

L'ataxie cérébelleuse de l'American Staffordshire Terrier : une céréoïde-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^{er} signes : 3-5 ans (2-9 ans)
- incurable



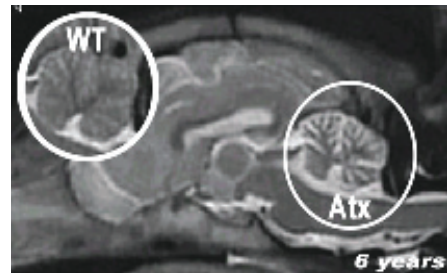
Chien ataxique de 6 ans



Diagnostic et analyses histologiques

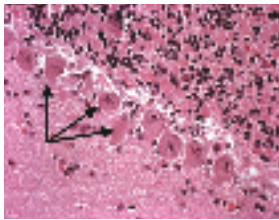
Diagnostic

- Scanner non informatif
- IRM

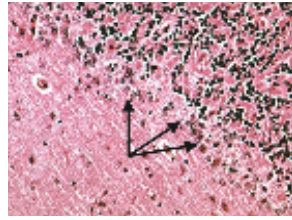


Histologie

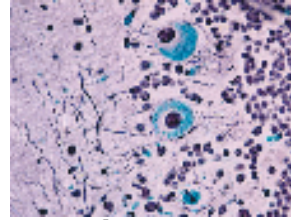
- Disparition des cellules de Purkinje
- Accumulation de céroïde-lipofuscine dans les cellules de Purkinje et les neurones du thalamus



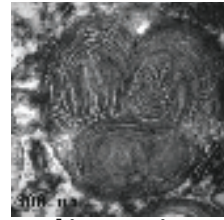
Chiens sain
(HES)



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



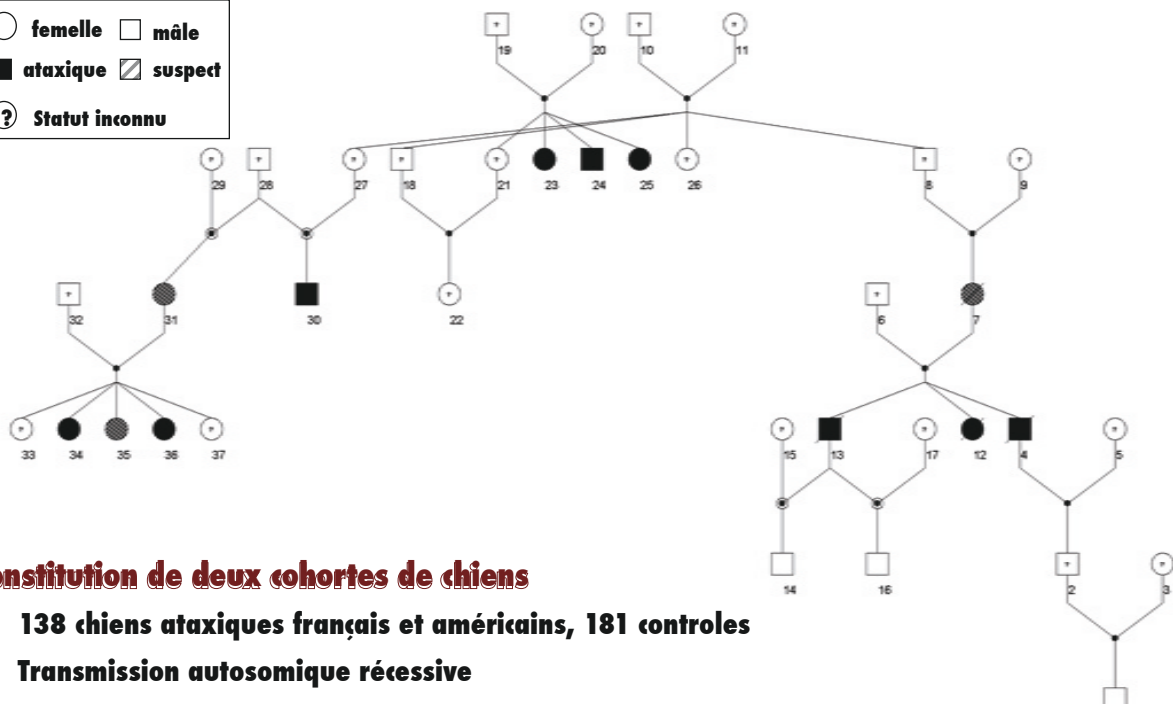
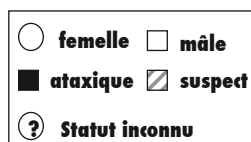
Les céroïdes-lipofuscinoses neuronales

