

# L'ataxie cérébelleuse de l'American Staffordshire Terrier : une céroïde-lipofuscinose neuronale



Marie Abitbol  
UMR955 Génétique Fonctionnelle et Médicale  
Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort



## Une ataxie cérébelleuse chez l'American Staffordshire Terrier

---

- **Histoire**

- décrite en France et  
aux USA, Olby *et al.* JVIM (2004)

- **Description**

- **ataxie**
- hypermétrie
- tremblements intentionnels
- nystagmus
- proprioception normale
- 1<sup>er</sup> signes : 3-5 ans (2-9 ans)
- incurable



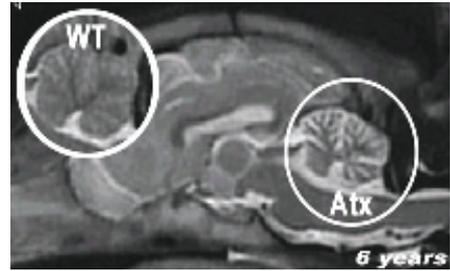
Chien ataxique de 6 ans



# Diagnostic et analyses histologiques

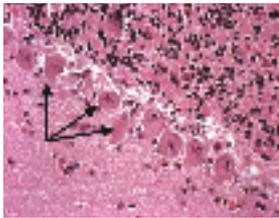
## Diagnostic

- Scanner non informatif
- IRM

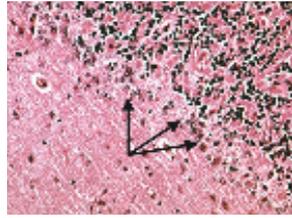


## Histologie

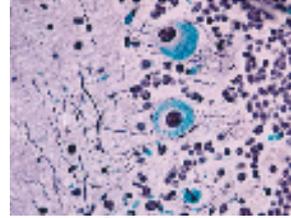
- Disparition des cellules de Purkinje
- Accumulation de céroïde-lipofuscine dans les cellules de Purkinje et les neurones du thalamus



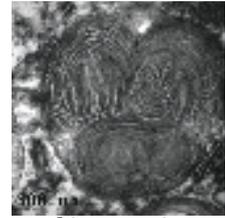
Chiens sain  
(HES)



Chien ataxique  
(HES)



Chien ataxique  
(Luxol fast blue)



Chien ataxique  
(Microscopie électronique)

→ Une Céroïde-Lipofuscine Neuronale (NCL)



# Les céroïdes-lipofuscinoses neuronales

## Les NCLs humaines :

- maladies neurodégénératives affectant principalement les enfants
  - perte progressive de la vue, détérioration des capacités mentales et motrices, épilepsie, décès prématuré
  - autosomiques récessives
  - accumulation intracellulaire d'un matériel de stockage autofluorescent
- rare formes adultes appelées maladie de Kufs, dominantes ou récessives
- 10 types génétiques de NCLs
  - CLN1-3, CLN5-8, CLN10 caractérisés au niveau moléculaire
  - CLN4 (maladie de Kufs) et CLN9 : loci non identifiés



