

Année 2008



**ROLE DU GENE *MDR1* DANS LA PREDISPOSITION
AUX MALADIES INFLAMMATOIRES
CHRONIQUES INTESTINALES
CHEZ LES COLLEYS ET APPARENTES**

THESE

Pour le

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

Présentée et soutenue publiquement devant

LA FACULTE DE MEDECINE DE CRETEIL

Le

par

Karen, Laure BURGER

Née le 24 avril 1982 à Paris 15^{ème}

JURY

Président : M.

Professeur à la Faculté de Médecine de CRETEIL

Membres

Directeur : Mlle Marie ABITBOL

Maître de conférences à l'ENVA

Assesseur : Mme Geneviève MARIGNAC

Maître de conférences à l'ENVA

LISTE DES MEMBRES DU CORPS ENSEIGNANT

Directeur : M. le Professeur MIALOT Jean-Paul

Directeurs honoraires : MM. les Professeurs MORAILLON Robert, PARODI André-Laurent, PILET Charles, TOMA Bernard

Professeurs honoraires: MM. BUSSIERAS Jean, CERF Olivier, LE BARS Henri, MILHAUD Guy, ROZIER Jacques, CLERC Bernard

DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET PHARMACEUTIQUES (DSBP)

Chef du département : Mme COMBRISSEON Hélène, Professeur - Adjoint : Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences

<p>- UNITE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES Mme CREVIER-DENOIX Nathalie, Professeur M. DEGUEURCE Christophe, Professeur* Mme ROBERT Céline, Maître de conférences M. CHATEAU Henry, Maître de conférences</p> <p>- UNITE DE PATHOLOGIE GENERALE , MICROBIOLOGIE, IMMUNOLOGIE Mme QUINTIN-COLONNA Françoise, Professeur* M. BOULOUIS Henri-Jean, Professeur M. FREYBURGER Ludovic, Maître de conférences</p> <p>- UNITE DE PHYSIOLOGIE ET THERAPEUTIQUE M. BRUGERE Henri, Professeur Mme COMBRISSEON Hélène, Professeur* M. TIRET Laurent, Maître de conférences Mme STORCK-PILOT Fanny, Maître de conférences</p> <p>- UNITE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE Mme ENRIQUEZ Brigitte, Professeur * M. TISSIER Renaud, Maître de conférences M. PERROT Sébastien, Maître de conférences</p> <p>- DISCIPLINE : ETHOLOGIE M. DEPUTTE Bertrand, Professeur</p>	<p>- UNITE D'HISTOLOGIE , ANATOMIE PATHOLOGIQUE M. CRESPEAU François, Professeur M. FONTAINE Jean-Jacques, Professeur * Mme BERNEX Florence, Maître de conférences Mme CORDONNIER-LEFORT Nathalie, Maître de conférences</p> <p>- UNITE DE VIROLOGIE M. ELOIT Marc, Professeur * Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences</p> <p>- DISCIPLINE : PHYSIQUE ET CHIMIE BIOLOGIQUES ET MEDICALES M. MOUTHON Gilbert, Professeur</p> <p>- UNITE DE GENETIQUE MEDICALE ET MOLECULAIRE M. PANTHIER Jean-Jacques, Professeur Mme ABITBOL Marie, Maître de conférences*</p> <p>- UNITE DE BIOCHIMIE M. MICHAUX Jean-Michel, Maître de conférences M. BELLIER Sylvain, Maître de conférences*</p> <p>- DISCIPLINE : ANGLAIS Mme CONAN Muriel, Professeur certifié</p>
--	--

DEPARTEMENT D'ELEVAGE ET DE PATHOLOGIE DES EQUIDES ET DES CARNIVORES (DEPEC)

Chef du département : M. POLACK Bruno, Maître de conférences - Adjoint : M. BLOT Stéphane, Maître de conférences

<p>- UNITE DE MEDECINE M. POUCHELON Jean-Louis, Professeur* Mme CHETBOUL Valérie, Professeur M. BLOT Stéphane, Maître de conférences M. ROSENBERG Charles, Maître de conférences Mme MAUREY Christelle, Maître de conférences</p> <p>- UNITE DE CLINIQUE EQUINE M. DENOIX Jean-Marie, Professeur M. AUDIGIE Fabrice, Maître de conférences* Mme GIRAUDET Aude, Praticien hospitalier Mme MESPOULHES-RIVIERE Céline, Maître de conférences contractuel Mme PRADIER Sophie, Maître de conférences contractuel</p> <p>- UNITE DE REPRODUCTION ANIMALE Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, Maître de conférences* (rattachée au DPASP) M. NUDELMANN Nicolas, Maître de conférences M. FONTBONNE Alain, Maître de conférences M. REMY Dominique, Maître de conférences (rattaché au DPASP) M. DESBOIS Christophe, Maître de conférences Mme CONSTANT Fabienne, Maître de conférences (rattachée au DPASP) Mme DEGUILLAUME Laure, Maître de conférences contractuel (rattachée au DPASP)</p> <p>- DISCIPLINE : URGENCE SOINS INTENSIFS Mme Française ROUX, Maître de conférences contractuel</p>	<p>- UNITE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE M. FAYOLLE Pascal, Professeur * M. MAILHAC Jean-Marie, Maître de conférences M. MOISSONNIER Pierre, Professeur Mme VIATEAU-DUVAL Véronique, Maître de conférences Mme RAVARY-PLUMIOEN Bérangère, Maître de conférences (rattachée au DPASP) M. ZILBERSTEIN Luca, Maître de conférences contractuel M. HIDALGO Antoine, Maître de conférences contractuel</p> <p>- UNITE D'IMAGERIE MEDICALE Mme BEGON Dominique, Professeur* Mme STAMBOULI Fouzia, Maître de conférences contractuel</p> <p>- DISCIPLINE : OPHTALMOLOGIE Mme CHAHORY Sabine, Maître de conférences contractuel</p> <p>- UNITE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES M. CHERMETTE René, Professeur * M. POLACK Bruno, Maître de conférences M. GUILLOT Jacques, Professeur Mme MARGNAC Geneviève, Maître de conférences contractuel Mme HALOS Lénaïg, Maître de conférences M. HUBERT Blaise, Praticien hospitalier</p> <p>- DISCIPLINE : NUTRITION-ALIMENTATION M. PARAGON Bernard, Professeur M. GRANDJEAN Dominique, Professeur</p>
--	---

DEPARTEMENT DES PRODUCTIONS ANIMALES ET DE LA SANTE PUBLIQUE (DPASP)

Chef du département : M. MAILLARD Renaud, Maître de conférences - Adjoint : Mme DUFOUR Barbara, Maître de conférences

<p>- UNITE DES MALADIES CONTAGIEUSES M. BENET Jean-Jacques, Professeur* Mme HADDAD/ HOANG-XUAN Nadia, Maître de conférences Mme DUFOUR Barbara, Maître de conférences</p> <p>- UNITE D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE M. BOLNOT François, Maître de conférences * M. CARLIER Vincent, Professeur Mme COLMIN Catherine, Maître de conférences M. AUGUSTIN Jean-Christophe, Maître de conférences</p> <p>- DISCIPLINE : BIOSTATISTIQUES M. SANAA Moez, Maître de conférences</p>	<p>- UNITE DE ZOOTECHNIE, ECONOMIE RURALE M. COURREAU Jean-François, Professeur M. BOSSE Philippe, Professeur Mme GRIMARD-BALLIF Bénédicte, Professeur Mme LEROY Isabelle, Maître de conférences M. ARNE Pascal, Maître de conférences M. PONTER Andrew, Maître de conférences*</p> <p>- UNITE DE PATHOLOGIE MEDICALE DU BETAAIL ET DES ANIMAUX DE BASSE-COUR M. MILLEMANN Yves, Maître de conférences* Mme BRUGERE-PICOUX Jeanne, Professeur (rattachée au DSBP) M. MAILLARD Renaud, Maître de conférences M. ADJOU Karim, Maître de conférences</p>
---	---

Mme CALAGUE, Professeur d'Education Physique

* Responsable de l'Unité

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur

Professeur à la Faculté de Médecine de Créteil,
qui nous fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.
Hommage respectueux.

A Mademoiselle Marie Abitbol

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort,
qui a accepté de diriger cette thèse et de m'aider parfois dans l'urgence pour arriver à
concrétiser mon ambition professionnelle. Merci d'avoir toujours laissé la porte ouverte.
Qu'elle trouve ici le témoignage de ma reconnaissance.

A Madame Geneviève Marignac

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort,
pour l'attention qu'elle a portée à notre travail.
Qu'elle soit assurée de notre gratitude.

A chacun des éleveurs et propriétaires de chiens ayant participé à cette étude, je tiens à
présenter mes remerciements pour leur disponibilité. Sans eux, cette étude n'aurait pas pu se
faire.

Le Club de race du Berger Blanc Suisse a fait preuve d'une mobilisation particulièrement
forte.

Au **laboratoire ANTAGENE**, principalement à **Delphine Delattre** et **Guillaume Queney**.

Au **Dr Christophe Hugnet**, Vétérinaire-chercheur,
qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude





A Ma Grand-mère,

qui a essayé de suivre le déroulement de cette thèse malgré son âge avancé.
Merci pour l'intérêt que tu as porté à mon travail.

A Mes Parents,

qui m'ont aidée à choisir cette voie dans les moments les plus difficiles.
Merci pour l'aide que vous m'avez apportée pour la réalisation de cette thèse, autant sur la participation dans les envois des lettres que dans le travail de prise de contact avec les éleveurs. Qu'une nouvelle vie s'offre à vous sans les soucis de vos enfants.

A Mon Frère, Olivier,

qui m'a profondément éclaircie sur les méandres de l'informatique.
Merci pour tes conseils judicieux et pratiques. Bonne chance dans ta nouvelle vie.

A Olivier,

celui que le roller a mis sur mon chemin un 1^{er} juillet et qui a bien voulu partager ma vie.
En espérant que ce métier ne sera pas un obstacle pour notre avenir,
Je te remercie particulièrement pour ton amour et ta patience au fil des jours.



A Amélie,

ma binôme qui m'a supportée pendant près de 4 ans. En espérant te revoir sous le soleil de la côte d'Azur.

A Anne,

merci pour les soirées de révisions conjointes des annales sur MSN. En espérant que tu nous trouveras bientôt de nouvelles zoonoses à exploiter !

A Elodie et avec son sacré caractère,

merci pour ta présence excentrique lors des TD et nos discussions personnelles en période de doute.

A Hélène,

merci d'avoir été l'initiatrice de cette thèse grâce à Némée. Qu'il profite de son statut d'homozygote sain et évite le chocolat...

A Noémie,

merci pour ta musique et ton appart qui m'a rendue de fiers services. A bientôt, après nos internats respectifs.

Bonne chance à vous les filles pour la suite et merci pour votre amitié durant ces 5 années !

