pochette de protection pour prélèvement-----	75
Figure 26 – Kit complet prélèvements sang et urines -----	75
Figure 27 – Schéma explicatif du protocole de récupération des divers prélèvements à effectuer dans le cadre de l’étude de la glomérulopathie du Dogue de Bordeaux-----	76
Figure 28 – Kit de biopsies rénales -----	77
Figure 29 – Représentation « <i>Manhattan plot</i> », représentant les résultats de l’étude d’association de l’automutilation acrale chez l’épagneul français-----	83
Figure 30 – Principe de l’« <i>homozygosity mapping</i> »-----	84
Figure 31 – Pedigree d’un Dogue de Bordeaux étalon diagnostiqué atteint de glomérulopathie familiale (entouré en rouge) à l’aide du logiciel Cyrillic® -----	87
Figure 32 – Représentation « <i>Manhattan plot</i> » du GWAS -----	88
Figure 33 – Schéma d’un podocyte et des protéines impliquées dans le syndrome néphrotique cortico-résistant -----	90
Figure 34 – Structure schématique de la néphrine -----	94

Figure 35 – Vue schématique de la podocine-----	95
Figure 36 – Schéma représentant la sous-famille des TRPC -----	96
Figure 37 – Schéma d'un oligomère de la protéine CD2AP -----	97
Figure 38 – Représentation de ACTN4 selon ses domaines fonctionnels -----	99
Figure 39 – Schéma représentant une sous-unité de INF2-----	100
Figure 40 – Structure de la podocalyxine -----	101
Figure 41 – Représentation g-plot du gène <i>ARHGDIA</i> -----	104
Figure 42 – Représentation g-plot du gène <i>TRPC6</i> -----	104

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I – Gènes candidats et leur protéine associée	93
---	----

LISTE DES ABREVIATIONS

ARCI	Autosomal Recessive Congenital Ichthyosis
ABD	Actin Binding Domain
ADN	Acide DesoxyriboNucléique
ARN	Acide RiboNucléique
CFA	<i>Canis Familiaris</i> Autosome
CMD	CardioMyopathie Dilaté
CNRS	Centre National de Recherche Scientifique
DAD	Diaphanous Auto-regulatory Domain
DAG	DiAcylGlycerol
DFG	Débit de Filtration Glomérulaire
DID	Diaphanous Inhibitory Domain
DSR	Débit Sanguin Rénal
DL	Déséquilibre de Liaison
Dr	Docteur
ENVT	Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
FCI	Fédération Cynologique Internationale
FPCM	Fragmentation du Processus Coronoïde Médial
GFS	Glomérulosclérose Focale Segmentaire
GWAS	Genome Wide Association Study
IC	Incongruence Articulaire
IECA	Inhibiteur de l'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine
IGDR	Institut de Génétique et Développement de Rennes
IP3	Inositol trisPhosphate
KNP	Kératodermie Naso-Plantaire
LOF	Livre des Origines Français
LRE	Lamina Rara Externa
LRI	Lamina Rara Interna
LD	Lamina Densa
MBG	Membrane Basale Glomérulaire
NUPA	Non-Union du Processus Anconé
OCD	OstéoChondrite Disséquante
OFA	Orthopedic Foundation for Animals
PHB	ProHiBitine
P _{cap}	Pression Capillaire Moyenne
PCR	Polymerase Chain Reaction

PIP2	PhosphatidylInositol 4,5-bisPhosphate
Puf	Pression d'ultrafiltration
QLT	Quantitative Trait Loci
RPCU	Rapport Protéine Créatinine Urinaire
SADB	Société des Amateurs du Dogue de Bordeaux
SCC	Société Central Canine
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TRP	Transient Receptor Potential

INTRODUCTION

Le chien, connu pour être le meilleur ami de l'homme, est encore aujourd'hui l'un des animaux de compagnie les plus appréciés. Etant de plus en plus médicalisé, les connaissances cliniques le concernant ne cessent de croître. La maladie rénale chronique est une de ces affections. Elle est le résultat clinique de plusieurs types de lésions, mais celles qui touchent le glomérule rénal prédominent : elles sont qualifiées de glomérulopathies.

La glomérulopathie familiale du Dogue de Bordeaux est néanmoins une affection encore peu connue, mais semble prendre de plus en plus d'importance. Celle-ci peut toucher plusieurs membres d'une même portée, avec un ou les deux parents atteints, ce qui laisse supposer une transmission génétique.

Ainsi, l'objectif de notre étude est de s'intégrer à une équipe de recherche, de participer au recrutement d'individus, et d'avoir une première approche dans la recherche d'une ou des régions d'intérêt susceptibles d'être impliquées dans la glomérulopathie familiale du Dogue de Bordeaux. Elle se fait en collaboration avec l'équipe « *Génétique du Chien* » de l'institut Génétique et Développement de Rennes (IGDR), dirigée par le Dr Catherine André, et le Dr Rachel Lavoué, maître de conférence à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

Dans une première partie de type bibliographique, nous présenterons la race Dogue de Bordeaux, puis nous évoquerons le glomérule rénal et sa fonction de filtration glomérulaire ainsi que les structures anatomiques impliquées dans celle-ci. Nous aborderons également la glomérulopathie familiale du Dogue de Bordeaux, et l'intérêt de la génétique chez le chien.

Dans une seconde partie expérimentale, les méthodes de recrutement des individus de l'étude, ainsi que les outils génétiques qui ont été utilisés, seront développés.

PARTIE A :
ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. MONOGRAPHIE DE LA RACE DOGUE DE BORDEAUX

1.1. Historique

Le Dogue de Bordeaux fait partie des plus anciens chiens français, cependant son origine n'est pas encore totalement éclaircie. On pense qu'il pourrait descendre de chiens grecs, appelés Mastiffs, introduits en Grande-Bretagne par les Romains ; mais il est également possible qu'il ait été amené en France par des peuples d'Orient durant le Moyen-âge (Duphot, 1987 ; Triquet, 1997).

Les premières traces écrites qui l'évoquent datent du 14^{ème} siècle. A cette époque, il était utilisé comme chien de chasse, ainsi que gardien de troupeaux et de maisons. Gaston Phébus écrivit notamment à son sujet dans son Livre De Chasse, qu'il « *tient plus fort sa morsure que ne ferait trois lévriers* ».

Puis, au 19^{ème} siècle, dans le Sud-ouest, il devint chien de combats clandestins, ayant comme adversaire d'autres chiens, mais aussi des taureaux ou des ours.

Plus original, jusqu'au début du 20^{ème} siècle, il sera employé dans la région bordelaise dans les boucheries : il tirait alors de petites voitures ou portait des paniers qui servaient à transporter la viande de l'abattoir jusqu'à l'étal de boucherie.

De nos jours, il est majoritairement utilisé comme chien de garde ou d'agrément (Duphot, 1987).

Le Dogue de Bordeaux n'a pas toujours été connu sous ce nom. Au Moyen-âge, on parlait d'« *Alan Vautre* » (« *Alan* » étant synonyme de « *dogue* »).

Ce n'est qu'en 1863, à l'occasion de la première exposition française canine se déroulant au Jardin d'Acclimatation, qu'apparaît pour la première fois l'appellation « *Dogue de Bordeaux* ». Celle-ci regroupait trois types de chiens :

- le type **Parisien**, élancé, la robe pâle, le museau long et mince, s'apparentant au Mastiff,
- le type **Toulousain**, puissant, la tête à tendance « *piriforme* », à l'ossature fine, peu musclé, et aux couleurs variées, s'apparentant au Dogue Allemand de l'époque,
- le type **Bordelais**, massif, le nez court, la tête énorme, le corps proche du sol qui correspond le plus au Dogue de Bordeaux que l'on connaît aujourd'hui.

A partir de cet événement, les descriptions de ces chiens se firent de plus en plus précises et nombreuses jusqu'à aboutir, deux ans après la création de la SADB (Société des Amateurs du Dogue de Bordeaux), en 1926, à l'inscription du premier standard officiel au LOF (« *Livre des Origines Français* » qui répertorie les origines des chiens de races français). A cette époque deux couleurs de masque furent admises (noir et rouge), ainsi que deux catégories de poids (dogue et doguin). Les deux masques sont toujours d'actualité, cependant seule une catégorie de poids subsiste.

Alors que l'espèce était en plein essor, la Seconde Guerre Mondiale stoppa net la croissance de la race, la mettant même en péril. Dans les années 1960, en France, on ne comptait plus qu'une vingtaine de Dogue de Bordeaux. Grâce aux efforts de quelques passionnés, le nombre d'individus a progressivement augmenté et de nos jours, le livre des origines français du Dogue de bordeaux enregistre plus de 1000 inscriptions par an.

1.2. Standard de la race

Le Dogue de Bordeaux (**figure 1**) appartient au groupe 2 de la classification de la FCI (« *Fédération Cynologique Internationale* »), regroupant les Pinschers, les Schnauzers, les Molossoïdes, et les Bouviers Suisses. Il appartient plus précisément à la section 2.1 (chiens molossoïdes de type dogue). Le standard de la race complet, publié en 2009, est présenté en **annexe 1**.



Figure 1 – Illustrations d'un Dogue de Bordeaux
(Société Centrale Canine - Fiches et standards de race)

C'est un chien de grande taille brachycéphale concaviligne, massif, trapu, puissant, et très musclé. Bon chien de garde, il n'est pas pour autant agressif, se montre affectueux et est très attaché à son maître.

1.3. Dominantes pathologiques

Le Dogue de Bordeaux n'est pas une race que l'on retrouve beaucoup dans la littérature vétérinaire. Cependant, de plus en plus de pathologies commencent à être décrites. Nous développerons principalement des affections pour lesquelles le dogue de Bordeaux semble prédisposé.

1.3.1. Affections dermatologiques

L'affection dermatologique la plus fréquente est la kératodermie naso-plantaire (KNP) familiale du Dogue de Bordeaux. Celle-ci se présente sous forme d'hyperkératinisation des coussinets, voire de la truffe, avec des fissurations qui peuvent engendrer de douloureuses crevasses. Elle apparaît chez de jeunes individus (entre 4 et 9 mois), sans prédisposition de sexe. Le caractère handicapant de la maladie semble cependant s'atténuer avec l'âge (Paradis, 1992, André et al., 2007).

Le diagnostic se fait sur la base de l'anamnèse, de la clinique et de l'histologie et repose sur le caractère inné de l'affection (Paradis, 1992). Le traitement est uniquement symptomatique, le plus efficace étant le retrait progressif de l'excédent de corne, avec si besoin application de pommades antibiotiques ou corticoïdes. L'utilisation de pommades émollientes ne semble cependant pas avoir de réelle efficacité (Levy, 2005).

Grâce à l'élaboration d'un pedigree, il a été mis en évidence que cette maladie se transmettait sur un mode autosomique récessif. Par la suite, des études génétiques au CNRS de Rennes au sein de l'équipe « *Génétique du Chien* » ont pu identifier le gène responsable de la KNP : il s'agit du gène *KRT16* codant pour une kératine (Plassais, 2014). Grâce à ce travail de recherche, un test génétique est à présent disponible pour dépister la maladie (Test HFH-B commercialisé par Antagene).

Par ailleurs, le Dogue de Bordeaux semblerait également prédisposé pour d'autres affections dermatologiques telles que la démodicie, l'intertrigo facial, et le syndrome du pyogranulome stérile (Guaguère & Prélaud, 2006).

1.3.2. Affections ostéo-articulaires

Le Dogue de Bordeaux présente des prédispositions pour trois affections ostéo-articulaires bien connues : la dysplasie coxo-fémorale, la dysplasie du coude, et la polyarthrite.

1.3.2.1. Dysplasie coxo-fémorale

La dysplasie coxo-fémorale est un développement anormal de l'articulation coxo-fémorale à l'origine d'une instabilité articulaire, menant progressivement à des lésions d'arthrose. Elle apparaît entre 3 mois et 2 ans, et peut se dépister chez le Dogue de Bordeaux à partir de 15 mois. Ce dépistage peut donner lieu à une notation officielle de A à E à l'aide de radiographies, le diagnostic étant posé par un lecteur officiel spécifique à chaque race (chez le Dogue de Bordeaux, il s'agit depuis 2010 du Professeur Didier FAU). Cette notation officielle sert lors du choix d'alliance reproductive, afin de limiter la prédisposition à l'affection. Par exemple, on évitera de faire reproduire deux individus notés E.

Outre une composante environnementale et individuelle, cette affection présente une composante génétique qui est actuellement en cours d'étude.

Les signes cliniques sont :

- Une boiterie sans traumatisme, à froid, accentuée après un effort prolongé, par le froid ou l'humidité
- Une démarche chaloupée
- Une course en « *saut de lapin* »
- Une douleur au niveau de la hanche

Ces signes sont également associés à une instabilité à la compression des grands trochanters, une amyotrophie, et une difficulté d'extension vers l'arrière et à l'abduction (associé à de la douleur) (Syrle, 2017).

Outre le diagnostic radiographique, plusieurs tests diagnostiques existent, le plus fiable étant le test d'Ortolani. Il consiste, après avoir placé le chien en décubitus latéral, et le fémur en position horizontale, à pousser le fémur proximale pour luxer la tête fémorale d'une main, pendant que l'autre main est sur le bassin, un doigt sur le grand trochanter, pour faire contre-appui. Un mouvement de rotation externe est effectué pour replacer la tête fémorale. Lorsque le chien est dysplasique, un petit bruit sec est audible.

Le traitement peut être médical (maîtrise du poids, restriction d'activité, promenade en laisse, physiothérapie, anti-inflammatoires non stéroïdiens) ou chirurgical (symphysiodèse, ostéotomie, prothèse de hanche, résection de tête et col du fémur). Le choix du traitement chirurgical est dépendant de l'âge de l'animal ainsi que de l'étendue des lésions, tandis que le traitement médical est valable à tout âge.

Selon des statistiques de l'« *Orthopedic Foundation for Animals* » (OFA) aux Etats-Unis, le Dogue de Bordeaux serait le troisième chien le plus fréquemment atteint derrière le Carlin et le Bouledogue Américain, avec 57,4% de chiens atteints (données récoltées entre 1974 et 2017).

1.3.2.2. Dysplasie du coude

La dysplasie du coude est une atteinte ostéo-articulaire qui regroupe trois affections : la non-union du processus anconé (NUPA), la fragmentation du processus coronoïde médial (FPCM), et l'ostéochondrite disséquante (OCD), ces trois affections menant à une incongruence articulaire (IC).

Tout comme la dysplasie de la hanche, elle apparaît chez l'animal jeune (entre 4 et 8 mois), et peut se dépister chez le Dogue de Bordeaux à partir de 15 mois par radiographie. Un système similaire de notation existe (de 0 à 3). Le lecteur officiel pour cette dysplasie est également le

Professeur Didier FAU. Son apparition est fonction de l'alimentation, d'une influence hormonale, ou d'un traumatisme. Une composante génétique existe également.

Les signes cliniques sont une boiterie progressive ou brutale, d'abord intermittente puis permanente, une rotation externe du membre même assis, une circumduction, une douleur à la palpation et mobilisation, et une distension de l'articulation. Dans les cas chroniques, une amyotrophie et un « *Radius Curvus* » (IC) sont également visibles.

Le diagnostic peut se faire par radiographie, mais pas uniquement. Dans le cas d'une suspicion de FPCM, on effectuera le test de Campbell. Celui-ci consiste à placer le carpe et le coude à 90°, puis à effectuer un mouvement de rotation interne de la main de 50° (pour mettre en tension le ligament collatéral latéral), et un mouvement de rotation externe de 30° (pour mettre en tension le ligament collatéral médial). Une manifestation de douleur est évocatrice d'une dysplasie. On pourra également faire une arthroscopie ou un scanner.

Dans le cas d'une NUPA, on effectuera une extension forcée du coude pour la mettre en évidence.

Le traitement peut être médical (confinement, exercice, anti-inflammatoires non stéroïdiens) ou chirurgical (exérèse du bec de l'olécrâne, fixation par vis). Le choix dépendra de l'affection et de l'âge du chien.

Aux Etats-Unis, le Dogue de Bordeaux est en treizième position du classement des chiens prédisposés à la dysplasie du coude avec 21,7% de chiens atteints (données récoltées entre 1974 et 2017).

1.3.2.3. Polyarthrite

La polyarthrite est une inflammation de plusieurs articulations qui provoque boiteries, raideur, ou refus de se déplacer, pouvant toucher un ou plusieurs membres, simultanément ou l'un à la suite de l'autre, et qui peut s'accompagner de fièvres. L'étiologie est diverse : elle peut être infectieuse ou à médiation immune, érosive ou non ; et est fondamentale dans le choix du traitement. Bien que n'étant pas la race la plus atteinte, le Dogue de Bordeaux pourrait être prédisposé (Queyroy, 2007).

1.3.3. Affections cardiaques

Deux affections cardiaques touchent le Dogue de Bordeaux : la cardiomyopathie dilatée (CMD) et la sténose sous-aortique.

1.3.3.1. Cardiomyopathie dilatée

Cause importante de morbidité et mortalité chez le chien, cette affection fait partie des maladies cardiaques acquises les plus fréquentes et touche plutôt les chiens de grande taille (Fox et al., 1999). Le Dogue de Bordeaux ne fait pas partie des races les plus prédisposées, et peu d'études lui sont consacrées. Cependant la prévalence est non négligeable, l'OFA le plaçant en vingt-troisième position avec 1% d'individus touchés entre 1974 et 2017. C'est pourquoi la SADB recommande un dépistage échocardiographique des reproducteurs.

Cette maladie est caractérisée par une réduction de la force de contractilité et une dilatation des chambres cardiaques, impliquant un seul ou les deux ventricules, ce qui est à l'origine d'un dysfonctionnement sévère de la fonction systolique (O'Grady & O'Sullivan, 2004; Borgarelli et al., 2006). D'autres signes cardiaques peuvent apparaître, comme une insuffisance mitrale ou tricuspidiennne qui seront à l'origine d'un reflux ; ou des arythmies telles que des fibrillations atriales et de la tachycardie ventriculaire (Fox et al., 1999).

Elle se déclare en moyenne entre 4 et 10 ans (Fox et al., 1999), et l'étiologie est souvent inconnue. Une origine génétique ou familiale est fortement suspectée, et l'alimentation jouerait également un rôle dans l'apparition de la maladie.

Le diagnostic est le plus souvent morphologique (O'Grady & O'Sullivan, 2004). L'échocardiographie est donc un examen indispensable (Borgarelli et al., 2006). Le doppler s'avère également être un bon outil de dépistage précoce (O'Grady & O'Sullivan, 2004).

1.3.3.2. Sténose sous-aortique

La sténose sous-aortique est une atteinte congénitale cardiaque caractérisée par une anomalie de la valvule sigmoïde aortique, avec comme lésions la formation d'un anneau fibreux ou fibro-musculaire au niveau sous-valvulaire (Fox et al., 1999). La prédisposition du Dogue de Bordeaux à cette maladie a clairement été démontrée (Höllmer et al., 2008) et celle-ci se transmet selon un mode autosomique récessif (Ohad et al., 2013).

Elle se développe progressivement dans les 12 à 15 premiers mois de vie. L'étiologie n'est pas encore très bien connue et dépend de multiples facteurs. Elle engendre un obstacle à l'éjection systolique du ventricule gauche, ce qui provoque une hypertrophie concentrique de ce dernier et une augmentation de la vitesse d'éjection du sang dans l'aorte. La perfusion coronarienne est diminuée, entraînant une ischémie et une fibrose myocardique (Fox et al., 1999).

Le diagnostic est échographique, avec éventuellement le mode doppler, et le traitement dépend de la sévérité de la sténose : il peut être médical (restriction d'activité, bêta-bloquants) ou chirurgical (dilatation par cathéter à ballonnet). L'affection peut être fatale si elle n'est pas traitée.

1.3.4. Affections oculaires

On distingue les affections héréditaires (rétinopathie multifocale) et les affections liées à la morphologie du Dogue de Bordeaux (entropion, ectropion).

La rétinopathie multifocale est un décollement de la rétine sur plusieurs endroits différents, à l'origine d'une dégénérescence de la rétine.

Dans les formes les moins graves, le chien ne semble pas présenter de problèmes de vision malgré l'apparence anormale de la rétine. Dans les formes les plus graves, les lésions peuvent conduire à la cécité.

Elle apparaît en général avant 4 mois et progresse lentement. Les signes sont parfois intermittents, pas toujours visibles et il peut arriver qu'il y ait des rémissions. La maladie se transmettrait selon un mode autosomique récessif.

Elle se diagnostique par un examen ophtalmologique indirect, ou un électrorétinogramme.

Il n'existe à ce jour aucun traitement.

D'autre part, du fait de leur peau plissée, les Dogues de Bordeaux sont prédisposés aux affections des paupières, telles que l'entropion (inversion du bord de la paupière) ou l'ectropion (éversion du bord de la paupière). Ils peuvent concerner la paupière inférieure, supérieure, voire les deux.

Dans le cas d'un entropion, un frottement des cils et/ou de poils sur la cornée et la conjonctive, consécutif à l'enroulement de la paupière vers l'intérieur, cause une irritation très douloureuse pour l'animal.

Quant à l'ectropion, il expose la conjonctive palpébrale, la membrane nictitante, les orifices des glandes de Meibomius, et la partie ventrale de la cornée et de la sclère, ce qui provoque une conjunctivite chronique et des sécrétions oculaires mucopurulentes, voire une kératite d'exposition par manque de lubrification de la cornée dans les cas les plus graves.

Le traitement chirurgical est obligatoire pour l'entropion, mais à moduler selon la gravité de l'atteinte pour l'ectropion.

1.3.5. Affection rénale

Depuis une dizaine d'années, une nouvelle pathologie d'origine rénale touche la population de Dogues de Bordeaux. Le Docteur Rachel Lavoué est l'une des premières à s'y être intéressée. C'est le sujet de notre étude, que nous développerons dans un second temps.

2. PHYSIOLOGIE ET PHYSIOPATHOLOGIE RENALE CHEZ LE CHIEN

Le rein, premier acteur dans l'appareil urinaire, est l'organe de filtration du sang, et d'élimination des déchets de l'organisme. En effet, il est responsable en grande partie du maintien de l'homéostasie (équilibre du milieu interne). Il permet ainsi :

- La conservation des molécules indispensables à la survie d'un organisme
- L'élimination de ce qui est néfaste : déchets du métabolisme (urée, créatinine, ammoniac, acide urique, allantoiné), toxines, médicaments
- Le maintien de l'équilibre acido-basique de l'organisme
- La synthèse d'hormones telles que la rénine et l'érythropoïétine
- L'activation de la vitamine D par hydroxylation du cholécalférol
- La néoglucogenèse

Nous verrons dans cette partie des rappels d'anatomie, puis nous aborderons quelques éléments de physiologie.

2.1. Rappels d'anatomie

Chez les mammifères, dont le chien fait partie, les reins sont généralement bruns, de consistance ferme et peu élastique avec une forme comparable à celle d'un haricot. Ils se trouvent accolés à la paroi dorsale de la cavité abdominale, en région dorso-lombaire, de part et d'autre de l'aorte et de la veine cave caudale qui longent la colonne vertébrale, entre la treizième vertèbre thoracique (T13) et la deuxième vertèbre lombaire (L2). Le rein droit est plus léger et se positionne généralement plus crânialement que le rein gauche (Barone, 1990). Sa taille dépend du poids vif de l'animal. Ainsi, pour un Dogue de Bordeaux pesant environ 50 kg, les reins feront entre 7,6 et 10,6 cm de long (avec une moyenne de 8,8 cm) (Barr et al., 1990).

En coupe longitudinale d'un rein sain (**figure 2**), on distingue quatre éléments (en allant de l'extérieur vers l'intérieur du rein) :

- Un cortex, qui représente environ un tiers de la hauteur du rein
- Une limite cortico-médullaire
- Une médulla, à l'apparence striée
- Un bassinet, qui récolte l'urine définitive

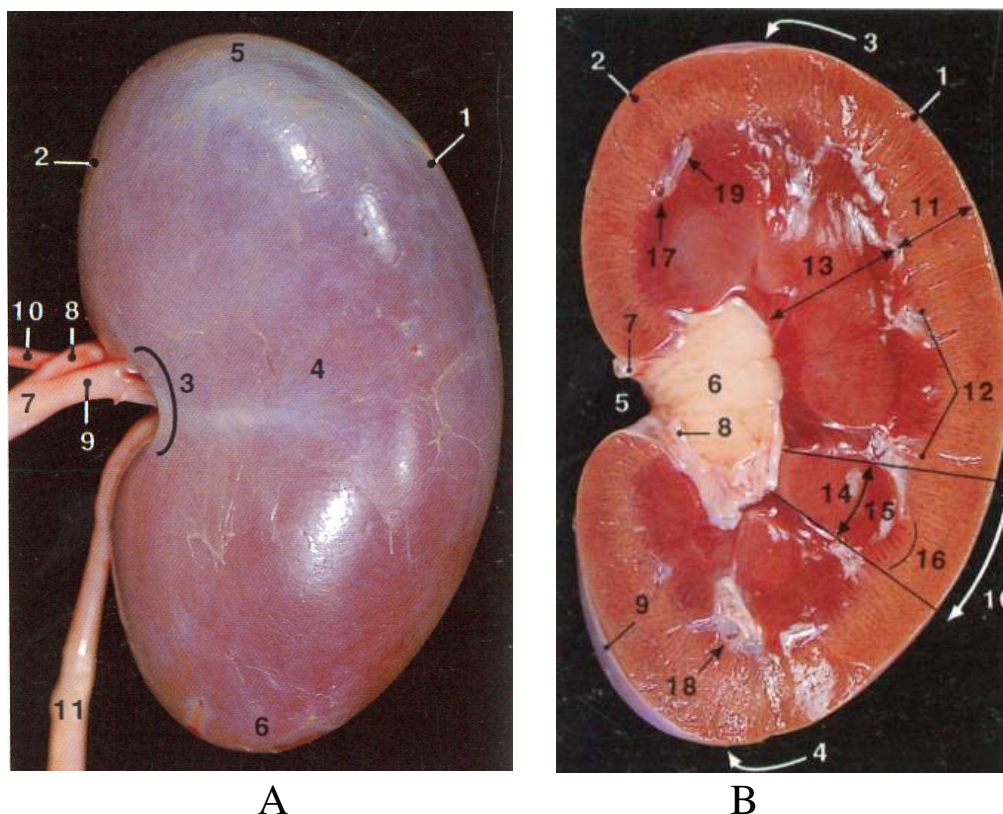


Figure 2 – Vue latérale droite d'un rein droit entier (A) et en coupe longitudinale (B) de chien
(Extrait de Ruberte & Sautet, 1998)

A : Le rein possède un bord latéral (1), un bord médial (2), un pôle crânial (5) et un pôle caudal (6). Le bord latéral est épais et convexe et le bord médial, plus court, est interrompu par le hile rénal (3) qui se prolonge par un espace appelé sinus rénal.

On distingue également l'artère (7) et la veine (10) rénales, le rameau ventral (8), et dorsal (9), ainsi que l'uretère (11).

Une capsule fibreuse (4), puis adipeuse (retirée ici), entoure l'intégralité de chaque rein.

B : Cette coupe révèle l'organisation interne du rein. On retrouve comme en A le bord latéral (1), et médial (2), le pôle crânial (3) et caudal (4), l'artère (7) et la veine (8) rénales, ainsi que le hile (5) et la capsule (9) rénale. On y distingue également le cortex (11), la médulla (13), le sinus rénal (6), des colonnes rénales, ainsi que des vaisseaux tels qu'une artère (17) et veine (18) interlobées, et une artère arquée (19). Une structure semble se répéter : il s'agit du lobe rénal (10), composé d'une pyramide rénale (14), avec une base (15) et d'une partie radiée (16).

2.1.1. Le néphron : unité fonctionnelle du rein

Un rein est constitué d'environ 400 000 à 800 000 néphrons qui assurent la fonction rénale. Chaque néphron comprend :

- Un **glomérule rénal**, composé d'un réseau de capillaires irrigué par une artériole afférente et drainé par une artériole efférente, et d'une capsule de Bowman qui permet une première filtration du sang aboutissant à la formation d'une urine primitive.
- Un **tubule**, constitué d'un tube contourné proximal, d'une anse de Henlé et d'un tube contourné distal, et qui assure la formation de l'urine définitive par phénomène de sécrétion et de réabsorption entre le fluide tubulaire et les capillaires. Ces échanges sont finement contrôlés par des hormones et des médiateurs, d'origine systémique ou locale.

D'un point de vue spatial, les glomérules et les tubes contournés sont des constituants du cortex, tandis que les tubes collecteurs et l'anse de Henlé sont situés dans la médulla (**Figure 3**)

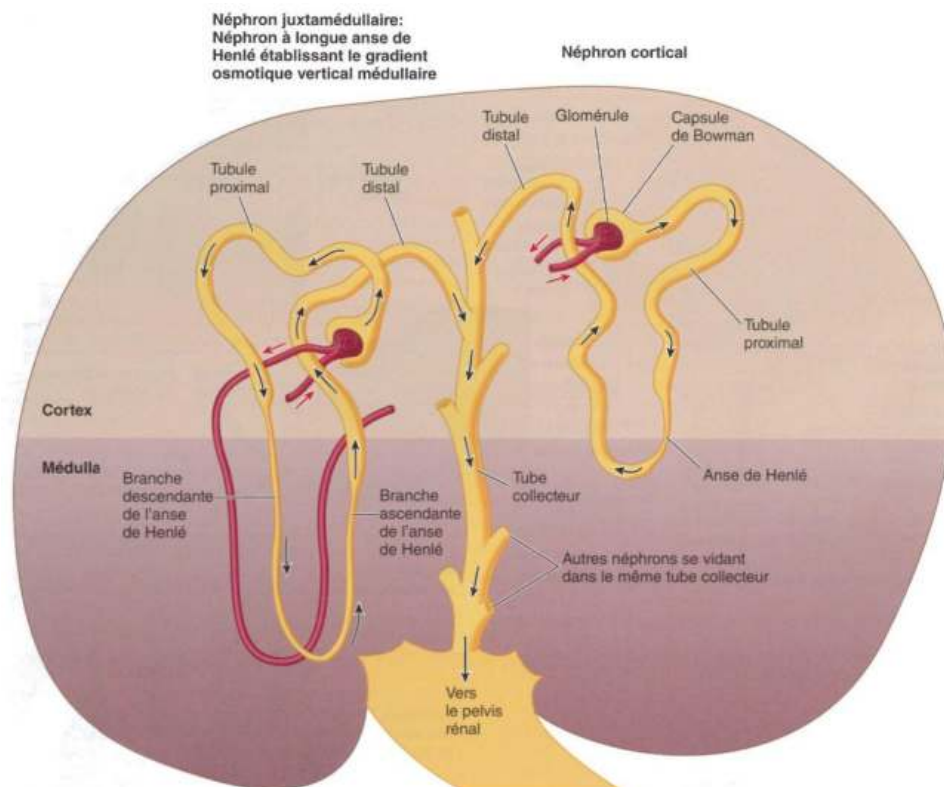


Figure 3 – Représentation de néphrons en fonction de leur situation dans le rein
(Extrait de Sherwood et al., 2016)

Les néphrons ont été agrandis pour une meilleure visibilité.

On distingue des néphrons corticaux, dont les glomérules sont du côté externe du cortex et les anses de Henlé dans la partie supérieure de la médulla, et des

néphrons juxta-glomérulaires, dont les glomérules sont du côté interne du cortex et les anses de Henlé en profondeur dans la médulla.

2.1.2. Unité de filtration rénale : le glomérule rénal

Le glomérule rénal (**figure 4**) est une vésicule sphérique à double paroi, mesurant 150 à 200 μm (sa taille varie en fonction de la race de chien), qui regroupe plusieurs structures : le bouquet de capillaires glomérulaires, la capsule de Bowman (contenant des cellules spécialisées, les podocytes), la membrane basale glomérulaire, et le mésangium. Il est constitué d'un pôle vasculaire et d'un pôle tubulaire, et possède trois niveaux de filtration.