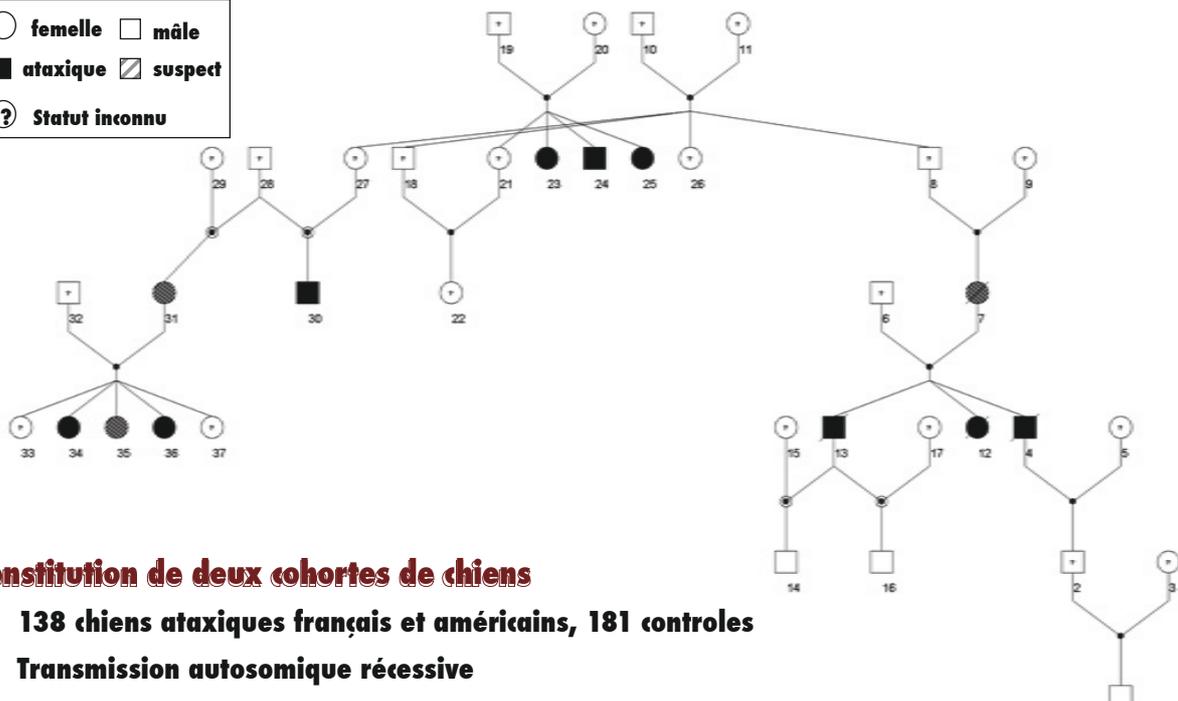
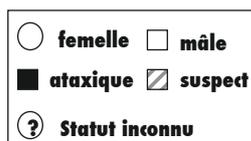
# Les céroïdes-lipofuscinoses neuronales

Locus	Maladie	Protéine	Localisation
CLN1	Infantile, juvénile, adulte	PPT1, palmitoyl protein thioesterase	Enzyme lysosomiale
CLN2	Infantile, juvénile	TPP1, tripeptidyl peptidase 1	Enzyme lysosomiale
CLN3	Juvénile	CLN3	Lysosomal, transmembrane protein
CLN4	Adulte	?	?
CLN5	Infantile	CLN5	Lysosomiale, soluble
CLN6	Infantile	CLN6	Réticulum endoplasmique, protéine transmembranaire
CLN7	Infantile	MFS8, MFS facilitator family	Lysosomiale, protéine transmembranaire
CLN8	Infantile	CLN8	Réticulum endoplasmique, protéine transmembranaire
CLN9	Juvénile	?	?
CLN10	Infantile	CTSD, cathepsin D	Lysosomiale, multiples fonctions

D'après Jalanko & Braulke, BBA 1793 (2009): 697-709.



## Génétique de la NCL des chiens Am. Staff.



### Constitution de deux cohortes de chiens

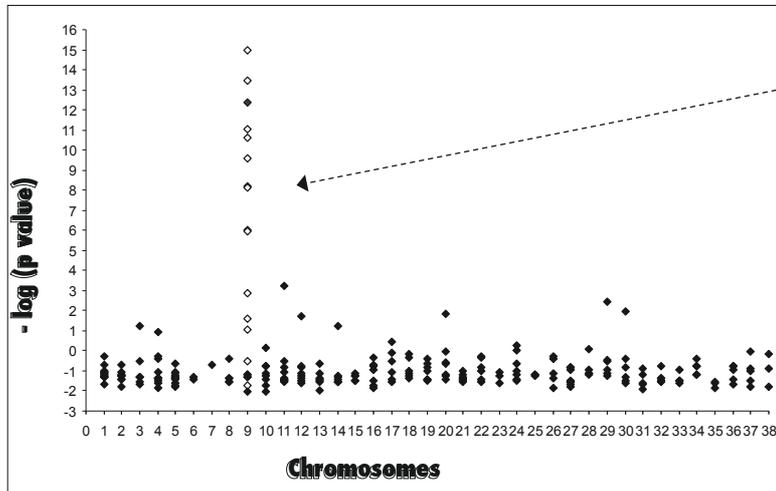
- 138 chiens ataxiques français et américains, 181 contrôles
- Transmission autosomique récessive
- Pénétrance augmentant avec l'âge
- Expressivité variable