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS.....	5
TABLE DES FIGURES.....	7
LISTE DES TABLEAUX.....	9
INTRODUCTION.....	11
PREMIERE PARTIE	13
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	13
1. BIOLOGIE DU GENE MDR	15
1.1. LE GENE MDR1 CANIN.....	15
1.1.1. <i>La famille des transporteurs glycoprotéiques des mammifères</i>	15
1.1.2. <i>Structure du gène MDR1 canin</i>	15
1.1.3. <i>Expression du gène MDR1</i>	16
1.2. LA GLYCOPROTEINE P.....	18
1.2.1. <i>Structure</i>	18
1.2.2. <i>Fonctions</i>	19
1.2.3. <i>Distribution tissulaire</i>	21
1.2.3.1. Tractus digestif et annexes.....	21
1.2.3.2. Reins et foie.....	21
1.2.3.3. Vessie.....	22
1.2.3.4. Poumons.....	22
1.2.3.5. Cerveau et testicules.....	22
1.2.3.6. Placenta.....	23
1.2.3.7. Glandes surrénales.....	23
1.2.3.8. Cellules lympho-hématopoïétiques.....	23
1.2.3.9. Autres tissus sains.....	24
1.2.3.10. Fœtus.....	24
1.2.3.11. Cellules tumorales.....	25
1.3. MODELES DE SOURIS INVALIDEES POUR LES GENES MDR1.....	26
1.3.1. <i>Constitution des lignées</i>	26
1.3.2. <i>Conséquences de la mutation</i>	27
1.3.2.1. Pharmacocinétique.....	27
1.3.2.2. Organique.....	29
1.4. ANOMALIE GENETIQUE DU GENE MDR1 DANS LA RACE COLLEY ET APPARENTEES.....	35
1.4.1. <i>Description de la mutation</i>	35
1.4.2. <i>Phylogénie de la mutation</i>	36
1.4.3. <i>Sensibilité avérée à certains principes actifs et autres anomalies</i>	39
2. LES MALADIES INTESTINALES CHRONIQUES INFLAMMATOIRES CHEZ LE CHIEN	43
2.1. ETUDE CLINIQUE.....	43
2.1.1. <i>Symptômes</i>	43
2.1.2. <i>Exploration de la gravité de l'inflammation</i>	44
2.2. PHYSIOPATHOGENIE.....	45
2.2.1. <i>Etiologie</i>	45
2.2.1.1. Immunopathologie de la muqueuse intestinale :.....	45
2.2.1.2. Eléments immunologiques circulants.....	46
2.2.1.3. Les réponses d'hypersensibilité lors de MICI.....	47
2.2.2. <i>Déterminisme génétique</i>	48
2.2.3. <i>Rôle de la glycoprotéine P</i>	49
2.2.4. <i>Traitement</i>	50
2.3. CONCLUSION.....	50
DEUXIEME PARTIE	51
ETUDE EXPERIMENTALE	51
1. BUT DE L'ETUDE	53

2.	ANIMAUX, MATERIEL ET METHODES.....	53
2.1.	SELECTION DES POPULATIONS ECHANTILLONS.....	53
2.1.1.	Race.....	53
2.1.2.	Age.....	53
2.1.3.	Durée de l'étude.....	53
2.1.4.	Recrutement supplémentaire.....	54
2.2.	QUESTIONNAIRE DE SANTE.....	54
2.3.	GENOTYPAGE DES CHIENS.....	55
2.3.1.	Prélèvement d'ADN.....	55
2.3.2.	Analyse moléculaire.....	56
2.4.	ANALYSES STATISTIQUES.....	58
3.	RESULTATS.....	59
3.1.	TOUTES RACES CONFONDUES.....	59
3.1.1.	Description de la population.....	59
3.1.1.1.	Origine du recrutement.....	59
3.1.1.2.	Age/Sexe.....	59
3.1.1.3.	Race.....	59
3.1.1.4.	Génotype.....	59
3.1.2.	Score.....	60
3.1.2.1.	Général.....	60
3.1.2.2.	Digestif.....	61
3.1.2.3.	Score Cumulé ou CIBDAI.....	62
3.1.3.	Distribution des génotypes MDR1 chez les bergers.....	62
3.1.3.1.	Prévalence de allèle muté dans chaque race.....	62
3.1.3.2.	Comparaison des résultats obtenus.....	63
3.1.4.	Influence de différents paramètres sur la pathologie digestive.....	64
3.1.4.1.	Influence de la race sur la pathologie digestive.....	64
3.1.4.2.	Influence du sexe sur la pathologie digestive.....	65
3.1.4.3.	Influence de l'âge sur la pathologie digestive.....	66
3.1.4.4.	Influence du génotype sur la pathologie digestive.....	66
3.1.5.	Autres maladies présentes chez les chiens de l'étude.....	70
3.2.	ETUDE CHEZ LE BERGER BLANC SUISSE.....	71
3.2.1.	Description de la population.....	71
3.2.2.	Répartition des génotypes.....	71
3.2.3.	Score CIBDAI.....	71
3.2.4.	Influence de différents paramètres sur les troubles digestifs.....	72
3.2.4.1.	Sexe.....	72
3.2.4.2.	Age.....	72
3.2.4.3.	Génotype.....	73
3.3.	ETUDE CHEZ LE BERGER AUSTRALIEN.....	73
3.3.1.	Description de la population.....	73
3.3.2.	Répartition des génotypes.....	73
3.3.3.	Score CIBDAI.....	74
3.3.4.	Influence de différents paramètres sur les troubles digestifs.....	75
3.3.4.1.	Sexe.....	75
3.3.4.2.	Age.....	76
3.3.4.3.	Génotype.....	76
3.4.	ETUDE CHEZ LE BORDER COLLIE.....	78
3.4.1.	Description de la population.....	78
3.4.2.	Répartition des génotypes.....	78
3.4.3.	Scores.....	78
3.4.4.	Influence de différents paramètres sur les troubles digestifs.....	79
3.4.4.1.	Sexe.....	79
3.4.4.2.	Age.....	79
3.4.4.3.	Génotype.....	79
3.5.	ETUDE CHEZ LE COLLEY.....	79
3.5.1.	Description de la population.....	79
3.5.2.	Répartition des génotypes.....	80
3.5.3.	Score.....	80
3.5.4.	Influence de différents paramètres sur les troubles digestifs.....	81
3.5.4.1.	Sexe.....	81
3.5.4.2.	Age.....	82

3.5.4.3.	Génotype	82
3.6.	ETUDE CHEZ LE SHETLAND	83
3.6.1.	<i>Description de la population</i>	83
3.6.2.	<i>Répartition des génotypes</i>	84
3.6.3.	<i>Score</i>	85
3.6.4.	<i>Influences de différents paramètres sur les troubles digestifs</i>	85
3.6.4.1.	Sexe.....	85
3.6.4.2.	Age.....	86
3.6.4.3.	Génotype	86
4.	DISCUSSION	89
ANNEXES	95
ANNEXE 1 :	LETTRE D'ACCOMPAGNEMENT AUX PROPRIETAIRES	97
ANNEXE 2 :	LETTRE D'ACCOMPAGNEMENT AUX ELEVEURS	99
ANNEXE 3 :	QUESTIONNAIRE DE SANTE	101
ANNEXE 4 :	LISTES DES RESULTATS BRUTS DES 177 CHIENS.....	103
BIBLIOGRAPHIE	107

LISTE DES ABREVIATIONS

- ▣ AhR : *Aryl hydrocarbon Receptor*
- ▣ ADN : Acide DesoxyRibonucléique
- ▣ ARN : Acide RiboNucléique
- ▣ ADNc : Acide DesoxyRibonucléique complémentaire
- ▣ ARNm : ARN messenger
- ▣ ATP : Adénosine TriPhosphate
- ▣ CAR : *Constitutive Androstane Receptor*
- ▣ CD : *Cluster of differentiation*
- ▣ CIBDAI : *Canine Inflammatory Bowel Disease Activity Index*
- ▣ GALT : *Gastro Intestinal Associated Lymphoid Tissue*
- ▣ Gly-P : Glycoprotéine P
- ▣ IBD : *Inflammatory Bowel Disease*
- ▣ Ig : Immunoglobuline
- ▣ kD : Kilo Dalton
- ▣ *Mdr1, MDRI: Multi Drug Resistant 1*
- ▣ MICI : Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
- ▣ Pb : Paire de base
- ▣ PCR : *Polymerase Chain Reaction*
- ▣ PPAR : *Peroxisome Proliferative Activated Receptor*
- ▣ PXR : *Pregnane X Receptor*
- ▣ TNF : *tumor necrosis factor*

TABLE DES FIGURES

Figure 1: Régulation de la détoxification et du catabolisme des xénobiotiques par les récepteurs nucléaires dont PXR et CAR (d'après http://www.jle.com).....	17
Figure 2: Modèle structural de la Gly-P humaine d'après Chen <i>et al.</i> [4].....	18
Figure 3: Organisation transmembranaire des domaines de la Gly-P d'après Georges E. <i>et al.</i> [15].....	19
Figure 4: Mécanisme d'action du transport des molécules médicamenteuses par la Gly-P	20
Figure 5: Représentation schématique de l'expression temporelle de la Glycoprotéine P chez l'embryon puis le fœtus humain au cours de la grossesse d'après Van Kalken <i>et al.</i> [75].....	24
Figure 6: Principe de constitutions de lignée de souris invalidés pour un gène donné d'après T. Strachan [71].....	27
Figure 7: Présence de la Gly-P dans les vaisseaux capillaires cérébraux de souris d'après Schinkel <i>et al.</i> [63].....	28
Figure 8: Marquage par immunofluorescence du transporteur <i>mdr1a</i> sur des coupes transversales de colon de souris sauvage <i>mdr1a</i> (+/+) et mutée <i>mdr1a</i> (-/-) d'après Panwala <i>et al.</i> [50].....	30
Figure 9: Coupe transversale de la paroi intestinale d'une souris mutée <i>mdr1a</i> (-/-) avec colite et d'une souris mutée <i>mdr1a</i> (-/-) sans colite d'après Panwala <i>et al.</i> [50].....	31
Figure 10: Aspect macroscopique des intestins de souris saines, malades sans traitements antibiotiques et avec traitements antibiotiques d'après Panwala <i>et al.</i> [50].....	32
Figure 11: Modèle hypothétique du rôle intestinale de la Gly-P d'après Y. Mochida <i>et al.</i> [45].....	34
Figure 12: Organisation de la délétion des 4 paires de bases sur le chromosome 14 canin d'après Roulet <i>et al.</i> [57].....	36
Figure 13: Arbre généalogique de la lignée des Colleys d'après Neff <i>et al.</i> [49].....	37
Figure 14: Représentation schématique de l'axe Hypothalamo-hypophysaire-surrénalien chez les chiens à <i>MDR1</i> mutés et sauvages d'après Mealey <i>et al.</i> [43].....	41
Figure 15: Critère de gradation des maladies intestinales chroniques inflammatoires d'après Jergens [30].....	44
Figure 16: Pathogénèse des maladies intestinales chroniques inflammatoires chez la souris d'après Podolsky <i>et al.</i> [19].....	46
Figure 17: Représentation schématique des quatre types d'hypersensibilité d'après Roitt <i>et al.</i> [56].....	48
Figure 18: Technique de prélèvement buccal d'ADN chez un chien (d'après www.antagene.com).....	55
Figure 19: Etape de dénaturation de l'ADN lors de PCR (d'après www.ens-lyon.fr).....	57
Figure 20: Etape d'hybridation des amorces lors de PCR (d'après www.ens-lyon.fr).....	57
Figure 21: Etape d'élongation à partir des amorces lors de PCR (d'après www.ens-lyon.fr).....	58
Figure 22: Répartition des génotypes <i>MDR1</i> des 177 chiens bergers	60
Figure 23: Répartition des scores généraux des 177 chiens bergers.....	60
Figure 24: Répartition des scores digestifs des 177 chiens bergers.....	61
Figure 25: Répartition des scores CIBDAI des 177 chiens bergers.....	62
Figure 26: Répartition par race des 43 chiens bergers ayant un score digestif non nul.....	64
Figure 27: Répartition par race, des 43 chiens bergers ayant un score digestif non nul, rapporté à l'effectif de l'échantillon racial.....	65
Figure 28: Répartition des génotypes <i>MDR1</i> des 43 chiens bergers ayant un score digestif non nul	67
Figure 29: Répartition des scores digestifs des 24 chiens bergers homozygotes mutés.....	69
Figure 30: Répartition des scores digestifs des 55 bergers hétérozygotes.....	69
Figure 31: Répartition des scores digestifs des 98 bergers homozygotes sauvages	70
Figure 32: Répartition des scores CIBDAI chez les 14 Bergers Blancs Suisses	72
Figure 33: Répartition des génotypes <i>MDR1</i> chez les 84 Bergers Australiens	74
Figure 34: Répartition des scores CIBDAI chez les 84 Bergers Australiens	74