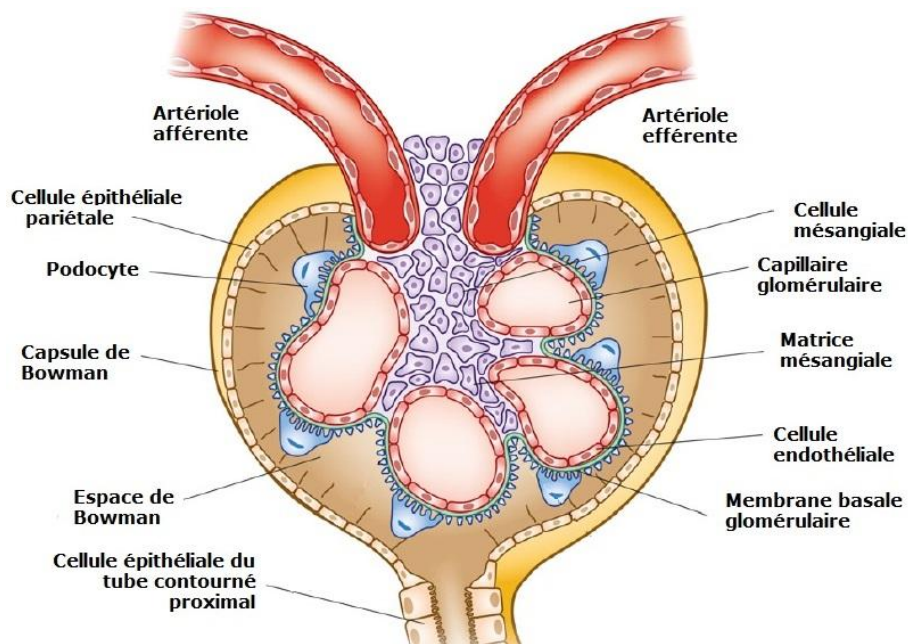


Figure 4 – Représentation d'une coupe longitudinale d'un glomérule rénal
(D'après Kitching et al., 2016)

2.1.2.1. Le réseau de capillaires et le mésangium

Au sein du glomérule rénal, le réseau capillaire est particulier : on le qualifie de réseau admirable. En effet, contrairement aux autres réseaux capillaires de l'organisme, précédé d'un système artériel et suivi d'un système veineux, celui-ci est entouré de deux systèmes artériels. Le diamètre des capillaires est de 60 à 80 nm.

Son endothélium (**figure 5**) est également bien spécifique et adapté à sa fonction. Il est fenêtré, avec des prolongements cytoplasmiques percés de pores d'environ 0,1 μm , et qui n'interdisent pas le passage des protéines sériques.

Ce réseau de capillaire constitue le *premier niveau de filtration*.

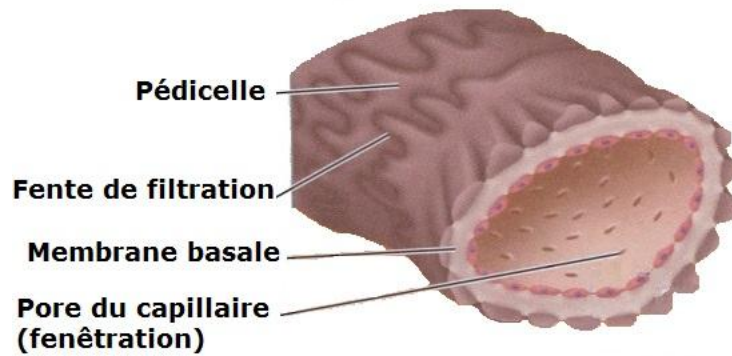


Figure 5 – Structure d'un capillaire glomérulaire
(D'après *Sherwood, et al., 2016*)

Au sein de ce réseau se trouve le mésangium. Il est composé par une vingtaine d'anses capillaires, entouré d'un tissu de soutien constitué de cellules : les cellules mésangiales. Ces cellules sont des cellules fibroblastiques spécialisées qui sont capables de se contracter afin de contrôler la filtration glomérulaire. Elles permettent également la synthèse d'éléments de la matrice extracellulaire, ainsi que de collagène entrant dans la composition de la membrane basale glomérulaire. Enfin, elles synthétisent des cytokines, médiateurs impliquées dans la réaction immunitaire, et des endothélines, intervenant dans la vasoconstriction.

On peut diviser le mésangium en deux parties: une partie glomérulaire qui se situe au sein de l'invagination de la capsule de Bowman et une partie extra-glomérulaire qui se trouve à l'extérieur de cette invagination. Les cellules mésangiales glomérulaires peuvent être en contact avec deux types de tissus : la plupart sont liées à l'endothélium des capillaires glomérulaires tandis que les plus centrales sont en contact direct avec la membrane basale glomérulaire.

2.1.2.2. La capsule de Bowman

La capsule de Bowman, ou capsule glomérulaire, est une invagination qui vient entourer le bouquet de capillaires glomérulaires (**figure 6**). Elle est constituée d'un feuillet externe pariétal en continuité avec le tube contourné proximal, et d'un feuillet interne viscéral, qui tapisse les anses capillaires situées au centre du glomérule. On trouve entre les feuillets un espace, appelé espace de Bowman ou chambre de filtration.

La paroi interne constitue un revêtement cellulaire discontinu constitué par des cellules spécialisées : les podocytes. Entre les podocytes se trouvent des fentes de filtration.

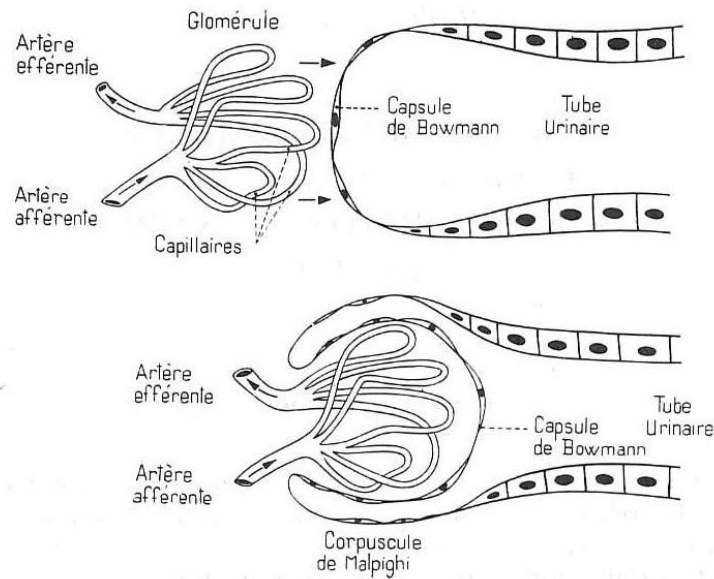


Figure 6 – Formation d'un glomérule rénal

(Extrait de Hermann, 1979)

Cette figure illustre l'englobement de la capsule de Bowman autour du réseau de capillaires glomérulaires.

2.1.2.2.1. La membrane basale

La membrane basale constitue *une deuxième barrière de filtration*, plus sélective que la première. Chez le chien elle fait environ 150 nm d'épaisseur.

Elle est notamment constituée de collagène de type IV, de laminine, de protéoglycanes, d'entactines, de fibronectines. Des éléments qui lui sont spécifiques entrent aussi dans sa composition, tels que la laminine 11, des chaînes alpha de collagène IV spéciales (chaînes $\alpha 3$, $\alpha 4$ et $\alpha 5$, qui semblent jouer un rôle particulier dans la fonction propre à la membrane basale glomérulaire), et les protéoglycanes agrin et perlecan. (Kashtan, 1998)

On distingue trois couches (**figure 7**) : la lamina rara interna en contact avec l'endothélium vasculaire, la lamina densa, couche centrale qui est aussi la plus épaisse, et la lamina rara externa en contact avec les podocytes.

Certaines de ses glycoprotéines ont dans leur composition des acides aminés comme l'acide glutamique, l'acide aspartique, et l'acide sialique. Grâce à ces résidus, qui sont sous forme ionisés au pH sanguin, la membrane basale a une charge électrique globale négative, ce qui permet de bloquer certaines molécules, notamment celles chargées négativement.

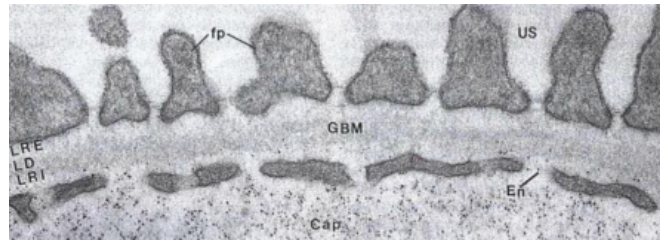


Figure 7 – Observation au microscope électronique au grossissement 80 000 de la membrane basale glomérulaire
(Extrait de Brenner, 2007)

On y distingue la membrane basale glomérulaire (GBM), composée de la lamina rara externa (LRE), la lamina densa (LD), et la lamina rara interna (LRI). Elle est en contact d'un côté avec des pieds de podocyte (fp) et la lumière capsulaire (US), et de l'autre avec l'endothélium fenêtré (En) du capillaire (Cap).

2.1.2.2.2. Les podocytes

Les podocytes sont des cellules très spécialisées qui ont perdu leur faculté à se diviser (Eldin & Giebisch, 1985). Ils sont formés d'un corps cellulaire d'où partent de très longs prolongements cytoplasmiques peu nombreux et épais (appelés pieds principaux), qui se ramifient à leur tour en de nombreux et fins pieds secondaires, qui viennent s'accoler à la membrane basale glomérulaire, que l'on appelle les pédicelles (**figure 8**).

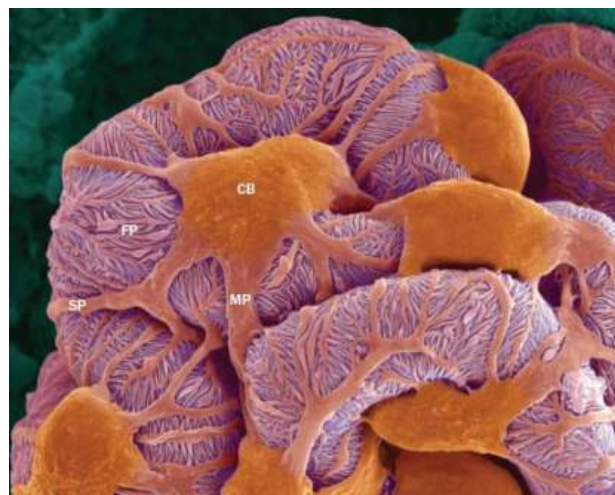


Figure 8 – Observation au microscope électronique de podocytes (en orange), entourant les capillaires glomérulaires (en violet) dans un glomérule rénal humain
(Extrait de Welsh et Saleem, 2011)

Au niveau des podocytes, on distingue le corps cellulaire (CB, pour cell body), les pieds principaux (MP, pour Major Processes), les pieds secondaires (SP, pour Secondary Processes), et les pédicelles (FP, pour Foot Process) (Welsh & Saleem, 2011).

Les pieds des podocytes possèdent un cytosquelette contractile composé d'actine, de myosine, d' α -actinine, de vinculine, et de taline, qui répondent aux vasopressines, ce qui permet de réguler le coefficient d'ultrafiltration Kf (Pavenstädt, 2000). Un effacement de ces pieds sera responsable d'une protéinurie.

En effet, les podocytes et leurs digitations forment *la troisième et dernière barrière de filtration*. Entre les pédicelles, se trouve un espace qui s'étend sur 20 à 100 nm, appelé fente de filtration. Les pédicelles sont reliés entre eux par des protéines de surface qui forment ce que l'on appelle le diaphragme de fente (**figure 9**), dont la modification par des mutations est à l'origine de protéinurie. C'est la modification de cet environnement qui serait peut-être à l'origine de la glomérulopathie familiale du Dogue de Bordeaux.

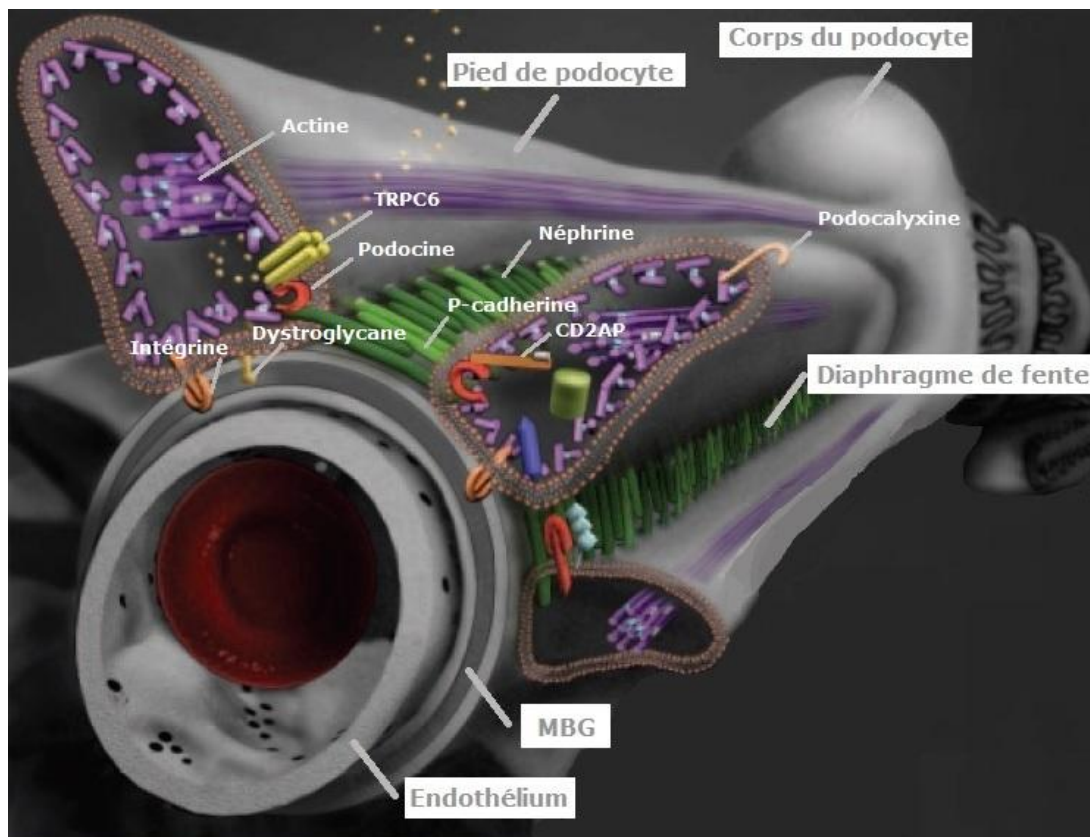


Figure 9 – Représentation 3D d'un podocyte entourant un capillaire glomérulaire
(D'après Möller et al., 2006)

Les pédicelles, fixés à la membrane basale glomérulaire (MBG) par des $\alpha\beta$ 1 intégrines et des dystroglycane, entourent complètement le capillaire et sont reliés entre eux par le diaphragme de fente, dont la néphrine et la podocine sont les principales molécules.

Cette forme si particulière est maintenue grâce au cytosquelette dont les filaments d'actine font partie.

A ce diaphragme de fente s'ajoute un glycocalyx, réseau de fibres qui crée un environnement chargé négativement et qui est composé de podocalyxine, protéine synthétisée par le podocyte ; et d'acide sialique, molécule chargée négativement, qui tout comme les glycoprotéines de la membrane basale, contribue à la sélectivité glomérulaire.

Les podocytes permettent aussi de stabiliser toute déformation de la membrane de filtration glomérulaire et maintiennent une surface large de filtration dans le diaphragme de fente (Pavenstädt, 2000).

2.1.2.2.3. *Le diaphragme de fente*

Le diaphragme de fente (**figure 10**) est une fine double membrane de quelques dizaines de nanomètres, en forme de fermeture éclair, situé entre les pédicelles des podocytes, et qui constitue une seconde membrane de filtration plus sélective que la membrane basale glomérulaire. On y retrouve la néphrine, la podocine et la protéine membranaire CD2AP, synthétisées par le podocyte. Le diaphragme de fente contient de petits pores d'environ 4x14 nm, (juste inférieur à la taille de l'albumine) empêchant le passage de protéines sériques (Rodewald & Karnovsky, 1974).

Des protéines d'attachement appartenant à la famille des jonctions serrées telles que les P-cadherines et des zonulas adherans sont également présentes.

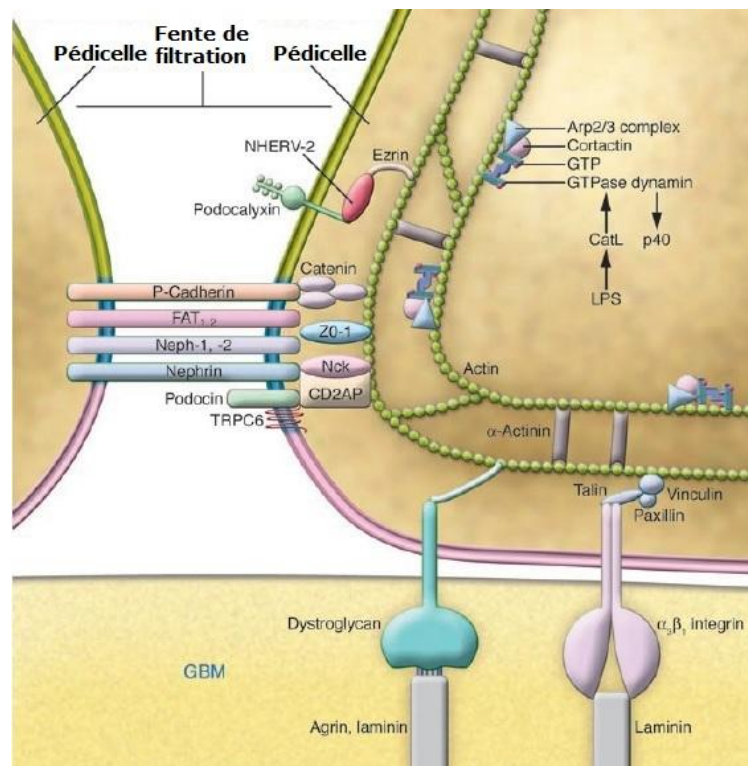


Figure 10 – Illustration d'un diaphragme de fente
(D'après Ronco et al., 2007)

2.2. Physiologie rénale et filtration

2.2.1. Mécanismes de la filtration glomérulaire

La filtration glomérulaire, première étape de la formation de l'ultrafiltrat glomérulaire, ou urine primitive, est un phénomène passif qui conduit au passage du liquide filtré (à savoir l'eau, du plasma, et les constituants non protéiques) de la lumière capillaire vers l'espace urinaire de Bowman à travers la barrière de filtration composée des trois couches que nous venons de détailler : l'endothélium vasculaire, la membrane basale glomérulaire, et enfin le diaphragme de fente (**figure 11**).

A l'état physiologique, seulement 15 à 20% du plasma présent dans les capillaires glomérulaires est filtré.

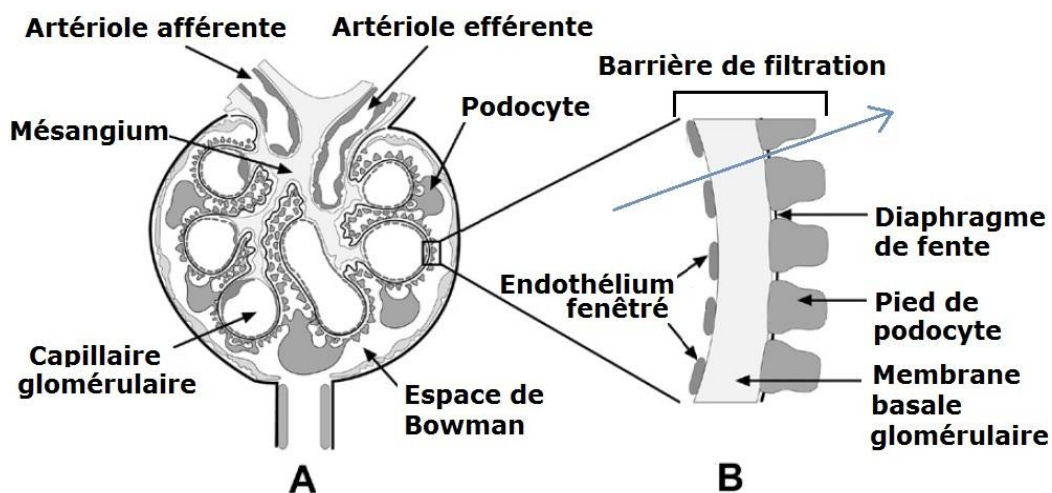


Figure 11 – Illustration de la barrière de filtration
(D'après Jalanko & Kääriäinen, 2013)

Les molécules filtrées passent d'abord par les pores des capillaires, puis par la membrane basale, et enfin entre les pieds de deux podocytes par le diaphragme de fente. Leur trajet est représenté par la flèche bleue.

Comme nous l'avons vu précédemment, la taille est l'un des critères de passage de la barrière de filtration.

Une étude a ainsi montré, à l'aide de capillaires glomérulaires de rat, que la clairance fractionnelle de molécules de dextran (polysaccharides ramifiés non métabolisés) électriquement neutres diminuait lorsque le diamètre était supérieur à 20 Å, jusqu'à ne plus passer quand elles atteignaient 42 Å. Ainsi, plus les molécules sont grosses, moins elles passent l'endothélium vasculaire, jusqu'au seuil d'environ 70 kDa (Deen et al., 1985).

La charge électrique est également un facteur discriminant : la barrière de filtration étant globalement chargée négativement, d'une part à cause de la membrane basale glomérulaire, et d'autre part à cause du glycocalyx, celle-ci va avoir tendance à repousser les molécules chargées négativement qui auront beaucoup plus de mal à passer. L'exemple le plus classique est celui de l'albumine : molécule de 67 kDa, elle est tout juste assez petite pour passer la barrière de filtration, cependant ses charges négatives compliquent son passage. L'albumine est donc beaucoup moins présente dans l'ultrafiltrat comparée à une molécule de même diamètre mais de charge positive.

Le dernier critère, minime comparé aux deux autres mais néanmoins non négligeable, est la forme et la configuration des macromolécules. Ainsi, les protéines linéaires, plus déformables, ont moins de difficultés à passer la barrière que les protéines globulaires.

2.2.2. Composition du filtrat glomérulaire

La composition du filtrat glomérulaire est presque identique au plasma sanguin, si l'on exclut les grosses protéines et les cellules sanguines. Il possède quelques petites protéines (10 à 20 mg/l) qui ont pu passer la barrière de filtration, mais qui seront réabsorbées par la suite. Les substances neutres non ionisées comme l'urée ont la même concentration dans le plasma et l'ultrafiltrat, tandis que pour les substances ionisées, la concentration des ions Cl^- est un peu plus élevée et celle des cations un peu moins élevée dans le filtrat que dans le plasma (Lacour, 2013).

2.2.3. Notion de débit de filtration glomérulaire

Le débit de filtration glomérulaire (DFG) est la quantité d'ultrafiltrat qui passe dans l'espace glomérulaire. Il varie selon la taille et la race de chien.

Il dépend de deux caractéristiques physiques : la perméabilité de la barrière glomérulaire représentée par le coefficient d'ultrafiltration **Kf**, et la pression de part et d'autre de la barrière appelé pression d'ultrafiltration **Puf**.

En d'autres termes on a : $\text{DFG} = \text{Kf} \times \text{Puf}$

La pression d'ultrafiltration **Puf** conditionne la quantité d'eau et de solutés qui traversent la membrane capillaire. On a donc un gradient de pression de filtration entre les capillaires et la chambre glomérulaire.

Cette pression est la résultante de plusieurs autres pressions :

- **La pression hydrostatique**, qui favorise le passage d'eau et de solutés à travers la paroi du glomérule. Elle dépend elle-même de :
 - la *pression capillaire moyenne* (P_{cap}), globalement constante le long du capillaire, dont la valeur est de l'ordre de 45 mmHG,
 - la *pression urinaire* (P_{urin}), faible en temps normal, mais qui peut augmenter lorsqu'il y a stagnation de l'urine dans la capsule de Bowman.
- **La pression oncotique**, qui dépend de la présence de protéines dans le milieu, et qui s'oppose à la filtration glomérulaire, résultant de :
 - la *pression oncotique* dans les capillaires (Π_{cap}), qui varie selon la concentration en protéines dans le sang
 - la *pression oncotique urinaire* (Π_{urin}), normalement nulle car la concentration en protéines dans la chambre de Bowman est nulle.

On obtient $P_{uf} = P_{cap} - P_{urin} - (\Pi_{cap} - \Pi_{urin})$

Le DFG est modulé par plusieurs facteurs :

- **Le débit sanguin rénal** (DSR) qui est fonction de la volémie et de la contractilité myocardique. En effet, une hémorragie ou une déshydratation extracellulaire globale fait diminuer la volémie. Cette diminution de la volémie implique une diminution du retour veineux au cœur, entraînant à son tour une diminution de la pression artérielle rénale et du DSR, et donc du DFG. En cas d'insuffisance cardiaque, le DSR est diminué, entraînant une diminution du DFG.
Le DSR dépend également de la pression artérielle, la résistance dans les capillaires sanguins, et la résistance dans l'artériole efférente. Si le DSR augmente, les protéines se concentreront moins vite dans les capillaires, le P_{uf} augmentera et donc le DFG aussi. A l'inverse, s'il diminue (par vasoconstriction de l'artériole afférente), la pression capillaire diminue, donc la pression de filtration diminue, et donc le débit de filtration glomérulaire aussi. Lorsque c'est l'artériole afférente qui est vasoconstricte, le DFG varie pas ou peu car le DSR diminue mais la pression capillaire augmente, donc les deux effets se compensent.
- **La pression hydrostatique** dans les capillaires glomérulaires qui dépend des pressions artérielles systémique et rénale.
- **La pression intratubulaire**, qui peut changer s'il y a présence d'obstacle dans les voies urinaires. Si c'est le cas, la pression intra-tubulaire augmente et compense la pression dans le capillaire glomérulaire. Le DFG devient alors nul.
- **La pression oncotique** systémique qui dépend de la concentration des protéines plasmatiques.

- **Le coefficient d'ultra-filtration K_f** , qui dépend de facteurs neuro-hormonaux et de lésions glomérulaires (néphropathies). Chez un individu sain, si K_f diminue, le DFG ne varie pas grâce à la pression de filtration P_{uf} qui augmente.

Pour résumer, les facteurs permettant de réguler la filtration glomérulaire et qui seront la cible de l'autorégulation du DFG sont les suivants :

- L'équilibre des pressions hydrostatiques et oncotiques dans le capillaire glomérulaire
- La pression hydrostatique intratubulaire
- Le Débit Sanguin Rénal (DSR)
- La perméabilité et la surface glomérulaires
- Le tonus des artéioles afférentes et efférentes

2.2.4. Régulation de la filtration

2.2.4.1. Autorégulation du DFG

Le DFG, au vu de son importance, est finement régulé. Ainsi, il faut une grande variation de pression artérielle pour avoir une variation significative du DFG (de 80 à 150 voire 180 mmHg) (**Figure 12**). Cela permet ainsi de maintenir le débit sanguin rénal et la filtration glomérulaire quasiment constants pour une gamme très étendue de pressions artérielles.

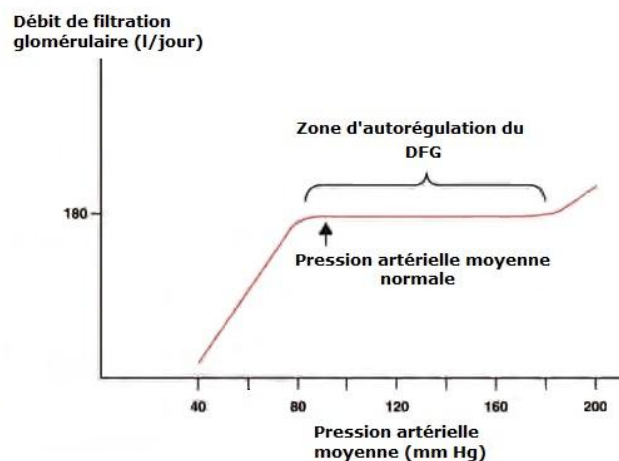


Figure 12 – Autorégulation du DFG
(Extrait de Lacourt, 2012)

Ce graphique illustre le maintien du DFG malgré les variations de pression artérielle qu'il peut y avoir physiologiquement.

Pour limiter les effets de la fluctuation de la pression artérielle, cette autorégulation se fait par le maintien de l'équilibre entre les résistances des artérioles afférentes et efférentes, par un processus de vasomotricité. Lorsque la pression artérielle augmente, la paroi des artères est étirée, ce qui provoque l'ouverture de canaux calciques sensibles à l'étirement et la vasoconstriction réflexe. Cela permet de réguler la pression hydrostatique, qui comme nous l'avons vu, influence directement le DFG (Lacour, 2013).

Une partie de l'autorégulation rénale est le fruit d'un autre mécanisme : le rétrocontrôle tubulo-glomérulaire. L'augmentation de la pression artérielle augmente le DSR, ce qui augmente le DFG et accroît le flux du filtrat et la quantité de NaCl présent dans celui-ci. Cet accroissement est détecté par les cellules de la macula densa (qui se situe au niveau de la branche ascendante de l'anse de Henlé). Le NaCl va être réabsorbé sans eau, ce qui va augmenter l'osmolarité interstitielle et aboutir à la libération d'adénosine. Cette dernière va se fixer sur les récepteurs purinergiques, ce qui déclenchera une vasoconstriction de l'artériole afférente et diminuer le DSR (Jacob, 2007).

2.2.4.2. Régulation hormonale

Il existe également une régulation hormonale, que nous ne développerons que brièvement. Elle n'est mise en place quasiment qu'en cas d'hypovolémie. Plusieurs hormones sont impliquées : l'angiotensine II, l'adrénaline, la noradrénaline, les prostaglandines, et les kinines. L'angiotensine II, l'adrénaline, et la noradrénaline ont un effet vasoconstricteur sur les artérioles afférente et efférente, tandis que les prostaglandines et les kinines, libérées sous l'action de l'angiotensine II et la noradrénaline, ont plutôt un effet vasodilatateur, ce qui permet d'éviter une ischémie rénale excessive.

2.2.5. Exploration fonctionnelle rénale

2.2.5.1. Mesure du DFG

La mesure du DFG repose sur la notion de clairance, qui correspond au volume de plasma filtré par unité de temps. Elle permet d'évaluer l'état de gravité d'une maladie rénale.

La méthode la plus précise utilise un polysaccharide de fructose, neutre, de 5 kDa, et éliminé uniquement par filtration et sans réabsorption appelé inuline. Ainsi, l'inuline filtrée est égale à l'inuline excrétée, ce qui permet, après mesure du débit d'urine, de la concentration urinaire en inuline, et le calcul de la quantité d'inuline excrétée, d'avoir la clairance de l'inuline.

En pratique, lorsqu'on veut mesurer le DFG, c'est la clairance de la créatinine, molécule issue de la dégradation de la créatine, qui est utilisée. Malgré une légère sécrétion au niveau du tube contourné proximal à l'origine d'une surestimation du débit de filtration glomérulaire, la

créatinine possède les mêmes propriétés que l'inuline, c'est-à-dire qu'elle est librement filtrée dans le glomérule sans réabsorption, synthèse, ou métabolisation dans le rein.

Cependant, en clinique, la connaissance du DFG n'est pas indispensable, et la mesure de la concentration plasmatique de créatinine est suffisante. Ainsi, une élévation de la créatinine plasmatique indique une insuffisance rénale. A ce stade, on effectue des mesures régulières afin de contrôler l'évolution de la maladie.

2.2.5.2. Physiopathologie

Une anomalie de filtration glomérulaire a plusieurs conséquences. L'une d'entre elles est l'apparition d'une protéinurie. En effet, tout est fait au niveau de la barrière de filtration pour que les protéines ne soient pas filtrées. Même si les plus petites qui sont chargées négativement arrivent à passer cette barrière, elles sont ensuite réabsorbées au niveau du tube contourné proximal, ce qui fait que l'urine définitive est complètement dépourvue de protéines.

Ainsi, lorsque la barrière de filtration ne remplit plus son rôle, les protéines passent dans les urines. On parle alors de protéinurie glomérulaire, à l'origine de glomérulopathies.

Elles peuvent être détectées par bandelette urinaire (qui ne détecte pratiquement que l'albumine).