# Criblage du génome

**Analyse de liaison** chez 48 chiens américains, 315 marqueurs MSS2, (FH2263-CAP09S)  $Z_{max}=9.4$

**Etude d'association** chez 77 chiens français, 247 marqueurs MSS2, ABCA5-SNP  $p=1.1 \times 10^{-15}$



14 marqueurs supplémentaires sur CFA09

Logiciel STRAT  
Tests du  $\chi^2$   
Correction de Bonferroni

Abitbol *et al.* PNAS (2010)

**Analyse de liaison et étude d'association :**

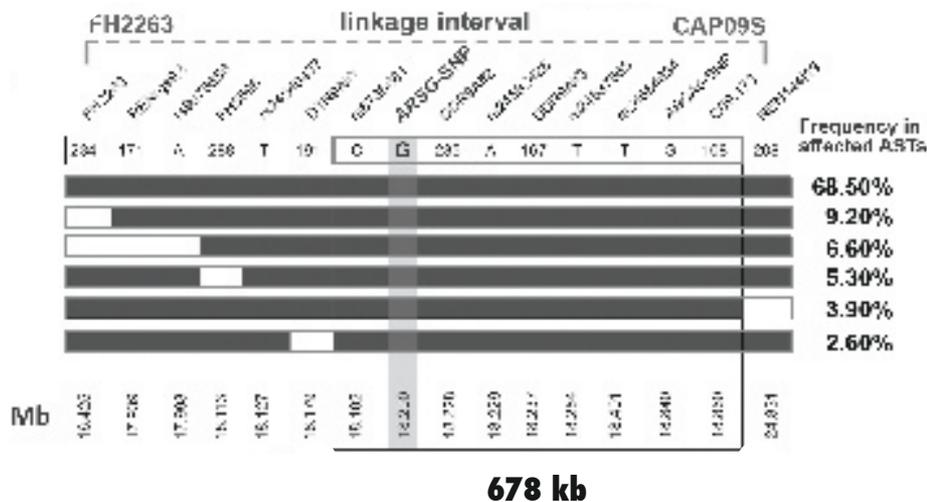
→ une unique région sur CFA09



# Cartographie fine du locus de NCL

Utilisation de la puce Illumina Infinium CanineSNP170 (LUPA) pour génotyper 12 chiens ataxiques et 10 contrôles

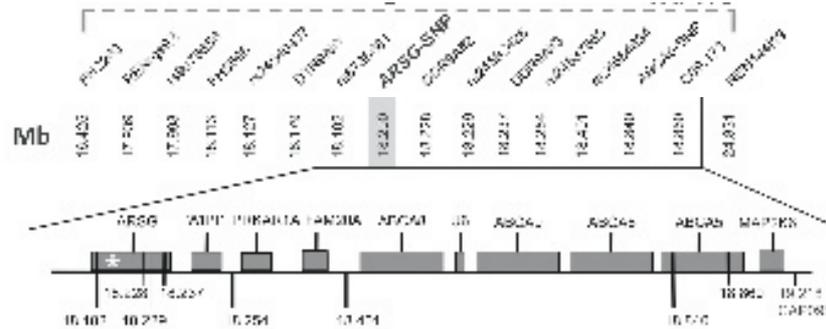
Six SNPs polymorphes sélectionnés pour génotyper les 77 chiens français