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

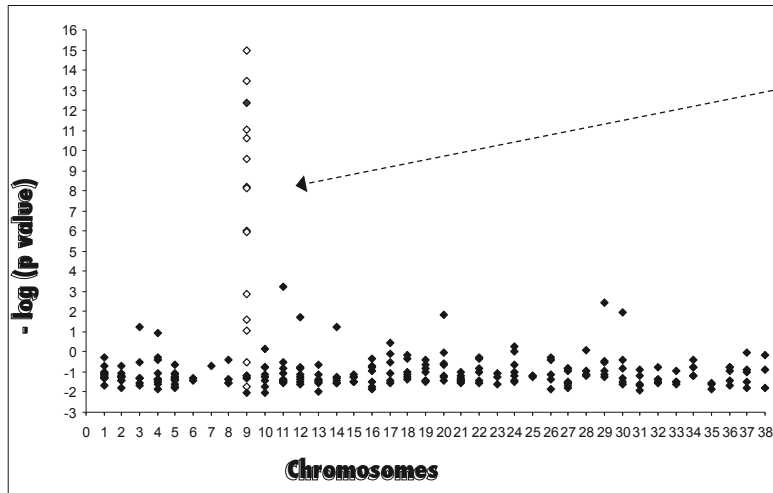
- 138 chiens ataxiques français et américains, 181 contrôles
- Transmission autosomique récessive
- Pénétrance augmentant avec l'âge
- Expressivité variable



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 χ^2

Correction de Bonferroni

Abitbol *et al.* PNAS (2010)

Analyse de liaison et étude d'association :

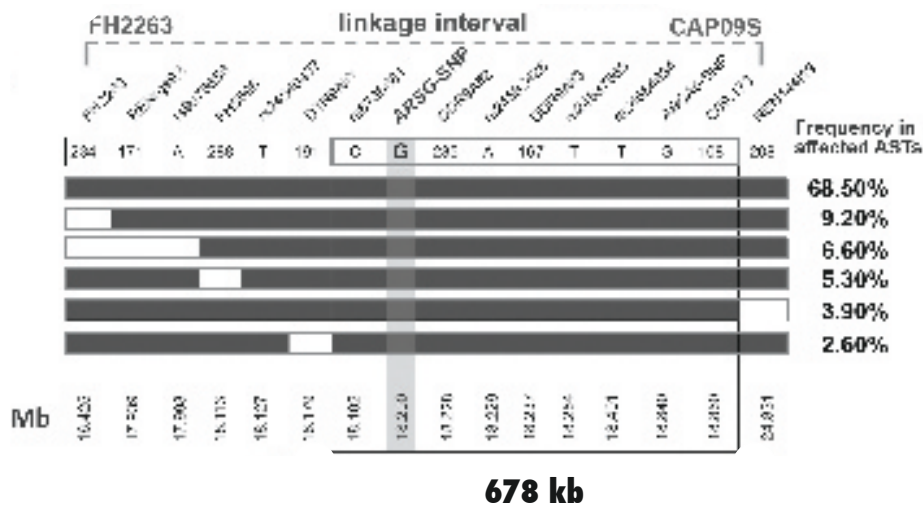
→ une unique région sur CFA09



Cartographie fine du locus de NCL

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

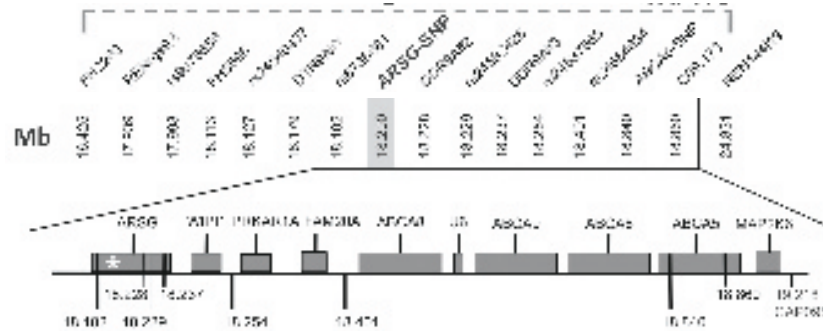
Six SNPs polymorphes sélectionnés pour génotyper les 77 chiens français