Figure 35: Répartition des géotypes <i>MDRI</i> des 19 Bergers Australiens ayant un score digestif non nul	77
Figure 36: Répartition des scores CIBDAI chez les 9 Border Collies.....	78
Figure 37: Répartition des géotypes <i>MDRI</i> des 12 Colleys	80
Figure 38: Répartition des scores CIBDAI chez les 12 Colleys.....	81
Figure 39: Répartition des géotypes <i>MDRI</i> des 7 Colleys ayant un score digestif non nul	83
Figure 40: Répartition des géotypes <i>MDRI</i> chez les 58 shetlands	84
Figure 41: Répartition des scores CIBDAI des 58 Shetlands	85
Figure 42: Répartition des géotypes <i>MDRI</i> des 7 Shetlands à score digestif non nul.....	87

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Fréquences de l'allèle MDR1 et des génotypes dans l'étude de Neff M. <i>et al.</i> [49]	38
Tableau 2: Fréquence des génotypes <i>MDR1</i> chez le Colleys dans divers pays [16, 25, 34, 42, 44]	38
Tableau 3: Prévalence des allèles mutés chez les Colleys et apparentés dans divers pays	39
Tableau 4: Répartition numérique des génotypes <i>MDR1</i> des 177 chiens bergers	59
Tableau 5: Répartition des génotypes <i>MDR1</i> et fréquence de l'allèle <i>MDR1</i> muté dans chaque race	63
Tableau 6 : Tableau permettant la comparaison des fréquences génotypiques observées dans les échantillons de Colley, Berger Australien et Shetland	63
Tableau 7: Répartition numérique des races des 43 chiens bergers ayant un score digestif non nul.	64
Tableau 8: Nombre de chiens, par race, ayant un score digestif non nul, rapporté à l'effectif de l'échantillon racial.	65
Tableau 9: Test χ^2 pour comparer la proportion des mâles et femelles touchés par des troubles digestifs chez les 177 chiens bergers	66
Tableau 10: Répartition des âges des 43 chiens à score digestif non nul	66
Tableau 11: Répartition numérique des génotypes <i>MDR1</i> des 43 chiens bergers ayant un score digestif non nul	67
Tableau 12: Répartition des génotypes <i>MDR1</i> chez les 177 chiens à score digestif non nul et nul	67
Tableau 13: Répartition numérique des âges des 8 Bergers Blancs Suisses avec un score digestif non nul	73
Tableau 14: Répartition numérique des génotypes chez les 84 Bergers Australiens	73
Tableau 15: Test χ^2 pour comparer la proportion des mâles et femelles touchés par des troubles digestifs chez les 84 Bergers Australiens.....	75
Tableau 16: Répartition numérique des âges des 19 Bergers Australiens avec un score digestif non nul	76
Tableau 17: Répartition numérique des génotypes des 19 Bergers Australiens ayant un score digestif non nul	76
Tableau 18: Répartition des génotypes <i>MDR1</i> chez les chiens de race Berger Australien à score digestif non nul et nul	77
Tableau 19: Répartition numérique des âges des 12 Colleys	79
Tableau 20: Répartition numérique des génotypes <i>MDR1</i> des 12 Colleys.....	80
Tableau 21: Tableau du test de Fisher pour comparer la proportion des mâles et femelles touchés par des troubles digestifs chez les 12 Colleys.....	82
Tableau 22: Répartition numérique des âges des 7 Colleys ayant un score digestif non nul	82
Tableau 23: Répartition numérique des génotypes <i>MDR1</i> des 7 Colleys ayant un score digestif non nul	82
Tableau 24: Répartition des génotypes <i>MDR1</i> chez les chiens de race Berger Australien à score digestif non nul et nul	83
Tableau 25: Répartition numérique des génotypes <i>MDR1</i> chez les 58 shetlands.....	84
Tableau 26: Tableau du test de Fisher pour comparer la proportion des mâles et femelles touchés par des troubles digestifs chez les 48 Shetlands	86
Tableau 27: Répartition numérique des âges des 7 Shetlands ayant un score digestif non nul	86
Tableau 28: Répartition numérique des génotypes <i>MDR1</i> chez les 7 Shetlands à score digestif non nul	86

INTRODUCTION

La glycoprotéine P, codée par le gène *MDR1*, est, depuis des années, connue pour être un transporteur dont les substrats sont de nature variable. Grâce à une structure tridimensionnelle changeante, elle forme un pore permettant le passage sélectif de molécules au sein d'organes et de tissus variés (tube digestif, rein, foie, vessie, poumon, cerveau...).

L'invalidation du gène *MDR1* chez la Souris a été rendue responsable de troubles pharmacocinétiques affectant le stockage et l'élimination de principes actifs tels que la vinblastine, la digoxine, ou encore des corticoïdes. Aucun trouble n'a néanmoins été rapporté concernant la viabilité, la fertilité et le développement de ces souris.

En 1994 ont été observées, de façon tout à fait fortuite, une série d'intoxications neurologiques par un antiparasitaire de la famille des Avermectines, chez des souris homozygotes pour l'invalidation du gène *MDR1*. Différents praticiens vétérinaires, au même moment, ont rapporté que certains chiens de la race Colley exprimaient cette même sensibilité médicamenteuse. Les études de ces cas sporadiques, à partir des années 80, a permis de mettre en évidence une augmentation du stockage et une diminution de l'élimination de l'antiparasitaire dans le système nerveux des chiens atteints. La relation entre le défaut de la glycoprotéine P et la mutation fut alors faite chez les Colleys, naturellement porteurs d'une délétion dans le gène *MDR1*.

Les recherches qui suivirent, ont mis en évidence, chez des souris homozygotes invalidées pour le gène *MDR1*, une sensibilité particulière de ces animaux au développement de colites inflammatoire ressemblant à celles observées lors de maladie de Crohn chez l'Homme.

C'est grâce à ces constatations, effectuées chez la Souris, que l'hypothèse d'une prédisposition génétique aux maladies inflammatoires chroniques intestinales des chiens homozygotes mutés dans le gène *MDR1*, a été postulée.

Dans une 1^{ère} partie bibliographique, nous décrirons la biologie du gène *MDR1*, les modifications entraînées par son dysfonctionnement et la physiologie des maladies chroniques intestinales chez le chien.

Dans une 2^{ème} partie expérimentale, nous explorerons l'hypothèse d'une prédisposition génétique des chiens homozygotes mutés au développement de maladies digestive chroniques, à l'aide d'un échantillon de chiens appartenant à la race Colley et à diverses races de bergers, recrutés grâce à la base de données CLOVIS des consultations de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort et dont le statut digestif aura été établi grâce à un questionnaire et le génotypage pour le locus *MDR1* effectué par la société **Antagene**, partenaire de cette étude.

PREMIERE PARTIE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. BIOLOGIE DU GENE MDR

1.1. Le gène *MDR1* canin

1.1.1. La famille des transporteurs glycoprotéiques des mammifères

Le gène *MDR1* est un gène situé sur le chromosome 7 du Chien qui code pour un peptide de 1282 acides aminés. Ce gène appartient à la superfamille des gènes codant pour des transporteurs transmembranaires (Famille ABC pour « **ATP Binding Cassette** ») dont il existe au total 3 sous-familles chez l'Homme ayant des localisations tissulaires différentes les unes des autres [47] :

La sous famille MDR (*Multiple Drug Resistant*) représentée par au maximum 3 membres selon les espèces, chacun des gènes codant pour un isoforme de pompe transmembranaire appelé **Glycoprotéine P (Gly-P)**. Ils sont capables d'expulser à l'extérieur de la cellule des xénobiotiques non modifiés.

La sous famille MRP (*Multidrug Resistance-associated Proteins*) regroupant 7 membres, est exprimée de façon aléatoire dans les cellules tumorales et est ainsi responsable d'une résistance pléiotropique, c'est-à-dire une résistance croisée à des agents cytotoxiques de nature différente. Ces protéines sont principalement retrouvées dans la membrane plasmique. Elles sont responsables de l'élimination de xénobiotiques préalablement modifiés par des enzymes intra-cellulaires. Ces transporteurs sont retrouvés non seulement chez l'Homme mais aussi chez le Singe, le Rat et le Chien.

La sous famille MXR (*MitoXantrone Resistant-associated gene*) dernière protéine de membrane découverte, retrouvée exprimée dans le placenta, les glandes mammaires et l'appareil digestif.

Alors que l'Homme possède 2 classes de *MDR* (*MDR1* et *MDR2/3*) et la Souris 3 (*mMdr1a* ou *mdr3*, *mMdr1b* ou *mdr1* et *mMdr2*, *m* pour *mouse*), le Chien et le hamster ne possède que la classe I (respectivement *cMdr1* et *Pgp1*).

1.1.2. Structure du gène *MDR1* canin

L'équipe de Steingold *et al.* a identifié et comparé l'ARNm du gène *MDR1* canin (dans des lignées cellulaires tumorales lymphocytaires résistantes aux traitements anti-tumoraux). Ils ont mis en évidence une composition de l'ARNm structurellement homologue à l'ARNm humain. Dans leur étude, le taux d'homologie entre l'ARNm canin *cMdr1* et humain *MDR1* était de 93% et de 90%, avec celui de la Souris *mMdr1*. Cette ressemblance permettrait donc, dans une certaine mesure, d'extrapoler les résultats obtenus dans une espèce vers l'autre [69].

Le gène *MDR1* qui code pour une protéine appelée **glycoprotéine P (Gly-P)** est composé de 28 exons (parties transcrites pour la formation de la protéine) dont 14 codent pour une première moitié de la protéine et 13, pour la seconde. Les 2 moitiés représentent chacune 610 acides aminés dont la partie charnière (60 acides aminés) est constituée d'une séquence peu conservée entre espèces de mammifères [73, 55].

Etant donné la forte homologie (43%) entre les 2 moitiés du gène, certaines équipes ont supposé que le gène final était le résultat d'une duplication d'un gène primitif. Il existe également une homologie structurale entre des gènes codant pour les transporteurs actifs de membrane bactérienne et le gène *MDR1*. Néanmoins, en 1990, Chen *et al.* [5], ont mis en évidence la possibilité d'association de 2 gènes codant pour des protéines analogues et ayant évolué différemment au cours du temps [4, 20].

1.1.3. Expression du gène *MDR1*

De récentes études ont montré que la régulation de l'expression du gène *MDR1* est partiellement contrôlée par des récepteurs nucléaires (le **PXR** pour *Pregnane X receptor*, le **PPAR** pour *peroxysome proliferative activated receptor* ou le **AhR** pour *aryl hydrocarbon receptor*) mais aussi par un récepteur constitutif à l'antrostane (le **CAR**).

Ces 4 récepteurs nucléaires activent la transcription de leurs gènes cibles (gènes codant pour des enzymes de biotransformation hépatique) en formant un hétérodimère avec les **RXR** pour *retinoic acid X receptor*.

Néanmoins le mécanisme d'action de **CAR** est relativement particulier au sein de la famille des récepteurs nucléaires puisque qu'il est en permanence lié à des séquences spécifiques *enhancer* de l'ADN en l'absence de ligands. C'est la liaison de certains d'entre eux (dont les androstanes) qui va dissocier **CAR** des promoteurs de ces gènes cibles et inhiber leur expression. À l'inverse un certain nombre de ligands chimiques, comme le phénobarbital, va activer **CAR** selon un mode classique pour les récepteurs nucléaires, et induire entre autres des gènes de détoxification comme le **cytochrome p450** ou **CYP**.

Ce dernier appartient à une superfamille de 57 gènes codant pour des enzymes qui métabolisent un grand nombre de médicaments mais également des substances endogènes (stéroïdes, eicosanoïdes, vitamines...). Ces enzymes jouent un rôle majeur dans le métabolisme des xénobiotiques, dont les médicaments, et ont un rôle primordial dans la protection de l'organisme contre les agressions extérieures (polluants, pesticides...) au même titre que la Gly-P.

Plusieurs groupes ont ainsi montré que les xénobiotiques étaient perçus par la cellule humaine comme des signaux pouvant modifier un certain nombre de paramètres cellulaires, notamment l'expression des gènes. Chez l'Homme, il a été montré que le **CAR** tout comme **PXR**, se liait à la région *enhancer* du gène *MDR1* située à environ 8kb en amont du site d'initiation de la transcription de *MDR1*. Celle-ci activerait fortement l'expression du gène *MDR1* dans les cellules intestinales [3,14].