→ Une région candidate de 1039 kb

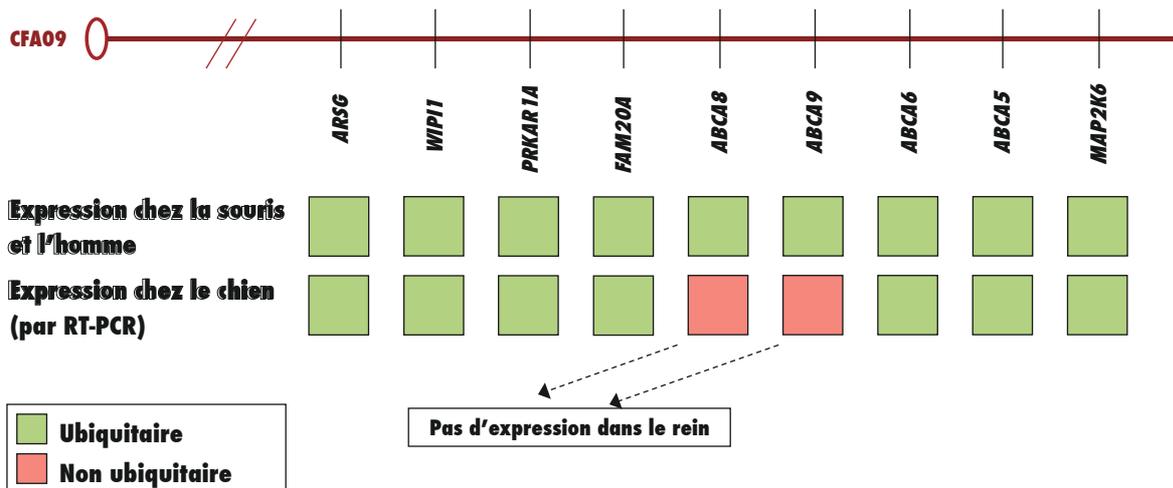


# Gènes et transcrits de la région candidate



Position en Mb	Gène	Description
18.18	<i>ARSG</i>	Arylsulfatase G
18.24	<i>WIPI1</i>	WD repeat domain, phosphoinositide interacting 1
18.31	<i>PRKAR1A</i>	Protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha
18.33	<i>FAM20A</i>	Family with sequence similarity 20, member A
18.43	<i>LOC610988</i>	Similar to 60S ribosomal protein L23a
18.44	<i>LOC610995</i>	None
18.55	<i>ABCA8</i>	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 8
18.57	<i>U6</i>	U6 spliceosomal RNA
18.64	<i>ABCA9</i>	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 9
18.72	<i>ABCA6</i>	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 6
18.85	<i>ABCA5</i>	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 5
18.97	<i>MAP2K6</i>	Mitogen-activated protein kinase kinase 6

# Expression des gènes de la région candidate



→ Séquençage des exons et des jonctions intron-exon de 3 gènes candidats :

- *MAP2K6* : pas de polymorphisme
- *ABCA5* : 3 SNPs synonymes dans les exons 14, 17 et 36 (*ABCA5*-SNP)
- *ARSG* : un SNP non synonyme dans l'exon 2 (c.296G>A)

# Un SNP dans le gène de l'arylsulfatase G

Brevet n° 08305372.8-2403

Statut clinique des chiens	Statut			Absence de NCL		
	G/G	G/A	A/A	0%	0%	4%
Chiens typiques de la CRMG-WWF	66,3%	29,6%	4,1%	0	0	100%
ASTs français	(n=38)	(n=32)	(n=1)			(n=69)
ASTs américains	(n=48)	(n=59)	(n=3)			(n=110)

Chiens sans statut clinique			
Race	G/G	G/A	A/A
<b>American Staffordshire Terrier</b>	<b>66,3 % (n=65)</b>	<b>29,6 % (n=29)</b>	<b>4,1 % (n=4)</b>
Staffordshire Bull Terrier	100 % (n=22)	0	0
Bulldog Américain	100 % (n=18)	0	0
Bull Terrier	100 % (n=139)	0	0
Bull Terrier miniature	100 % (n=33)	0	0
Bullmastiff	100 % (n=23)	0	0
Mastiff	100 % (n=31)	0	0
Boxer	100 % (n=159)	0	0
Bulldog Anglais	100 % (n=82)	0	0

## Autres races (1-8 chiens)

Berger Allemand  
Berger Belge  
Labrador Retriever  
Jack Russel Terrier  
Barzoï  
Bouledogue Français  
Dogo Argentino  
Dalmatien  
Montagne des Pyrénées  
Drahthaar  
Rottweiler  
Golden Retriever  
Schnauzer  
Australian Cattle Dog  
Berger de Podhale  
Beagle  
Shar Pei  
Léonberg  
Bichon ...