→ Une région candidate de 1039 kb

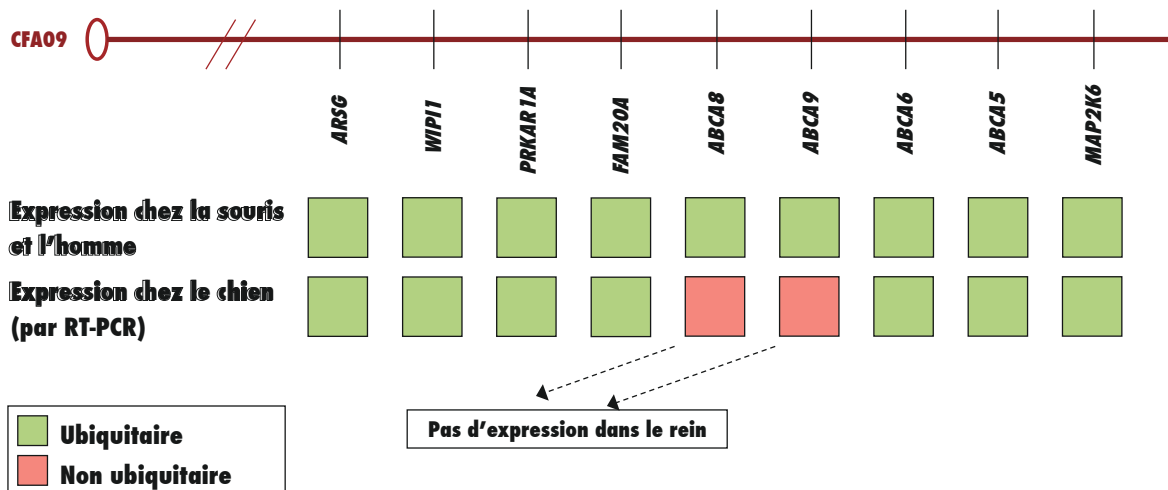


Gènes et transcrits de la région candidate



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			Prévalence de NCL		
	G/G	G/A	A/A	0%	0%	4%
Chiens typiques (ARSG-WVF)	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
American Staffordshire Terrier	66,3 % (n=65)	29,6 % (n=29)	4,1 % (n=4)
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

		↓ ↓		99		
			60	90	*	
Canis	ARSG		AASFCPSRASLLTGRLGLRNGV--TLN-----			99
Homio	ARSG		AASFCPSRASLLTGRLGLRNGV--TRN-----			TGRLGLRNGV
Dog	ARSG		AASFCPSRASLLTGRLGLRNGV--TEN-----			ARSG-NCL
Gallus	ARSG		AASFCPSRASLLTGRLGV RNGV--TEN-----			TGRLGLRNGV
Felis	ARSG		DAATCEPRAAAT TGRVGT RYGV--TFN-----			
Danio	GALAS		AAFLCEPSRAALLTGRLDVRNGEYCTNAHARKAY			
Caenor	SUL-2		AASFCPSRASLLTGRLP R LGI----VGGREY			
Clon	ARS		AATLCEPSRAALLTGRYA R SGL---RQVAPV			
Homio	ARSA		DVELCTPSRAALLTGRLDVRNGN--YDG-----			
Homio	ARSB		-QFLCTPSRSQLLTGRYQ R TGL-----GHQ			
Homio	SLV		ASFLCTPSRAAHTGRIPV R SGN--ASWERTGV			
Homio	ARSD		DATLCTPSRAAFT TGRHST R -GN--DASQYAT			
Homio	ARSE		DATLCTPSRAAFT TGRVPR R GN--VASTGYDT			
Homio	ARSF		AATLCEPSRASPLTGRYP R SGN--VSSCHRRV			