Outre la protéinurie glomérulaire, liée à un défaut de réabsorption des petites protéines au niveau du tube contourné proximal, on trouve également la protéinurie par excès de production, comme dans le cas de leucémie ou d'autres hémopathies.

Après avoir traité de la physiologie rénale, nous allons à présent développer une affection rénale particulière : la glomérulopathie familiale du Dogue de Bordeaux.

3. LA GLOMERULOPATHIE FAMILIALE DU DOGUE DE BORDEAUX

La glomérulopathie familiale du Dogue de Bordeaux, appelée aussi glomérulonéphropathie, est une maladie découverte récemment chez cette race. C'est en 2011 qu'ont été décrites pour la première fois les formes modérées et légères de la maladie. Affection déjà décrite chez le Cocker Spaniel, le Bull Terrier, le Samoyède, le Doberman, le Pinscher, le Dalmatien, le Bullmastiff, le Rottweiler, le Beagle, le Bouvier Bernois, et des chiens croisés du Navasota, elle semble avoir une origine génétique (Lavoué et al., 2010).

3.1.Etiologie

L'étiologie de la glomérulopathie n'est pas très bien connue à ce jour. Elle serait consécutive à une ou des mutations génétiques impactant le fonctionnement de la filtration glomérulaire. Ainsi, il est possible qu'il y ait des anomalies au niveau du podocyte, de la membrane basale glomérulaire, de la membrane de filtration, ou des fentes de filtration.

3.2.Physiopathologie

La physiopathologie de la glomérulopathie du Dogue de Bordeaux est encore mal connue. Les connaissances à ce jour la rapprochent de celle des autres glomérulopathies.

Des lésions glomérulaires, notamment au niveau des podocytes, seraient à l'origine d'une perméabilité anormale. Celle-ci entraînerait une fuite protéique urinaire, ce qui provoquerait une hypoprotéïnémie, et notamment une hypoalbuminémie, responsable d'un syndrome néphrotique.

Des œdèmes peuvent apparaître en conséquence de la baisse de la pression oncotique causée par l'hypoprotéidémie si elle est sévère. Il en résulte une hypovolémie.

L'hypoalbuminémie mènerait également à une hypercholestérolémie et une hyperlipémie (Cotard, 1993).

3.3.Formes et signes cliniques

La plupart des chiens développent des signes cliniques dans leur première année de vie. Les premiers signes cliniques évocateurs sont une protéinurie et une hypercholestérolémie. Suivent ensuite anorexie, polyuro-polydipsie, perte de poids, léthargie et vomissements. Les plus jeunes peuvent présenter un retard de croissance. Il existe trois formes à la maladie : la forme juvénile, la forme intermédiaire et la forme asymptomatique (Lavoué et al., 2010).

3.3.1. Forme juvénile

Cette forme est la plus grave. Les signes cliniques se manifestent dans les deux premières années de vie de l'animal. Il y a apparition progressive d'une protéinurie, accompagnée d'une hypercréatininémie. Puis une polyuro-polydipsie s'installe, associée d'un retard de développement musculaire, ainsi que des troubles digestifs et parfois neurologiques : ces derniers s'expliqueraient par l'augmentation de l'urémie (Lavoué et al., 2010). On observe des lésions tardives de fibrose, nécrose, et inflammation au niveau des glomérules rénaux. Cette forme mène inexorablement à une mort prématurée dans les deux premières années de vie de l'animal. L'incidence serait de 0,5 à 1%, mais cette affection serait largement sous-estimée pour plusieurs raisons : manque de diagnostic, mortalité périnatale, refus de communication (Lavoué et al., 2010).

3.3.2. Forme intermédiaire

Cette forme se développe moins rapidement que la précédente : le diagnostic se fait entre 2 et 5 ans. Les signes cliniques sont également plus frustes et très variables : on observe le plus souvent une polyuro-polydipsie et une protéinurie. La prévalence serait de 1 à 2%.

3.3.3. Forme dite « *silencieuse* » ou asymptomatique

Dans cette forme, les signes cliniques sont quasi-inexistants. Seule une protéinurie peut être observée. Cette forme est la plus difficile à mettre en évidence. La prévalence serait de 30%.

3.4. Diagnostic

La conduite diagnostique face à une suspicion de glomérulopathie passe par quatre points essentiels :

- Mise en évidence d'une glomérulopathie grâce au recueil des circonstances d'apparition et des commémoratifs (predisposition raciale, historique de l'animal, signes cliniques évocateurs), à la découverte d'une protéinurie anormale, à la modification de paramètres sanguins, et à l'examen échographique.
- Confirmer l'atteinte glomérulaire par vérification de la persistance de la protéinurie et identification de la nature des protéines (notamment par leur taille) par électrophorèse.
- Déterminer si elle est primaire ou secondaire, et voir s'il y a des complications associées.
- Effectuer des biopsies rénales afin de confirmer le diagnostic.

3.4.1. Paramètres sanguins

La mesure de certains paramètres sanguins étant indispensables pour déceler une insuffisance rénale, on effectuera une prise de sang, de préférence à jeun. Ainsi, dans le cas de l'affection étudiée, l'**urée**, la **créatinine**, le **phosphore**, le **cholestérol**, seront augmentés, tandis que l'**albumine** et les **protéines sériques** seront diminuées.

Les valeurs de référence pour ces paramètres chez le Dogue de Bordeaux ont été déterminées dans une étude réalisée en 2013 par Lavoué et al. (**Annexe 2**).

On peut également noter une hypercoagulabilité causée par une perte d'antithrombine (qui a une masse moléculaire proche de celle de l'albumine) dans les urines, caractérisée par une thrombocytose, une augmentation de la fibrinogénémie et une dyslipidémie (White et al., 2016).

3.4.2. Analyse urinaire

Une première analyse par bandelette urinaire permet également de mettre en évidence les signes d'une insuffisance rénale, et notamment la présence de protéines dans les urines, point de départ de la glomérulopathie familiale. La présence de protéines est à mettre en relation avec le pH urinaire (Smee et al., 2007).

On pourra également déterminer le RPCU (Rapport Protéines/Créatinine urinaires) pour évaluer la quantité de protéines urinaires, et effectuer une électrophorèse afin de caractériser leur nature.

Un RPCU sera considéré comme anormal s'il est supérieur à 0,5 ; normal en-dessous de 0,2 ; et douteux lorsqu'il se situe entre ces deux valeurs. Une valeur supérieure à 2 de façon répétée sur plusieurs semaines est fortement évocatrice d'une glomérulopathie (Lees et al., 2005).

3.4.3. Echographie rénale

L'échographie des reins montre un cortex épaissi, avec un effacement de la limite cortico-médullaire, ainsi qu'une médulla peu distinguishable. Des kystes corticaux sont occasionnellement visibles (Lavoué et al., 2010). Néanmoins ces images ne sont pas spécifiques de la maladie.

3.4.4. Aspect macroscopique

Les reins ont une surface irrégulière et sont plus petits et plus pâles que la normale (**figure 13**). La capsule rénale est adhérente au plan profond.



Figure 13 – Aspect macroscopique d'un rein appartenant à un Dogue de Bordeaux atteint de la forme juvénile de la glomérulopathie familiale
(D'après Lavoué et al., 2010)

La figure A présente un rein entier sans sa capsule glomérulaire. Son aspect granuleux est dû à la présence de nombreux petits kystes d'environ 1 à 2 mm de diamètre présents dans le cortex.

La figure B présente ce même rein coupé transversalement. On distingue les petits kystes corticaux que l'on voyait sur la figure précédente coupés transversalement. Le rapport cortex/médulla est ici de 1:1, et sa limite est ici encore visible, ce qui n'est pas toujours le cas (Lavoué et al., 2010).

3.4.5. Histologie

L'analyse de biopsies rénales par un spécialiste demeure à ce jour le seul moyen d'avoir un diagnostic de certitude. En effet, les lésions sont très semblables à d'autres affections rénales, comme une dysplasie ou d'autres maladies rénales chroniques (Lavoué et al., 2010).

Les analyses histologiques révèlent une hypercellularité mésangiale avec augmentation de la matrice, une membrane de filtration et une capsule de Bowman épaissies (glomérulosclérose), une expansion de la matrice mésangiale et une hyperlobulation dans certains glomérules (glomérules et tubules dysplasiques) (**figure 14-B**). Ces lésions sont morphologiquement similaires à celles trouvées dans la glomérulonéphropathie mésangio-proliférative. Les lésions glomérulaires notées chez le Dogue de Bordeaux ne sont cependant pas immuno-médiées car aucun immun-complexe n'a été trouvé, ni par immunohistochimie, ni par immunofluorescence. Des dilatations kystiques de l'espace de Bowman avec une atrophie glomérulaire accompagné d'adhésions segmentaires à la capsule ont été également observées

(**figure 14-A**) en tant que lésions secondaires à un blocage des néphrons d'une fibrose plus distale. Il a pu également être noté une légère irrégularité de la membrane basale avec un effacement variable des pieds des podocytes.

Enfin on note une atrophie tubulaire multifocale marquée, souvent péri-globulaire, une infiltration lymphocytaire et une diminution de cellules plasmatiques.

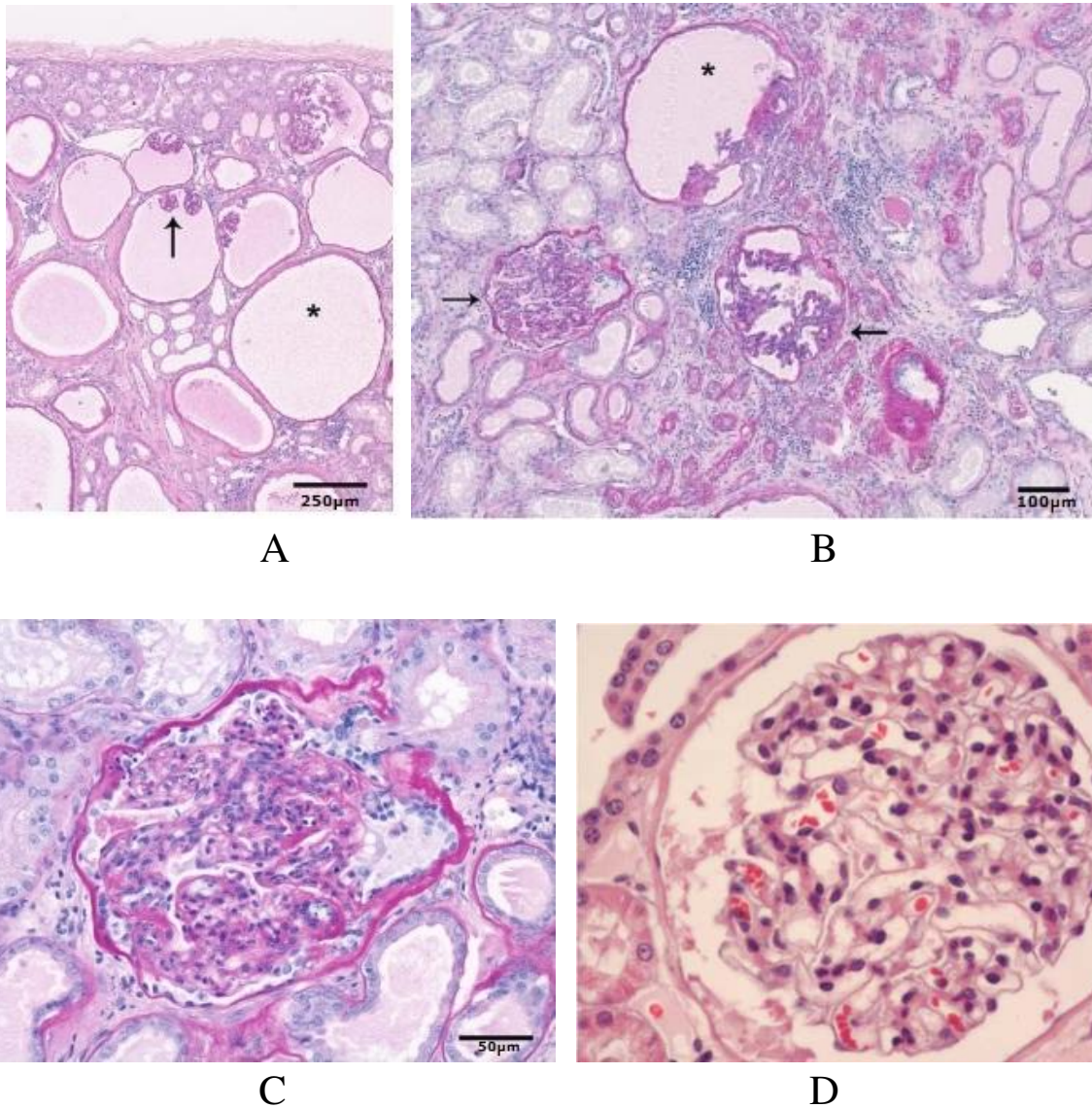


Figure 14 – Aspect histologique (coloration PAS) du cortex rénal (A et B) et d'un glomérule rénal d'un Dogue de Bordeaux atteint de la forme juvénile de la glomérulopathie familiale (C), ainsi que d'un glomérule de chien sain (D) (D'après Lavoué et al., 2010, et Ettinger, 2017).

La *figure A* illustre une atrophie glomérulaire kystique (indiquée par la flèche noire) et une absence de capillaires (indiquée par l'étoile). Une fibrose interstitielle et péri-glomérulaire, ainsi que des signes d'inflammation sont également visibles.

La *figure B* montre également une atrophie glomérulaire kystique (indiquée par l'étoile), mais aussi une hyperlobulation, une hypercellularité mésangiale, et des

synéchies (indiqués par les flèches). Enfin, des tubules atrophiés ainsi que des lésions d'inflammation lymphocytaire multifocales sont également visibles au sein du tissu conjonctif.

La figure C est un grossissement du glomérule indiqué par la flèche de gauche sur la figure B ci-dessus. L'hyperlobulation, l'hypercellularité et l'expansion de la matrice mésangiale, l'effondrement des capillaires, la distension de leurs membranes, plusieurs synéchies et la prolifération des cellules épithéliales pariétales sont particulièrement visibles (Lavoué et al., 2010).

La figure D est un glomérule de chien sain. La membrane basale est régulière sur toute sa longueur, la lumière du capillaire est large, la matrice mésangiale est moins développée, et on ne trouve pas d'hypercellularité.

3.4.6. Microscopie électronique

Le diagnostic de certitude se fait par microscopie électronique (**figure 15**).

Les clichés de microscopie électronique permettent de distinguer une membrane basale glomérulaire d'épaisseur variable, avec des zones plissées qui contiennent des petites inclusions membranaires électron-denses. Les cellules épithéliales et les podocytes apparaissent souvent gonflés. Il y a un effacement diffus des pieds des podocytes, des transformations multifocales des villosités, des interpositions des cellules mésangiales, et un effondrement des capillaires.

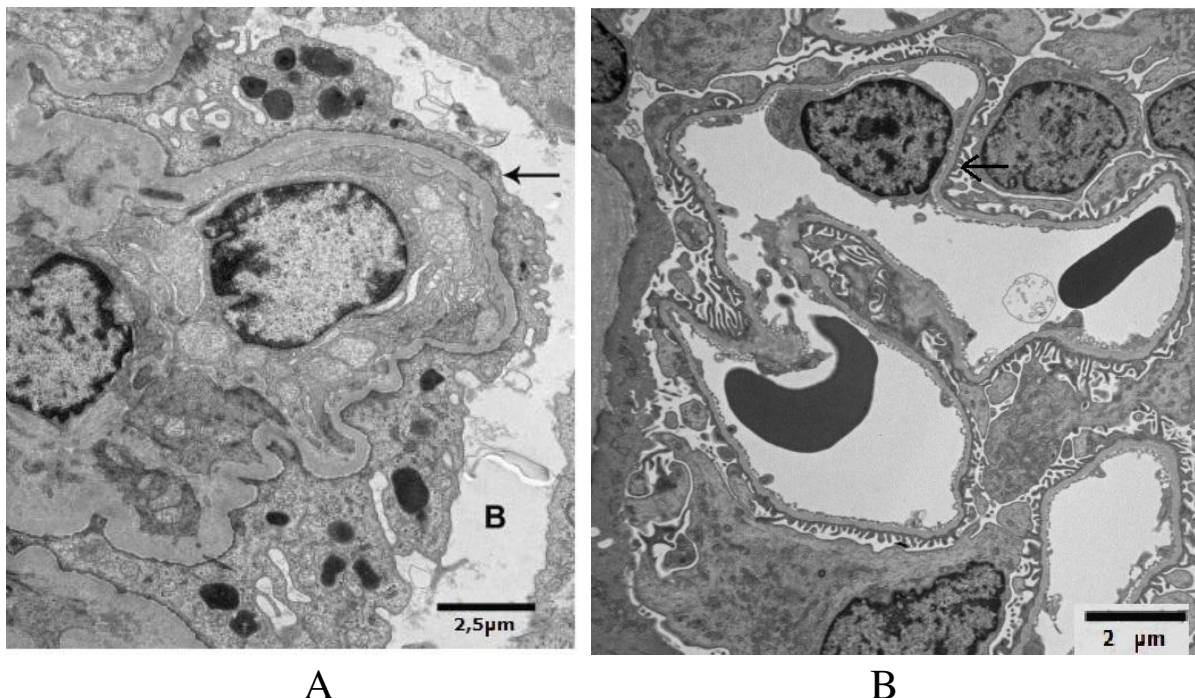


Figure 15 – Clichés de microscopie électronique d'une portion de glomérule appartenant à un Dogue de Bordeaux atteint de la forme juvénile de la glomérulopathie familiale (A) comparé à celui d'un chien sain (B)
(D'après Lavoué et al., 2010 et Cianciolo, 2016)

La figure A illustre l'effacement d'un pied de podocyte (indiqué par la flèche noire) par rapport à un glomérule de chien sain (B), ainsi que le gonflement des cellules endothéliales, alors que la lumière des capillaires est occluse par un monocyte. La paroi des capillaires glomérulaires ne présente cependant aucune anomalie d'épaisseur ni d'immun-complexes. La capsule de Bowman est indiquée par la lettre B.

3.5. Traitement

Le traitement est à ce jour hygiénique et symptomatique.

Un changement d'alimentation devra être établi dans le but de limiter l'aggravation des lésions glomérulaires en réduisant la Puf : on privilégiera un aliment riche en oméga 3, contenant des protéines de très bonne qualité et hautement digestibles, mais pauvre en phosphore et sodium (Brown et al., 2013, Littman et al., 2013).

Un traitement médicamenteux pourra également être mis en place, afin de limiter la protéinurie qui entretient la glomérulopathie. Il pourra être prescrit un inhibiteur de l'enzyme de conversion (IECA), comme par exemple l'énalapril ou le bédazépril, dont la posologie de départ sera de 0,5mg/kg/jour une fois par jour, puis augmentée progressivement par palier de 0,5 mg/kg/jour sans jamais dépasser 2 mg/kg/jour deux fois par jour (Grauer et al., 2000). Il ne pourra être cependant mis en place que si l'animal est cliniquement stable normohydraté et euvolémiqne.

Dans le cas où les IECA ne donnent pas de résultats satisfaisants, on pourra également choisir dans l'arsenal thérapeutique un antagoniste des récepteurs de type I à l'angiotensine, comme par exemple le telmisartan, en commençant avec une posologie de 0,3 à 0,5 mg/kg/jour et en augmentant jusqu' à 1 à 5 mg/kg/jour (Brown et al., 2013).

Les deux traitements pourront être éventuellement utilisés de manière concomitante.

L'objectif du traitement est de faire diminuer le RPCU de 50% par rapport à la valeur initiale, ou au moins de le maintenir en-dessous de 0,5.

Un suivi régulier est à prévoir, afin de contrôler l'évolution de la maladie, et de moduler le traitement en conséquence.

3.6.Pronostic

Le pronostic dépendra de la forme de glomérulopathie.

Dans le cas de la **forme juvénile**, le pronostic est sombre : la mort survient généralement dans les deux ans de l'animal.

Le pronostic de la **forme intermédiaire** dépendra de la vitesse d'apparition des signes cliniques et de leur niveau de gravité.

Quant à la **forme asymptomatique**, le pronostic est bon, car les lésions rénales sont moins importantes et moins avancées, ce qui n'impacte ni le confort de vie de l'animal, ni sa longévité.

4. INTÉRÊT DE LA GÉNÉTIQUE CHEZ LE CHIEN

4.1.Domestication, sélection, structure de l'espèce

Le chien, contrairement à d'autres espèces, présente une diversité phénotypique très importante. Si l'on compare par exemple un chihuahua et un berger allemand, les différences sont nombreuses et évidentes, que ce soit au niveau de la taille, du poil, de la longueur du museau ou des pattes.

Cette diversité est le reflet d'un grand polymorphisme génétique entre races (Parker et al., 2017). Cependant, l'espèce canine a subi au cours du temps plusieurs épisodes sélectifs d'un point de vue génétique, à l'origine d'une réduction de cette diversité génétique à l'intérieur de chaque race.

Deux épisodes majeurs de goulots d'étranglements ont ainsi contribué à cette sélection génétique et à la structure génétique actuelle de l'espèce.

Le premier a eu lieu lors de la domestication du loup il y a 10 à 15 000 ans. On a d'abord pensé que celle-ci avait débuté uniquement en Asie (Vilà et al., 2002). Cependant des études plus récentes ont au contraire montré des origines diverses, notamment en Europe, en Asie Centrale ou encore en Asie du Sud-Est (Frantz et al., 2016).

Ces études sont plus complexes qu'il n'y paraît. En effet, les populations de loups étaient très mobiles, le nombre d'ossements préhistoriques d'anciens chiens est restreint, et l'ADN extrait, qu'il soit mitochondrial ou génomique, n'est pas toujours de bonne qualité. Cet ADN extrait, combiné aux dernières données archéozoologiques et de biologie moléculaire, laisse à penser qu'il y aurait eu deux foyers distincts de domestication (Wayne, 1993 ; Vilà et al., 1997 ; Savolainen et al., 2002; Pang et al., 2009 ; Thalmann et al., 2013).

Ainsi, la domestication aurait commencé en Europe et se serait poursuivie en Asie à partir d'une autre population de loups. Cette dernière, importée en Europe par les hommes nomades, aurait ensuite progressivement remplacé les chiens européens il y a plus de 6 400 ans (Larson et al., 2012 ; Frantz et al., 2016).

Concernant ses circonstances d'apparition, plusieurs hypothèses existent. L'homme aurait d'une part joué un rôle en sélectionnant certains loups pour la défense et la chasse ; d'autre part, l'espèce aurait elle-même contribué à ce processus. En effet, certains loups, plus téméraires et moins agressifs que les autres, auraient trouvé des avantages, notamment d'un point de vue alimentaire, à se rapprocher de l'homme. Il leur était alors plus facile et moins contraignant de se nourrir auprès des hommes que de chasser. Ce mécanisme a été appelé « *proto-domestication* » (Hare et al., 2012).

Le chien et l'homme ont donc évolué ensemble depuis des dizaines de milliers d'années dans le même environnement. Cette co-évolution a eu des répercussions sur le génome du chien qui s'est adapté en conséquence. On distingue notamment 2 groupes de gènes concernés : les gènes responsables de la digestion et du métabolisme des acides gras, et les gènes relatifs au développement du système nerveux, en supposant que les changements comportementaux soient consécutifs à la sélection (Axelsson et al., 2013).

Ce premier goulot d'étranglement a donc permis un premier remaniement génomique. Si celui-ci est le fruit de plusieurs événements plus intuitifs que véritablement recherchés, le deuxième goulot a été davantage franc et réfléchi. Il s'est produit lors de la création des races modernes il y a quelques centaines d'années : certains caractères physiques, comportementaux, ou autres, ont été volontairement sélectionnés, grâce à des alliances consanguines au cours de nombreuses générations, marquant le début d'une sélection intense imposée par l'homme.

Les premières traces écrites qui en témoignent datent de la fin du 19^{ème} siècle. C'est à cette époque qu'ont été définis les phénotypes particuliers des « *standards* » de race, reconnues par la « *Fédération Cynologique Internationale* » (FCI), et en France par la « *Société Centrale Canine* » (SCC). Des critères comme la taille, la longueur et/ou la couleur des poils, la stature, etc., sont établis et homogénéisés. De nos jours, on ne dénombre pas moins de 400 races réparties en 10 groupes. En France, pour qu'un chien soit considéré comme de race pure, il doit être issu de parents inscrits sur le « *Livre des Origines Français* » (LOF) attestant de leur appartenance à la race.

Cette sélection drastique a laissé des traces dans le génome du chien. La structure haplotypique des chromosomes et le déséquilibre de liaison (DL) ont été modifiés (**figure 16**).

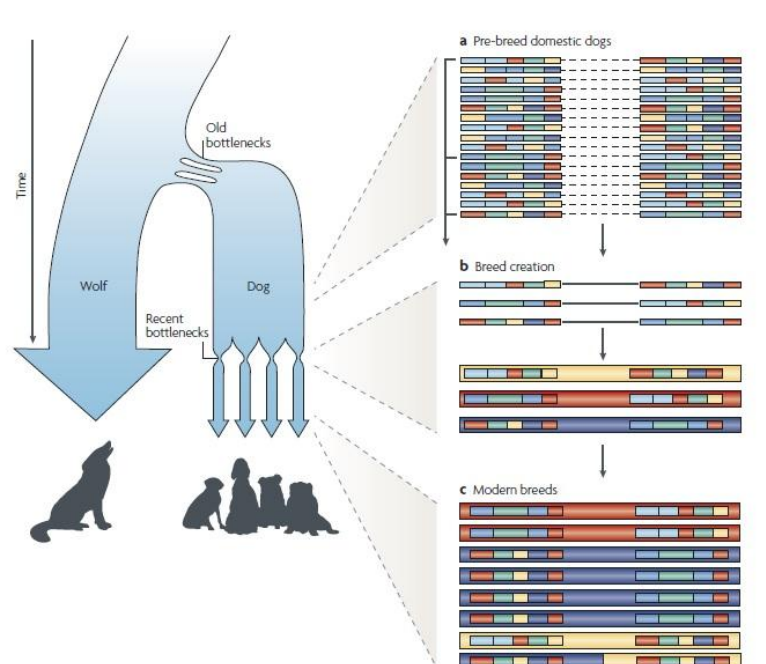


Figure 16 – Structure haplotypique du génome canin
(Extrait de Karlsson et al., 2007)

Avant le premier goulot d'étranglement, chez le loup, le brassage génétique est fort, et les combinaisons non aléatoires d'allèles appartenant à des *loci* consécutifs, appelées déséquilibre de liaison (DL), sont petites.

Suite à la création des races, la petite taille des populations fondatrices, le petit nombre de mâles reproducteurs et la consanguinité réduisent le brassage génétique et augmentent l'homozygotie. Les associations entre des allèles proches ne sont plus aléatoires mais liées, les régions en déséquilibre de liaison s'allongent, et les blocs haplotypiques sont de plus en plus homozygotes (Karlsson et al., 2007).

Ainsi, on observe une forte homogénéité intra-race, ces dernières étant considérées comme des isolats génétiques, au même titre que les isolats génétiques humains (Karlsson & Lindblad-Toh, 2008), comme par exemple en Finlande ou en Islande (Shearin & Ostrander, 2010).

Cependant, cette sélection à divers niveaux et époques a également entraîné la co-sélection des allèles à risques, prédisposant à certaines pathologies. En choisissant des caractères précis, des allèles responsables de pathologies ont eux aussi été sélectionnés, soit par effet de position (sélectionner un allèle a permis de sélectionner un autre physiquement proche, responsable d'une maladie), soit par leurs effets en eux-mêmes (Ostrander & Giniger, 1997). On peut citer par exemple le museau court des races brachycéphales, qui les prédispose à des problèmes respiratoires, ou le Shar-Pei, dont la fièvre familiale serait à corrélérer à son phénotype plissé.

Cependant, cette réduction de diversité génétique peut présenter certains avantages lorsqu'il s'agit de faire des études génétiques.

4.2.Intérêt du chien dans la recherche génétique chez l'homme

De par leur proximité phylogénétique, plus de 350 maladies génétiques chez le chien ont leur homologue dans l'espèce humaine (Lindblad-Toh et al., 2005). En effet, le génome du chien (**figure 17**) comprend à peu près le même nombre de gènes, dont la plupart (plus de 18 000 gènes sur 25 000 (Kirkness, 2003)) sont orthologues, c'est-à-dire qu'ils descendent d'un même gène ancestral.

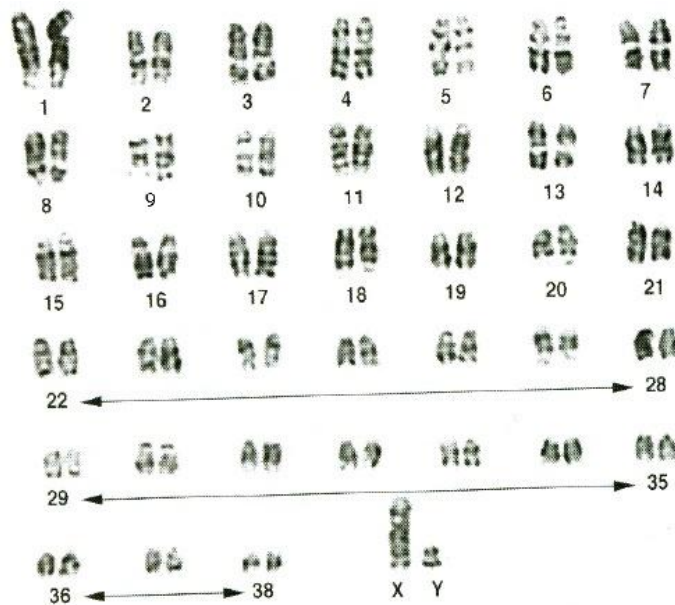


Figure 17 – Caryotype du chien, CFA (*Canis Familiaris*)
(Extrait de Kirkness, 2003)

Le génome du chien contient 2,4 milliards de nucléotides et environ 19 000 gènes (Ostrander & Wayne, 2005), répartis sur 38 paires d'autosomes et une paire de chromosomes sexuels. L'homme a quant à lui 3,2 milliards de nucléotides et environ 25 000 gènes, répartis sur 22 paires d'autosomes et une paire de chromosomes sexuels (Kirkness, 2003).

D'un point de vue génétique, le chien présente d'autres avantages :

- L'existence d'« *étalons champions* » (**figure 18**), renforçant la contribution génétique mâle par rapport à celle des femelles, combinée à une population fondatrice à petit effectif, mène à une homogénéité intra-raciale importante, qui a pour conséquence de limiter le nombre de loci et l'hétérogénéité des maladies (Shearin & Ostrander, 2010).

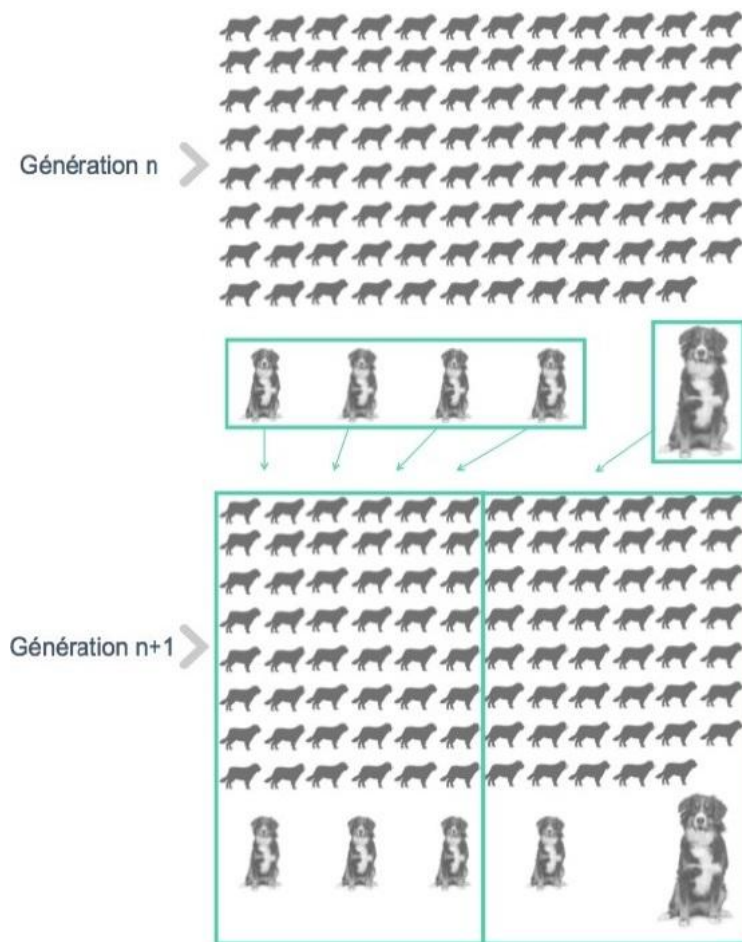


Figure 18 – Illustration de l'utilisation d'étalons champions dans la population des Bouviers Bernois français
(Adapté de Abadie et al., 2009)

Seulement 5,4% des mâles bouviers bernois participent à la génération suivante (chiens dans les deux petits rectangles), parmi lesquels seulement 0,78% des mâles (représenté par le chien dans le rectangle à droite) produit plus de 50% de la génération suivante (génération n+1).