Plus de 500 chiens non AST génotypés

→ La transition G - A dans l'exon 2 provoque une substitution R99H dans l'ARSG

## R99 : un acide aminé très conservé

60      ↓      ↓      99      \*

Canis ARSG AASTPCPSRAADLTGRLGLRNGV--TLN-----2

Felis ARSG AASTPCPSRAADLTGRLGLRNGV--TRN-----F

Dog ARSG AASTPCPSRAADLTGRLGLRNGV--TEN-----F

Gallus ARSG AASTPCPSRAADLTGRLGV R NGV--TEN-----F

Fugu ARSG DASTPCPSRAADLTGRVGT R NGV--TFN-----F

Danio GALS ARFLCPSRAADLTGRLDVRNGFYCTNAHARAY

Caenor Sul-2 AAGSCPSRAADLTGRLPL R LGI-----VGGREY

Clonost ARS AATLCPSSRAADLTGRYAL R SGL---RQDVAPV

Felis ARSA DVELCTPSRAADLTGRLDVRNGN---YDG-----V

Felis ARSB -QPLCTPSRSQILTGRYQD RTGL-----GHQT

Equus SIV ASFLCTPSRAADMTGRIPV R SGN--ASWERTGVE

Felis ARSD RATTCTPSRAAPLTGRHST R -GN--DASNGYBAT

Felis ARSE RASTCTPSRAAPLTGRYPV R SGN--VASTGYDVT

Equus ARSF AATLCPSSRAAPLTGRYPV R SGN--VSSCHRRVI

ARSG NCL TGRLLGLRNGV

ARSG NCL TGRLLGLHNGV

ARSA ML1 TGRLLDVRNGM

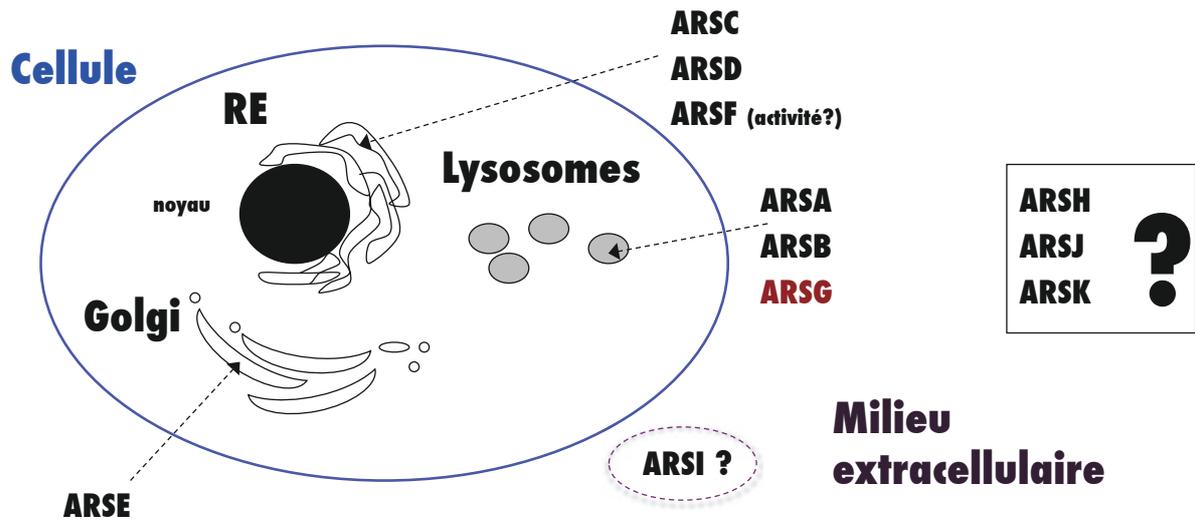
ARSA ML2 TGRLLDVRWNGM

84

\* Substitution R99H chez les chiens atteints de NCL

↓ acides aminés conservés, du site catalytique des arylsulfatases

# L'arylsulfatase G : une sulfatase lysosomiale



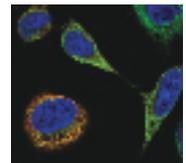
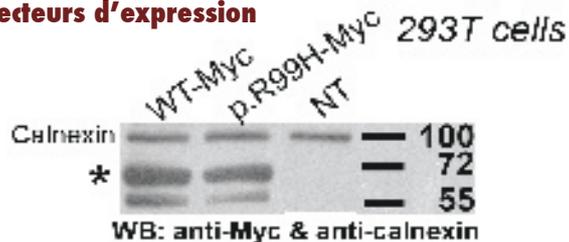
**Substrats endogènes des ARS : sulfatides (ARSA), chondroïtine & héparane sulfates (ARSB)**