99

ARSG

ARSG-NCL

TGRLGLRNGV

TGRLGLRNGV



99

ARSA

ARSA-ML1

ARSA-ML2

TGRLDVRNGM

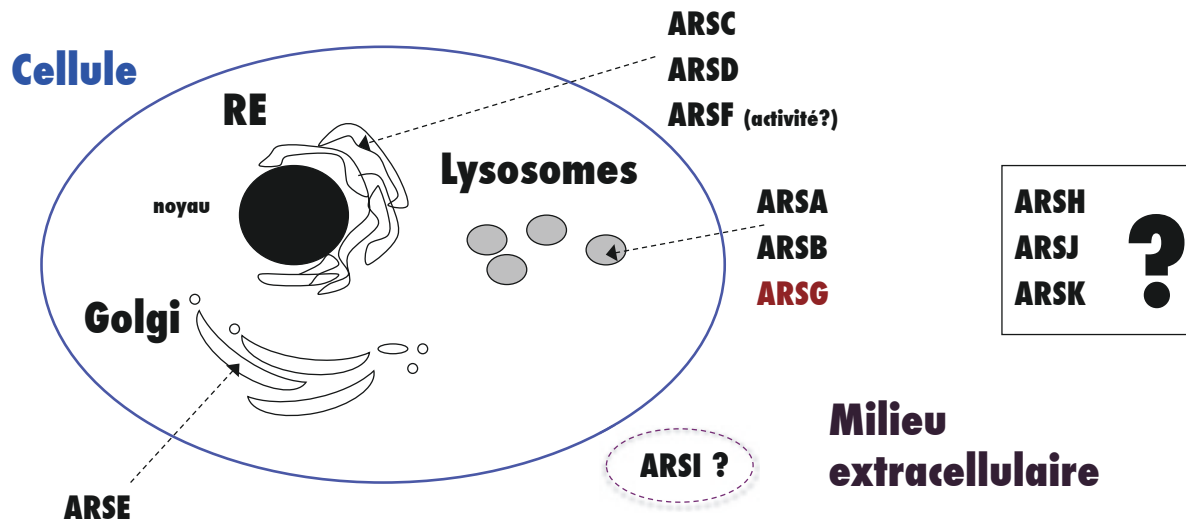
TGRLDVRNGM

TGRLDVRNGM

84

* Substitution R99H chez les chiens atteints de NCL
 ↓ acides aminés conservés, du site catalytique des arylsulfatases

L'arylsulfatase G : une sulfatase lysosomiale



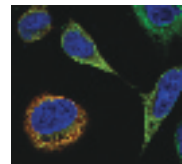
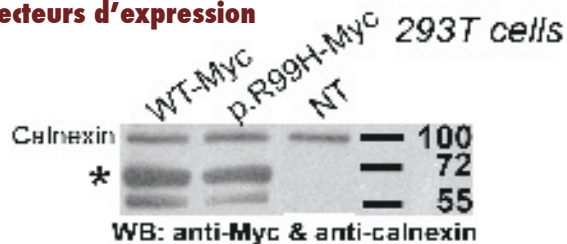
Substrats endogènes des ARS : sulfatides (ARSA), chondroïtine & héparane sulfates (ARSB)