- Comme vu précédemment, les chromosomes du chien contiennent de longues régions en déséquilibre de liaison pouvant atteindre plusieurs mégabases, alors que chez l'homme leur taille varie de 10 à 20 kb. Cette particularité a pour avantage de nécessiter peu de marqueurs pour investiguer le génome : 30 à 50 000 marqueurs chez le chien contre 500 000 à 1 million chez l'homme (Lindblad-Toh et al., 2005).

Par ailleurs, il existe aussi chez le chien un outil extrêmement utile en génétique : le pedigree. Celui-ci permet d'avoir une trace écrite et officielle de l'ascendance des chiens, de leurs différents mariages, et de leur descendance. Il est alors possible de construire un arbre généalogique sur un grand nombre de générations, de suivre le caractère héréditaire d'un trait à travers les générations, et de poser des hypothèses quant à son mode de transmission.

En association avec la présence de consanguinité dans l'espèce et pratiques d'élevage avec étalons champions, cette homogénéité des individus dans une race a également pour conséquence d'augmenter la prévalence de certaines maladies. De nombreuses atteintes héréditaires ont une prévalence de 1 à 10%, alors qu'à titre de comparaison, chez l'homme, on parle de maladie fréquente lorsque celle-ci est de l'ordre de 0,05% (soit un cas sur 2 000), et de très fréquente lorsqu'elle est de 0,2% (soit un cas sur 500). Certaines prévalences sont encore plus élevées, comme par exemple dans le cas de la surdité chez le Dalmatien, où elle est de 30% (Cargill et al., 2004). On peut citer également le cas de la maladie valvulaire dégénérative mitrale chez le Cavalier King Charles, où d'après certaines études, 100% des individus de plus de 11 ans sont atteints (Chetboul et al., 2004). Cette forte prévalence est un atout dans les études génétiques, il est alors plus facile d'accéder à l'ADN d'individus malades, pouvant appartenir à une même fratrie.

Enfin, l'homme et chien vivant ensemble :

- Ils partagent le même environnement, et sont donc exposés aux mêmes facteurs environnementaux
- Les chiens font partis des animaux les plus médicalisés, les connaissances à leur sujet sont donc plus approfondies que dans d'autres espèces

Toutes ces caractéristiques font du chien un excellent modèle pour la recherche génétique, et il y avait donc un réel intérêt à séquencer son génome. C'est pour ces raisons qu'en 1997, une cartographie à partir de l'ADN de plusieurs chiens de différentes races a été réalisée (Mellersh et al., 1997). Un séquençage et une annotation du génome en 2003 issu de l'ADN d'un Caniche mâle ont suivi quelques années plus tard (version annotée CanFam1, « *Canis Familiaris 1* ») (Kirkness, 2003).

D'autres annotations ont été également réalisées par la suite à partir du séquençage de l'ADN d'un Boxer femelle, associé au séquençage partiel de l'ADN de 9 autres races (Beagle, Bellington Terrier, Berger allemand, Chien d'eau portugais, Labrador retriever, Lévrier italien, Malamute, Rottweiler et Setter Anglais), de 4 loups et d'un coyote, couvrant 99% du génome : CanFam2 en 2005, puis une troisième et quatrième, respectivement en 2012 (CanFam3.1) et 2016 (CanFam3.1-plus) (Wucher et al., 2017).

Ces données sont disponibles sur une plate-forme en ligne (<https://genome-euro.ucsc.edu/>).

Le prochain projet de la communauté scientifique canine, mis en place par les Docteurs E. Ostrander, R. Wayne (NIH, USA) et G. Dong (Chine), et inspiré du projet de séquençage chez l'homme « *The 1000 Genomes Project Consortium* » (Abecasis et al., 2010), consiste à réaliser le séquençage de génomes de 10 000 chiens.

Débuté au printemps 2016 par le séquençage de 1 000 génomes canins, ce projet devrait aboutir en 2020. Ce dernier a pour but l'amélioration de la compréhension de l'histoire évolutive du chien, l'exploration des changements génétiques associés à la domestication et la mise en évidence des relations génotype/phénotype.

4.3.Exemples de maladies canines/humaines

Si d'un point de vue génomique, le chien est intéressant comme modèle, d'un point de vue phénotypique, les manifestations cliniques exprimées chez l'homme et chez le chien sont souvent similaires (Karlsson & Lindblad-Toh, 2008).

Par exemple, un certain nombre de maladies présentes chez l'homme se retrouvent et s'expriment de façon similaire chez le chien.

Par exemple, l'amaurose congénitale de Leber chez l'enfant ressemble beaucoup à l'atrophie rétinienne du Briard, plus récemment appelée dystrophie rétinienne. Ces maladies se caractérisent par une dégénérescence des photorécepteurs, pouvant aboutir chez l'homme à une cécité incurable, et chez le chien à une cécité nocturne qui peut dans certains cas devenir totale. En 1997, le gène responsable de l'amaurose congénitale de Leber a été identifié : il s'agit du gène *RPE65*, codant pour une protéine de l'épithélium rétinien pigmentaire, et dont la délétion de quatre nucléotides provoque le déplacement du cadre de lecture, et fait apparaître un codon stop (Gu et al., 1997). Un an plus tard, Aguirre et son équipe démontrèrent que c'était ce même gène qui était impliqué dans l'atrophie rétinienne du Briard : le gène *RPE65*, avec une délétion similaire (Aguirre et al., 1998).

A contrario, l'étude de maladies génétiques chez le chien peut permettre de trouver de nouveaux gènes chez l'homme. Ce fut le cas pour l'ichtyose chez le Golden retriever (**figure 19**).

Une étude d'association menée sur 40 chiens génotypés a mis en évidence une région de 8,1 Mb comprenant 217 gènes sur le chromosome 12. Parmi eux, le gène *PNPLA1* (« *patatin like phospholipase domain containing 1* ») s'est révélé être un bon gène candidat. Ce gène code pour la protéine PNPLA1, qui intervient dans le métabolisme lipidique de la barrière cutanée. Localisée entre la couche épidermique supérieure et les couches inférieures kératinisées, elle joue un rôle dans la différenciation correcte des kératinocytes. Un séquençage des 10 exons de *PNPLA1* ainsi que de toutes les jonctions introns/exons a révélé une insertion/délétion responsable de l'apparition d'un codon stop dans l'exon 8, à l'origine de la production d'une protéine tronquée non fonctionnelle.

S'appuyant sur cette découverte chez le chien, l'implication de ce gène dans l'ichtyose humaine a été recherchée, et deux mutations de *PNPLA1* ont alors été trouvées chez des individus atteints d'ichtyose dans deux familles distinctes (Grall et al., 2012).

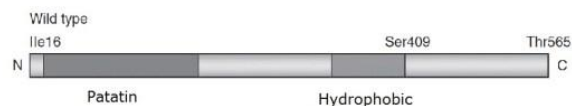
A. Caractéristiques cliniques de l'ichtyose chez le Golden Retriever



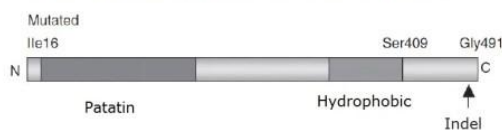
A. Caractéristiques cliniques de l'ichtyose chez l'homme



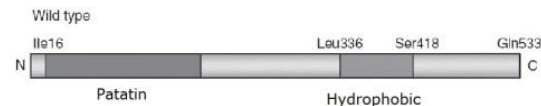
B. Protéine PNPLA1 normale chez le chien sain



Protéine altérée chez les Golden Retriever atteints



B. Protéine PNPLA1 normale chez l'homme sain



Protéine altérée chez certains patients atteints

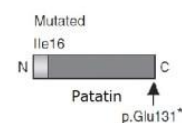


Figure 19 – Homologie clinique et génétique de l'ichtyose du Golden retriever et de l'ichtyose humaine de type ARCI (Autosomal Recessive Congenital Ichthyosis) (Adapté de Grall et al., 2012)

A : Homologie clinique de l'ichtyose du Golden Retriever avec une ARCI humaine.

B : La protéine impliquée dans l'ichtyose chez le Golden retriever et l'homme est la même, cependant les mutations ne sont pas localisées au même endroit sur le gène. Chez le chien, c'est dans la région terminale de la protéine que la mutation a été identifiée, tronquant la protéine de 74 acides aminés ; alors que chez l'homme, c'est le domaine enzymatique de cette protéine qui est touché, privant la protéine des deux tiers de sa structure.

Suite à cette découverte, un test génétique canin commercialisé par le laboratoire Antagene est sous licence internationale depuis 2010.

Cependant le Golden retriever n'est pas le seul à développer une ichtyose proche de celle de l'homme, d'autres races canines peuvent également être des modèles (**figure 20**).

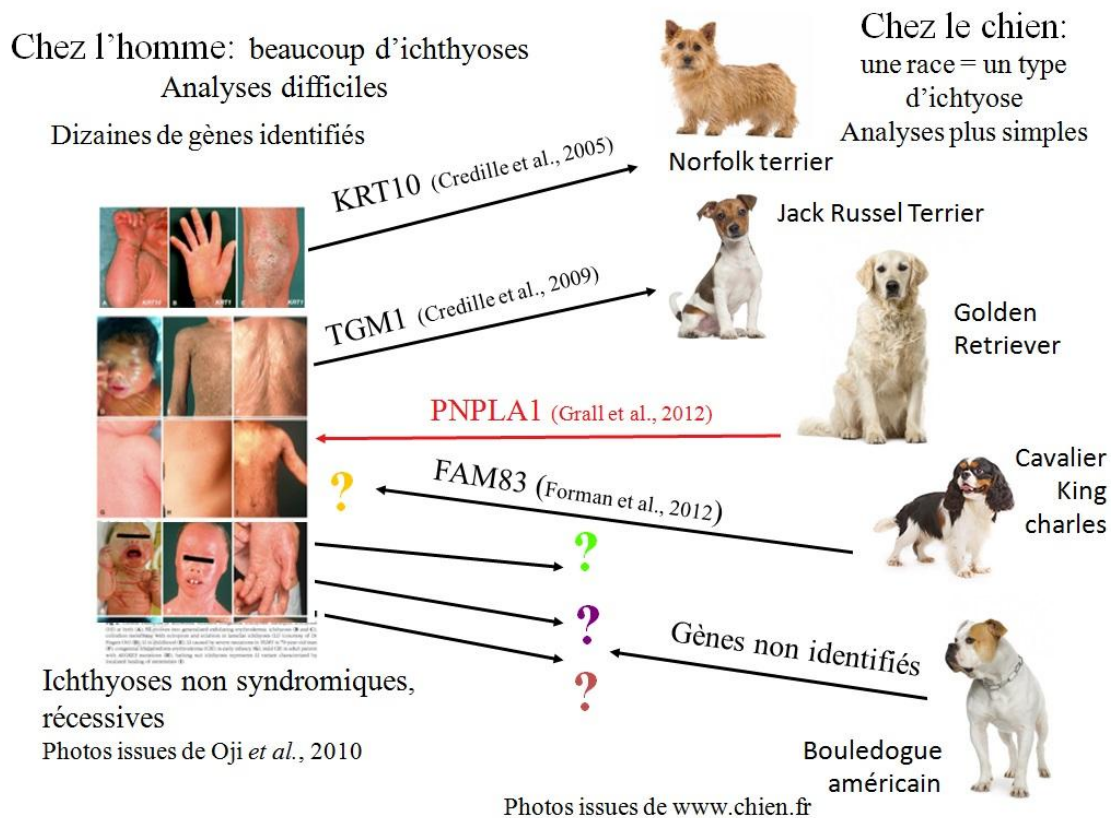


Figure 20 – Comparaison de l'ichtyose humaine et canine au niveau génétique
(D'après Plassais et al., 2012 ; Grall et al., 2012)

Pour chaque forme d'ichtyose chez l'homme, il existe une forme canine spécifique d'une race, avec des signes cliniques et une cause génétique identiques. Certaines de ces ichtyoses ont été d'abord trouvées chez l'homme, puis chez le chien, mais comme on l'a vu avec l'ichtyose du golden retriever, certaines ont d'abord été trouvées chez le chien, puis chez l'homme (Plassais et al, 2012).

Cependant il reste encore certaines ichtyoses, diagnostiquées chez le chien, dont l'origine génétique n'a pas encore été trouvée, ce qui ouvre la perspective de nouveaux gènes candidats pour des ichtyoses encore inconnues chez l'homme (Plassais et al., 2012).

La génétique du chien est donc un domaine en pleine expansion, qui sert aussi bien pour la recherche animale que dans la recherche humaine.

PARTIE B :
ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

1. PRÉAMBULE

1.1. Collecte des échantillons

Notre étude s'insère donc dans le projet de recherche visant à identifier les causes de la glomérulopathie familiale du Dogue de Bordeaux. La première étape dans toute étude génétique consiste à collecter des prélèvements sanguins afin d'en extraire l'ADN.

Il a été choisi de se concentrer en premier lieu sur les élevages plutôt que sur des particuliers, et ce pour plusieurs raisons :

- Le nombre d'individus possédés. En effet, un élevage contient le plus souvent de 4 à 14 individus, avec en moyenne 6,6 individus par élevage, dont 2 mâles et 4 femelles, avec des portées de 3 à 12 chiots (moyenne sur 36 élevages français, source site internet des éleveurs).
- La volonté de faire avancer la recherche dans le domaine des maladies héréditaires au sein de la race. En effet, étant les premiers acteurs dans la reproduction, les éleveurs se sentent particulièrement concernés par la transmission de maladies génétiques.
- La forte médicalisation des chiens. Les éleveurs font un suivi médical de leurs animaux de manière plus assidue et plus systématique auprès de leur vétérinaire que des particuliers. Ce suivi permet de faire également des études longitudinales sur des chiens malades, et est indispensable pour obtenir un diagnostic de certitude.
- Le regroupement des éleveurs au sein d'une association : la « *Société des Amateurs du Dogue de Bordeaux* » (SADB, <http://www.sadb.org/>), agréée par la « *Société Centrale Canine* », et dont l'objectif est de gérer l'amélioration de la race en France. La SADB est un véritable relai pour sensibiliser les éleveurs à la recherche en génétique, qui sont plus enclins à participer aux études menées sur les Dogues de Bordeaux. La communication et le recrutement sont donc grandement simplifiés.

Ainsi, divers éleveurs ont été contactés au cours des dernières années afin de faire participer leurs chiens à l'étude des causes génétiques de la glomérulopathie du Dogue de Bordeaux.

Le recrutement s'est effectué de différentes façons :

- Soit à l'occasion de réunions d'éleveurs (Nationales d'élevage, Régionales d'élevage). Cette modalité de recrutement a été effectuée par l'équipe du CNRS de Rennes.
- Soit par téléphone ou e-mail. Dans ce cas, un travail de listage a été effectué. A l'aide de l'annuaire disponible sur le site <http://www.chien.com/>, nous avons pu lister les coordonnées de 64 élevages qui ont été intégrées dans une base de données : nom de l'élevage, nom de/ des (l')éleveur(s), adresse, numéro(s) de téléphone, e-mail, et nombre de chiens dans l'élevage. Les différents chiens de certains élevages ont été

ensuite répertoriés, avec comme informations : nom, élevage, identification, date de naissance et âge, statut reproducteur, retraité ou décédé, nom des parents, participation antérieure aux études du CNRS. Un contact téléphonique a été réalisé pour 11 élevages. Il a été alors expliqué le travail de recherche effectué par le CNRS de Rennes, le principe de l'étude, les prélèvements nécessaires, et le suivi si possible jusqu'à la mort de l'animal. Le document contenant toutes ces données ne sera pas joint à notre rapport pour cause d'anonymat, les études de ce type étant confidentielles.

Des échanges par courrier électronique ont été également réalisés pour des élevages déjà contactés.

Des kits contenant le nécessaire pour réaliser les prélèvements sont ensuite envoyés par un chercheur de l'équipe « *Génétique du Chien* » (CNRS) à l'éleveur. Ces prélèvements peuvent se faire à l'occasion d'une visite annuelle vaccinale, ou d'un bilan de contrôle chez le vétérinaire traitant.

Les kits comprennent (**figures 21-26**) :

- **Un tube EDTA** (**figure 21**) pour l'extraction de l'ADN, qui sera conservé par la suite au CNRS de Rennes dans la bio-banque Cani-DNA. Il est nécessaire de prélever un minimum de 3 mL de sang.



Figure 21 – Tube EDTA pour kit
(Production personnelle)

- **Un tube hépariné**, associé à **un tube de type « Eppendorf »** identifié (**figure 22**). Un autre prélèvement sanguin (de minimum 2 mL) est réalisé sur un tube hépariné. Le vétérinaire traitant doit ensuite centrifuger immédiatement le tube pour récupérer le plasma, qu'il mettra ensuite dans le tube de type « *Eppendorf* » identifié et prévu à cet effet. Le plasma servira notamment pour les dosages de l'urée et de la créatinine qui seront effectués au service de médecine interne de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT) par le Dr. Rachel Lavoué.



Figure 22 – Tubes
hépariné et type
« *Eppendorf* » pour kit
(Production personnelle)



Figure 23 – Tubes sec et type « Eppendorf » pour kit
(Production personnelle)

- **Un tube sec**, associé à **un tube de type « Eppendorf »** identifié (**figure 23**). Un autre prélèvement sanguin (de minimum 2 mL également) est réalisé sur un tube sec. Le vétérinaire traitant devra ensuite le centrifuger après coagulation pour récupérer le sérum, qu'il mettra ensuite dans le tube de type « Eppendorf » identifié et prévu à cet effet. Le sérum servira pour la numération formule sanguine, afin de vérifier qu'il n'y ait pas d'autres pathologies sous-jacentes. Ces mesures seront également réalisées au service de médecine interne de l'ENVN par le Dr. Rachel Lavoué.

- **3 à 4 tubes de type « Eppendorf »** (**figure 24**) pour le prélèvement de 4 mL d'urine (prélèvement qui doit être réalisé par cystocentèse). 1 mL d'urine est à garder tel quel, tandis que les 3 mL restants seront à centrifuger immédiatement. Le surnageant sera ensuite réparti dans 2 ou 3 autres tubes de type « Eppendorf ».



Figure 24 – Tubes type « Eppendorf » pour kit
(Production personnelle)

Il est alors demandé au vétérinaire traitant de faire une analyse urinaire complète (bandelette, densité urinaire, analyse du culot avec et sans coloration) afin de s'assurer préalablement à l'envoi, de la présence ou non de protéinurie, et de l'absence d'inflammation ou d'infection urinaire. Le reste du surnageant et le tube d'urine sera ensuite récupéré par le service de médecine interne de l'ENVN pour effectuer le reste des mesures (RPCU, dosage des protéines s'il y en a).

- **Une pochette plastique (figure 25)** afin de protéger de toute fuite de liquide biologique durant le transport.



Figure 25 – Pochette de protection pour prélèvement
(Production personnelle)



Figure 26 – Kit complet prélèvements sang et urines
(Production personnelle)

Les kits de prélèvement sont également accompagnés d'un protocole (**Annexe 3**) et d'un schéma explicatif de prélèvement (**figure 27**), ainsi que d'un questionnaire clinique où sont notamment notés les résultats de l'analyse urinaire (**Annexe 4**).

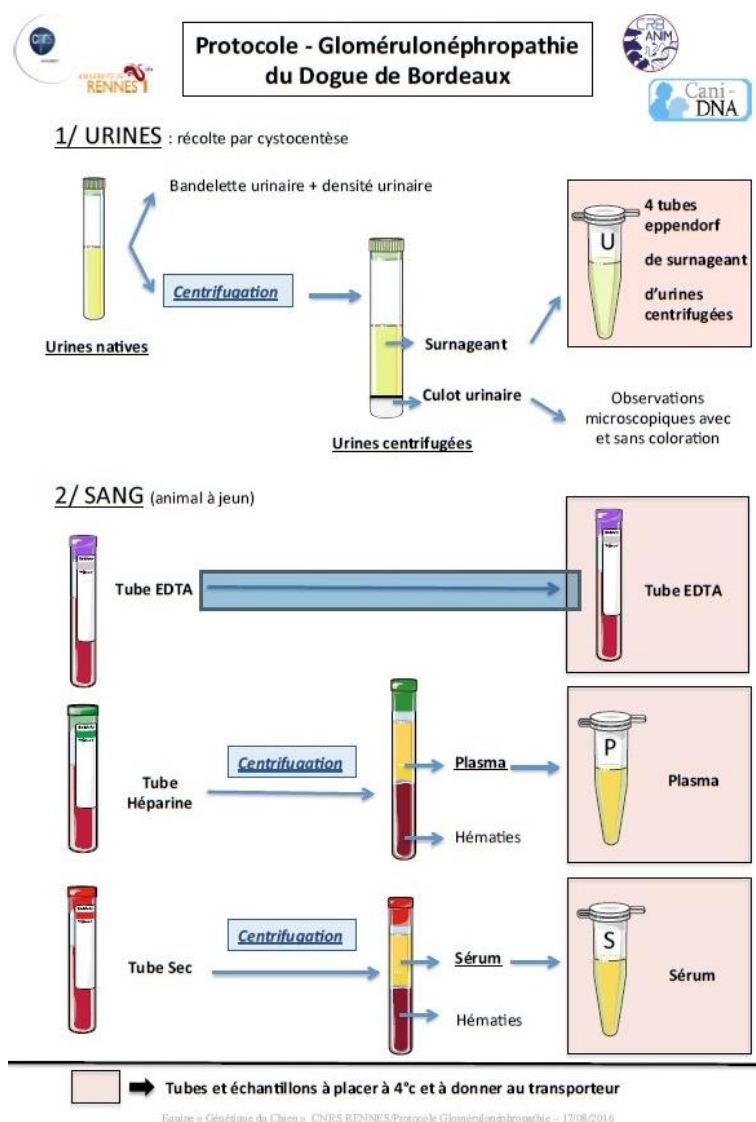


Figure 27 – Schéma explicatif du protocole de récupération des divers prélèvements à effectuer dans le cadre de l'étude de la glomérulopathie du Dogue de Bordeaux
(Document fourni par le CNRS de Rennes)

Comme vu précédemment, le diagnostic de certitude se fait par microscopie électronique. Ainsi, lors de la fin de vie d'un Dogue de Bordeaux participant à l'étude, un dernier kit pour les biopsies rénales est envoyé à l'éleveur ou dans certains cas directement au vétérinaire (**figure 28**). Ce kit est composé d'un tube EDTA, 4 tubes de formol pour analyse histologique, 4 tubes de RNAlater pour extraire l'ARN afin de l'ajouter à la bio-banque, et 2 tubes de Glutaraldehyde pour analyse au microscope électronique (les structures se conservant mieux dans ce milieu), ce dernier étant à conserver impérativement à 4°C.



Figure 28 – Kit de biopsies rénales
(Cette boîte étant conservée à température ambiante, les tubes de Glutaraldéhyde ne figurent pas sur la photo)
(*Production personnelle*).

Bien que réalisables du vivant de l'animal, les biopsies sont faites post-mortem, car dans le cas d'individus sains l'acte, invasif, ne se justifie pas.

Les biopsies sont à réaliser dans les deux heures suivant la mort de l'animal. Elles doivent être de deux par milieu de conservation, cubiques (2mm d'arête), et prélevées en zone corticale, puis conservées à 4°C, et acheminées rapidement à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse via un transporteur envoyé par le CNRS de Rennes.

Grâce à notre recrutement, 21 kits pour prélèvement sanguins et urinaires, ainsi que 43 kits de prélèvement sanguin ont été envoyés. Parmi eux, 6 kits sur 21 et 28 sur les 43 ont été renvoyés au CNRS.

1.2. Exploitation des prélèvements et synthèse des données récoltées

Les prélèvements sont dans un premier temps récupérés par un transporteur pour être acheminés à l'ENV, où les paramètres sanguins et rénaux seront mesurés.

Le CNRS de Rennes récupère ensuite les prélèvements sanguins, qu'il stocke à 4°C dans un réfrigérateur au maximum 10 jours, avant d'en extraire l'ADN et les intégrer dans la bio-banque « *Cani-DNA* ». Cette bio-banque, créée en 2003, contient des échantillons d'ADN et de tissus recueillis par les praticiens vétérinaires, les cliniques et hôpitaux spécialisés, les laboratoires d'analyses et d'histopathologie vétérinaire, ainsi que les centres de cancérologie et d'imagerie. Depuis 2012, une convention cadre, qui réunit le CNRS de Rennes, les quatre Ecoles Nationales Vétérinaires (ENV), ainsi que la société Antagene, a été mise en place. Cette convention permet d'étendre la bio-banque, qui compte aujourd'hui 21 000 échantillons

d'ADN extraits à partir de sang, dont 13 000 ADN stockés sur le site rennais, 6 000 à Antagene et 2 000 dans les Écoles Nationales Vétérinaires.

L'extraction de l'ADN se fait à l'aide d'un kit (Nucleospin® Blood, Macherey-Nagel), contenant des tampons de lavage, d'élution, des protéinases, et des tubes de recueil, et consiste à lyser les éléments autres que l'ADN puis à effectuer divers lavages par centrifugation pour obtenir 400 µL de solution d'ADN purifié dans un tube de 1,5mL qui sera identifié, dosé et rangé dans un congélateur dédié à la bio-banque.

1.3. Critères d'inclusion dans l'étude

Sont inclus dans l'étude, aussi bien pour les individus sains que pour les individus malades, des Dogues de Bordeaux sur lesquels ont été effectués les prélèvements sanguins et urinaires vus précédemment, et dont un diagnostic de certitude a été posé par un vétérinaire histo-pathologiste (Pr. Luca Aresu, département des sciences vétérinaires – pathologie générale et anatomie pathologique, université de Turin, Italie).

L'âge ne demeure pas un critère en soi, cependant les individus ne seront pas atteints par la même forme de glomérulopathie familiale.

Aucun critère de sexe n'est posé.

Ainsi, 33 animaux ont été sélectionnés (15 mâles/18 femelles), parmi eux :

- 25 animaux atteints de glomérulopathie familiale (13 mâles/12 femelles), dont :
 - 12 *formes juvéniles*, c'est-à-dire des individus entre 0 et 2 ans (9 mâles/3 femelles)
 - 10 *formes intermédiaires*, c'est-à-dire des individus entre 2 et 6 ans (3 mâles/7 femelles)
 - 3 *formes silencieuses*, c'est-à-dire des individus de plus de 6 ans (1 mâle/2 femelle)
- 5 atteints d'une maladie rénale autre que la glomérulopathie (2 mâles/3 femelles)
- 3 sains de toute maladie rénale (3 femelles)

Le génotypage, notamment des marqueurs de type « *SNP* » des échantillons d'ADN récoltés, sera ensuite utilisé pour des études d'association et de liaison, et de la cartographie par recherche d'homozygotie ou « *homozygosity mapping* ».

1.4. Comparaison des génomes de chiens indemnes et atteints

Afin de comparer les génomes des chiens atteints et sains, un génotypage d'un nombre de SNP (« *Single Nucleotide Polymorphism* ») est ensuite effectué à partir des ADN des individus sélectionnés. Le génotypage se fait soit au sein du CNRS, soit par une entreprise extérieure (*Illumina* ou *Affymetrix*) à l'aide de puces.

Les génotypes des individus seront ensuite utilisés pour réaliser des études d'association et de liaison, ou de la cartographie par recherche d'homozygotie ou « *homozygosity mapping* ».

1.4.1. Marqueurs SNP ou « *Single Nuclotide Polymorphism* »

Un marqueur « *Single Nuclotide Polymorphism* » ou marqueur « *SNP* » est une variation d'une seule paire de bases dans un endroit précis sur le génome. Ces marqueurs sont stables, très abondants, et distribués uniformément sur le génome. Chez le chien, il existe 2,5 millions de SNP, soit 1 SNP tous les 5 kb (Lindblad-Toh et al., 2005). Ils peuvent se présenter sous un état homozygote ou hétérozygote.

Afin de déterminer quel allèle de chaque SNP est présent à chaque locus, des puces à marqueur SNP ou « *microarrays* » sont utilisées.

1.4.2. Puces à ADN

Une « *puce à ADN* » (microarray) peut être construite de différentes façons. La première consiste à amplifier par méthode PCR (« *Polymerase Chain Reaction* ») un génome afin d'obtenir des microgouttelettes de solutions qui seront déposées sur une lame de verre traitée chimiquement pour fixer l'ADN. La seconde utilise des oligonucléotides synthétisés *in situ* par photolithographie ou par impression « *jet d'encre* ». C'est celle utilisée pour le génotypage (Lin, 2004).

Deux plateformes primaires sont ainsi utilisées pour le génotypage de SNP du génome du chien : *Illumina* et *Affymetrix*. Ces deux technologies en compétition offrent des approches différentes pour génotyper les SNP. Les puces *Illumina* sont plus chères à fabriquer mais fournissent une meilleure spécificité (Bush & Moore, 2012). Chez le chien, elles permettent de génotyper 172 000 marqueurs SNP, alors que les puces *Affymetrix* en génotypent 650 000 (André et al., 2017).

Les puces à ADN ont de multiples usages. Elles peuvent notamment servir à l'analyse d'expressions de gènes dans un tissu, comme par exemple pour étudier l'expression de différents gènes au niveau de la valve mitrale (Oyama & Chittur, 2006).

Elles servent aussi à l'analyse de voies biochimiques, comme par exemple dans les travaux sur la cascade de signalisation des récepteurs à activité tyrosine kinase dans les cellules NIH-3T3 (Fambrough et al., 1999).

Elles peuvent également contribuer à la validation de mécanismes d'action de médicaments : une étude les a utilisées pour montrer la corrélation entre le profil d'expression obtenu lorsqu'une population bactérienne est stimulée par l'utilisation d'un médicament et le profil d'expression d'une levure possédant un gène muté impliqué dans le métabolisme d'action de ce médicament (Marton, 1998).

Elles sont aussi employées dans la détection de pathogènes : un laboratoire français a utilisé ce moyen dans le cadre de virus équins (Hans et al., 2015).

Enfin, elles ont des applications dans l'étude génomique, notamment dans la reconstitution de génomes entiers, mais aussi pour le génotypage de SNP, qui s'avère indispensable pour le criblage génomique, la caractérisation d'anomalies cytogénétiques, pour des études de liaison génétique, ou études d'association avec des milliers de gènes candidats. C'est pour ce dernier point que les puces à ADN nous intéresseront.

1.5.Sélection de gènes candidats

L'approche des gènes candidats s'appuie sur quatre éléments : la physiopathologie de la maladie étudiée, l'annotation de génomes de différentes espèces et la synténie entre ceux-ci, c'est-à-dire des régions chromosomiques conservées entre plusieurs espèces (Derrien, 2012). Quelle que soit l'approche, la connaissance de la physiopathologie de la maladie doit être la plus précise possible afin de déterminer les fonctions biologiques altérées et de présélectionner les voies métaboliques concernées.

Une première approche consiste ainsi à répertorier l'ensemble des gènes qui pourraient être impliqués dans le mécanisme en cause dans la maladie. On s'intéressera alors à des gènes connus et bien étudiés, présents à différents loci connus du génome, qui interviennent d'une façon ou d'une autre dans la physiopathologie de la maladie, et qui pourraient de ce fait être responsables du phénotype. C'est de cette façon que l'implication du gène *COL11A2*, codant la chaîne alpha du collagène de type XI, a été démontrée dans le nanisme du Labrador retriever. En effet, celui-ci a été trouvé parmi 171 gènes et loci sélectionnés pouvant être susceptibles d'être responsables du phénotype (Frischknecht et al., 2013).