**Substrats artificiels des ARS : petits substrats aryle tels que le pNCS (p-nitrocatechol sulfate)**

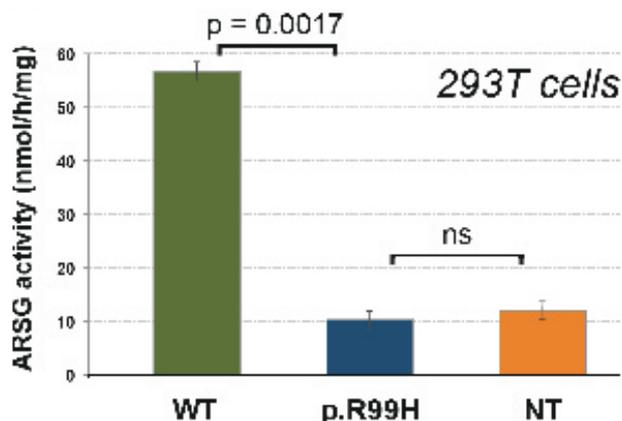


## Activité arylsulfatase G en cellules

**Validation des vecteurs d'expression**

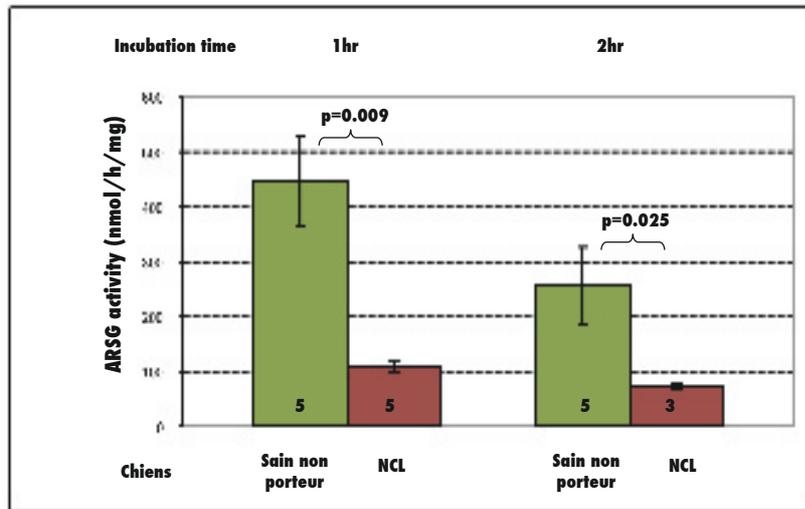


**Activité enzymatique (test au p-nitrocatechol sulfate)**



# Activité arylsulfatase chez les chiens

L'activité arylsulfatase (*p*-nitrocatecholsulfate) dans les lymphocytes est réduite chez les chiens atteints de NCL



NCL : chien atteint de NCL

La baisse d'activité de l'arylsulfatase chez les chiens atteints de NCL confirme que le SNP **c.296G>A** identifié dans *ARSG* est la mutation causale de la NCL



## *ARSG* : un candidat pour les NCLs humaines adultes

### Maladie de Kufs :

- Pas de déficit visuel
- Symptômes majeurs :
  - type A: épilepsie, ataxie et dysarthrie
  - type B: démence
  - type mixte
- Accumulation de matériel PAS-positif dans les neurones
- Sporadique, autosomique récessive ou dominante
- Etiologie moléculaire inconnue