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

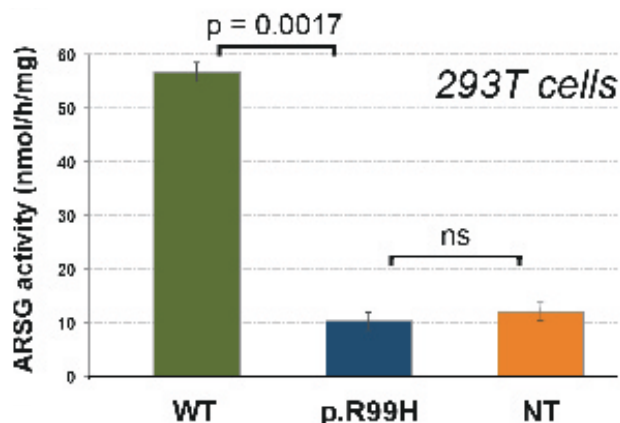


Activité arylsulfatase G en cellules

Validation des vecteurs d'expression

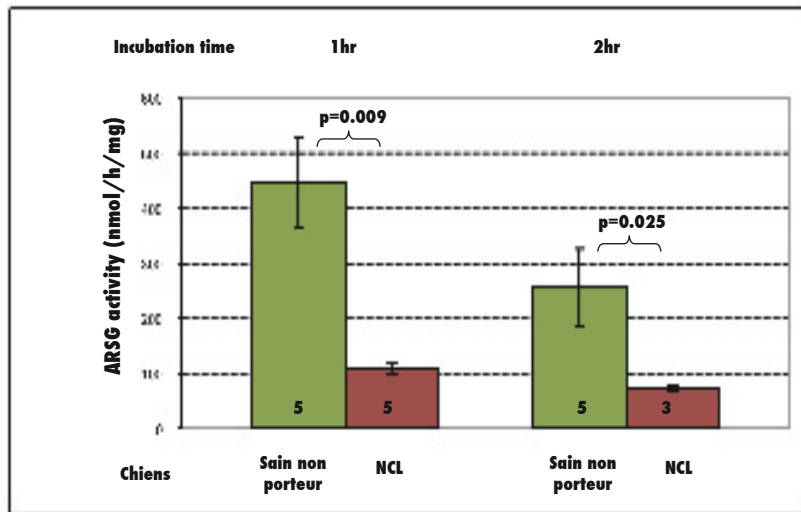


Activité enzymatique (test au p-nitrocatechol sulfate)



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 :

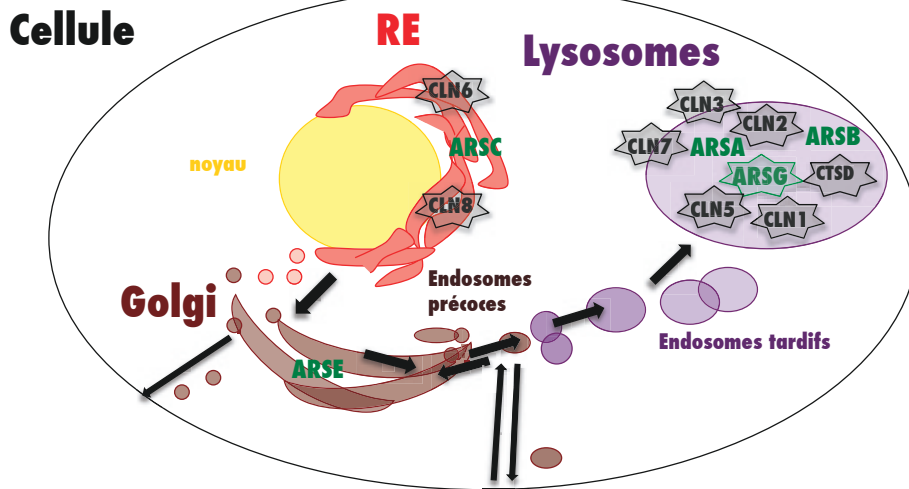
- Terrier Tibétain
- American Staffordshire Terrier



Activité ARSG chez les patients Kufs ?



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



Sulfatases lysosomiales et maladies de stockage

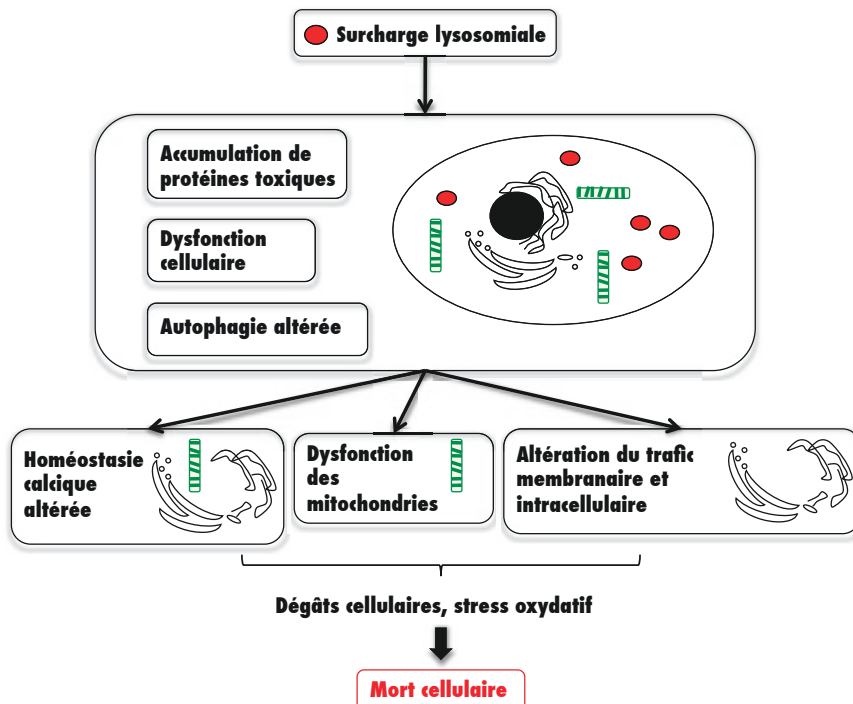
- ❖ Iduronate 2-sulfatase : mucopolysaccharidose type II
- ❖ Heparan N-sulfatase : mucopolysaccharidose type IIIA
- ❖ Glucosamine 6-sulfatase : mucopolysaccharidose type III D
- ❖ Galactosamine 6-sulfatase : mucopolysaccharidose type IVA
- ❖ ARSA : leucodystrophie métabolique
- ❖ ARSB : mucopolysaccharidose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