Ainsi, lorsque des xénobiotiques pénètrent dans une cellule, plusieurs mécanismes peuvent être mis en jeu pour limiter l'accumulation de produits toxiques (*figure 1*) :

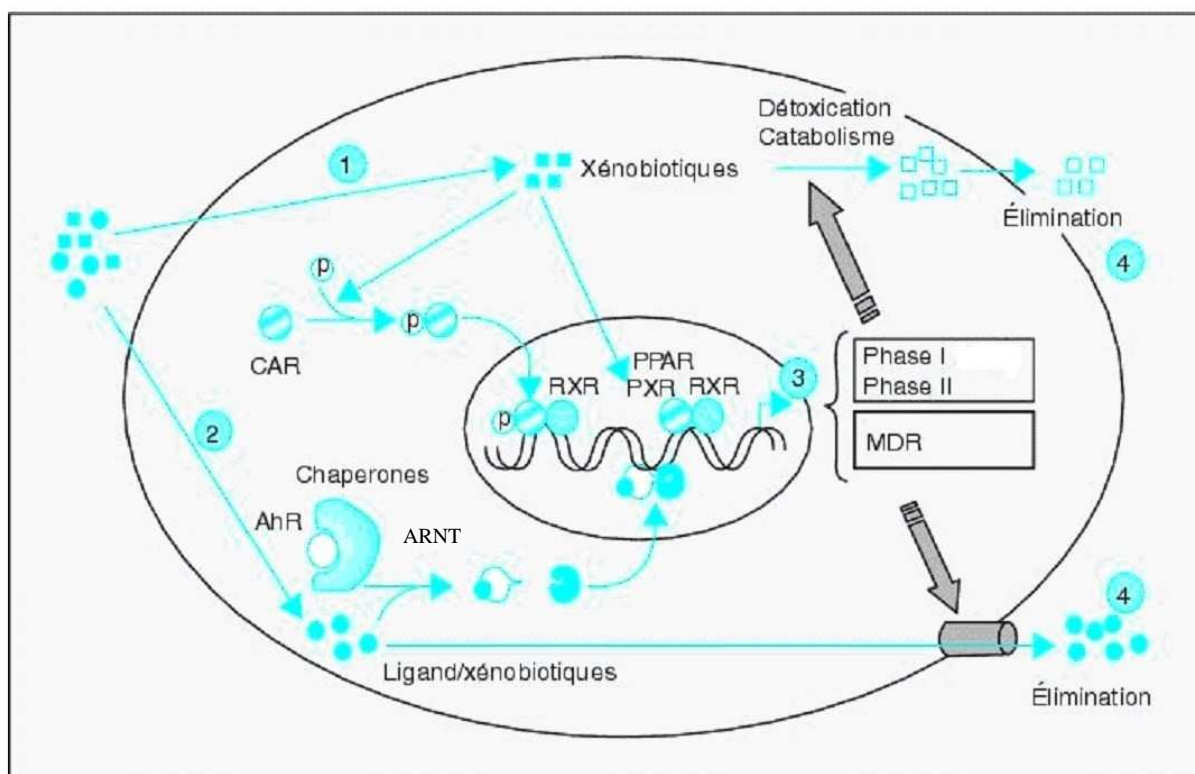
1) l'activation de la capacité transcriptionnelle de récepteurs nucléaires peut être réalisée directement par liaison xénobiotique/ligand dans une poche de liaison hydrophobe du ligand (cas de **PXR** ou **PPAR**) ou par phosphorylation de la protéine (cas du récepteur **CAR** par les phénobarbitates).

2) certains xénobiotiques se comportent comme des ligands de la protéine **AhR** : la liaison entraîne la séparation des protéines chaperonnes qui bloquent **AhR** dans le cytoplasme, provoquant

soit la dimérisation avec l'ARNT (*AhR nuclear translocator*) et leur fixation sur les promoteurs des gènes cibles soit l'élimination du couple xénobiotique/ligand. Dans les deux cas, l'augmentation de l'activité transcriptionnelle des protéines provoque une réponse accrue de la cellule.

3) Au final, cela entraîne la synthèse de deux types de protéines : des enzymes de la phase I et de la phase II impliqués dans la détoxification ou le catabolisme des xénobiotiques (en particulier les cytochromes tel que **cytochrome p450**) mais aussi des protéines de transport de type **MDR** (*multi drug resistance proteins*).

Figure 1: Régulation de la détoxification et du catabolisme des xénobiotiques par les récepteurs nucléaires dont PXR et CAR (d'après <http://www.jle.com>)



Les **xénobiotiques** (petits carrés et ronds de couleur bleue) qui pénètrent dans la cellule (représentée par le cercle ovale noir) empruntent plusieurs voies d'élimination possibles :

Soit ils sont détoxifiés ou catabolisés directement (partie supérieure du schéma), soit ils stimulent la synthèse de récepteurs nucléaires (**PXR, PPAR** à l'intérieur du cercle ovale centrale représentant le noyau) qui eux même stimule la synthèse de transporteur **MDR** (cylindre en bas à droite du schéma) ou d'enzyme ou coEnzyme de détoxification (**phase I** ou **Cyt p450** et **II**), enfin soit ils se fixent sur des récepteurs cytoplasmiques (**AhR**, cercle blanc en bas à gauche du schéma) qui, perdant leurs molécules inhibitrices (volumineux croissant), jouent le rôle de promoteur pour la synthèse de MDR et des même enzymes précédemment citées.

P = Phosphate

De plus, l'équipe de Geick *et al.* [14] ont démontré l'induction de la transcription du gène *MDR1* par des molécules comme la carbamazépine (antiépileptique), la 5β pregnane 3,2-dione (stéroïde sexuel), la dexaméthasone (stéroïde), la pregnolone (hormone), etc.

1.2. La glycoprotéine P

1.2.1. Structure

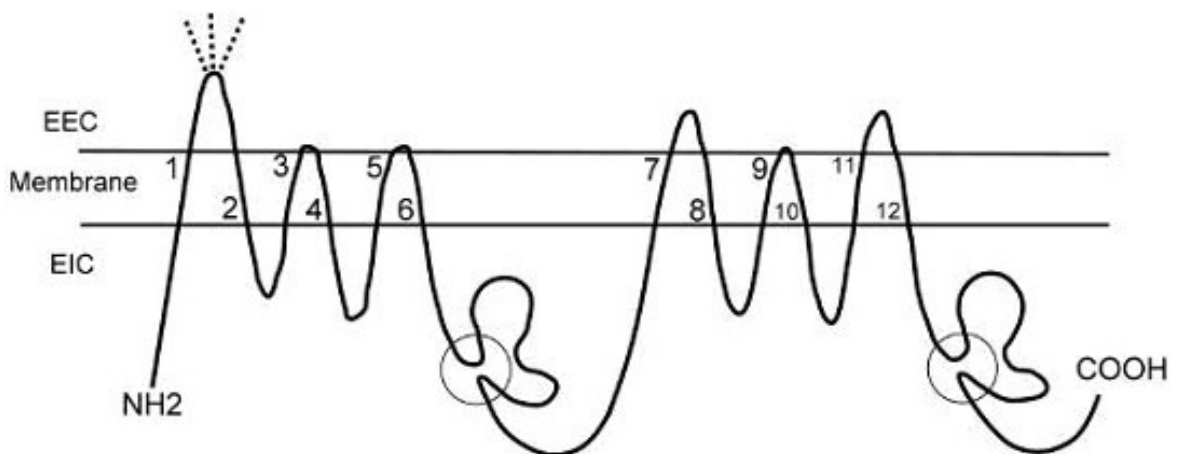
La majorité des études effectuées sur la glycoprotéine P l'ont été chez l'Homme. Cependant, la forte homologie (93%) entre la protéine humaine et la protéine canine, nous permet d'avoir une vue d'ensemble de la structure de la protéine canine lorsque l'on étudie la protéine humaine.

La glycoprotéine P humaine (Gly-P) est constituée de 2 régions comprenant chacune [47]:

- ∞ Une **région N-terminale** possédant une très faible homologie de séquence avec la région N-terminale de la seconde moitié de la glycoprotéine P.
- ∞ Une **région C-terminale** fortement homologue d'une moitié à une autre.

On distingue 12 domaines hydrophobes transmembranaires (exclusivement constitués d'acides aminés hydrophobes tels que GLY, ALA, VAL, LEU, ILE, PHE) répartis en deux ensembles de 6 domaines. Ces deux structures sont reliées par une boucle intracellulaire (*linker region*). Deux domaines intra et extracellulaire sont associés (*Nucleotide-Binding Domains*). Le schéma de la *figure 2* illustre l'organisation de la protéine humaine [4].

Figure 2: Modèle structural de la Gly-P humaine d'après Chen *et al.* [4]



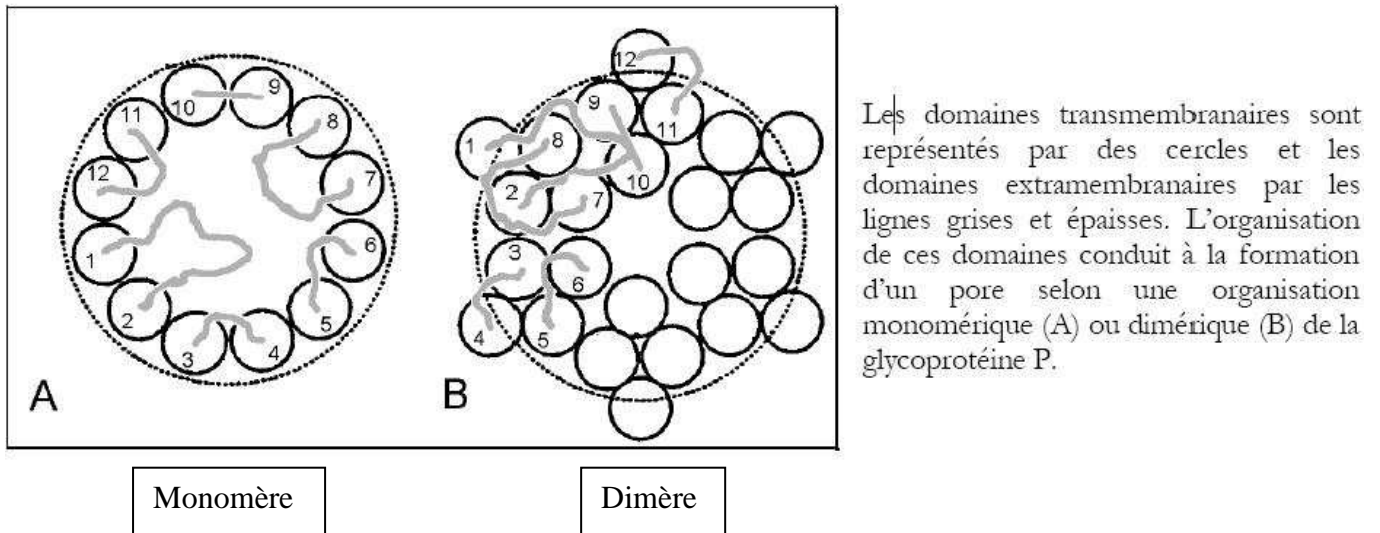
EEC = Espace extracellulaire ; EIC = espace intracellulaire

Les cercles représentent les sites de fixations des molécules d'ATP, les segments transmembranaires sont numérotés de 1 à 12 et les lignes en pointillées représentent les sites de glycosylation.

1.2.2. Fonctions

D'après Georges E. *et al.*, la conformation tridimensionnelle de la protéine est celle d'un pore au travers duquel certaines molécules (médicamenteuses ou non) peuvent circuler (illustration par la *figure 3*) [15].