### Deux modèles animaux :

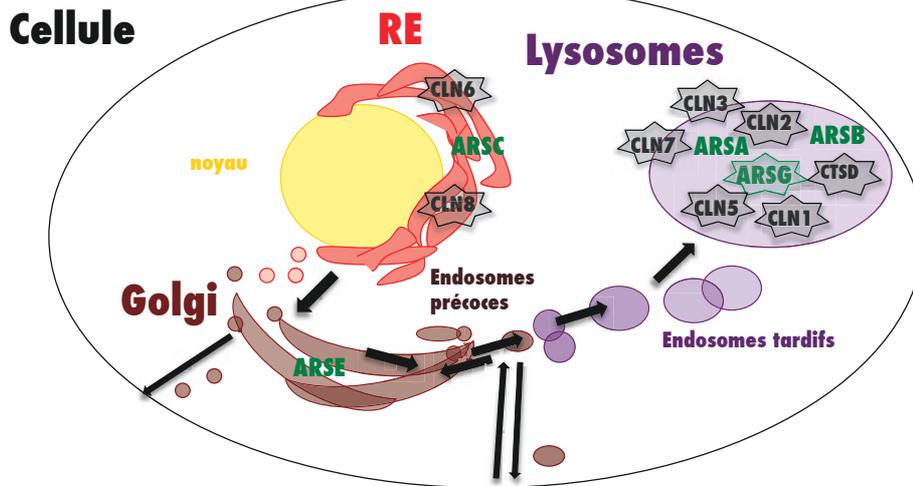
- Terrier Tibétain
- American Staffordshire Terrier



Activité ARSG chez les patients Kufs ?



# Maladies de stockage : un lien entre les sulfatases & et les protéines CLN ?



## Sulfatases lysosomiales et maladies de stockage

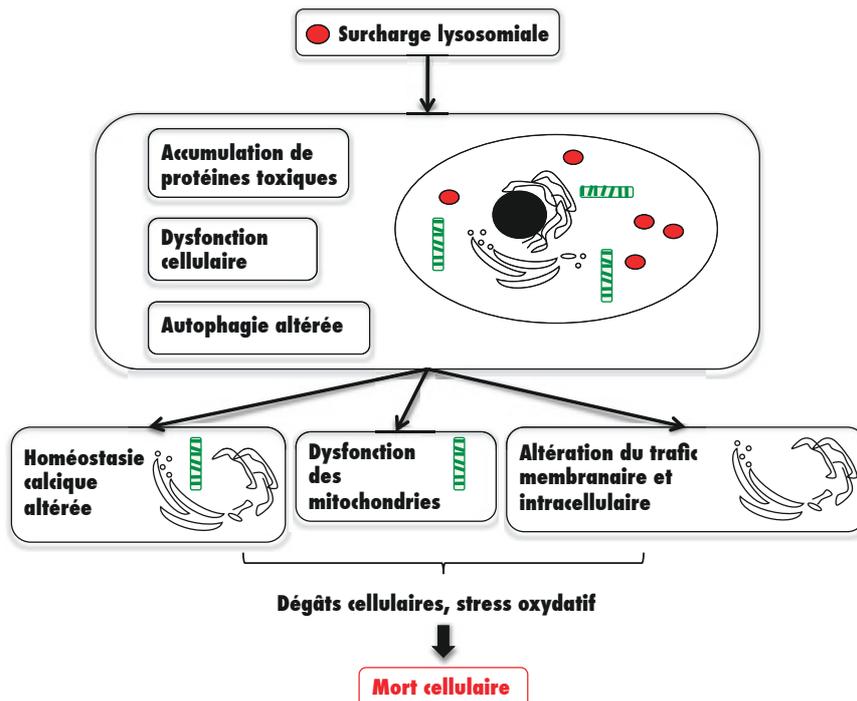
- ❖ Iduronate 2-sulfatase : mucopolysaccharidose type II
- ❖ Heparan N-sulfatase : mucopolysaccharidose type IIIA
- ❖ Glucosamine 6-sulfatase : mucopolysaccharidose type III D
- ❖ Galactosamine 6-sulfatase : mucopolysaccharidose type IVA
- ❖ ARSA : leucodystrophie métachromatique
- ❖ ARSB : mucopolysaccharidose type VI
- ❖ ARSG : NCL chez le chien