ARS non lysosomiales et autres maladies

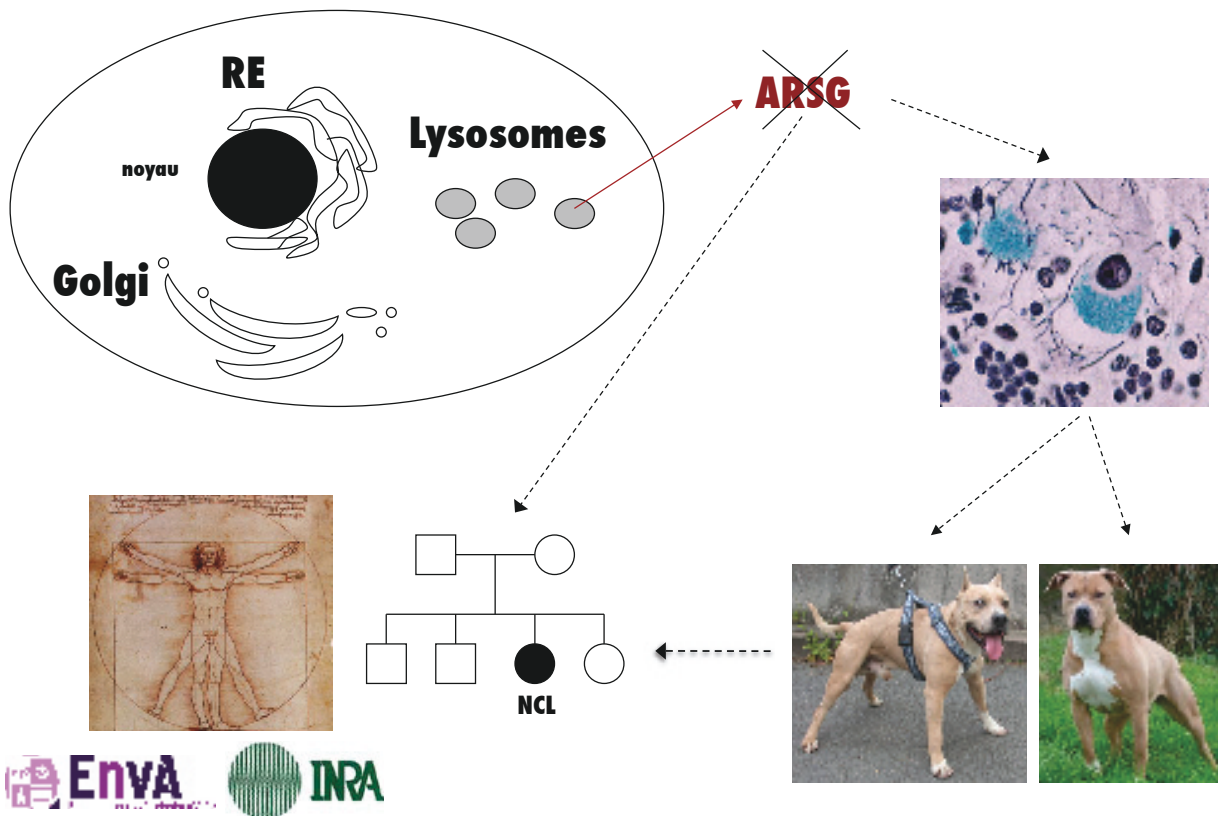
- ❖ ARSC : RE, ichthyose liée à l'X
- ❖ ARSE : Golgi, chondrodysplasia punctata



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