Figure 3: Organisation transmembranaire des domaines de la Gly-P d'après Georges E. *et al.* [15]

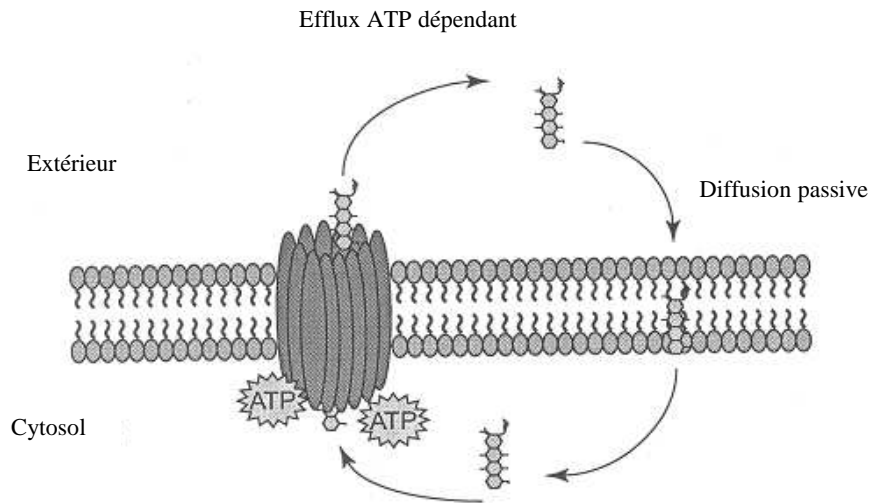


La Gly-P a une structure de pore (*figure 3*) et fonctionne activement comme une pompe à ATP. L'activité de ce transporteur transmembranaire est déterminée par 2 éléments [47]:

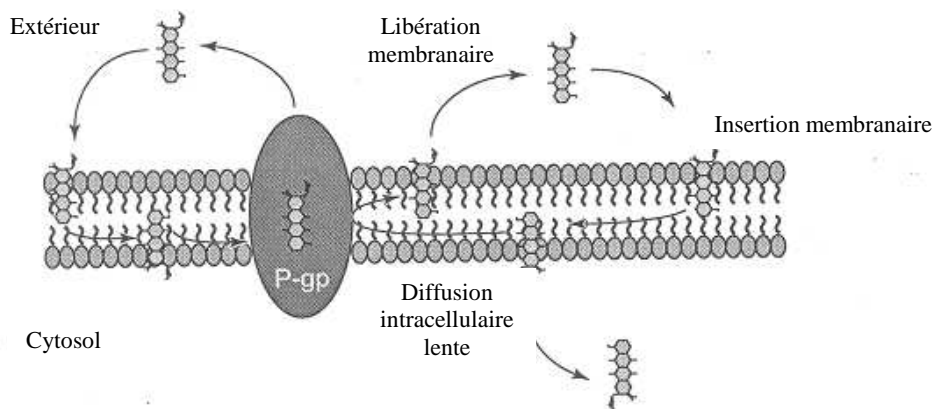
- ▣ L'état de phosphorylation de la glycoprotéine P dépendant directement de la concentration en ATP du milieu intérieur [27],
- ▣ La quantité de molécule substrat présente dans le milieu intracellulaire.

Deux mécanismes de transport des molécules par la Gly-P ont été envisagés (*figure 4*): un modèle de pompe ATP dépendante et un modèle d'interaction avec les lipides membranaires.

Figure 4: Mécanisme d'action du transport des molécules médicamenteuses par la Gly-P d'après Johnsonne *et al.* [31]



A) Modèle de pompe ATP dépendante constituée d'un pore unique : Les molécules médicamenteuses entrent par diffusion à travers la membrane lipidique et sont redirigées vers l'extérieur par le transporteur.



B) Modèle « flippase » : Les molécules médicamenteuses interagissent avec les lipides membranaires avant d'interagir avec la Gly-P et être ainsi éliminées de la cellule. Dans certains cas, la molécule rentre néanmoins dans la cellule mais de façon plus lente.

La Gly-P possède, selon certaines études, une masse d'environ 140kD chez la Souris ou l'Homme [4, 20] voir de 170kD [53]. Selon Endicott J.A. et Ling V., les principales variations structurales proviendraient des phénomènes de glycosylation et de phosphorylation de la molécule [11].

Alors que la glycosylation est responsable de la stabilité et de la bonne mise en place de la Gly-P dans la membrane, le rôle de la phosphorylation reste encore à définir [60].

Une récente étude a montrée que cette phosphorylation biochimique intervenait principalement dans le transport des ions chlorures mais sans conséquence connue. En effet, une surexpression de la Gly-P dans les cellules tumorales réfractaires aux traitements a été mise en relation avec une augmentation de l'activité des canaux aux chlorures. Il a été supposé que la Gly-P

régulait l'activité de ces canaux par un phénomène de phosphorylation induite par la protéine kinase C [28].

De nombreuses molécules sont concernées par le transport, allant des molécules anti-tumorales comme les antracyclines aux alcaloïdes en passant par les corticostéroïdes [40].

Le lopéramide, le domperidone, l'ondansetron sont également des substrats de la Gly-P [64].

Le fonctionnement de la glycoprotéine passe essentiellement par la présence d'énergie environnante sous forme d'ATP. En cas d'absence de molécule d'énergie, il y a accumulation de molécules médicamenteuses dans le secteur intracellulaire car la Gly-P est alors inactive [9].

Démonstré par les auteurs Willingham *et al.*, le verapamil bloque ainsi l'évacuation naturelle vers le compartiment extracellulaire de composés tels que les alcaloïdes de la pervenche ou les antracyclines dans des cellules multi-resistantes aux traitements anti-tumoraux [79]. Ainsi, le vérapamil (petite molécule lipophile) inhibe de façon certaine l'activité ATPase de la pompe.

1.2.3. Distribution tissulaire

Les localisations seront présentées principalement dans l'espèce canine ; les données concernant l'Homme et la Souris seront utilisées en complément.

1.2.3.1. Tractus digestif et annexes

Chez le Chien, Ginn P.E. a mis en évidence la présence du transporteur dans la muqueuse gastrique et dans les cellules en brosse de la lumière du tractus digestif inférieur (duodénum, jéjunum, iléon et colon). Les annexes du tube digestif expriment de façon diffuse la Gly-P, par exemple les acini du pancréas. Elle participe donc ainsi à la fonction d'excrétion et de sécrétion de la muqueuse. Les cellules des conduits des glandes salivaires mandibulaires expriment fortement la protéine au pôle apical de celles-ci [18].

Chez la Souris, seul le transporteur mMdr1a est retrouvé dans l'iléum et non le mMdr1b [70]. Foyo *et al.* ont également mis en évidence une expression élevée dans le jéjunum, le colon et le rectum [13]. La présence de la Gly-P dans les cellules de la bordure en brosse de l'intestin grêle illustre parfaitement, ici, la protection qu'elle confère contre les éléments exogènes contenus dans le bol alimentaire contribuant ainsi à la faible proportion de cancers intestinaux [27].

1.2.3.2. Reins et foie

Chez le Chien, la Gly-P est retrouvée discrètement au niveau du pôle apical des cellules des canaux biliaires ainsi qu'à la surface des hépatocytes. Le rein, lui, exprime fortement la protéine au niveau de l'épithélium du tubule proximal et plus faiblement au niveau du tubule distal et de l'anse de Henlé [18]. De plus, chez la Souris, la Gly-P ne se retrouve que sous la forme mMdr1a dans la vessie et le foie. Néanmoins, des taux équivalents de mMdr1a et mMdr1b ont été retrouvés dans les reins.

Témoins du rôle excréteur et épurateur des deux organes, l'équipe de Lieberman D.H. *et al.* ont révélé la présence du transporteur sur la face apicale des cellules en brosse des tubules proximaux rénaux humains et Bailly JD. *et al.* [1] ont montré l'occupation par le transporteur de la face biliaire des hépatocytes humains ainsi que des cellules épithéliales des canaux biliaires [39].

1.2.3.3. Vessie

Uniquement chez l'Homme, les cellules de l'urothélium vésical sont le site d'expression de l'ARNm du gène *MDR1*. Cette présence pourrait être associée à une protection vis-à-vis de certaines toxines (éléments carcinogènes exogènes tels que la fumée de cigarette, principal agent inducteur de carcinome vésicaux) [6].

1.2.3.4. Poumons

Les épithéliums apicaux canins des bronches, bronchioles et alvéoles sont immunomarquées par les anticorps anti-Gly-P. L'Homme autant que le Chien présente ce marquage, attestant ainsi de la présence de la Gly-P dans cet organe [8, 18].

1.2.3.5. Cerveau et testicules

Le cerveau (ainsi que d'autres tissus nerveux : cervelet, moelle épinière...) et les testicules représentent des parties de l'organisme qui sont protégées de la présence sanguine de xénobiotiques potentiellement toxiques. Ce sont des **sanctuaires pharmacologiques**.

Tout d'abord, les cellules endothéliales cérébrales qui recouvrent la face interne des capillaires cérébraux sont reliées les unes aux autres avec des jonctions serrées. On y note une absence de larges pores et de fenestration des capillaires. En conséquence, cette couche de cellules représente une barrière physique, lipophile, continue, bloquant le passage passif de molécules hydrophiles. Des transporteurs spécifiques sont donc mis en jeu pour le transport de molécules comme le glucose, les acides aminés...

Néanmoins, des molécules hydrophobes telles que la nicotine, l'éthanol et la caféine pénètrent dans le cerveau passivement à travers ces cellules endothéliales. Un mécanisme visant à extraire ces molécules toxiques est donc nécessaire.

Le rôle de la Gly-P dans l'intégrité de certaines barrières hémato-tissulaires a été mis en évidence limitant ainsi la distribution des xénobiotiques dans des organes particulièrement fragiles tels que le cerveau, les testicules et le fœtus. Chez l'Homme et le Chien, la présence du transporteur sur la face luminale de l'endothélium des capillaires des testicules et du cerveau illustre parfaitement ce rôle de barrière que joue la protéine [7, 8].

Une étude de 1995, a révélé que les patients atteints d'épilepsie résistante aux traitements avaient dans leurs capillaires endothéliaux et leurs astrocytes, une expression exacerbée du gène de *MDR1*. Il n'a pas été déterminé, s'il s'agissait de l'origine du mal ou sa conséquence [72]. Il a été alors étudié le polymorphisme du gène chez l'Homme qui a révélé que ces individus réfractaires aux traitements étaient pourvus de la même séquence (génotype CC en position 3435 du gène) codant pour une surexpression de la Gly-P. Le transporteur empêcherait alors la concentration des principes actifs médicamenteux dans les neurones [68].

La Souris n'exprime le transporteur que sous la forme mMdr1a dans les capillaires constituant les barrières hémato-encéphalique et hémato-testiculaire.

1.2.3.6. Placenta

Les principales molécules transportées mises en évidence chez l'Homme dans cet organe ont été la vinblastine (anticancéreux de type poison du fuseau), la vincristine (anticancéreux), la digoxine (glycoside cardiotonique) et la progestérone (hormone), principaux substrats de la Gly-P. Chez l'Homme, on a montré la présence du transporteur sur la face apicale (en brosse) des cellules trophoblastiques du placenta maternel illustrant de nouveau le caractère protecteur de la Gly-P vis-à-vis d'éléments iatrogènes pour le fœtus [7, 71].

Chez la Souris, seul le transporteur sous la forme mMdr1b est exprimé dans le placenta.

1.2.3.7. Glandes surrénales

Le Chien exprime très fortement la Gly-P exclusivement au sein du cortex surrénalien. Chez l'Homme, les études divergent quelque peu selon les auteurs : la médulla exprimerait la Gly-P pour Foyo *et al.* [1] et non pour Cordon-Cordo *et al.* [7]. La Souris, quant à elle exprime le type *mMdr1b* dans son tissu surrénalien. Sa localisation a suggéré la responsabilité de la Gly-P dans la sécrétion des hormones stéroïdiennes telles que l'aldostérone ou l'hydrocortisone [47].