Une autre approche consiste à s'appuyer sur l'analogie entre génomes et leur annotation. En effet, comme vu précédemment, il existe de nombreux gènes orthologues entre espèces différentes. Ainsi, on peut répertorier l'ensemble des gènes déjà identifiés chez d'autres espèces, impliqués dans des pathologies au mécanisme physiopathologique similaire, et voir s'ils pourraient être aussi responsables de la maladie étudiée. C'est ainsi que le gène *MSTN* (« *Myostatin* »), déjà impliqué dans le phénotype « *culard* » chez les bovins et les ovins, a été

identifié comme étant responsable d'une musculature plus ou moins développée chez le Whippet (Mosher et al., 2007).

L'expression de certains gènes dans les organes touchés par la maladie peut également être indicateur de gènes candidats, notamment lors d'expression plus importante. On peut citer en exemple l'hyperkératose du Dogue de Bordeaux, où les gènes codant les kératines, très présentes dans la peau et les phanères, ont constitué de bons gènes candidats, et l'expression des kératines spécifiques du derme ou de l'épiderme a été particulièrement étudiée (Heuse, 2008).

D'autres gènes vont plutôt s'exprimer à des moments spécifiques du développement, comme l'embryogenèse, l'enfance ou l'âge adulte, ou bien dans certaines étapes de maturation cellulaire, ou encore dans le développement d'un organe.

Enfin, certains gènes candidats se trouvent indirectement impliqués, de par leur fonction dans des voies métaboliques d'intérêt, dans le même voire parfois, dans un autre tissu. Cette approche un peu plus inhabituelle est à considérer lorsque les autres approches n'ont pas abouti. C'est ainsi qu'une équipe norvégienne a pu mettre en évidence une mutation dans un gène généralement exprimé dans le rein (*NPHP4* – «*Nephrocystin 4*»), qui serait aussi impliqué dans la dystrophie des cônes et bâtonnets du teckel standard à poil dur. S'appuyant sur les recherches génétiques des maladies humaines mettant en cause ce gène parmi 6 autres candidats, une délétion de 180 pb au niveau de l'exon 5 (*NPHP4* en contient 30) serait responsable de l'apparition d'un codon stop dans l'exon 6 et donnerait une protéine tronquée. Ainsi, la protéine NPHP4 mutée ne possède plus le site de liaison à la protéine RPGRIP1, et l'absence d'interaction entre les deux mènerait au phénotype malade (Wiik et al., 2008).

Une fois ces gènes sélectionnés par ces différentes approches, il faut trouver leur position dans le génome du chien. Pour cela, plusieurs bases de données internationales sont à disposition en ligne. Celle que nous utiliserons sera celle de l'UCSC (University Santa Cruz of California).

1.6. Exploitation des résultats

1.6.1. Association génétique : GWAS

1.6.1.1. Principe et méthode

Réalisée sur 2 populations bien distinctes (cas-témoin) et non-apparentées, une **étude d'association pangénomique** ou **GWAS** (« *Genome Wide Association Study* ») permet d'associer statistiquement une variation de phénotype à une variation de génotype pour identifier un locus contenant un gène impliqué dans une maladie. Elle sert dans l'étude de maladies monogéniques, mais aussi dans les polygéniques, utilise des marqueurs polymorphes (par exemple de type SNP, comme vu précédemment).

Cette technique s'appuie sur le déséquilibre de liaison. Il y a déséquilibre de liaison si au bout de multiples recombinaisons aléatoires, deux ou plusieurs régions sur un chromosome ségrègent toujours ensemble au fil des générations, autrement dit, si deux allèles présentent une association préférentielle.

Dans le cadre d'une étude d'association pangénomique, la mutation responsable de la maladie est considérée comme étant en déséquilibre de liaison avec un ou plusieurs SNP. Par conséquent, si des tests statistiques montrent qu'un allèle d'un SNP dans une population malade se retrouve plus fréquemment que dans une population indemne, cela signifie que le SNP et la mutation sont en déséquilibre de liaison.

1.6.1.2. Représentation des données : le Manhattan plot

Afin d'exploiter cette étude d'association, on utilise une représentation graphique spécifique appelée **Manhattan plot (figure 29)**.

Chaque graduation de l'axe des abscisses représente un chromosome, rangé selon son numéro, tandis que l'axe des ordonnées représente la valeur statistique d'association déterminée par le logarithme négatif de la p-value, obtenu par le test de Chi² (-log(p-value)). Il y a toujours présence d'un bruit de fond statistique, mais certaines régions se détachent de manière plus ou moins nette. Ces régions correspondent aux zones contenant les marqueurs SNP associés au phénotype étudié si elles dépassent un certain seuil, appelé seuil de significativité.



Figure 29 – Représentation « *Manhattan plot* », représentant les résultats de l'étude d'association de l'automutilation acrale chez l'épagneul français
(Extrait de Plassais, 2014)

Chaque point représente un SNP, positionnés selon leur localisation sur les chromosomes. Les chromosomes sont chacun représentés par une couleur différente, et rangés par leur position physique (de 1 à 38 et le chromosome X). Les SNP du chromosome en rouge dépassent le seuil de significativité, ce qui veut dire que ce chromosome contient le ou les gènes recherchés.

1.6.2. Cartographie par homozygotie ou « *homozygosity mapping* »

Cette approche peut se montrer très efficace lorsque l'on a une transmission sur le mode autosomique récessif et de la consanguinité au sein d'une population.

Elle s'appuie sur l'hypothèse qu'avec ces deux conditions réunies, la mutation de tous les individus malades provient d'un même effet fondateur chez un ancêtre commun. Cette mutation est supposée unique dans un gène donné (Ytournal et al., 2008).

Ainsi, en se basant sur le déséquilibre de liaison, la mutation causale ainsi que les segments chromosomiques entourant la mutation sont transmis à l'identique au cours des générations, et par conséquent tous les individus atteints de la maladie sont homozygotes pour ce segment chromosomique (**figure 30**) (Ytournal et al., 2008).

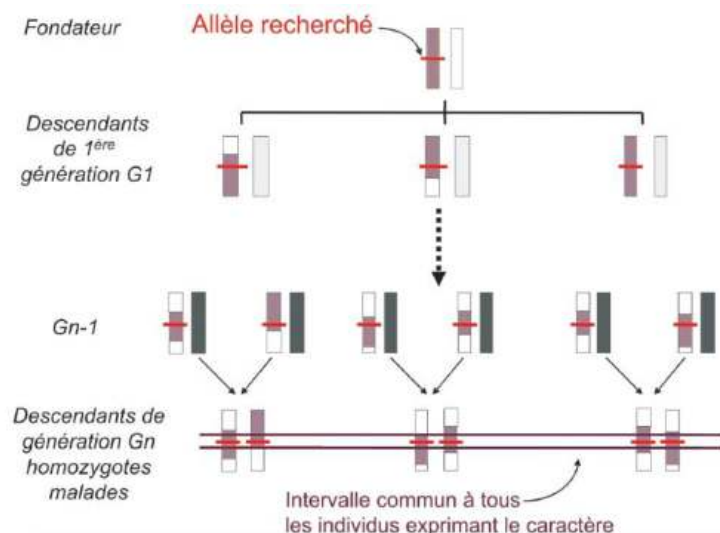


Figure 30 – Principe de l'«homozygosity mapping»
(Extrait de Ytournal et al, 2008)

L'allèle recherché et une partie des segments adjacents sont transmis à la génération suivante. Lorsque, un certain nombre de générations plus tard, des individus hétérozygotes se reproduisent, les descendants deviennent homozygotes pour la maladie, et il existe un segment commun identique à tous les individus malades, présent sur les deux chromosomes (Ytournal et al., 2008).

Ces segments chromosomiques seront néanmoins de tailles différentes d'un individu à l'autre, car ils dépendent du nombre de recombinaisons survenues au cours des générations depuis l'apparition de la mutation.

Ainsi, plus il y aura de recombinaisons, plus le segment d'intérêt sera petit.

Il en est de même si la population étudiée contient un grand nombre d'individus, le segment commun sera de taille réduite à cause du brassage génétique (Ytournal et al., 2008).

En pratique, on compare donc le génome d'individus sains et malades à partir de données de génotypage, et on recherche des blocs d'homozygotie présents chez les individus malades, mais absents chez les individus sains. Ces blocs seront représentés par au moins un marqueur homozygote chez tous les atteints.

Néanmoins, cette approche est rarement utilisée seule : une analyse d'association pangénomique ou de liaison génétique est souvent réalisée conjointement ou en amont de celle-ci.

La combinaison de plusieurs techniques permet donc après confrontation des résultats de réduire le nombre et la taille de loci pouvant ségréger avec la maladie.

C'est ainsi que l'« *homozygosity mapping* », associée à une analyse de liaison, a permis de mettre en évidence le gène *COL6A1* (« *collagen type VI alpha 1 chain* »), impliqué dans la dystrophie musculaire des chiens de race Landseer. Cette maladie est responsable d'un dysfonctionnement musculaire progressif, et est semblable à la maladie de Duchenne chez l'homme :

- L'analyse de liaison génétique, réalisée avec les données de génotypage d'une famille de 8 chiens (2 parents et 6 chiots dont 3 atteints) et d'une femelle non apparentée, a mis en évidence 5 segments, d'une longueur totale 74 Mb (Steffen et al., 2015).
- L'« *homozygosity mapping* » ou cartographie par recherche d'homozygotie a quant à elle permis de sélectionner 18 régions du génome homozygotes et partagées par les individus atteints.
- Lorsque les résultats des deux techniques ont été recoupés, seuls deux intervalles sur les chromosomes 10 et 31, et couvrants 4,7 Mb, ont été conservés (Steffen et al., 2015).

Après avoir présenté la démarche de l'étude et les différents outils utilisables, nous allons les appliquer à notre étude dans une 2^{ème} partie.

2. RÉSULTATS

Nous allons à présent nous intéresser aux origines génétiques de la glomérulopathie familiale du Dogue de Bordeaux. Notre démarche a été dans un premier temps de construire le pedigree d'un chien étalon à partir de données récupérées par l'équipe « *Génétique du Chien* » du CNRS, dans le but de déterminer le mode de transmission de la maladie. Nous avons ensuite effectué une analyse d'association pangénomique (cf partie B-1.6.1) sur les individus précédemment présentés (cf partie B-1.3) afin de déterminer une région qui serait susceptible de porter la mutation. Enfin nous avons eu une approche par sélection de gènes candidats (cf partie B-1.5) et cartographie par recherche d'homozygotie des gènes sélectionnés (cf partie B-1.6.2), dans le but de préciser la région qui serait susceptible de porter la mutation.

2.1. Analyse d'un pedigree

Après récolte d'informations, il nous a été possible de construire, à l'aide du logiciel Cyrillic[®], le pedigree d'un étalon diagnostiqué atteint de glomérulopathie familiale (**figure 31**). Ce logiciel, initialement créé pour construire des arbres généalogiques humains, est particulièrement utile pour les pedigrees canins, car il autorise notamment les croisements intergénérationnels.

Nous pourrions ainsi évaluer si l'on peut dégager un mode de transmission.

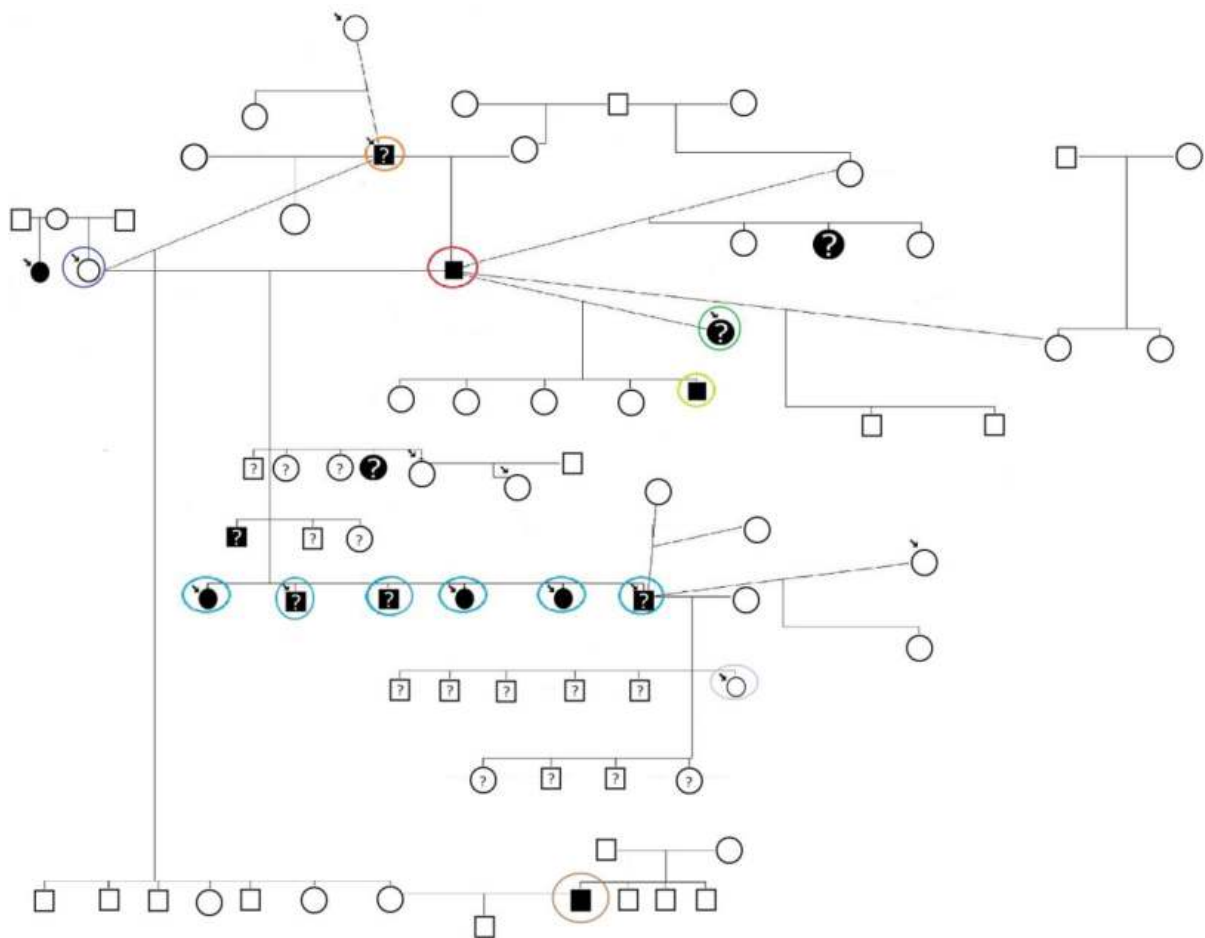


Figure 31 – Pedigree d'un Dogue de Bordeaux étalon diagnostiqué atteint de glomérulopathie familiale (entouré en rouge) à l'aide du logiciel Cyrillic®

Légende :

- □ : mâle sain
- ○ : femelle saine
- v : individu génotypé
- ■ ou ● : individu diagnostiqué atteint
- ? ou ? : individu suspect d'être atteint
- ? ou ? : individu au statut inconnu

Le père de l'individu étalon (entouré en orange sur la **figure 31**) présentait des signes évocateurs de glomérulopathie, mais n'a pas été diagnostiqué par histologie.

L'individu étalon a eu une portée avec une reproductrice décédée d'une maladie rénale mais qui n'a pas pu être diagnostiquée (entourée en vert foncé). Dans cette portée, un chiot a été diagnostiqué atteint (entourée en vert clair).

Cet étalon a également eu une portée (entourée en bleu clair) avec une reproductrice diagnostiquée indemne de toute maladie rénale (entourée en bleu foncé). Dans cette portée, trois individus ont été diagnostiqués atteints de glomérulopathie familiale, et deux étaient fortement suspects car atteints d'insuffisance rénale. L'un des suspects a été reproducteur à son tour, l'un de ses chiots a été diagnostiqué indemne de toute maladie rénale.

D'autre part, l'individu mâle entouré en marron a été diagnostiqué atteint de glomérulopathie familiale, alors que ses parents étaient indemnes. C'est par ailleurs le seul de sa portée à l'être.

On constate ainsi que toutes les générations ne sont pas touchées et que pour chaque portée, on obtient des fréquences différentes de 50% sains et 50% atteints, qui suggèrent un mode dominant.

Ainsi, il semblerait que la transmission se fasse soit sur un mode autosomique récessif, soit sur un mode autosomique dominant avec une pénétrance incomplète.

2.2. Etude d'association pangénomique (GWAS)

Nous avons ensuite cherché à voir si génétiquement on pouvait trouver une différence significative entre la population indemne de glomérulopathie familiale chez les Dogues de Bordeaux (composée des individus indemnes de toute atteinte rénale, et ceux atteints d'une maladie rénale autre que celle étudiée, soit 8 individus), et la population atteinte (soit 25 individus), ces deux populations étant considérées comme indépendantes.

Cette étude a été réalisée à l'aide du logiciel Plink, et à l'issue de celle-ci, une représentation « *Manhattan plot* » a été réalisée (**figure 32**).

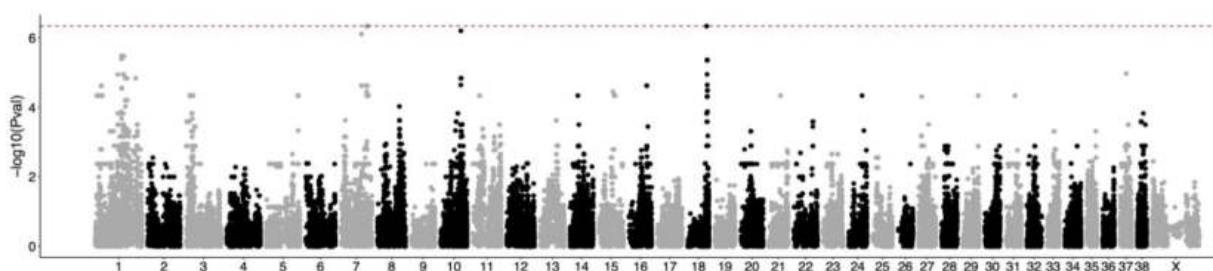


Figure 32 – Représentation « *Manhattan plot* » du GWAS

Ce graphe montre le logarithme négatif de la valeur p d'association de chaque SNP avec le phénotype étudié, en fonction de leur position sur le génome. Au sein de chaque chromosome (axe des abscisses), les SNP sont rangés selon leur localisation génomique.

Certains chromosomes semblent se détacher, comme notamment le chromosome 18 ou le chromosome 10, cependant aucune conclusion ne peut être tirée avec certitude, car le seuil de significativité (représenté par les pointillés) n'est jamais dépassé.

Cela peut être dû à une trop petite population étudiée et au manque de témoins.

On pourrait également expliquer ce manque de résultat par une trop faible fréquence de la ou des mutations.

Cette méthode ne nous ayant pas permis de mettre en évidence une région chromosomique particulière, nous avons ensuite adopté une approche gènes candidats.

2.3.Stratégie des gènes candidats

2.3.1. Introduction

Comme nous l'avons vu précédemment, la microscopie électronique laisse à penser que les podocytes pourraient être mis en cause dans cette maladie du Dogue de Bordeaux. Ainsi, un effacement des pieds des podocytes pourrait être à l'origine de la protéinurie observée. Nous allons donc nous intéresser aux protéines impliquées dans la jonction entre les podocytes et la lame basale, ainsi qu'aux jonctions entre podocytes.

Afin de sélectionner des gènes candidats, nous nous sommes appuyés dans un premier temps sur les études réalisées chez l'homme et la souris.

La pathologie et les lésions histopathologiques de la glomérulopathie du Dogue de Bordeaux présentent beaucoup de similarités avec les lésions de glomérulosclérose focale segmentaire (GFS) chez l'homme, responsable d'un syndrome néphrotique le plus souvent cortico-résistant (Aresu et al., 2010). Celle-ci se traduit généralement par une protéinurie précoce à la naissance ou peu de temps après avec une baisse du taux d'albumine plasmatique et des œdèmes (Jalanko & Kääriäinen, 2013), mais cette affection peut se présenter sous diverses formes, et à différents âges, avec chacune leur propre origine génétique différente. Nous avons donc sélectionné des gènes impliqués ou soupçonnés d'être impliqués dans cette affection afin d'établir une liste de gènes candidats (**Figure 33**).

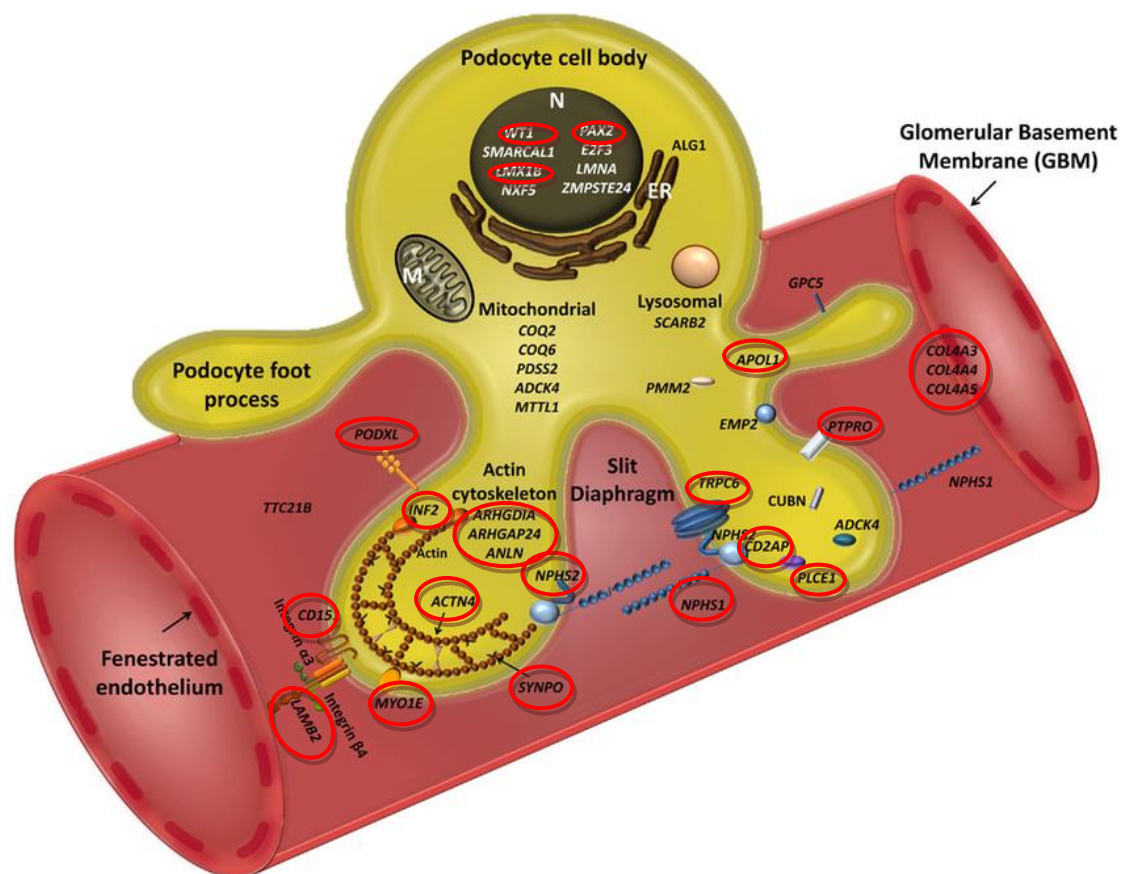


Figure 33 – Schéma d'un podocyte et des protéines impliquées dans le syndrome néphrotique cortico-résistant
(Extrait de Bierzynska et al., 2014)

Un certain nombre d'entre eux ont été choisis pour être des gènes candidats dans notre étude. Ces gènes sont entourés en rouge.

Le **tableau I** récapitule les gènes étudiés ainsi que leur position.

Nom de la protéine (gène)	Fonction	Etudes chez l'homme	Position dans le génom du chien
Nephrine 1 (NPHS1)	Protéines composant le diaphragme de fente	Li et al., J Am Soc Nephrol 26: 2361–2377, 2015	chr1 116294918- 117314801
Podocine (NPHS2)		Roselli et al., AJP January 2002, Vol. 160, No. 1 p131-139	chr7 19854915-20875955
CD2-associated Protein (CD2AP)		Tsvetkov et al., Clinical Medicine Insights: Case Reports 2016;9 15–19	chr12 15048421-16184051

Nom de la protéine (gène)	Fonction	Etudes chez l'homme	Position dans le génom du chien
Phospholipase C epsilon 1 (PLCE1)		Hinke et al., Nature genetics, volume 38, numéro 12, décembre 2006, p1397- 1405	chr28 7667176-8988060
Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor type O (PTPRO)	Protéines composant le diaphragme de fente	/	chr27 30582289-31821894
Transient Receptor Potential Channel (TRPC6)		Canales et al., BJM & MR 5(10): 1198-1212, 2015,	chr5 29456764-30508523
Zonula Occludens (ZO-1/TJP1)		Itoh et al., PLOS ONE, September 2014, Vol 9	chr3 38494466-39741487
Myosin 1C (MYO1C)		/	chr9 45135153-46158438
Myosine 1E (MYO1E)		Mele et al., N Engl J Med. 2011 July 28; 365(4): 295–306	chr30 23567315-24766036
α-Actinine 4 (ACTN4/α)	Protéines du cytosquelette, de communication et enzymes	Feng et al., PLoS ONE 11(12): e0167467.	chr1 113852846- 114928174
Podocalyxine (PODXL)		Barua et al., Kidney International (2014) 85, 124– 133	chr14 5075423-6125360
Inverted-Formin 2 (INF2)		Rood et al., The Netherlands Journal of Medicine, Février 2016, Vol.74, No2	chr8 71757080-72785343
RhoA-activated Rac1 GTPase- activating protein 24 (ARHGAP24)		/	chr32 8572318-10077333
Rho guanine nucleotide dissociation inhibitor- α (ARHGDIA)		/	chr9 0-923252
Aniline (ANLN)		/	chr14 47305001-48355733
Syntopodine (SYNPO)		/	chr4 57995080-59063196

Nom de la protéine (gène)	Fonction	Etudes chez l'homme	Position dans le génom du chien
Apolipoprotéine 1 (<i>APOLI</i>)		/	chr10 27626298-28638366
Hypo-sialylated angiopoietin-like 4 (<i>ANGPTL4</i>)	Modulation de l'angiogenèse	Clement and al, Nat Med, 2011	chr20 52442076-53449053
Laminine β2 (<i>LAMB2</i>)	Protéines de la membrane basale glomérulaire	/	chr20 39550062-40562626
CD151 (<i>CD151</i>)		(Baleato and al, AJP October 2008, Vol. 173, No. 4 (+ 1))	chr18 44695481-45700179
Integrin β4 <i>ITGB4</i>		/	chr9 4324959-5355273
Sous-unités alpha 3 et 4 du collagène de type IV <i>COL4A3</i> <i>COL4A4</i>		Muchizuki et al., Nature Genetics, 1994	chr25 (<i>COL4A3</i>) 40036482–40104782 (<i>COL4A4</i>) 39854816–39976187
Sous-unité alpha 5 du collagène de type IV (<i>COL4A5</i>)		Haas, Arch Pathol Lab Med, February 2009	chrX 81982070-82250078
Wilm Tumor – 1 (<i>WT-1</i>)	Protéines nucléaires	/	chr18 (34599578- 35652047)
Paired box gene 2 <i>PAX2</i>		Barua et al., J Am Soc Nephrol 25: 1942–1953, 2014	chr28 12935467-14020097
LIM homeobox transcription factor 1 β (<i>LMX1B</i>)		Zhou et al., Journal of Receptors and Signal Transduction, 2012; 32(6): 285–289	chr9 56042774-57125574
L Antigen Family Member 3 Pcc1 (<i>LAGE3</i>)	Complexe KEOPS (Kinase, Endopeptidase and Other Proteins of small Size).	/	chrX 121685170- 122686702
Cgi121 (<i>TPRKB</i>)		/	chr17 48771151-49780383
N6-adenosine threonylcarbamoyl transferase protein Kae1 (<i>OSGE</i>)		/	chr15 17278676-18286702

Nom de la protéine (gène)	Fonction	Etudes chez l'homme	Position dans le génom du chien
Bud32 (<i>TP53RK</i>)		/	chr24 33394279-34398700
<i>C14orf142</i>	Interaction avec le complexe KEOPS	/	chr8 61906649-62911058

Tableau I – Gènes candidats et leur protéine associée

Le nom du gène est en italique et entre parenthèses.

Une barre oblique (« / ») signifie qu'aucune étude montrant un rôle significatif du gène dans la GFS n'a été trouvée. Néanmoins ces gènes pourraient malgré tout être impliqués dans la glomérulopathie familiale du Dogue de Bordeaux, c'est pourquoi ils figurent dans notre sélection de gènes candidats.

Les gènes en gras correspondent à ceux dont l'implication a été confirmée par les études citées dans la troisième colonne.

Certains gènes interviennent dans la cohésion de la cellule avec la lame basale, d'autres interviennent dans la communication, ou d'autres sont des composants du cytosquelette qui donnent cette forme si caractéristique au podocyte.

On retrouve également des protéines du complexe KEOPS, impliqué dans la transcription, la conservation des télomères, et la ségrégation des chromosomes, ainsi que des protéines nucléaires.

Les protéines et gènes en gras sont les plus importants car, pour certains, il a été démontré qu'ils avaient un rôle non négligeable dans la GFS de l'Homme, et pour d'autres, ils pourraient être à l'origine d'une protéinurie. Ils sont donc les plus susceptibles d'être impliqués dans la glomérulopathie familiale du Dogue de Bordeaux et seront vus plus en détails dans la partie qui suit.

2.3.2. Étude des gènes candidats

Cette partie a pour but de présenter les gènes candidats les plus importants.

2.3.2.1. La néphrine

Il nous a paru intéressant de sélectionner ce gène de par son rôle majeur dans le diaphragme de fente et la jonction entre les pieds des podocytes.

En effet, la néphrine (**figure 34**) est une protéine transmembranaire majeure du diaphragme de fente. Elle est composée de 1241 acides aminés (Li et al., 2015), et se localise entre les

pieds des podocytes. Elle est exprimée presque exclusivement au niveau du cortex rénal dès la différenciation de ces derniers (Tryggvason, 2001).

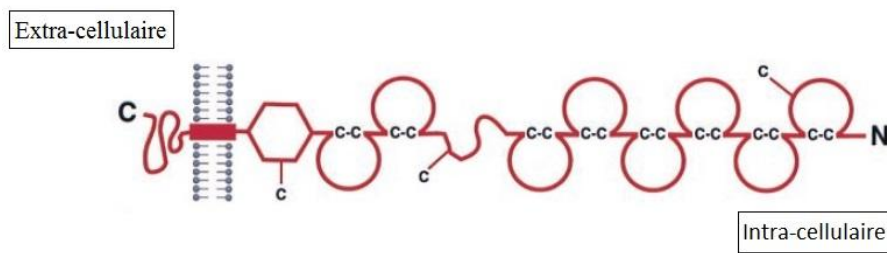


Figure 34 – Structure schématique de la néphrine
(Extrait de Ruotsalainen et al., 1999)

Elle se compose de trois domaines :

- un domaine extracellulaire qui présente des analogies de structure avec la superfamille des immunoglobulines. La liaison à un ligand encore inconnu initierait une cascade d'activations. C'est également au niveau de ce domaine que se forme une liaison en fermeture éclair avec le domaine analogue de la néphrine du podocyte adjacent.
- un domaine transmembranaire de type fibronectine de type 3.
- un court domaine intracellulaire interagissant directement ou indirectement avec les différentes protéines du diaphragme de fente et le cytosquelette (Mannat Dumas de La Roque, 2016).

Elle a été découverte chez l'Homme en 1998 à partir du syndrome néphrotique de type finlandais (Tryggvason, 2001), affection qui se transmet selon le mode autosomique récessif, et qui se caractérise par une protéinurie massive, ainsi qu'une insuffisance rénale évoluant rapidement vers une insuffisance terminale (Jotterand et al., 2009).