## ARS non lysosomiales et autres maladies

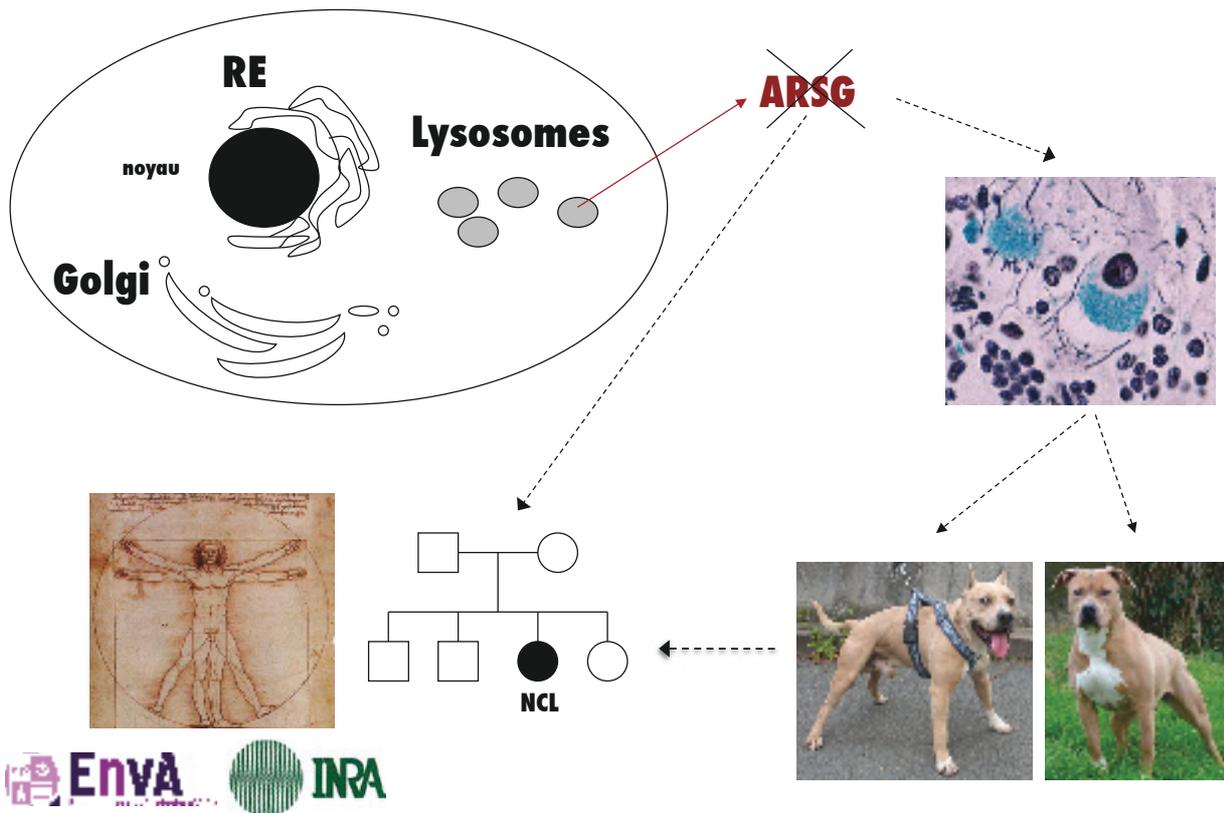
- ❖ ARSC : RE, ichthyose liée à l'X
- ❖ ARSE : Golgi, chondrodysplasia punctata



# Arylsulfatase G et pathogénie des NCLs



# ARSG chez le chien et l'homme



## L'équipe NCL



**Centre de radiothérapie-scanner**  
- Françoise Delisle



**UMR955 Génétique Fonctionnelle et Médicale**

- Marie Abitbol
- Laurent Tiret
- Florence Bernex
- Marie Maurer
- Fanny Pilot-Stork
- Jean-Jacques Panthier
- Geneviève Aubin-Houzelstein



**UMR6061 Génétique et développement (CNRS-Rennes)**

- Catherine André
- Benoit Hédan
- Christophe Hitte
- Stéphane Dréano



**Hôpital de Lariboisière**  
**Service d'Anatomie Pathologique**

- Françoise Gray



**Laboratoire de neurobiologie**

- Stéphane Blot
- Jean-Laurent Thibaud

**Antagene**

- Guillaume Queney
- Delphine Delattre
- Anne Thomas



**Institut Cochin**

- Catherine Caillaud
- Jean-Pierre Puech



**College of Veterinary Medicine, North Carolina State University, Raleigh, USA**  
- Natasha Olby **NC STATE UNIVERSITY**

Vétérinaires, clubs FABAS & STCA, propriétaires