1.2.3.8. Cellules lympho-hématopoïétiques

Ricky *et al.* ont proposé l'hypothèse du rôle de la Gly-P dans la protection des *Natural Killer* vis-à-vis d'une lyse induite par l'environnement hostile ou lors d'une réponse immunitaire élevée [31].

L'excrétion consécutive de la rhodamine 123 (substrat artificiel de la Gly-P) à partir des lymphocytes T CD8+ et la moindre expression de la Gly-P chez les lymphocytes T CD4+ a été illustré par l'équipe de Bommhardt *et al.*, chez la Souris [2].

De plus, il a été montré une faible expression de la Gly-P dans les lymphocytes CD19+ (lymphocyte B) et les CD14+ (monocyte) et une absence totale du transporteur chez les lymphocytes CD15+ (granulocyte) [35].

Le rôle de la Gly-P dans le déplacement de ces cellules lympho-hématopoïétiques a été étudié. Des constatations ont ainsi été mises en évidence par l'équipe de Randolph *et al.* qui a montré que les monocytes migraient dans le tissu conjonctif sous-jacent à travers l'endothélium vasculaire de façon identique en absence ou présence d'anticorps anti-MDR1. La même équipe a révélé la présence de la Gly-P sur les cellules dendritiques (cellules épidermiques participant à la présentation de l'antigène lors de réaction immunitaire) ainsi que l'inhibition de leur migration à travers les vaisseaux lymphatiques en présence d'un antiarythmique, le Vérapamil (inhibiteur de la Gly-P) [54,58]. Le transporteur n'est donc pas un élément de migration commun à toutes les cellules de l'immunité.

Chez l'Homme, un polymorphisme d'une base dans l'exon 26 du gène *MDR1* a été relié à une diminution d'expression de la Gly-P et, par voie de conséquence, à de son activité. Ce polymorphisme correspond à la substitution d'une base cytosine (C) en une base thymine (T). Chaque gène comprenant deux allèles (deux copies ou versions), la population peut être répartie en trois groupes : les **homozygotes pour l'allèle C** ou groupe 3435CC (les deux versions du gène conservent la base cytosine), les **hétérozygotes** ou groupe 3435CT (l'une des versions conserve la base cytosine, l'autre allèle présente la substitution thymine) et les **homozygotes pour l'allèle T** ou groupe 3435TT (les deux formes présentent la substitution thymine). Ces trois génotypes sont associés à des variations d'expression de la Gly-P. Les homozygotes pour l'allèle C (3435CC, gène normal ou sauvage) présentent une expression de la Gly-P duodénale 65 fois plus importante que les homozygotes pour la substitution thymine (3435TT). Les hétérozygotes (3435CT) ont un niveau d'expression intermédiaire. La répartition entre homozygotes 3435CC (expression normale) et 3435TT (expression diminuée) varie suivant les ethnies [25].

Plusieurs études ont montré que le génotype *MDR1* pouvait être un facteur prédictif de la réponse aux médicaments, par exemple, chez les malades infectés par le virus de l'immunodéficience humaine et traités par des inhibiteurs de protéases (nelfinavir, efavirenz). Il a été montré que, le génotype TT était associé à une meilleure restauration immunitaire (évaluée par le taux de cellules CD4+) et à des concentrations plasmatiques en antiprotéases plus élevées.

1.2.3.9. Autres tissus sains

Chez le Chien, l'utérus, les ovaires, le myocarde, les glandes mammaires, les glandes sébacées, l'épithélium de l'œsophage et la thyroïde exprime de façon variable et inconstant la protéine *MDR1* [18].

Chez l'Homme, tandis que les glandes mammaires, l'endomètre, les follicules thyroïdiens, le placenta, la prostate expriment la protéine [8], les fibroblastes et les kératinocytes n'expriment pas le transporteur [54, 73].

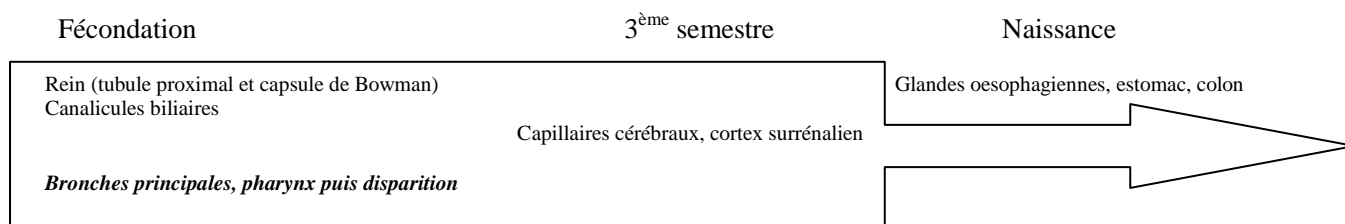
1.2.3.10. Fœtus

Chez l'Homme, seule espèce étudiée pour ce point, le foie, le pancréas et les intestins n'ont aucune expression fœtale ou embryonnaire.

Néanmoins en fonction de l'avancée de la grossesse, le cortex surrénalien exprime le transporteur au niveau des 3 zones puis juste au niveau de la zone réticulée et fasciculée. Cette capacité du néocortex à exprimer fortement la Gly-P serait directement en relation avec la capacité du fœtus à synthétiser les hormones stéroïdiennes.

L'expression temporelle de la Gly-P lors de la grossesse chez la femme est illustrée par la *figure 5*.

Figure 5: Représentation schématique de l'expression temporelle de la Glycoprotéine P chez l'embryon puis le fœtus humain au cours de la grossesse d'après Van Kalken *et al.* [75]



La glycoprotéine illustre ici, son implication dans les étapes du développement embryonnaire.

1.2.3.11. Cellules tumorales

Divers études sur des échantillons de cellules tumorales ont montré la présence de la Gly-P à l'état normal ou surexprimé.

Ces cellules sont capables d'utiliser à leur profit le rôle de détoxification du transporteur: en produisant un grand nombre de glycoprotéines P, elles se débarrassent ainsi des médicaments anti-cancéreux (substrat de la Gly-P).

Chez le Chien :

La protéine a été retrouvée au niveau d'hépatomes, d'hémangiopericytomes, de lymphosarcomes/lymphomes, de mélanosarcomes, de leiomyosarcomes, de carcinomes squameux, d'adénomes des glandes apocrines, de tumeurs des thyroïdes, de tumeurs de la muqueuse buccale et de tumeurs gastro-intestinales [18, 46, 48].

Chez l'Homme :

L'expression du gène *MDR1* codant pour la Gly-P est augmentée dans de nombreux cancers humains : du côlon, des reins, des seins, des surrénales, de la vessie, dans les leucémies etc. On retrouve dans cette liste les organes présentant une expression basale élevée du transporteur. Mais dans d'autres organes l'expression peut également devenir acquise dans un tissu tumoral (phéochromocytome par exemple), à la suite d'un traitement anti-tumoral [1, 7, 14, 57].

Kohno *et al.* ont mis en évidence l'activation du promoteur du gène *MDR1* suite à un traitement anticancéreux à base de vincristine, de daunomycine, d'adriamycine et de colchicine. Ainsi la tumeur devient résistante à ces molécules de la même façon qu'un traitement antibiotique lors d'une infection peut entraîner la sélection de germes antibio-résistants [36].

Les tumeurs de la vessie sont un exemple très intéressant : Clifford *et al.* ont montré que les personnes qui exprimaient faiblement l'ARNm de *MDR1* au niveau vésical étaient prédisposées à développer des carcinomes à cellules transitionnelles. De plus, la faible expression du transporteur dans les tumeurs bénignes vésicales exposait les cellules vésicales aux agents carcinogènes extérieurs qui n'étaient plus refoulés par la pompe Gly-P. Il en résultait donc une prédisposition à développer des tumeurs malignes chez ces personnes. Enfin, le fort degré d'expression du gène *MDR1* dans les tumeurs vésicales de haut grade pouvait constituer un marqueur de la progression tumorale [6].

Chez la Souris:

Kankesan *et al.* ont montré que l'inhibition de la Gly-P dans les cellules tumorales hépatiques et mammaires traitées provoquait une diminution de la taille, du nombre des nodules et de leur ulcération. Ce serait donc les propriétés intrinsèques du tissu tumoral (surexpression du gène *MDR1*) qui empêcherait le médicament anti-cancéreux d'atteindre une concentration assez grande pour être efficace dans la cellule tumorale.

La perspective pour le traitement des tumeurs serait d'obtenir une sous expression ou inhibition totale de l'expression de la Gly-P, permettant, une diminution de la résistance des cellules aux traitements. Mais l'inactivation du gène dans les cellules tumorales de façon non ciblé entraînerait, le même effet dans les cellules saines et serait alors probablement délétère en Gly-P [32, 33].

A la vue de ces constatations, il serait donc intéressant de connaître les conséquences d'une inactivation du gène *MDR1* chez l'Homme à l'aide de modèle animaux tels que la Souris ou le Chien.

Le Chien et particulièrement le Colley et ses apparentés sont prédisposés à une mutation de ce gène (**délétion de 4pb**) qui équivaut à une invalidation du gène. Cette race est donc particulièrement intéressante pour modéliser l'effet d'une inactivation, à l'échelle de l'organisme, du gène *MDR1*. L'autre stratégie vise à inactiver de façon sélective le gène *MDR1* dans les cellules tumorales.

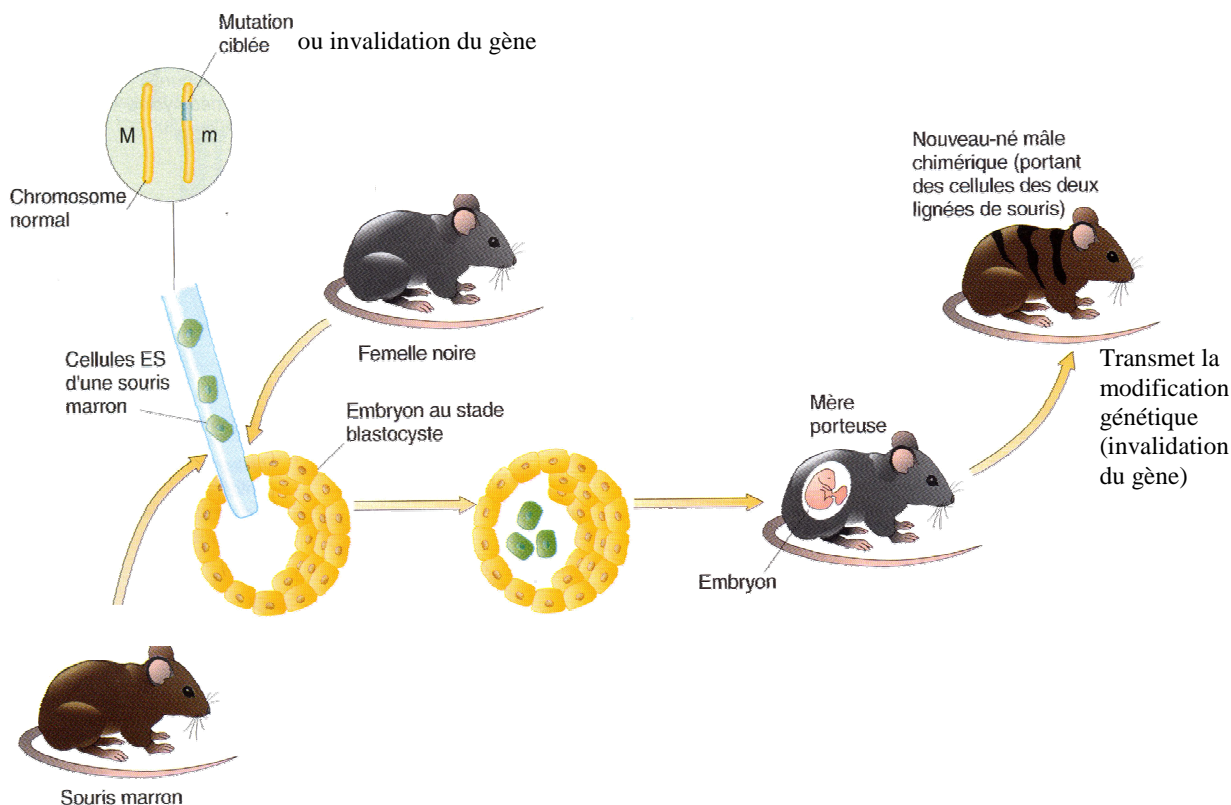
1.3. Modèles de souris invalidées pour les gènes MDR1

1.3.1. Constitution des lignées

A partir de banques d'ADN de souris de la lignée 129, les séquences génomiques des gènes *mdr1* ont été clonées. Certains exons de ces gènes ont été remplacés par des cassettes de sélection (en générale le gène de résistance à la néomycine). Ainsi, on a obtenu l'invalidation des gènes *mdr1a* ou *mdr1b* ainsi que l'acquisition d'une résistance à la néomycine.