Même si sa fonction reste encore floue, elle formerait le « *squelette* » du diaphragme de fente, et le rôle de cette protéine dans les glomérulopathies podocytaires a été largement démontré, que ce soit chez l'homme (Tryggvason, 2001; Löwik et al, 2009; Jalanko & Kääriäinen, 2013 ; Li et al., 2015) ou dans d'autres races de l'espèce canine (Ichii et al., 2011).

Près de 50 mutations différentes, incluant des insertions, des délétions, des mutations faux-sens, non-sens, ou au niveau du promoteur, ont été identifiées chez des individus atteints d'un syndrome néphrotique congénital chez l'Homme. Parmi les protéines mutées, certaines formes arrivent jusqu'à la membrane plasmique, tandis que d'autres présentent un défaut de repliement responsable d'une erreur d'adressage et sont retenues dans le réticulum endoplasmique (Liu et al., 2001).

D'autres protéines majeures interagissent avec la néphrine, parmi elles se trouvent la podocine.

2.3.2.2. La podocine

La podocine est également une protéine transmembranaire du diaphragme de fente. Découverte en 2000, elle est composée de 383 acides aminés, et forme une épingle à cheveux dont les 2 extrémités N- et C-terminal sont dans le cytosol (**figure 35**).

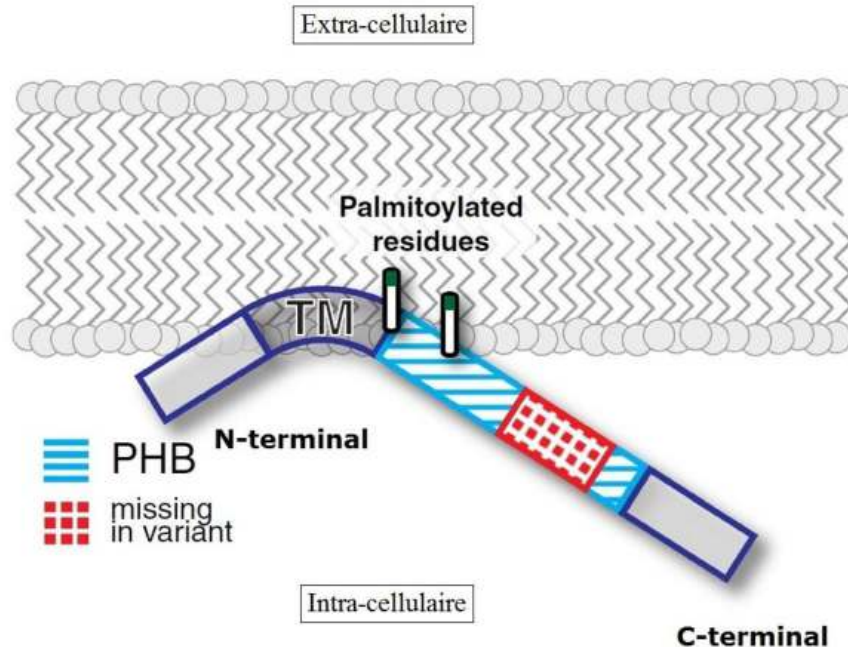


Figure 35 – Vue schématique de la podocine
(*extrait de Völker et al., 2013*)

Un domaine central PHB (ProhiBitin Homology) représenté par la partie en bleu hachurée et se trouvant dans la partie C-terminal, est un module d'interaction protéique qui permettrait de recruter le cholestérol (Huber et al., 2003 ; Völker et al., 2013).

Un isoforme, plus court de 315 acides aminés, a été récemment découvert chez l'homme. La partie en rouge correspond à la partie manquante dans cet isoforme. Dans cette partie se trouve un exon codant pour la partie centrale du domaine PHB (Völker et al., 2013).

Appartenant à la famille des stomatines, elle est exclusivement exprimée dans les podocytes, et servirait à ancrer directement ou indirectement les composants du diaphragme de fente au cytosquelette du podocyte.

Elle serait également associée au radeau lipidique, ou « *lipid raft* », microdomaine de la membrane plasmique enrichi en glycosphingolipides (et notamment en sphingomyélines) et en cholestérol, qui intervient dans la communication cellulaire.

De nombreuses mutations du gène *NPHS2* ont été incriminées dans des syndromes néphrotiques congénitaux cortico-résistant (10 à 20% des formes sporadiques chez l'enfant, et environ 40% des formes familiales).

Comme pour la néphrine, certaines formes mutées de podocine ne sont pas adressées à la membrane plasmique et restent bloquées dans le réticulum endoplasmique.

Chez l'homme, une déficience de podocine empêche le recrutement de la néphrine dans le radeau lipidique (Antignac, 2005).

2.3.2.3. Transient Receptor Potential Channel

TRPC6 est une protéine à 6 hélices transmembranaires avec les extrémités N-terminale et C-terminale en position intracellulaire (**figure 36**) (Canales et al., 2015). C'est un canal cationique non sélectif perméable au calcium, et secondairement au sodium et au fer, qui fait partie de la super famille des TRP (Transient Receptor Potential). On la retrouve dans de multiples organes, notamment le placenta, les poumons et la thyroïde. Faisant également partie du diaphragme de fente, elle interagit avec la néphrine et la podocine: les canaux s'ouvrent suite à l'activation de certains récepteurs couplés aux protéines G, la phospholipase C est activée, induisant la production de diacylglycerol (DAG) et d'inositol trisphosphate (IP3) à partir de Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2). Le DAG va ensuite stimuler l'ouverture des canaux TRPC6 (Faller & Alain, 2011).

Son rôle a également été démontré dans la glomérulosclérose focale segmentaire, notamment grâce à des études chez la souris. En effet, une surexpression de celle-ci serait responsable d'une protéinurie massive (Canales et al., 2015).

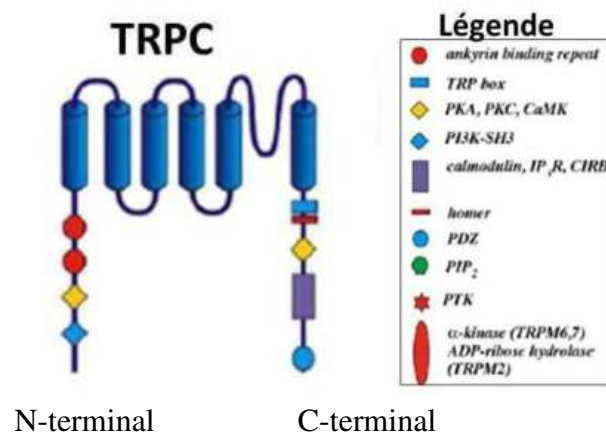


Figure 36 – Schéma représentant la sous-famille des TRPC
(Extrait de Pedersen et al., 2005)

Les protéines de la famille des TRPC possèdent 6 domaines transmembranaires, la boucle entre les domaines 5 et 6 formant un pore. Les extrémités N- terminale et C-terminal sont libres dans le cytoplasme et contiennent des sites de fixation pour des ligands tels que PIP2.

TRPC6 interagit également avec une autre protéine du diaphragme de fente : CD2AP (Canales et al., 2015).

2.3.2.4. CD2-associated Protein (CD2AP)

CD2AP est une protéine adaptatrice homo-tétramère de 70 kDa (Adair et al., 2014) qui interagit principalement avec CD2, protéine d'adhésion cellulaire exprimée par les lymphocytes T, les cellules NK (Natural Killer), et les cellules épithéliales. (Jalanko & Kääriäinen, 2013) Elle jouerait également un rôle dans la cytokinèse (Monzo & Cormont, 2005).

Dans le rein, CD2AP se trouve au niveau du diaphragme de fente, où elle permet notamment de relier la podocine et la néphrine à la phosphoinositide 3-OH kinase, le tout formant un complexe de signalisation (Jalanko & Kääriäinen, 2013).

Elle interagit également avec de nombreuses autres protéines comme des composants de la membrane cellulaire, des ligands impliqués dans le remodelage du cytosquelette (notamment des filaments d'actine), dans le trafic membranaire, dans la motilité cellulaire et dans la survie de la cellule (Adair et al., 2014). Ces interactions se font grâce à des domaines SH3 (**figure 37**).

Comme pour les protéines vues précédemment, une mutation dans le gène *CD2AP* est responsable d'une protéinurie massive, la protéine produite étant tronquée d'environ 80% (Tsvetkov et al., 2016). Le syndrome néphrotique qui en résulte est semblable à celui retrouvé lors de mutation de *NPHS1*, ce qui laisse à penser que les deux protéines participeraient à une voie de signalisation commune (Huber et al., 2003).



Figure 37 – Schéma d'un oligomère de la protéine CD2AP
(D'après Monzo & Cormont, 2005)

Le domaine SH3-2 interagit avec la podocine et CD2, tandis que la région « *Coiled-coil* » interagit avec la néphrine et permet l'oligomérisation de CD2AP.

2.3.2.5. La phospholipase C epsilon 1

La phospholipase C epsilon 1 est une protéine à deux isoformes (A et B, respectivement de 258 et 224 kDa) faisant partie de la famille des phospholipases C spécifiques aux phosphoinositides. Ces protéines catalysent l'hydrolyse des phospholipides de la membrane plasmique afin de générer des messagers secondaires : l'IP3 et le DAG, qui initient à leur tour une cascade de réactions impliquées dans la croissance et la différenciation cellulaire (Hinkes et al., 2006).

Cette protéine, beaucoup moins souvent mise en cause dans la GFD et plutôt secondaire par rapport aux protéines traitées précédemment, est également responsable quand elle est mutée d'une protéinurie et d'œdèmes (Hinkes et al., 2006).

2.3.2.6. La myosine 1 E

La myosine 1E est une protéine monomérique de la famille des myosines non-musculaires de classe I. Exprimée exclusivement dans le rein, elle est normalement localisée dans la membrane plasmique, mais lorsqu'elle est mutée se retrouve dans le cytoplasme.

Grâce à son domaine C-terminal TH1 (Tail Homology 1), elle interagit avec les membranes cellulaires. Elle interagit également avec les filaments d'actine via son domaine N-terminal (Sanna-cherchi et al., 2011), ce qui lui donne un rôle majeur dans le maintien des pieds des podocytes, et joue un rôle dans la régulation des « *réactions croisées* » entre le podocyte et sa matrice.

Ainsi, la myosine 1 E est importante dans la morphologie du podocyte, mais aussi dans la matrice extracellulaire.

Chez l'Homme, les conséquences sont une protéinurie, une microhématurie, une hypoalbuminémie et des œdèmes (Mele et al., 2011).

2.3.2.7. L' α -Actinine 4 (ACTN4/ α)

L' α -Actinine 4 (**Figure 38**) fait partie de la famille des actinines, un des éléments du cytosquelette. C'est une protéine homodimère d'environ 100 kDa (Feng et al., 2015), dont les sous-parties sont agencées de façon antiparallèle. Outre son rôle de co-facteur transcriptionnel, elle intervient dans :

- la liaison entre les différents filaments d'actine
 - l'ancrage du cytosquelette à des zones d'adhésions focales ainsi que de liaison du cytosquelette à la matrice extracellulaire
 - de jonction cellulaire, en étant notamment acteur dans le diaphragme de fente
 - de communication cellulaire
 - d'activateur de transcription nucléaire
- (Feng et al., 2015; Feng et al., 2016)

Des mutations dans le domaine de fixation de ACTN4 sont responsables d'une forme autosomale dominante d'une glomérulosclérose focale segmentaire.

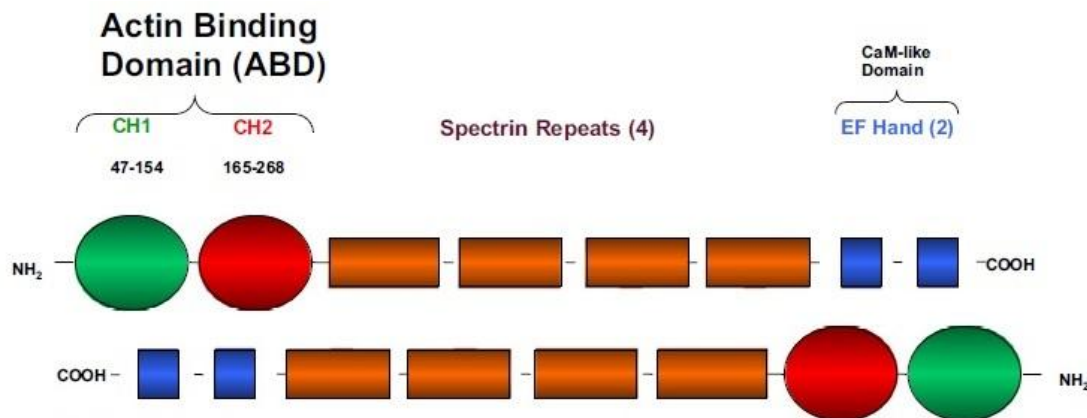


Figure 38 – Représentation de ACTN4 selon ses domaines fonctionnels
(adapté de Di Feng et al., 2015)

On distingue trois parties distinctes :

- un site de fixation aux filaments d'actine (ABD), constitué de deux sous-parties (CH1 et CH2)
- quatre répétitions d'un domaine de type spectrine d'une centaine de résidus formant une triple hélice et permettant l'accrochage à la membrane plasmique
- une partie terminale contenant deux motifs EF permettant de stabiliser le calcium et jouant un rôle important dans la migration et la diffusion cellulaire.

C'est dans la région du site de fixation que se situent les mutations les plus courantes. Elles sont associées à la glomérulosclérose focale segmentaire et sont situées en particulier au niveau de CH2 (Feng et al., 2015). Cette modification structurale du site de fixation est responsable d'une meilleure affinité avec les filaments d'actine. Il en résulte alors une augmentation de la rigidité du réseau lors de stress de celui-ci, qui peut mener à la rupture (Pollak, 2016).

Une protéinurie modérée apparaît ensuite à la fin de l'adolescence, avec une fonction rénale diminuée évoluant progressivement vers une insuffisance rénale terminale. Des recherches sur des souris ont également montré une albuminurie et un effacement des pieds des podocytes (Feng et al., 2015).

Cependant, l'impact de ACTN4 dans les gloméruloscléroses focales segmentaires reste mineure puisqu'elle est impliquée dans seulement 4% des cas (Jalanko & Kääriäinen, 2013).

2.3.2.8. Inverted-Formin 2 (INF2)

INF2 est également une protéine homodimère, appartenant à la sous-famille des formines qui contribue à réguler le cytosquelette. INF2 permet ainsi la polymérisation et la dépolymérisation des filaments d'actine en se posant sur l'extrémité barbue des filaments d'actine (Pollak, 2016).

Elle possède deux domaines centraux (**figure 39**) appelés « *formin homology* » 1 et 2. A chaque extrémité de ces domaines se trouvent des zones particulières appelées DID (« *Diaphanous Inhibitory Domain* ») et DAD (« *Diaphanous Auto-regulatory Domain* »).

Une interaction entre les deux domaines DID et DAD inhiberait l'activité régulatrice d'INF2 vis-à-vis des filaments d'actine (Mathis, 2014).

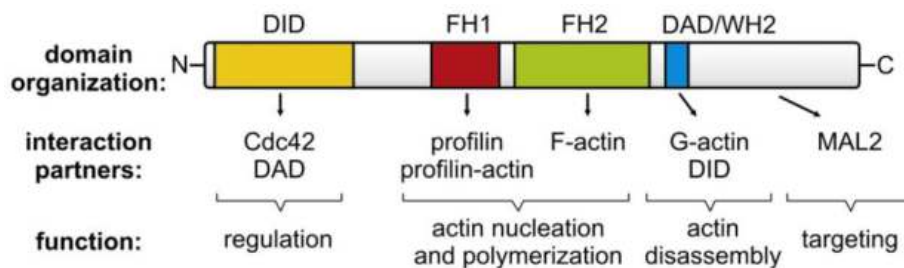


Figure 39 – Schéma représentant une sous-unité de INF2

(Extrait de Breitsprecher et al, 2010)

Sont représentées l'organisation de ses domaines, les molécules avec lesquelles ses domaines interagissent, et la ou les fonctions qui en découlent.

Les mutations se trouvent toutes au niveau du domaine DID. Celles-ci engendreraient une absence d'inhibition de la polymérisation des filaments d'actine et seraient à l'origine de la maladie (par ailleurs associée à la maladie de Charcot–Marie–Tooth, responsable de neuropathies chroniques sensitives et moteurs) (Pollak, 2016).

Une mutation dans cette région aurait également d'autres conséquences : la région DID de INF2 interagit avec les régions DAD d'autres formines, qui interviennent dans la communication cellulaire via les effecteurs de la famille Rho, et notamment des Rho-GTPases. En temps normal ces formines inhibent en amont les effets de l'activation de Rho, mais lorsque la région DID de INF2 est mutée, les formines ne contrôlent plus en amont les effets de Rho (Pollak, 2016).

2.3.2.9. La podocalyxine (PODXL)

La podocalyxine (**figure 40**) est une sialoglycoprotéine transmembranaire d'environ 140 kDa chargée négativement. Elle est localisée dans la partie apicale du podocyte et agit en tant

qu'anti-adhésine : elle maintient ainsi la perméabilité de la fente de filtration entre deux podocytes adjacents par répulsion de charge (Barua et al., 2014).

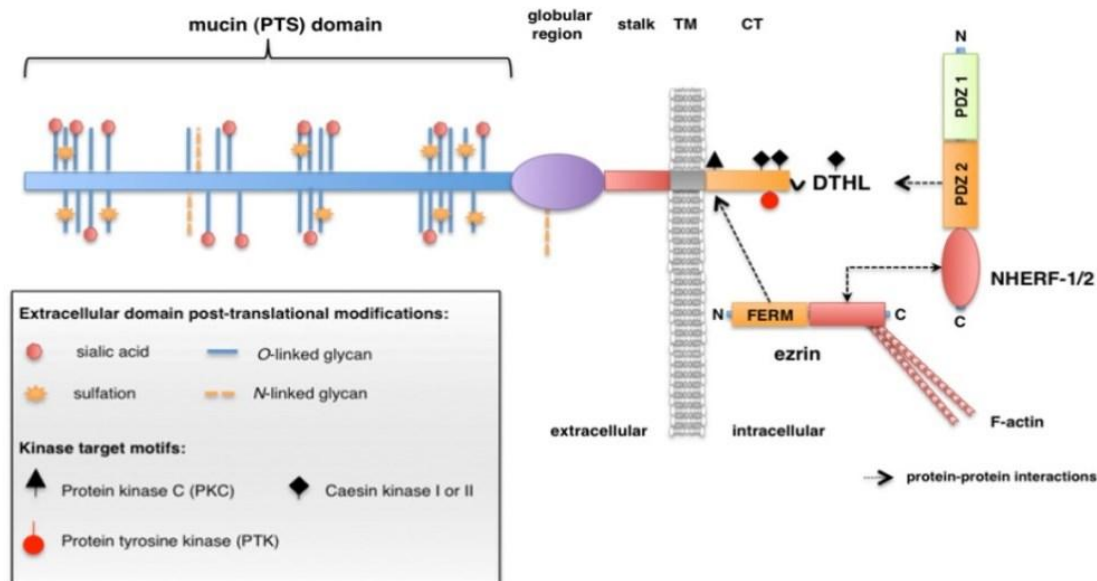


Figure 40 – Structure de la podocalyxine
(Extrait de Nielsen et Mcnaghy., 2014)

Le motif C-terminal de fixation PDZ (pour PSD-95, Dlg et ZO-1, protéines qui avec lesquelles la podocalyxine interagit) appelé « *DTHL* » (pour les acides aminés Asp-Thr-His-Leu) facilite les interactions avec les facteurs échangeurs et régulateurs Na^+/H^+ NHERF1 (Na^+/H^+ Exchanger Regulatory Factor 1) et NHERF2 (Na^+/H^+ Exchanger Regulatory Factor 2). Ces deux protéines adaptatrices forment un complexe avec une multitude d'autres protéines et sont impliquées dans le trafic protéique, le transport des ions, et les mécanismes de signalisation. La podocalyxine s'associe aussi avec la protéine de fixation à l'actine appelée « *erzin* ». La podocalyxine affecte ainsi une variété importante de fonctions cellulaires à travers son association avec NHERF, erzin et le cytosquelette.

Outre dans les podocytes, elle est aussi exprimée dans les précurseurs de l'hématopoïèse, les endothéliums vasculaires, et certains neurones. De par son interaction avec d'autres protéines intracellulaires et au moins un ligand extracellulaire, la podocalyxine régule à la fois l'adhésion et la morphologie cellulaire.

Dans le rein en développement, elle joue un rôle dans la formation et l'entretien des pieds des podocytes : elle apparaît juste avant la formation de ces derniers, et son absence mène à une mortalité néonatale.

Par ailleurs, on la retrouve également impliquée dans un certain nombre de cancers comme ceux du sein, de la prostate, du foie, du pancréas, des reins et certaines leucémies (Nielsen & McNaghy, 2009).

Expérimentalement, chez les rats, la neutralisation des charges négatives provoque une atteinte des podocytes avec effacement des pieds et altération du diaphragme de fente, néphrose et protéinurie massive (Nielsen & McNaghy, 2009; Barua et al., 2014).

Les souris mutées présentent également un effacement des pieds des podocytes, avec une anurie et une insuffisance rénale menant à la mort dans les 24h suivant la naissance (Barua et al., 2014).

2.3.2.10. La laminine $\beta 2$ (LAMB2)

La laminine $\beta 2$ est une sous-unité d'une laminine, la laminine-521, protéine de la membrane basale glomérulaire. C'est une protéine hétérotrimétrique en forme de croix aux bras de taille inégale, avec des sous-unités α , β , et γ (la laminine-521 a une conformation $\alpha 5:\beta 2:\gamma 1$) réunies entre elles par des ponts disulfures (Falix et al., 2017). Les laminines sont des composants indispensables de la membrane basale avec des rôles importants dans l'adhésion, la prolifération, la différenciation, et la migration cellulaire. Elles fournissent l'architecture de base pour le bon assemblage des autres composants de la membrane glomérulaire (Jarade et al., 2006).

Le domaine N-terminal « *globular laminin* » (LN) interagit avec des laminines adjacentes.

Ce gène est associé au syndrome de Pierson, qui occasionne en plus d'un syndrome néphrotique cortico-résistant des problèmes oculaires tels que microphthalmie, microcorie (absence totale ou partielle du muscle dilatateur de l'iris) ainsi que de la myasthénie et des problèmes neurologiques (Matejas et al., 2010).

2.3.2.11. Wilm Tumor – 1 (WT-1)

WT-1 est un facteur de transcription de la famille des protéines en doigt de zinc. Il joue un rôle crucial dans le développement embryonnaire du rein. Dans le rein mature, il est exprimé dans le podocyte et dans les cellules épithéliales de la capsule de Bowman (Jalanko & Kääriäinen, 2013).

Des mutations germinales de WT1 du gène sont responsables du syndrome de Denys-Drash qui associe une sclérose mésangiale diffuse, une prédisposition au néphroblastome et, chez les patients de caryotype XY, un pseudo-hermaphrodisme masculin.

2.3.2.12. Les chaînes $\alpha 3$, 4, et 5 du collagène IV

Le collagène de type IV compose majoritairement la MBG. Composé de chaînes α dont le poids tourne autour de 180 kDa, il s'agence en une structure similaire à celui d'un grillage de poulailler. Il existe 6 différentes chaînes, mais elles possèdent toutes le même agencement de domaines. On distingue ainsi un court domaine non collagénique coté N-terminal appelé 7S, un long domaine central collagénique composé de répétitions interrompues de trio d'acides aminés de type GLY-X-Y, et un domaine C-terminal non collagénique appelé NC1. Les chaînes α s'assemblent pour former une triple hélice trimérique (Minner, 2016).

Les gènes qui nous ont intéressés sont les gènes *COL4A3*, *COL4A4* et *COL4A5*, qui codent respectivement pour les chaînes $\alpha 3$, $\alpha 4$ et $\alpha 5$. Il a été récemment démontré que des mutations sur ces gènes étaient impliquées dans le syndrome d'Alport, entraînant une GFS. Dans ce syndrome, les chaînes $\alpha 3$ à $\alpha 5$ sont absentes, et sont remplacées par des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$. Concernant *COL4A4*, des mutations ont été trouvées chez le Cocker Spaniel, entraînant une insuffisance rénale juvénile (Lees et al., 1998).

2.3.3. Cartographie par recherche d'homozygotie des gènes sélectionnés

Après avoir passé en revue les gènes les plus souvent impliqués dans les causes de glomérulosclérose focale segmentaire, nous allons à présent voir si l'un ou plusieurs de ces gènes pourrait être impliqué dans la glomérulopathie familiale du Dogue de Bordeaux.

Tous les gènes répertoriés dans le tableau (cf **tableau I**) ont été testés par la technique de cartographie par recherche d'homozygotie (principe développé partie I, VI-6.3) chez les individus présentés auparavant. Les chiens ont été regroupés selon leur statut : sains de toute maladie rénale (3 individus), chiens atteints d'une maladie rénale autre que la glomérulopathie juvénile du Dogue de bordeaux (5 individus), et les chiens diagnostiqués par histo-pathologie atteints de glomérulopathie juvénile (25 individus). Tous les marqueurs sont bi-alléliques, chacun représentés par une couleur. L'hétérozygotie est également représentée par une couleur spécifique.

Parmi toutes les analyses effectuées, nous n'en présenterons que deux : *ARHGDIA* (**figure 41**) et *TRPC6* (**figure 42**).

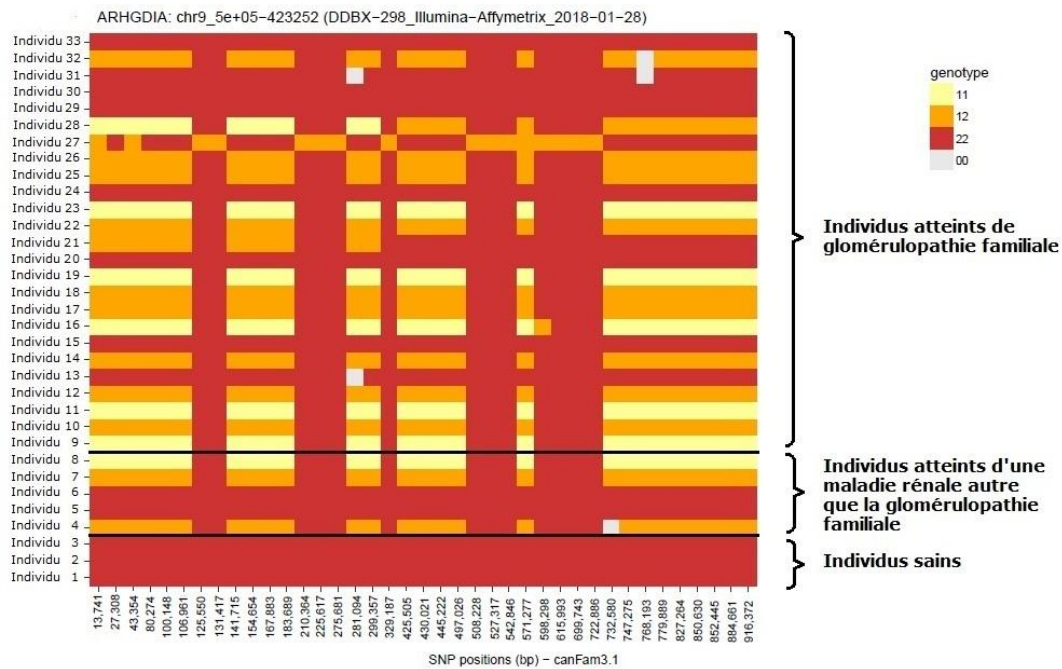


Figure 41 – Représentation g-plot du gène *ARHGDI*

Chaque allèle est associé à un chiffre, 1 ou 2, et chaque génotype est représenté par une couleur : « 11 » en jaune, « 12 » en orange, « 22 » en rouge, et « 00 » en gris lorsque l'on a aucun renseignement sur ces SNP.

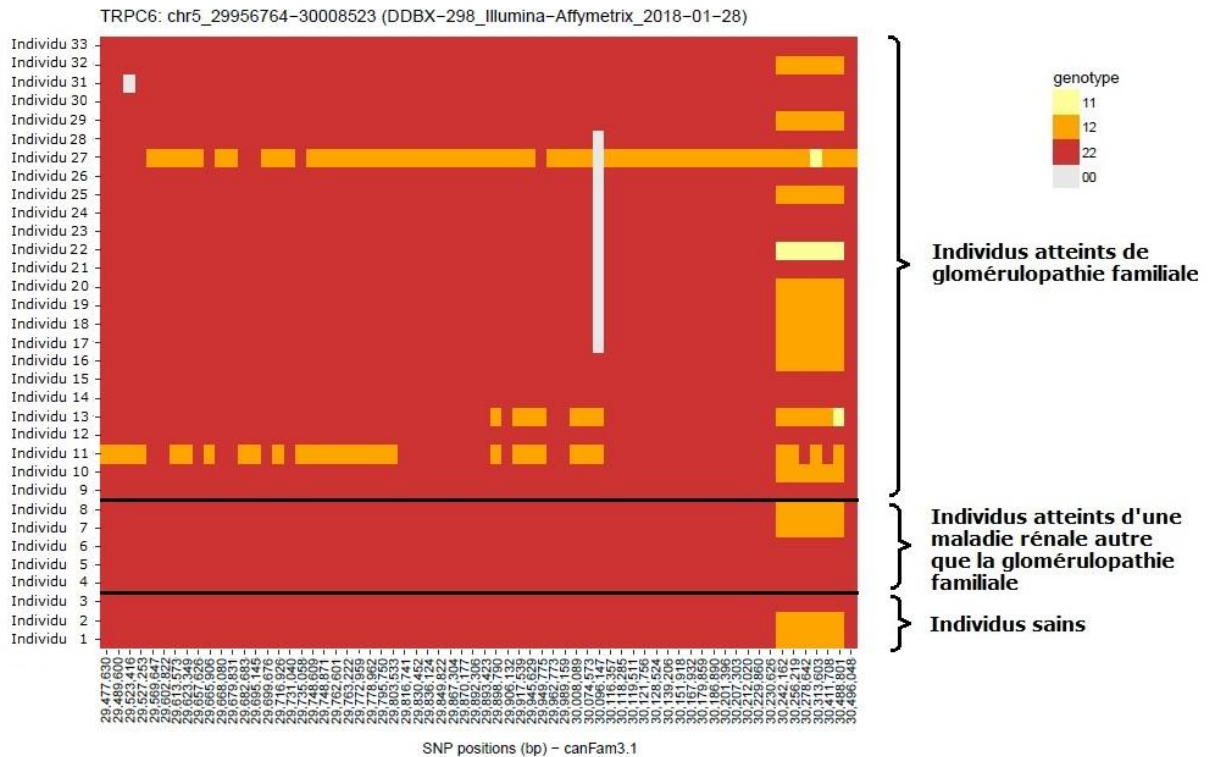


Figure 42 – Représentation g-plot du gène *TRPC6*

La région chromosomique contenant le gène *TRPC6* semble très homogène au sein de la race, car le génotype « 22 » en rouge est largement représenté.

Pour le gène *ARHGDIA*, tous les individus sains sont homozygotes pour le génotype « 22 », néanmoins ce n'est pas le cas pour les individus atteints d'une autre affection rénale, dont le profil d'allèles SNP se rapproche plus des individus atteints de glomérulopathie familiale. Ce gène pourrait donc contenir une mutation impliquée dans la glomérulopathie familiale du Dogue de Bordeaux si le mode de transmission se fait selon un mode autosomique dominant à pénétrance incomplète. Néanmoins, cette hypothèse n'étant pas confirmée, on ne peut donc pas conclure quant à une implication de ce gène dans la maladie d'intérêt.

Il est à noter que la plupart des gènes testés ont présenté un profil similaire.

Concernant *TRPC6*, ce gène semble très homozygote dans la population. Il pourrait contenir une mutation impliquée dans la glomérulopathie familiale du Dogue de Bordeaux si l'hypothèse que le mode de transmission se fait bien selon un mode autosomique récessif est validée. On ne peut donc rien conclure non plus.

Le manque de résultat probant pourrait ainsi s'expliquer par le fait que le ou les gènes impliqués dans la maladie soient très ancrés dans la race, et donc homozygotes. Il pourrait être également lié à l'incertitude concernant le mode de transmission. La cartographie par recherche d'homozygotie serait donc inefficace.

DISCUSSION

La difficulté majeure de notre étude se trouve dans la récupération des données. Les propriétaires d'animaux sont souvent enclins à fournir l'ADN de leur chien pour une simple prise de sang, cependant le suivi par analyse d'urines, et biopsies à la mort de l'animal s'avère plus compliqué. Il demeure cependant indispensable, le diagnostic de certitude étant obtenu par microscopie électronique.

Il nous a également été difficile de recruter des animaux indemnes de toute affection rénale. En effet, les propriétaires de ce type d'animaux sont moins enclins à contribuer à l'étude jusqu'au bout (c'est-à-dire jusqu'à la mort de l'animal) car cela leur paraît moins important de participer lorsque leurs chiens vont bien. C'est pourquoi notre étude manque de témoins, d'où la difficulté d'avoir des résultats francs aussi bien en GWAS qu'en cartographie par recherche d'homozygotie. L'idéal aurait été d'avoir deux à trois fois plus de « *témoins* » que de « *cas* ». Il faudrait donc renforcer le recrutement d'individus indemnes de toute maladie rénale en insistant sur leur importance pour la recherche.

Le nombre élevé d'interlocuteurs rend également cette étude complexe. En effet, les principaux acteurs ont été l'équipe du CNRS de Rennes, le docteur Rachel Lavoué à Toulouse, le docteur Luca Aresu à Turin, et bien évidemment les éleveurs de Dogue de Bordeaux localisés dans la France entière, ainsi que leur vétérinaire traitant. Ce grand nombre d'interlocuteurs ralentit la récupération et l'exploitation de données, mais cette situation est cependant inévitable.

Par ailleurs, pour simplifier l'étude dans un premier temps, nous n'avons pas distingué les trois formes de glomérulopathie dans nos tests génétiques. Or il est possible que le ou les gènes impliqués soient différents selon la forme que l'on considère. Il faudrait donc essayer de les étudier séparément.

CONCLUSION

La glomérulopathie familiale du Dogue de Bordeaux est une affection d'origine génétique qui peut se présenter sous trois formes : une forme juvénile, qui touche les animaux de moins de 2 ans, caractérisée par un syndrome néphrotique sévère menant à la mort en quelques mois ; une forme intermédiaire touchant les animaux entre 2 et 5 ans, dont les signes cliniques et la rapidité d'évolution sont variables ; et enfin une forme asymptomatique découverte le plus souvent par hasard, dont le seul signe clinique est une protéinurie et dont les lésions sont moins importantes que pour les autres formes.

Nous avons ainsi intégré une équipe de recherche au sein du CNRS de Rennes, l'équipe « *Génétique du chien* » dirigée par le Dr Catherine André, afin de se rendre compte de la démarche à utiliser pour étudier les causes génétiques d'une maladie, à travers l'exemple de la glomérulopathie familiale du Dogue de Bordeaux.

Au cours de notre travail, nous avons été amenés à participer au recrutement d'individus issus d'élevages français de Dogue de Bordeaux, qui ont enrichi la banque d'échantillons d'ADN. Cette étape, bien que fastidieuse, s'avère indispensable dans le cadre de la recherche. Elle est facilitée pour cette race par le réseau solide et organisé d'éleveurs à travers la France, ainsi que la clarté des informations à la disposition du grand public.

Concernant la glomérulopathie du Dogue de Bordeaux, le recrutement doit être poursuivi, en particulier pour les Dogues de Bordeaux indemnes de toute maladie rénale, afin d'enrichir les données déjà obtenues, et à terme, refaire de nouvelles analyses génétiques qui permettront d'approfondir notre travail.

Par ailleurs, une étude préliminaire effectuée sur 33 Dogues de Bordeaux, n'a pas fait ressortir de régions chromosomiques ni de gènes en particulier. Cependant d'autres perspectives sont encore à étudier. La glomérulopathie familiale du Dogue de Bordeaux étant une affection dont on ne sait pas encore tout, il est possible que l'on découvre à l'avenir de nouvelles pistes de recherche.

En outre, nous avons testé un nombre limité de gènes, susceptibles d'être impliqués dans la glomérulopathie familiale du Dogue de Bordeaux. D'autres gènes pourraient être candidats, notamment des gènes étudiés dans le cadre de la glomérulosclérose focale segmentaire.

Ainsi, notre travail pourra constituer un point de départ pour des recherches plus approfondies.

BIBLIOGRAPHIE

- Adair, B. D., Altintas, M. M., Moller, C. C., Arnaout, M. A., & Reiser, J. (2014). Structure of the Kidney Slit Diaphragm Adapter Protein CD2-Associated Protein as Determined with Electron Microscopy. *Journal of the American Society of Nephrology*, 25(7), 1465–1473. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013090949>
- Aguirre, G. D., Baldwin, V., Pearce-kelling, S., Narfström, K., Ray, K., & Gregory, M. (1998). Congenital stationary night blindness in the dog : common mutation in the RPE65 gene indicates founder effect, (October).
- André, C., Guaguère, E., Chaudieu, G., Genevois, J. P., & Devauchelle, P. (2017). The importance of dogs for comparative pathology and genetics: Examples of shared resources and programmes. *Revue Veterinaire Clinique*, 52(3–4), 55–70. <https://doi.org/10.1016/j.anicom.2017.07.002>
- André, C., Guaguère, E., Thomas, A., Bensignor, E., & Queney, G. (2007). Recherche de gènes responsables de genodermatoses : exemple de la kératodermie naso-plantaire. *Bull. Acad. Vét. France*, 160(3), 245–250.
- Antignac, C. (2005). *Anomalies génétiques du podocyte. Actualités néphrologiques* (Flammarion).
- Aresu, L., Zanatta, R., Luciani, L., Trez, D., & Castagnaro, M. (2010). Severe Renal Failure in a Dog Resembling Human Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Journal of Comparative Pathology*, 143(2–3), 190–194. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2009.12.016>
- Axelsson, E., Ratnakumar, A., Arendt, M. L., Maqbool, K., Webster, M. T., Perloski, M., ... Lindblad-Toh, K. (2013). The genomic signature of dog domestication reveals adaptation to a starch-rich diet. *Nature*, 495(7441), 360–364. <https://doi.org/10.1038/nature11837>
- Barone, R. (1990). *Anatomie comparée des mammif res domestiques - Tome IV, splanchnologie II, 2 me  dition*.
- Barr, F. J., Holt, P. E., & Gibbs, C. (1990). Ultrasonographic measurement of normal renal parameters. *Journal of Small Animal Practice*, 31(4), 180–184. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1990.tb00764.x>
- Barua, M., Shieh, E., Schlondorff, J., Genovese, G., Kaplan, B. S., & Pollak, M. R. (2014). Exome sequencing and in vitro studies identified podocalyxin as a candidate gene for focal and segmental glomerulosclerosis. *Kidney International*, 85(1), 124–133. <https://doi.org/10.1038/ki.2013.354>
- Bierzynska, A., Soderquest, K., & Koziell, A. (2014). Genes and podocytes - new insights into mechanisms of podocytopathy. *Frontiers in Endocrinology*, 5(DEC), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00226>
- Borgarelli, M., Santilli, R. A., Chiavegato, D., D’Agnolo, G., Zanatta, R., Mannelli, A., & Tarducci, A. (2006). Prognostic indicators for dogs with dilated cardiomyopathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20(1), 104–110. [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2006\)20\[104:PIFDWD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2006)20[104:PIFDWD]2.0.CO;2)
- Brown, S., Elliott, J., Francey, T., Polzin, D., & Vaden, S. (2013). Consensus Recommendations for Standard Therapy of Glomerular Disease in Dogs. *J Vet Intern Med*, S27–S43. <https://doi.org/10.1677/erc.1.01323>

- Bush, W. S., & Moore, J. H. (2012). Chapter 11: Genome-Wide Association Studies. *PLoS Computational Biology*, 8(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002822>
- Canales, C., Krall, P., Kairath, P., Perez, I., Fragoso, M., Carmona-Mora, P., ... Walz, K. (2015). Characterization of a Trpc6 Transgenic Mouse Associated with Early Onset FSGS. *British Journal of Medicine and Medical Research*, 5(10), 1198–1212. <https://doi.org/10.9734/BJMMR/2015/12493>
- Cargill, E. J., Famula, T. R., Strain, G. M., & Murphy, K. E. (2004). Heritability and Segregation Analysis of Deafness in U . S . Dalmatians, 1393(March), 1385–1393.
- Chetboul, V., Tissier, R., Villaret, F., Nicolle, A., Déan, E., Benalloul, T., & Pouchelon, J. (2004). Caractéristiques épidémiologiques, cliniques, écho-doppler de l'endocardiose mitrale chez le Cavalier King Charles en France : étude rétrospective de 451 cas (1995 à 2003). *Canadian Veterinary Journal*, 45(December), 1012–1015.
- Cotard, J.-P. (1993). *Néphrologie et urologie du chien et du chat*.
- Deen, W., Bridges, C., Brenner, B., & Myers, B. (1985). Heteroporous model of glomerular size selectivity : application to normal and nephrotic humans, 374–389.
- Derrien, T. (2012). *L ' analyse comparee des genomes : applications à l ' identification de nouveaux gènes canins*. Université de Rennes 1.
- Duphot, V. (1987). *Le Dogue de Bordeaux*. Ecole nationale vétérinaire d'Alfort.
- Eldin, D., & Giebisch, G. (1985). *The kidney. physiology and pathophysiology* (Raven Pres).
- Falix, F. A., Bennebroek, C. A. M., van der Zwaag, B., Lapid-Gortzak, R., Florquin, S., & Oosterveld, M. J. S. (2017). A novel mutation of laminin $\beta 2$ (LAMB2) in two siblings with renal failure. *European Journal of Pediatrics*, 176(4), 515–519. <https://doi.org/10.1007/s00431-017-2871-6>
- Faller, P. P., & Alain, P. B. (2011). Etude du rôle des canaux TRPC6 et de l ' antidépresseur hyperforine dans l ' homéostasie du zinc dans les neurones corticaux de souris .
- Fambrough, D., McClure, K., Kazlauskas, A., & Lander, E. S. (1999). Diverse Signaling Pathways Activated by Growth Factor Receptors Induce Broadly Overlapping , Rather Than Independent , Sets of Genes, 97, 727–741.
- Feng, D., DuMontier, C., & Pollak, M. R. (2015). The role of alpha-actinin-4 in human kidney disease. *Cell & Bioscience*, 5(1), 44. <https://doi.org/10.1186/s13578-015-0036-8>
- Feng, D., Steinke, J. M., Krishnan, R., Birrane, G., & Pollak, M. R. (2016). Functional validation of an alpha-actinin-4 mutation as a potential cause of an aggressive presentation of adolescent focal segmental glomerulosclerosis: Implications for genetic testing. *PLoS ONE*, 11(12), 4–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167467>
- Fox, P., Sisson, D., & Moïse, N. (1999). *Textbook of Canine and Feline Cardiology: Principles and Clinical Practice*, 2nd edition.
- Frantz, L., Ollivier, M., Mullin, V., Pionnier-Capitan, M., Lebrasseur, O., Venters, B. J., ... Sawicka, A. (2016). Genomic and archaeological evidence suggests a dual origin of domestic dogs. *Sciences*, 3 JUNE 2016, 352(6290), 1228–1231.
- Frischknecht, M., Niehof-Oellers, H., Jagannathan, V., Owczarek-Lipska, M., Drögemüller, C., Dietschi, E., ... Leeb, T. (2013). A COL11A2 Mutation in Labrador Retrievers with Mild Disproportionate Dwarfism. *PLoS ONE*, 8(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060149>

- Grall, A., Guaguère, E., Planchais, S., Grond, S., Bourrat, E., Hausser, I., ... Zechner, R. (2012). PNPLA1 mutations cause autosomal recessive congenital ichthyosis in golden retriever dogs and humans. *Nature Publishing Group*, 44(2), 140–147. <https://doi.org/10.1038/ng.1056>
- Grauer, G. F., Greco, D. S., Getzy, D. M., Cowgill, L. D., Vaden, S. L., Chew, D. J., ... Barsanti, J. A. (2000). Effects of Enalapril versus Placebo as a Treatment for Canine Idiopathic Glomerulonephritis, 526–533.
- Gu, S. M., Thompson, D. A., Srikumari, C. R., Lorenz, B., Finckh, U., Nicoletti, A., ... Gal, A. (1997). Mutations in RPE65 cause autosomal recessive childhood-onset severe retinal dystrophy. *Nature Genetics*, 194–197. <https://doi.org/10.1038/ng0293-165>
- Guaguère, E., & Prélaud, P. (2006). *Guide pratique de dermatologie canine* (Kalianxis).
- Hans, A., Gaudaire, D., Manuguerra, J., Leon, A., Gessain, A., Laugier, C., & Berthet, N. (2015). Combination of an Unbiased Amplification Method and a Resequencing Microarray for Detecting and Genotyping Equine Arteritis Virus, 53(1), 287–291. <https://doi.org/10.1128/JCM.01935-14>
- Hare, B., Wobber, V., & Wrangham, R. (2012). The self-domestication hypothesis: Evolution of bonobo psychology is due to selection against aggression. *Animal Behaviour*, 83(3), 573–585. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2011.12.007>
- Heuse, M. (2008). *Etude génétique de la kératodermie nasoplantaire du Dogue de Bordeaux*. ENVN.
- Hinkes, B., Wiggins, R. C., Gbadegesin, R., Vlangos, C. N., Seelow, D., Nürnberg, G., ... Hildebrandt, F. (2006). Positional cloning uncovers mutations in PLCE1 responsible for a nephrotic syndrome variant that may be reversible. *Nature Genetics*, 38(12), 1397–1405. <https://doi.org/10.1038/ng1918>
- Höllmer, M., Willesen, J. L., Jensen, A. T., & Koch, J. (2008). Aortic stenosis in the Dogue de Bordeaux. *Journal of Small Animal Practice*, 49(9), 432–437. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2008.00569.x>
- Huber, T. B., Hartleben, B., Kim, J., Schmidts, M., Schermer, B., Keil, A., ... Benzing, T. (2003). Nephhrin and CD2AP associate with phosphoinositide 3-OH kinase and stimulate AKT-dependent signaling. *Molecular and Cellular Biology*, 23(14), 4917–4928. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.14.4917-4928.2003>
- Huber, T. B., Simons, M., Hartleben, B., Sernetz, L., Schmidts, M., Gundlach, E., ... Benzing, T. (2003). Molecular basis of the functional podocin-nephhrin complex: Mutations in the NPHS2 gene disrupt nephhrin targeting to lipid raft microdomains. *Human Molecular Genetics*, 12(24), 3397–3405. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg360>
- Ichii, O., Yabuki, A., Sasaki, N., Otsuka, S., Ohta, H., Yamasaki, M., ... Kon, Y. (2011). Pathological correlations between podocyte injuries and renal functions in canine and feline chronic kidney diseases. *Histology and Histopathology*, 26, 1243–1255.
- Jacob, L. (2007). *L'insuffisance rénale aiguë* (Springer).
- Jalanko, H., & Kääriäinen, H. (2013). *Nephrotic Disorders. Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics* (Sixth Edit). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-383834-6.00068-9>
- Jarad, G., Cunningham, J., Shaw, A., & Miner, J. (2006). Proteinuria precedes podocyte abnormalities in *Lamb2*^{-/-} mice, implicating the glomerular basement. *Jci*, 116(8), 2272–

2279. <https://doi.org/10.1172/JCI28414.2272>

- Jotterand, V., Moll, S., Martin, P. Y., & Saudan, P. (2009). Glomérulosclérose segmentaire et focale avec collapsus du flocculus induite par les bisphosphonates ; présentation de deux cas cliniques et revue de la littérature. *Nephrologie et Therapeutique*, 5(2), 134–138. <https://doi.org/10.1016/j.nephro.2008.08.013>
- Karlsson, E. K., Baranowska, I., Wade, C. M., Salmon Hillbertz, N. H. C., Zody, M. C., Anderson, N., ... Lindblad-Toh, K. (2007). Efficient mapping of mendelian traits in dogs through genome-wide association. *Nature Genetics*, 39(11), 1321–1328. <https://doi.org/10.1038/ng.2007.10>
- Karlsson, E. K., & Lindblad-Toh, K. (2008). Leader of the pack: Gene mapping in dogs and other model organisms. *Nature Reviews Genetics*, 9(9), 713–725. <https://doi.org/10.1038/nrg2382>
- Kashtan, C. (1998). Alport Disease Syndrome and Thin Glomerular Basement Membrane. *Journal of the American Society of Nephrology*, 9(9), 1736–1750.
- Kirkness, E. F. (2003). The Dog Genome : Survey Sequencing and Comparative. *Science*, 301, 1898–1903. <https://doi.org/10.1126/science.1086432>
- Lacour, B. (2013). Physiologie du rein et bases physiopathologiques des maladies rénales. *RFL Revue Francophone Des Laboratoires*, 2013(451), 25–37. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(13\)71993-2](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(13)71993-2)
- Larson, G., Karlsson, E. K., Perri, A., Webster, M. T., Ho, S. Y. W., Peters, J., ... Lindblad-Toh, K. (2012). Rethinking dog domestication by integrating genetics, archeology, and biogeography. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(23), 8878–8883. <https://doi.org/10.1073/pnas.1203005109>
- Lavoué, R., Geffré, A., Braun, J. P., Peeters, D., & Trumel, C. (2013). Breed-specific biochemical reference intervals for the adult Dogue de Bordeaux. *Veterinary Clinical Pathology*, 42(3), 346–359. <https://doi.org/10.1111/vcp.12067>
- Lavoué, R., van der Lugt, J. J., Day, M. J., Georges, M., Busoni, V., Merveille, A. C., ... Peeters, D. (2010). Progressive juvenile glomerulonephropathy in 16 related French Mastiff (Bordeaux) dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0474.x>
- Lees, G. E., Brown, S. A., Elliott, J., Grauer, G. F., & Vaden, S. L. (2005). ACVIM Consensus Statement, 377–385.
- Lees, G., GAYMAN HELMAN, R., KASHTAN, C. E., MICHAEL, A. F., HOMCO, L. D., MILLICHAMP, N. J., ... KIM, Y. (1998). A model of autosomal recessive Alport syndrome in English cocker spaniel dogs. *Kidney International*, 54, 706–719. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1998.00062.x>
- Levy, F. (2005). *Les génodermatoses de l'épiderme, de la jonction dermo-épidermique et des annexes folliculaires du chien*. Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon.
- Li, X., Chuang, P. Y., D'Agati, V. D., Dai, Y., Yacoub, R., Fu, J., ... He, J. C. (2015). Nephin Preserves Podocyte Viability and Glomerular Structure and Function in Adult Kidneys. *Journal of the American Society of Nephrology*, 26(10), 2361–2377. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014040405>
- Lin, W. (2004). *Applications de la technologie des Puces à ADN à l'étude de la différenciation méiotique et des mécanismes de recombinaison chez la levure*

Saccharomyces cerevisiae ».

- Lindblad-Toh, K., Wade, C. M., Mikkelsen, T. S., Karlsson, E. K., Jaffe, D. B., Kamal, M., ... Lander, E. S. (2005). Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature*, 438(7069), 803–819. <https://doi.org/10.1038/nature04338>
- Littman, M. P., Daminet, S., Grauer, G. F., Lees, G. E., van Dongen, A. M., Background:Lees, G. E., & Dongen, A. M. Van. (2013). Consensus Recommendations for the Diagnostic Investigation of Dogs with Suspected Glomerular Disease. *J Vet Intern Med*, 19–26.
- Liu, L., Doné, S. C., Khoshnoodi, J., Bertorello, a, Wartiovaara, J., Berggren, P. O., & Tryggvason, K. (2001). Defective nephrin trafficking caused by missense mutations in the NPHS1 gene: insight into the mechanisms of congenital nephrotic syndrome. *Human Molecular Genetics*, 10(23), 2637–2644.
- Löwik, M. M., Groenen, P. J., Levtchenko, E. N., Monnens, L. A., & Van Den Heuvel, L. P. (2009). Molecular genetic analysis of podocyte genes in focal segmental glomerulosclerosis-a review. *European Journal of Pediatrics*, 168(11), 1291–1304. <https://doi.org/10.1007/s00431-009-1017-x>
- Mannat Dumas de La Roque, C. (2016). *Syndrome néphrotique idiopathique : caractéristiques et identification des facteurs prédictifs d ' évolution To cite this version : HAL Id : dumas-01390076 Diplôme d ' Etat de Docteur en Médecine Discipline : néphrologie Présentée et soutenue publiquement*. Université de Bordeaux.
- Marton, M. (1998). Drug target validation and identification of secondary drug target effects using DNA microarrays. *Nature Medecine*, 4(11), 1293–1301.
- Matejas, V., Hinkes, B., Alkandari, F., Al-Gazali, L., Annexstad, E., Aytac, M. B., ... Zenker, M. (2010). Mutations in the human laminin beta2 (LAMB2) gene and the associated phenotypic spectrum. *Human Mutation*, 31(9), 992–1002. <https://doi.org/10.1002/humu.21304>
- Mathis, S. (2014). *Corrélations génotype/phénotype dans la maladie de Charcot-Marie-Tooth - L'exemple des mutations du gène INF2*. Université de Limoges.
- Mele, C., Iatropoulos, P., Donadelli, R., Tomasoni, S., Piras, R., Pharm, C., ... Benigni, A. (2011). MYO1E mutations and childhood familial focal segmental glomerulosclerosis. *N Engl J Med*, 365(4), 295–306. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1101273>
- Mellersh, C. S., Mellersh, C. S., Langston, a a, Langston, a a, Acland, G. M., Acland, G. M., ... Ostrander, E. a. (1997). A linkage map of the canine genome. *Genomics*, 46(3), 326–336. <https://doi.org/10.1006/geno.1997.5098>
- Minner, J. (2016). Renal basement membrane components. *Kidney International*, 56(1999), 2016–2024.
- Monzo, P., & Cormont, M. (2005). CD2AP, un Adaptateur Moléculaire Entre L ' Endocytose Et Le Cytosquelette D ' Actine Dans La Cellule En Interphase Et Pendant La Cytocinèse ? *Médecine Science N°12*, 21, 1036–1037.
- Mosher, D. S., Quignon, P., Bustamante, C. D., Sutter, N. B., Mellersh, C. S., Parker, H. G., & Ostrander, E. A. (2007). A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. *PLoS Genetics*, 3(5), 779–786. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030079>
- Nielsen, J. S., & McNaghy, K. M. (2009). The Role of Podocalyxin in Health and Disease,

- 1669–1676. <https://doi.org/10.1681/ASN.2008070782>
- O’Grady, M. R., & O’Sullivan, M. L. (2004). Dilated cardiomyopathy: An update. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 34(5), 1187–1207. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2004.05.009>
- Ohad, D. G., Avrahami, A., Waner, T., & David, L. (2013). The occurrence and suspected mode of inheritance of congenital subaortic stenosis and tricuspid valve dysplasia in Dogue de Bordeaux dogs. *Veterinary Journal*, 197(2), 351–357. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.01.012>
- Ostrander, E. A., & Giniger, E. (1997). Semper Fidelis: What Man’s Best Friend Can Teach Us about Human Biology and Disease. *The American Journal of Human Genetics*, 61(3), 475–480. <https://doi.org/10.1086/515522>
- Ostrander, E. A., & Wayne, R. K. (2005). The canine genome. *Genome Research*, 1706–1716. <https://doi.org/10.1101/gr.3736605.large>
- Oyama, M. A., & Chittur, S. V. (2006). Genomic expression patterns of mitral valve tissues from dogs with degenerative mitral valve disease. *AJVR*, 67(8), 1307–1318.
- Pang, J. F., Kluetsch, C., Zou, X. J., Zhang, A. B., Luo, L. Y., Angleby, H., ... Savolainen, P. (2009). MtDNA data indicate a single origin for dogs south of yangtze river, less than 16,300 years ago, from numerous wolves. *Molecular Biology and Evolution*, 26(12), 2849–2864. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp195>
- Paradis, M. (1992). Footpad Hyperkeratosis in a Family of Dogues de Bordeaux. *Veterinary Dermatology*, 3(2), 75–78. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.1992.tb00148.x>
- Parker, H., Dreger, D., Rimbault, M., Davis, B. W., Mullen, A. B., Carpintero-Ramirez, G., & Ostrander, E. A. (2017). Genomic analyses reveal the influence of geographic origin, migration and hybridization on modern dog breed development. *Cell Rep.*, 19(4), 697–708. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aad5111>.Cell
- Pavenstädt, H. (2000). Roles of the podocyte in glomerular function. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 278, 173–179. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.10.021>
- Plassais, J. (2014). *Identification de gènes impliqués dans des maladies génétiques chez l’Homme et le chien : de la dermatologie à la neurologie*. Université de Rennes 1.
- Plassais, J. (2017). Le chien dans la pathologie et la génétique comparée: exemples de maladies et de gènes partagés entre l’homme et le chien, (July 2012).
- Pollak, M. (2016). Genetics of Familial FSGS. *Seminars in Nephrology*, 36(6), 467–472. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2016.09.010>
- Queyroy, H. (2007). *Diagnostic étiologique des polyarthrites canines - synthèse bibliographique et étude rétrospective*.
- Rodewald, R., & Karnovsky, M. J. (1974). Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. *Journal of Cell Biology*, 60(2), 423–433. <https://doi.org/10.1083/jcb.60.2.423>
- Ruotsalainen, V., Ljungberg, P., Wartiovaara, J., Lenkkeri, U., Kestila, M., Jalanko, H., ... Tryggvason, K. (1999). Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(14), 7962–7967. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.14.7962>
- Sanna-cherchi, S., Burgess, K. E., Nees, S. N., Caridi, G., Weng, P. L., Dagnino, M., ...

- Shapiro, L. S. (2011). Exome sequencing identified MYO1E and NEIL1 as candidate genes for human autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Kidney International*, 80(4), 389–396. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.148>
- Savolainen, P., Zhang, Y., Luo, J., Lundeberg, J., Leitner, T., Vila, C., ... Noe-Nygaard, N. (2002). Genetic evidence for an East Asian origin of domestic dogs. *Science (New York, N.Y.)*, 298(5598), 1610–3. <https://doi.org/10.1126/science.1073906>
- Shearin, A. L., & Ostrander, E. A. (2010). Leading the way: canine models of genomics and disease. *Disease Models & Mechanisms*, 3(1–2), 27–34. <https://doi.org/10.1242/dmm.004358>
- Sherwood, L., Klandorf, H., & Yancey, P. (2016). *Physiologie animale*.
- Smee, N. M., Harkin, K. R., & Wilkerson, M. J. (2007). Measurement of serum antinuclear antibody titer in dogs with and without systemic lupus erythematosus: 120 cases (1997–2005), 230(8).
- Steffen, F., Bilzer, T., Brands, J., Golini, L., Jagannathan, V., Wiedmer, M., ... Leeb, T. (2015). A Nonsense Variant in *COL6A1* in Landseer Dogs with Muscular Dystrophy. *G3 : Genes|Genomes|Genetics*, 5(12), 2611–2617. <https://doi.org/10.1534/g3.115.021923>
- Syrclé, J. (2017). Hip Dysplasia: Clinical Signs and Physical Examination Findings. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 47(4), 769–775. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2017.02.001>
- Thalmann, O., Kracker, S., Fischer, A., Feldman, M. E., Balla, A., Balla, T., ... Vadas, O. (2013). Complete Mitochondrial Genomes of Ancient Canids Suggest a European Origin of Domestic Dogs, 342(November), 871–874. <https://doi.org/10.1126/science.1243650>
- Triquet, R. (1997). *La saga du dogue de Bordeaux - Tome I: Du molosse antique au dogue moderne* (Maradi).
- Tryggvason, K. (2001). *Néphrine: son rôle dans le rein normal et pathologique*. (Flammarion Médecine-Sciences, Ed.), *Actualités néphrologiques*.
- Tsvetkov, D., Hohmann, M., Anistan, Y. M., Mannaa, M., Harteneck, C., Rudolph, B., & Gollasch, M. (2016). A CD2AP mutation associated with focal segmental glomerulosclerosis in young adulthood. *Clinical Medicine Insights: Case Reports*, 9, 15–19. <https://doi.org/10.4137/CCRep.S30867>
- Vilà, C., Savolainen, P., Maldonado, J. E., Amorim, I. R., Rice, J. E., Honeycutt, R. L., ... Wayne, R. K. (1997). Multiple and ancient origins of the domestic dog. *Science*, 276(5319), 1687–1689. <https://doi.org/10.1126/science.276.5319.1687>
- Vilà, C., Sundqvist, A. K., Flagstad, Ø., Seddon, J., Björnerfeldt, S., Kojola, I., ... Ellegren, H. (2002). Rescue of a severely bottlenecked wolf (*Canis lupus*) population by a single immigrant. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(1510), 91–97. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2184>
- Völker, L. A., Schurek, E., Rinschen, M. M., Tax, J., Schutte, B. A., & Lamkemeyer, T. (2013). Characterization of a short isoform of the kidney protein podocin in human kidney. *BMC Nephrology*, 14. <https://doi.org/10.1186/1471-2369-14-102>
- Wayne, R. K. (1993). Molecular evolution of the dog family, 9(6). Retrieved from file:///C:/Documents and Settings/J. D. Lund/Dokumenter/Referencer/Artikler 7 - HTML/Molecular evolution of the dog

family.htm%0Ahttp://www.idir.net/~wolf2dog/index.html

- Welsh, G., & Saleem, M. (2011). The podocyte cytoskeleton: Key to a functioning glomerulus in health and disease. *Nature Reviews Nephrology*, 8, 14–21.
<https://doi.org/10.1159/000359923>
- White, C. R., Langston, C., Hohenhaus, A. E., Lamb, K., Hackner, S., & Fox, P. R. (2016). Evaluation of the relationship between clinical variables and thromboelastographic findings in dogs with protein-losing nephropathy, 26(1), 74–79.
<https://doi.org/10.1111/vec.12409>
- Wiik, A. C., Wade, C., Biagi, T., Ropstad, E. O., Bjerkås, E., Lindblad-Toh, K., & Lingaas, F. (2008). A deletion in nephronophthisis 4 (NPHP4) is associated with recessive cone-rod dystrophy in standard wire-haired dachshund. *Genome Research*, 18(9), 1415–1421.
<https://doi.org/10.1101/gr.074302.107>
- Wucher, V., Legeai, F., Hédan, B., Rizk, G., Lagoutte, L., Leeb, T., ... Derrien, T. (2017). FEELnc: A tool for long non-coding RNA annotation and its application to the dog transcriptome. *Nucleic Acids Research*, 45(8), 1–12.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkw1306>
- Ytournal, F., Gilbert, H., & Boichard, D. (2008). Comment affiner la localisation d'un QTL? *Productions Animales*, 21(2), 147–158.

Référence internet :

<https://igdr.univ-rennes1.fr/fr/la-recherche/equipes-de-recherche/%C3%A9quipe-de-catherine-andr%C3%A9/crb-cani-dna>

ANNEXES

Annexe 1 - Standard de la race présenté tel qu'il a été publié le 4/11/2008
(Société Centrale Canine - Fiches et standards de race)

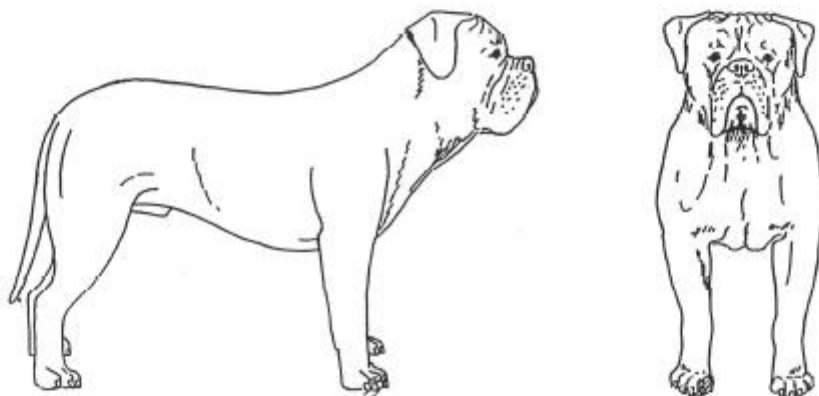


FEDERATION CYNOLOGIQUE INTERNATIONALE (AISBL)
SECRETARIAT GENERAL: 13, Place Albert 1^{er} B - 6530 Thuin (Belgique)

23.01.2009 / FR

Standard FCI N° 116

DOGUE DE BORDEAUX



Dessins de Sylvie GUIGNARD

Ces illustrations ne représentent pas forcément un exemple idéal de la race.