Cette modification génétique a été effectuée dans des cellules embryonnaires souches (ES) qui ont ensuite été réinjectées dans des blastocystes de souris de la lignée C57BL/6. Les souriceaux obtenus suite à la réimplantation des blastocystes dans des mères porteuses ont été génotypés pour vérifier l'invalidation effective du gène *mdr1a* ou *b*. Les souris modifiées génétiquement ont été croisées entre elles afin d'obtenir des individus homozygotes mutés (*mdr1a* *-/-* ou *mdr1b* *-/-*) (*figure 6*).

Figure 6: Principe de constitutions de lignée de souris invalidés pour un gène donné d'après T. Strachan [71]



1.3.2. Conséquences de la mutation

1.3.2.1. Pharmacocinétique

En 1994, les études ont révélées dans un premier temps une physiologie de base normale des souris invalidées pour le gène *mdr1a* grâce à des examens histologiques, biochimiques et sanguins.

La découverte de la responsabilité de la Gly-P dans le domaine de la pharmacocinétique a été mis en évidence lors d'intoxication, chez des souris mutées, à des antiparasitaires (**Ivermectine**) par l'équipe de Schinkel *et al.*. Quand des souris invalidées pour le gène *mdr1* furent infestées par des parasites et le traitement anti-parasitaire administré avec un protocole usuel, des signes d'intoxication (immobilisation, incapacité à se lécher, tremblements, augmentation de la fréquence respiratoire et coma) apparurent ainsi qu'une forte létalité. Les souris étaient toutes homozygotes pour l'invalidation du gène *mdr1a*. La concentration cérébrale en Ivermectine était 80 à 90 fois supérieure à celle des souris sauvages. Dans les autres organes et le plasma, la concentration était 3-4 fois supérieure. Il s'agissait donc soit d'un déficit d'excrétion, soit d'une augmentation de l'absorption du intestinale du principe actif soit, des deux [63].

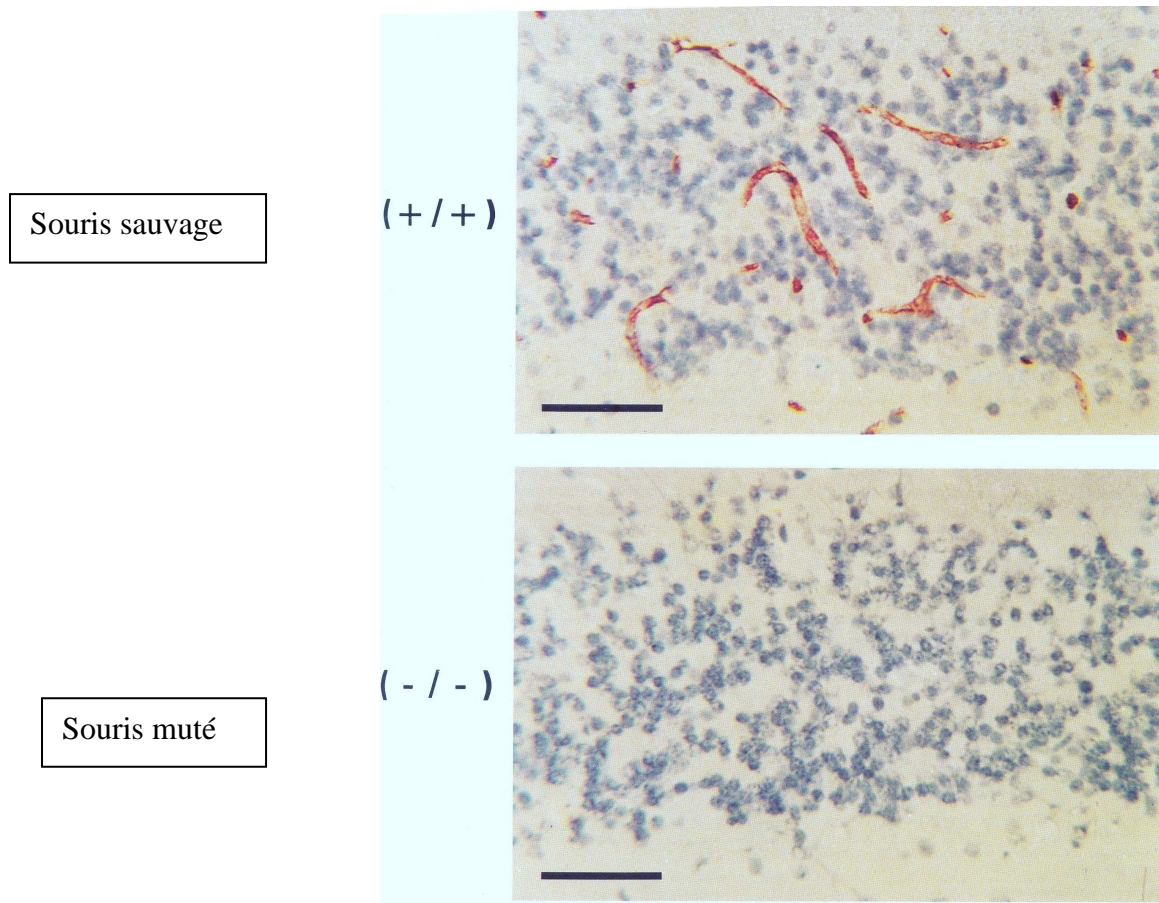
Il est utile de rappeler que l'action antiparasitaire de certains médicaments de la classe des Avermectines (lactones macrocycliques issues de *Streptomyces avermitilis*) est fondée sur leur capacité à se lier spécifiquement sur les canaux Cl⁻ dépendant des récepteurs GABA ou glutamate au niveau du système nerveux périphérique des parasites. L'action résultante est alors le blocage de

l'influx chlorique et une absence de transmission synaptique provoquant une paralysie spastique létale.

Chez les mammifères, les neurones portant les récepteurs GABA, sont exclusivement retrouvés au niveau du système nerveux central et sont protégés par la Gly-P présente sur la barrière hémato-méningée. Ainsi, l'animal ne subit pas les mêmes conséquences que le parasite [64].

La présence de la Gly-P dans les vaisseaux capillaires des souris sauvage et l'absence du même transporteur dans les souris mutées intoxiquées sont illustrées par la *figure 7*.

Figure 7: Présence de la Gly-P dans les vaisseaux capillaires cérébraux de souris d'après Schinkel *et al.* [63]



Un marquage immunohistochimique permet d'observer la présence de glycoprotéines (MDR1a et MDR1b) sur des sections d'encéphale de souris génotype sauvage et muté. La couleur rouge indique la fixation des anticorps monoclonaux C219 par la méthode du complexe avitine-biotine-peroxydase. L'anticorps reconnaît deux épitopes conservés et localisés sur le 1^{er} et le 2nd domaines du transporteur.

Dans un deuxième temps, la même équipe a reconfirmé la présence d'une accumulation médicamenteuse accrue dans le cerveau de ces souris (le taux cérébral en Ivermectine était 100 fois supérieur aux souris sauvages 4h après l'administration *per os* et celui de la Vinblastine 3 à 4 fois supérieur). Il a également été observé une diminution de l'élimination tissulaire de ces principes actifs [62,63].

L'équipe de Schinkel *et al.* a mis en évidence en 1995 de fortes concentrations de digoxine, de ciclosporine A (immunosuppresseur), de dexaméthasone (hormone glucocorticoïde) et de morphine (analgésique) au niveau cérébral respectivement, 20-50 fois supérieur, 3-4 fois supérieur et 1,7 fois supérieur chez les souris *mdr1a* (-/-) comparé aux souris sauvages. Comme la vinblastine, la ciclosporine A a augmenté temporairement dans les testicules et constamment dans les muscles, la vessie et les intestins chez les souris invalidées. La cinétique d'élimination fécale a été plus lente pour la digoxine et la ciclosporine A, chez ces individus par rapport aux souris sauvages [65].

Peu de temps après, de nombreuses études ont reconfirmé la présence d'une altération de la cinétique de distribution de la vinblastine chez les souris invalidées. De ce fait, les animaux *mdr1a* (-/-) présentaient des temps de demi-vie plus longs et une réduction de l'élimination de 25-30% du principe actif, comparés à des souris normales. De plus, il a été observé une accumulation cérébrale, hépatique et cardiaque de la molécule chez les souris (-/-) [74].

Après administration, il a également été observé, dans des lignées *mdr1b* (-/-) une augmentation de la digoxine, principal substrat de la Gly-P dans le secteur intracellulaire (principalement dans les surrénales des mâles et les ovaires des femelles non gestantes). Plus généralement, chez les souris *double knock-out* (doublement invalidées) pour les 2 locus (*mdr1a* et *mdr1b*), on a observé une augmentation tissulaire du substrat au niveau des testicules, du cerveau, des surrénales et des ovaires.

En 1999, une nouvelle étude a réaffirmé une augmentation de la dexaméthasone, après administration, dans le cortex cérébral des souris *mdr1a* (-/-). Le rôle de la GlyP dans la barrière protectrice hémato-méningée fut confirmé. La faible augmentation des corticoïdes intra-hépatiques est expliquée par le phénomène de compensation par le locus *mdr1b* chez les souris invalidées pour *mdr1a*, au niveau hépatique : **Le locus *mdr1b* est surexprimé dans le foie chez les souris mutées pour *mdr1a* (-/-)** (Cf 1.3.2.2) [66].

D'autres molécules à tropisme digestif ont également vu leur pharmacocinétique modifiée chez les souris mutées *mdr1a* (-/-). En effet, pour le loperamide (antidiarrhéique), l'ondansétron et le domperidone (antiémétiques), il a été observé une augmentation de la concentration plasmatique et tissulaire de ces produits, chez les souris *mdr1a* (-/-) comparées aux souris sauvages [62, 63].