ORIGINE : France.

DATE DE PUBLICATION DU STANDARD OFFICIEL EN VIGUEUR : 04.11.2008.

UTILISATION : Garde, défense et dissuasion.

CLASSIFICATION FCI : Groupe 2 Chiens de type Pinscher et Schnauzer, molossoïdes et chiens de montagne et de bouvier suisses.

Section 2.1 Molossoïdes de type dogue.

Sans épreuve de travail.

BREF APERÇU HISTORIQUE : Le Dogue de Bordeaux est l'un des chiens français les plus anciens, descendant probable des Alans et, en particulier de l'Alan Vautre dont Gaston Phébus (ou Fébus) Comte de Foix dit, au XIV^e siècle, dans son Livre de Chasse, qu'il « tient plus fort sa morsure que ne ferait trois lévriers ». Le mot dogue apparaît à la fin du XIV^e siècle.

Au milieu du XIX^e siècle, ces anciens dogues n'étaient guère renommés qu'en Aquitaine. On les utilisait à la chasse au gros gibier (sanglier), aux combats (souvent codifiés), à la garde des maisons et du bétail, au service des bouchers. En 1863 eut lieu à Paris, au Jardin d'Acclimatation, la 1^{ère} exposition canine française. Les Dogues de Bordeaux figuraient sous leur nom actuel. Il a existé différents types : type toulousain, type parisien, type bordelais, à l'origine du dogue actuel.

La race qui avait beaucoup souffert pendant les deux guerres mondiales, au point d'être menacée d'extinction après la guerre de 1939-1945, reprit son essor dans les années 1960.

1^{er} standard («Caractère des vrais dogues») in Pierre Mégnin, *Le Dogue de Bordeaux*, 1896.

2^{ème} standard in J. Kunstler, *Etude critique du Dogue de Bordeaux*, 1910

3^{ème} standard par Raymond Triquet, avec la collaboration du Docteur Vétérinaire Maurice Luquet, 1971,

4^{ème} standard reformulé selon le modèle de Jérusalem (F.C.I.) par Raymond Triquet avec la collaboration de Philippe Sérouil, Président, et du Comité de la Société des Amateurs de Dogues de Bordeaux, 1993.

Standard précisé en 2007 par Raymond Triquet (Président d'honneur de la SADB), Sylviane Tompousky (Présidente de la SADB) et Philippe Sérouil (membre du Comité de la SADB)

ASPECT GENERAL : Typiquement un molossoïde brachycéphale concaviligne. Le Dogue de Bordeaux est un chien très puissant, dont le corps très musclé conserve un ensemble harmonieux. Il est construit plutôt près de terre, c'est à dire que la distance sternum-sol est légèrement inférieure à la hauteur de la poitrine.

Trapu, athlétique, imposant, il a un aspect dissuasif.

PROPORTIONS IMPORTANTES :

La longueur du corps, de la pointe de l'épaule à la pointe de la fesse, est supérieure à la hauteur au garrot dans la proportion de : 11/10.

La hauteur de la poitrine est supérieure à la moitié de la hauteur au garrot.

La longueur maximale du museau est égale au tiers de la longueur de la tête.

La longueur minimale du museau est égale au quart de la longueur de la tête.

Chez le mâle, le périmètre céphalique correspond à peu près à la hauteur au garrot.

COMPORTEMENT / CARACTERE : Ancien chien de combat, le Dogue de Bordeaux est doué pour la garde qu'il assume avec vigilance et un grand courage mais sans agressivité.

Bon compagnon, il est très attaché à son maître et très affectueux.
Calme, équilibré avec un seuil de réponse (réaction) élevé.
Le mâle a un caractère généralement dominant.

TETE : Volumineuse, anguleuse, large, assez courte, trapézoïdale quand elle est vue de face et de dessus. Les axes longitudinaux du crâne et du chanfrein sont convergents (vers l'avant). La tête est sillonnée de rides symétriques de chaque côté du sillon médian. Ces rides profondes et tourmentées sont mobiles selon que le chien est attentif ou non. La ride qui va de la commissure interne de l'œil à la commissure des lèvres est typique. La ride allant de la commissure externe de l'œil à la commissure des lèvres ou vers le fanon, si elle est présente, doit rester discrète.

REGION CRANIENNE :

Crâne : Chez le mâle : le périmètre du crâne, pris au niveau de la plus grande largeur, correspond à peu près à la hauteur au garrot.

Chez la femelle : il peut être légèrement inférieur.

Son volume et sa forme sont les conséquences du développement très important des temporaux, des arcades sus-orbitaires, des arcades zygomatiques et de l'écartement des branches du maxillaire inférieur. La région supérieure du crâne est légèrement convexe d'un côté à l'autre.

Dépression frontale profonde s'atténuant vers l'extrémité postérieure de la tête. Le front domine la face mais ne la surplombe pas. Il est pourtant encore plus large que haut.

Stop : Très accusé formant avec le chanfrein un angle presque droit (95 à 100°).

REGION FACIALE :

Truffe : Large, aux narines bien ouvertes, bien pigmentée selon la couleur du masque ; truffe remouchée (retroussée) admise mais pas renfoncée vers les yeux.

Museau : Puissant, large, épais, mais non empâté sous les yeux, assez court, profil supérieur très légèrement concave, aux plis sobrement indiqués.

Sa largeur diminuant à peine jusqu'au bout du museau, il a, vu de dessus, la forme générale d'un carré. Par rapport à la région supérieure du crâne, la ligne du chanfrein forme un angle très obtus ouvert vers le haut. Lorsque la tête est horizontale, le bout du museau tronqué, épais et large à la base se trouve en avant d'une verticale tangente à la face antérieure de la truffe. Son périmètre approche les deux tiers de celui de la tête. Sa longueur se situe entre le quart et le tiers de la longueur totale de la tête, de la truffe à l'occiput. Les limites supérieure (du tiers) et inférieure (du quart de la longueur de la tête) sont admises mais non recherchées, la longueur idéale du museau se situant entre ces extrêmes.

Mâchoires / dents : Très puissantes, larges. Le chien est prognathe inférieur (le prognathisme est un caractère racial). La face postérieure des incisives inférieures est en avant et non au contact de la face antérieure des incisives supérieures. La mâchoire inférieure s'incurve vers le haut. Le menton est bien marqué et ne doit ni dépasser exagérément la lèvre supérieure ni être recouvert par elle.

Dents fortes, en particulier les canines. Canines inférieures écartées et légèrement recourbées. Incisives bien alignées surtout à la mâchoire inférieure où elles forment une ligne apparemment droite.

Lèvres : Lèvre supérieure épaisse, modérément pendante, rétractile. Vue de profil elle présente une ligne inférieure arrondie. Elle recouvre la mâchoire inférieure sur les côtés. A l'avant le bord de la lèvre supérieure est en contact avec la lèvre inférieure, puis descend de chaque côté en formant en V renversé évasé.

Joues : Saillantes par suite d'un très fort développement musculaire.

Yeux : Ovaux, largement espacés. L'espace entre les angles internes des paupières équivaut à environ deux fois la longueur de l'œil (ouverture palpébrale). Regard franc. La conjonctive ne doit pas être apparente. Couleur noisette à brun foncé pour les dogues à masque noir, couleur moins foncée tolérée mais non recherchée chez les sujets à masque marron ou sans masque.

Oreilles : relativement petites, de couleur un peu plus foncée que la robe. A leur attache, la base antérieure est légèrement relevée.

Elles doivent retomber, mais non pendre mollement, le bord antérieur étant contre la joue quand le chien est attentif. L'extrémité inférieure est légèrement arrondie ; elle ne doit pas pouvoir dépasser l'œil. Elles sont attachées assez haut, au niveau de la ligne supérieure du crâne dont elles semblent encore accentuer la largeur.

COU : Très fort, musclé, presque cylindrique. Sa peau est ample, lâche et souple. Sa circonférence moyenne égale presque celle de la tête. Il est séparé de la tête par un sillon transversal peu accentué, légèrement courbe. Son profil supérieur est légèrement convexe. Le fanon, bien marqué, débute au niveau de la gorge formant des plis jusqu'au poitrail sans pendre exagérément. Le cou, très large à la base se fond sans heurt avec les épaules.

CORPS :

Ligne du dessus : Bien soutenue.

Garrot : Bien marqué.

Dos : Large et musclé

Rein : Large, assez court et solide

Croupe : Modérément oblique jusqu'à la naissance de la queue.

Poitrine : Puissante, longue, haute et large, descendant plus bas que le coude ; poitrail large et puissant dont la ligne inférieure (inter-ars) est convexe vers le bas. Côtes bien descendues et bien cintrées mais pas en tonneau. La circonférence de la poitrine doit être de 25 cm à 35 cm supérieure à la hauteur au garrot.

Ligne du dessous et ventre : ligne harpée, de la poitrine bien descendue au ventre assez relevé et ferme, ni tombant ni levretté.

QUEUE : Très épaisse à la racine. Sa pointe atteint de préférence le jarret sans le dépasser. Portée bas, elle n'est ni cassée ni nouée mais souple.

Tombante au repos, elle se relève en général de 90 à 120 ° par rapport à cette position, lorsque le chien est en action, sans s'incurver sur le dos ni s'enrouler.

MEMBRES

MEMBRES ANTERIEURS :

Vue d'ensemble : Ossature forte, membres très musclés.

Epaule : Puissante, aux muscles saillants. Obliquité de l'omoplate moyenne (45° environ sur l'horizontale), angle de l'articulation scapulo-humérale : un peu plus de 90 °.

Bras : Très musclé.

Coudes : Dans l'axe du corps, ni trop serrés contre la paroi thoracique ni en dehors.

Avant-bras : Vus de face, droits ou un peu inclinés de dehors en dedans de façon à se rapprocher légèrement du plan médian, surtout chez les chiens à très large poitrine. Vus de profil, verticaux.

Région métacarpienne : Puissante. De profil, légèrement inclinée. Vue de face parfois légèrement en dehors pour compenser la légère inclinaison de l'avant-bras vers l'intérieur.

Pieds antérieurs : Forts, doigts serrés, ongles courbes et forts, coussinets bien développés et souples ; le dogue est bien digitigrade malgré son poids.

MEMBRES POSTERIEURS :

Vue d'ensemble : Membres robustes avec forte ossature, bien angulés. Vus de derrière : les postérieurs bien parallèles et verticaux donnent une impression de puissance bien que l'arrière-main soit légèrement moins large que l'avant main.

Cuisse : Très développée et épaisse, aux muscles apparents.

Grasset (genou) : Dans un plan parallèle au plan médian ou très légèrement en dehors

Jambe : Relativement courte, musclée, descendant bas.

Jarret : Court, nerveux, angle du jarret modérément ouvert.

Métatarse : Robuste, absence d'ergot.

Pieds postérieurs : Un peu plus longs que les antérieurs, doigts serrés.

ALLURES : Assez souples pour un molosse. Au pas, mouvement ample et souple au ras du sol. Bonne poussée des postérieurs, bonne amplitude des mouvements des antérieurs, surtout au trot, qui est l'allure préférée. Quand le trot s'accélère, la tête a tendance à se baisser, le dessus à s'incliner vers l'avant, les pieds antérieurs à se rapprocher du plan médian en allant chercher la terre loin devant. Petit galop avec déplacement vertical assez important. Capable de grande vitesse en déboulant au ras du sol sur de courtes distances.

PEAU : Epaisse et suffisamment ample, sans excès de rides.

ROBE

Qualité du poil : Fin, court et doux au toucher.

Couleur du poil : Unicolore, dans toute la gamme du fauve, de l'acajou à l'isabelle.

On recherche une bonne pigmentation. Les taches blanches peu étendues sont admises au poitrail et à l'extrémité des membres.

MASQUE :

Masque noir : Le masque est souvent assez peu étendu et ne doit pas envahir la région crânienne. Il peut être accompagné de légères charbonnures sur le crâne, les oreilles, le cou, et le dessus du corps. La truffe est noire.

Masque marron (anciennement dit rouge ou bistre): La truffe est marron, le bord des paupières est également marron ainsi que le bord des lèvres. Il peut être accompagné de charbonnures marron non envahissantes, chaque poil comporte une zone fauve ou sable et une zone marron ; les parties déclives sont alors plus claires.

Sans masque : Le poil est fauve ; la peau apparaît rouge (également appelé jadis « masque rouge »). La truffe peut alors être rougeâtre.

TAILLE ET POIDS :

Taille devant correspondre à peu près au périmètre céphalique

Hauteur au garrot : Mâle : 60 à 68 cm au garrot.

Femelle : 58 à 66 cm au garrot.

On tolérera 1 cm en moins et 2 cm en plus

Poids : Mâle : 50 kg au moins ; Femelle 45 kg au moins avec caractères identiques à ceux des mâles mais moins accusés.

DEFAUTS : Tout écart par rapport à ce qui précède doit être considéré comme un défaut qui sera pénalisé en fonction de sa gravité et de ses conséquences sur la santé et le bien-être du chien.

DEFAUTS GRAVES :

- Tête disproportionnée (trop petite ou exagérément volumineuse).
- Hypertype bouledogué : crâne plat, chanfrein mesurant moins du quart de la longueur totale de la tête, ride boursoufflée derrière la truffe. Repli important entourant la tête.
- Déviation latérale importante de la mandibule.
- Incisives visibles de façon constante, la gueule étant fermée. Incisives très petites implantées de façon irrégulière.
- Dos voussé (convexe)
- Queue présentant des vertèbres soudées mais non déviée.
- Pieds antérieurs tournés en dedans, même légèrement.
- Pieds antérieurs exagérément tournés en dehors.
- Cuisses plates.
- Angle du jarret trop ouvert (angulation droite).
- Angles trop fermés, chien sous lui du derrière.
- Jarrets de vache, jarrets en tonneau.

- Allure béquillarde ou roulis important à l'arrière.
- Essoufflement excessif, respiration rauque.
- Blanc à l'extrémité de la queue ou sur la région antérieure des membres, au dessus du carpe et du tarse ou blanc couvrant sans interruption l'avant du tronc, du poitrail à la gorge.

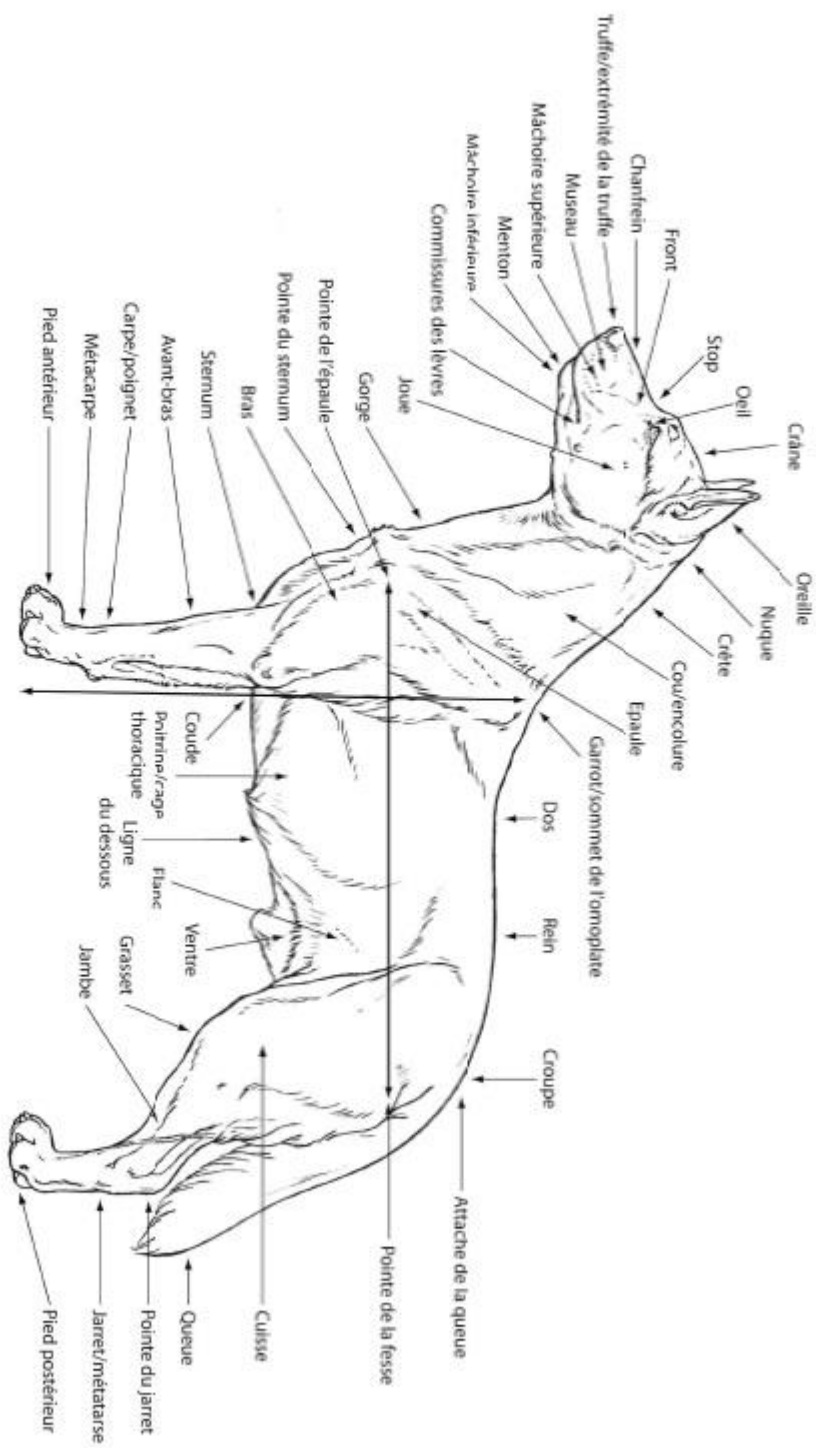
DEFAUTS ENTRAINANT L'EXCLUSION:

- Chien agressif ou peureux.
- Tout chien présentant de façon évidente des anomalies d'ordre physique ou comportemental sera disqualifié.
- Tête longue et étroite au stop peu accentué, au chanfrein mesurant plus du tiers de la longueur totale de la tête (manque de type en tête).
- Chanfrein parallèle à la ligne supérieure du crâne ou descendant, chanfrein busqué.
- Torsion de la mâchoire.
- Dogue non prognathe inférieur.
- Canines visibles de façon constante, la gueule étant fermée.
- Langue sortant de façon constante la gueule étant fermée.
- Yeux bleus, yeux exorbités.
- Queue à la fois nouée et déviée latéralement ou tordue (en tire-bouchon).
- Queue atrophiée.
- Avant-bras tors avec région métacarpienne très affaissée.
- Angle du jarret ouvert vers l'arrière (tarse dévié vers l'avant)
- Blanc en tête ou sur le corps, autre couleur de robe que le fauve (charbonné ou non) et en particulier robe bringée et robe uniformément marron dite « chocolat » (chaque poil est alors entièrement marron).
- Tare invalidante repérable

N.B.:

- Les mâles doivent avoir deux testicules d'aspect normal complètement descendus dans le scrotum.
- Seuls les chiens sains et capables d'accomplir les fonctions pour lesquelles ils ont été sélectionnés, et dont la morphologie est typique de la race, peuvent être utilisés pour la reproduction.

ANATOMIE EXTERIEURE



Annexe 2 – Valeurs de certains paramètres sanguins chez le Dogue de Bordeaux
(Lavoué et al., 2013)

Paramètre	Intervalle de référence
Urée (g/l)	0.060 - 0.198
Créatinine (mg/l)	8.5 - 15.1
Phosphore (mmol/l)	1.22 - 2.05
Cholestérol (mmol/l)	4.2 - 10.9
Albumine (g/l)	27.7 - 38.5

Annexe 3 – Protocole explicatif des prélèvements à faire fourni lors de l'envoi de kits pour inclusion dans l'étude

(Document fourni par le CNRS de Rennes)



CNRS – Université Rennes1
UMR 6290, Équipe « Génétique du chien »
2 av du Pr Léon Bernard 35043 Rennes Cedex
Tél : 02 23 23 45 09 Fax : 02 23 23 44 78
Adresse mail : cani-dna@univ-rennes1.fr
Site internet : <http://dog-genetics.genouest.org/>



Etude génétique sur la Glomérulonéphropathie du Dogue de Bordeaux

Dans le cadre du travail de recherche que nous menons sur les causes génétiques de la **Glomérulonéphropathie chez le Dogue de Bordeaux**, en collaboration avec le Dr Rachel Lavoué (ENVT), pouvez-vous envoyer:

- **Prélèvements sanguins** (à conserver à 4°C avant envoi):

- 3 mL de sang sur tube EDTA
- 2 mL de sang sur tube héparine, à centrifuger immédiatement. Séparer ensuite le plasma et le transférer dans un tube sec sans activateur de coagulation (type « Eppendorf »)
- 2 mL de sang sur tube sec à centrifuger. Séparer ensuite le sérum et le transférer dans un tube sec.

- **Prélèvements urinaires** (à conserver à 4°C avant envoi):

4mL A PRELEVER PAR CYSTOCENTESE IDEALEMENT

- 1mL à placer dans un tube sec de type « Eppendorf » ou autre tube sec
- 3 mL à centrifuger immédiatement. Répartir ensuite le surnageant dans 2 ou 3 autres tubes secs de type « Eppendorf » ou autres tubes secs sans activateur de coagulation.
- S'assurer préalablement à l'envoi, de l'absence d'inflammation ou d'infection urinaire (examen du culot urinaire) et réaliser une mesure de densité urinaire et une bandelette urinaire.

- **Biopsie de rein : STOCKER IMPERATIVEMENT LA GLUTARALDEHYDE à 4°C**

Si le chien doit être euthanasié, réaliser des biopsies de rein le plus rapidement possible, idéalement dans un délai de 2 heures.

- Préparer 2 **biopsies rénales cubiques de 2 mm d'arête** (taille d'un petit pois) à prélever dans la zone corticale et mettre dans les tubes de formol et de RNAlater.
- Préparer 2 **biopsies rénales cubiques de 2 mm d'arête** (taille d'un petit pois) dans la zone corticale. Les placer ensuite individuellement dans les tubes contenant la glutaraldéhyde et bien identifier les zones de prélèvement. Conserver à 4° C avant l'envoi et **prévenir aussitôt le CNRS au 02 23 23 45 09** qui fera la demande d'enlèvement du colis auprès du transporteur. La réception des **prélèvements à l'ENVT doit se faire sous 24 heures.**

BIEN PENSER A IDENTIFIER LES TUBES avec le nom de l'animal et le contenant : plasma, sérum et urine. Placer ensuite dans la pochette pour le transport.

Ce prélèvement n'engage aucun frais supplémentaire pour le propriétaire : soit le vétérinaire consent à la gratuité de l'acte dans le cadre de la recherche, soit le vétérinaire transmet une facture à l'ordre du **CNRS UMR 6290**. **Le remboursement par virement bancaire** du CNRS ne s'effectuera que sur présentation d'un RIB et du numéro de SIRET de la clinique. Les prélèvements qui nous sont envoyés entreront anonymement dans le cadre d'une étude globale. Il n'y aura donc pas de résultat individuel.

Nous vous remercions chaleureusement de votre collaboration, cette étape de recrutement est indispensable à la réussite de ces recherches. .

Dr Catherine ANDRE

Annexe 4 – Questionnaire Clinique fourni lors de l’envoi de kits pour inclusion dans l’étude
(Document fourni par le CNRS de Rennes)



CNRS – Université Rennes1
UMR 6290, Équipe « Génétique du chien »
2 av du Pr Léon Bernard 35043 Rennes Cedex
Tél : 02 23 23 45 09 Fax : 02 23 23 44 78
Adresse mail : cani-dna@univ-rennes1.fr
Site internet : <http://dog-genetics.genouest.org/>



Glomérulonéphropathie: Questionnaire Clinique

Travail de recherche sur les causes génétiques de la Glomérulonéphropathie du Dogue de Bordeaux en collaboration avec le Dr Rachel Lavoué (ENV Toulouse).

RENSEIGNEMENTS

Propriétaire :	Vétérinaire :
- Nom :	
- Adresse :	
.....	
- Téléphone :	- Téléphone :
- Mail :	- Mail :

IDENTIFICATION DU CHIEN

Nom usuel :	Identification :
Nom officiel :	LOF :
Affixe :	Sexe : F ☐ M ☐ Stérilisé : non ☐ oui ☐
Race :	Robe :
Date de naissance :	Masque :
Statut Dysplasique : Hanches :	Coudes :
Ce chien a-t-il reproduit : non ☐ oui ☐ , précisez (nombre de portées) :	
Décès : non ☐ oui ☐ date :	Cause de la mort :
Pedigree : Nom du Père :	Nom de la Mère :

Joindre une copie du pedigree

CONSENTEMENT

J'autorise ce prélèvement sur mon/mes chiens, dans le cadre de la recherche sur la diversité et les maladies génétiques dans l'espèce canine. Les informations fournies seront confidentielles :

- Le prélèvement pourra être utilisé par le CNRS et ses laboratoires partenaires.
- L'identité du prélèvement reste confidentielle.

Fait à :

Le :

Le propriétaire:

Le vétérinaire:

TSVP

PRELEVEMENTS

Date :

Type de prélèvements : - SANG : EDTA ☐ Plasma (eppendorf) ☐ Sérum (eppendorf) ☐

- URINE: Eppendorf surnageant urines ☐

- TISSUS: RNAlater* ☐ Fomol* ☐ Glutaraldéhyde* ☐

* Les tubes RNAlater, Fomol et glutaraldéhyde sont fournis uniquement sur demande

Tissus prélevés et autres remarques :

Joindre le dossier clinique du chien

COMMEMORATIFS ET MALADIES ANTERIEURES

Alimentation : industrielle ☐ ménagère ☐ BARF ☐

Vaccination : - date du dernier vaccin :

- Valence vaccinale :

Autres traitements REGULIERS :

- antiparasitaires externes ☐ Nom et date du dernier traitement:

- antiparasitaires internes ☐ Nom et date du dernier traitement:

- traitement corticostéroïdes ☐ Nom du médicament ou de l'injection :

Date et durée du dernier traitement :

- traitement AINS ☐ Nom du médicament :

Date et durée du dernier traitement :

- si autre, préciser :

Maladies antérieures, accidents, traumatismes et autres maladies (dates approximatives) :

Ce chien a-t-il eu des apparentés (parents, fratries, descendants) ayant développé ce type de maladie ou présentant des symptômes y faisant penser oui ☐ non ☐ ne sait pas ☐

Si la fratrie a été atteinte, préciser la proportion sur l'ensemble de la portée :

NB : Ne remplir la suite du questionnaire que si le chien est suspect ou atteint. MERCI

Equipe « Génétique du Chien »_CNRS RENNES/Questionnaire Glomérulonéphropathie

DOG-VET024B

Version du 09/08/2016

Revu par LL

2/3

PRESENTATION CLINIQUE DE LA GLOMERULONEPHROPATHIE

Age d'apparition des premiers symptômes :

Quels sont-ils ? Boit Beaucoup ☐ Urine beaucoup ☐ Amaigrissement ☐ Vomissement/Diarrhée ☐
Retard développement musculaire ☐ Convulsions ☐

Commentaires sur l'apparition des symptômes :

MOYENS DE DIAGNOSTIC DE LA GLOMERULONEPHROPATHIE

- clinique ☐
- imagerie médicale : Radiographie ☐ Échographie ☐ Scanner ☐ IRM ☐
- histologie ☐ Laboratoire ayant effectué l'analyse, référence histologique :

Si possible, pour tous ces examens, nous fournir une copie des comptes-rendus (résultats sanguins, urinaires...) ou écrire les résultats au dos de ce questionnaire.

Analyse urinaire : Urines non centrifugées
Densité (réfractomètre) :
Bandelette : oui ☐ non ☐

Examen du culot urinaire
Infection urinaire : oui ☐ non ☐
Anomalie microscopique sur étalement non coloré : oui ☐ non ☐

Examen du surnageant urinaire
RPCU (valeur et laboratoire) :

Analyse sanguine : Urémie :
Créatininémie :
Autres :

Précisez les analyses effectuées et les résultats :

Listez les différents traitements prescrits dans le contexte de la maladie rénale et les résultats obtenus:

	Nom	dosage/mg	fréquence	dates	Résultats
1.					
2.					

MERCI POUR LE TEMPS CONSACRE À REMPLIR CE QUESTIONNAIRE.

Equipe « Génétique du Chien »_CNRS RENNES/Questionnaire Glomérulonéphropathie

DOG-VET024B

Version du 09/08/2016

Revu par LL

3/3

Vu : L'enseignant Rapporteur

De l'Ecole Nationale Vétérinaire,
Agroalimentaire et de l'Alimentation
Oniris


D. DESFONTIS

Vu : La Directrice Générale

De l'Ecole Nationale Vétérinaire,
Agroalimentaire et de l'Alimentation
Oniris
D. BUZONI-GATEL



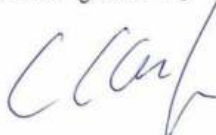
Sandy LECOQ-ESPALLARGAS
Directrice des Etudes
et de la Vie Etudiante

Nantes, le 02 novembre 2018

Vu :

Le Président de la Thèse

Professeur GÉRIC LE GAIGNEC



Vu :

Le Doyen de la Faculté de
Médecine de Nantes

Professeur Pascale JOLLIET

Vu et permis d'imprimer

NOM : MARQUIS
Prénom : Hanna

RECHERCHE DE CAUSES GÉNÉTIQUES IMPLIQUÉES DANS LA GLOMÉRULOPATHIE FAMILIALE DU DOGUE DE BORDEAUX

La glomérulopathie familiale du Dogue de Bordeaux est une affection d'origine génétique qui peut se présenter sous trois formes : une forme juvénile, qui touche les animaux de moins de 2 ans, caractérisée par un syndrome néphrotique sévère menant à la mort en quelques mois ; une forme intermédiaire touchant les animaux entre 2 et 5 ans, dont les signes cliniques et la rapidité d'évolution sont variables ; et enfin une forme asymptomatique découverte le plus souvent par hasard, dont le seul signe clinique est une protéinurie et dont les lésions sont moins importantes que pour les autres formes.

Au cours de ce travail, l'auteur a été amené à participer au recrutement d'individus issus d'élevages français de Dogue de Bordeaux, qui ont enrichi une banque d'échantillons d'ADN. Cette étape, bien que fastidieuse, s'avère indispensable dans le cadre de la recherche.

Par ailleurs, une étude préliminaire effectuée sur 33 Dogues de Bordeaux, n'a pas fait ressortir de régions chromosomiques ni de gènes en particulier. Cependant d'autres perspectives restent encore à étudier.

MOTS CLES :

- | | |
|-----------------------------------|---------------------------|
| - GENETIQUE | - FILTRATION GLOMERULAIRE |
| - DOGUE DE BORDEAUX (RACE CANINE) | - REIN |
| - SYNDROME NEPHROTIQUE | - GLOMERULOPATHIE |
| - MALADIE GENETIQUE CONGENITALE | - PODOCYTE |

JURY

Président : Monsieur Cédric LE CAIGNEC, Professeur à la Faculté de Médecine, Nantes

Rapporteur : Monsieur Jean-Claude Desfontis, Professeur à ONIRIS, Nantes

Assesseur : Monsieur Lionel MARTIGNAT, Professeur à ONIRIS, Nantes

Membre invitée : Madame Pascale QUIGNON, Maître de conférence à l'Université de Rennes 1, UMR6290

ADRESSE DE L'AUTEUR

11 rue des Girondins
Bâtiment E
92210 SAINT-CLOUD

Nom de l'imprimeur
Corep Nantes – Petite Hollande