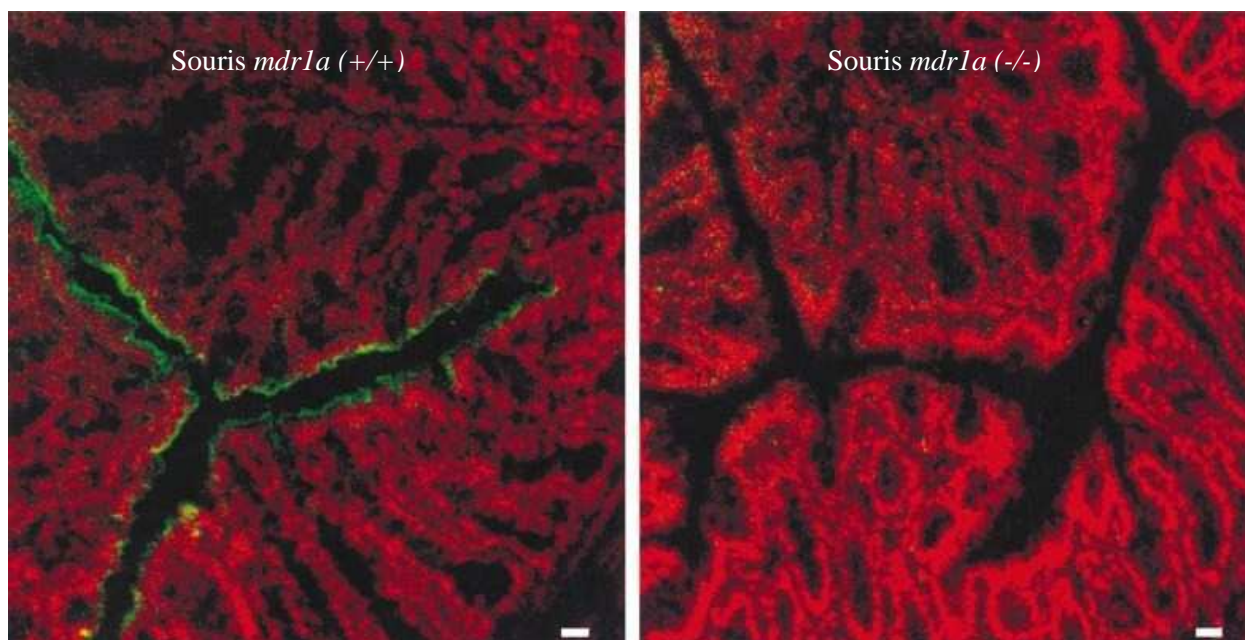
1.3.2.2. Organique

Il y a une décennie, une étude de Schinkel *et al.*, a montré que les souris *mdr1b* (-/-) avaient une viabilité, une fertilité, une gestation et une physiologie normales. Les recherches qui ont suivi se sont ensuite orientées vers la création de souris invalidées pour *mdr1a* **et** *mdr1b*. Schinkel *et al.* ont ainsi montré que les souris invalidées pour les deux gènes ne présentaient également aucune anomalie de viabilité, de fertilités ou de développement [61].

Un phénomène de compensation fonctionnelle par le gène *mdr1b* avait également été exposé chez les souris *mdr1a* (-/-) au niveau hépatique et rénal. Alors que la manifestation inverse n'a jamais été observée chez les souris *mdr1b* (-/-). Les conclusions des études portant sur l'invalidation unique d'un des deux types de transporteurs étaient donc à modérer, si le deuxième locus se surexprimait effectivement en cas de délétion du premier [66].

Un an après, Panwala *et al.* ont montré, de façon inattendue, que des souris invalidées pour *mdr1a* pouvaient présenter une inflammation spontanée intestinale dans des conditions environnementales stériles. Dans un premier temps, l'équipe a rapporté **l'absence de transporteur *mdr1a* sur la surface apicale des entérocytes chez les souris mutées *mdr1a* (-/-)** (figure 8) [50].

Figure 8: Marquage par immunofluorescence du transporteur *mdr1a* sur des coupes transversales de colon de souris sauvage *mdr1a* (+/+) et mutée *mdr1a* (-/-) d'après Panwala *et al.* [50]



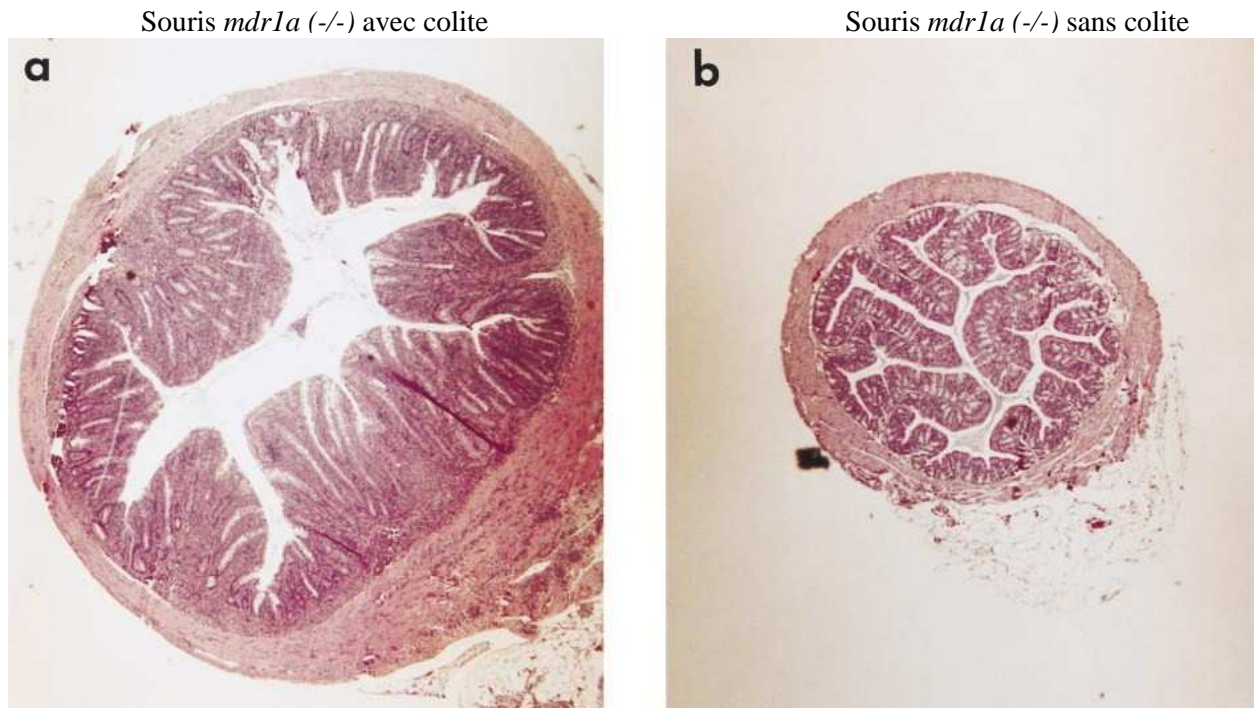
Mdr1a est exprimé sur la face apical des entérocytes du colon et visible grâce à un marquage immunofluorescent à l'aide d'anticorps anti-mdr FITC (vert) sur des coupes intestinales coliques colorées en rouge. L'échelle représente 20 µm.

Récemment, l'équipe de Bommhardt *et al.* avait montré la présence d'activité mdr (par localisation d'un substrat : la rhodamine 123) dans les lymphocytes T périphériques de la Souris sans identifier exactement le transporteur (*mdr1a*, *mdr1b* ou un tout autre transporteur) [2]. Donc dans un deuxième temps, afin d'identifier la nature exacte de ce transporteur, Panwala *et al.* ont comparé ce même flux de rhodamine dans les nœuds lymphatiques mésentériques et les lymphocytes intraépithéliaux intestinaux chez des souris sauvages et des souris *mdr1a* (-/-). L'équipe a remarqué qu'il y avait une absence totale de flux du substrat chez les souris mutées : **le gène *mdr1a* était bien exprimé dans les nœuds lymphatiques mésentériques et dans les lymphocytes T épithéliaux des entérocytes.** Une observation étonnante était alors faite : **25% des souris *mdr1a* (-/-) présentaient des symptômes cliniques digestifs** (diarrhée muqueuse) **et histologiques** (inflammation intestinale active généralisée) signes d'une colite semblable aux *Inflammatory Bowel Diseases* (IBD) ou *colite ulcéreuse humaine* dite maladie de Crohn [50].

Les lésions digestives étaient alors caractérisées par :

- ☑ un épaissement de la muqueuse (*figure 9*), une infiltration massive de cellules inflammatoires (lymphocytes T, lymphocytes B, granulocytes) au sein de la lamina propria.
- ☑ une désorganisation des couches épithéliales de la muqueuse intestinale,
- ☑ l'extension d'ulcères à travers la muqueuse jusqu'à la musculature ainsi qu'une diminution de la longueur des cryptes,
- ☑ une agrégation folliculaire infiltrée par les lymphocytes B exclusivement dans le colon.

Figure 9: Coupe transversale de la paroi intestinale d'une souris mutée *mdr1a* (-/-) avec colite et d'une souris mutée *mdr1a* (-/-) sans colite d'après Panwala *et al* [50]



Des coupes d'intestins colorées à l'aide d'hématoxyline et d'éosine ont montré un épaissement important de la muqueuse colique chez les souris *mdr1a* (-/-) présentant une colite (a) comparé aux souris *mdr1a* (-/-) sans colite (b).

De plus, les auteurs ont établi le rôle indispensable de la flore intestinale lors de l'induction et du maintien de la colite. La réduction de l'inflammation et l'absence de développement de colites avec un traitement antibiotique et un régime à base d'eau et de saccharose ont été mis en évidence (*figure 10*). Aucune bactérie exogène ni même *Helicobacter*, bactérie commensale, n'a été retrouvée dans cette flore intestinale.

Figure 10: Aspect macroscopique des intestins de souris saines, malades sans traitements antibiotiques et avec traitements antibiotiques d'après Panwala *et al* [50]



A certaines souris *mdr1a* (-/-) malades (présence de diarrhée), une administration d'antibiotiques a été effectuée pendant 10 semaines. A la fin du traitement, les souris ont été sacrifiées et leur colon examiné et comparé. On note que le colon des souris mutées *mdr1a* (-/-) malades et traitées (c) présente un aspect proche des souris sauvage (b) et une inflammation moindre que chez les souris mutées *mdr1a* (-/-) malades et non traitées (a).

Leurs recherches se sont orientées vers la responsabilité intrinsèque du système lymphoïde et non de la barrière intestinale. *In vitro*, les chercheurs ont observé l'accroissement prolifératif de cellules lymphoïdes isolées de nœuds lymphatiques mésentériques des souris *mdr1a* (-/-). Ces souris avaient été mises en contact avec des antigènes bactériens provenant de leur flore colique. De plus, ces souris présentaient une activation polyclonale des lymphocytes B. **La première conclusion était que les antigènes coliques étaient vraisemblablement la cause d'une réaction immunitaire exacerbée des lymphocytes locaux qui provoquait une colite.**

Mais étonnamment, l'équipe a remarqué l'apparition de colites chez 25% des souris mutées *mdr1a* (-/-) irradiées (absence totale de système immunitaire) ayant subi une greffe de moelle osseuse d'une souris sauvage (moelle osseuse avec des lymphocytes T pourvus de Gly-P). La responsabilité envisagée des cellules lymphoïdes fut abandonnée et les chercheurs accusèrent ainsi les cellules épithéliales de la muqueuse intestinale déletées en Gly-P. Cette conclusion a conforté le **rôle du transporteur dans la protection de la muqueuse intestinale.**

Finalement, il a été montré que l'infiltration lymphocytaire des lymphocytes B et lymphocytes T transmembranaires chez les souris invalidées pour *mdr1* s'avérait n'être pas histologiquement comparable à celle des colites retrouvées lors de maladie de Crohn. De plus les souris ne développaient pas des colites à cause d'un déséquilibre de perméabilité mais en raison de l'activation bactérienne en regard des cellules épithéliales [22].

L'équipe de Eisenbraun *et al.* a démontré la présence indispensable de la Gly-P dans le développement de sous-populations lymphocytaires intra-épithéliales. L'absence de ces lymphocytes pourrait avoir des conséquences sur l'intégrité de la paroi [10].

En 2002, Maggio-Price *et al.* a reconfirmé chez les souris mutante *mdr1a* (-/-) la présence de signes d'inflammation spontanée sévère généralisée à l'ensemble du colon (aucun germe type *helicobacter* spp étant retrouvé). Ici aussi les signes étaient [41] :

- ✓ hyperplasie des cellules épithéliales,
- ✓ dilatation et remplissage des cryptes de la muqueuse par des débris cellulaires,
- ✓ infiltration de cellules inflammatoires (lymphocytes, macrophages et granulocytes neutrophiles) dans la muqueuse et de la sous-muqueuse,
- ✓ métaplasie squameuse du rectum,
- ✓ atteinte aléatoire du caecum,
- ✓ ulcères coliques

De plus, les équipes de Maggio-Price *et al.* et Ho *et al.* ont respectivement montré que d'un côté la présence de *Helicobacter bilis* accélèrerait le développement de la maladie inflammatoire intestinale chronique et au contraire, *Helicobacter hepaticus* atténuerait la sévérité des symptômes (diarrhée) et modèrerait les lésions histologiques [22].

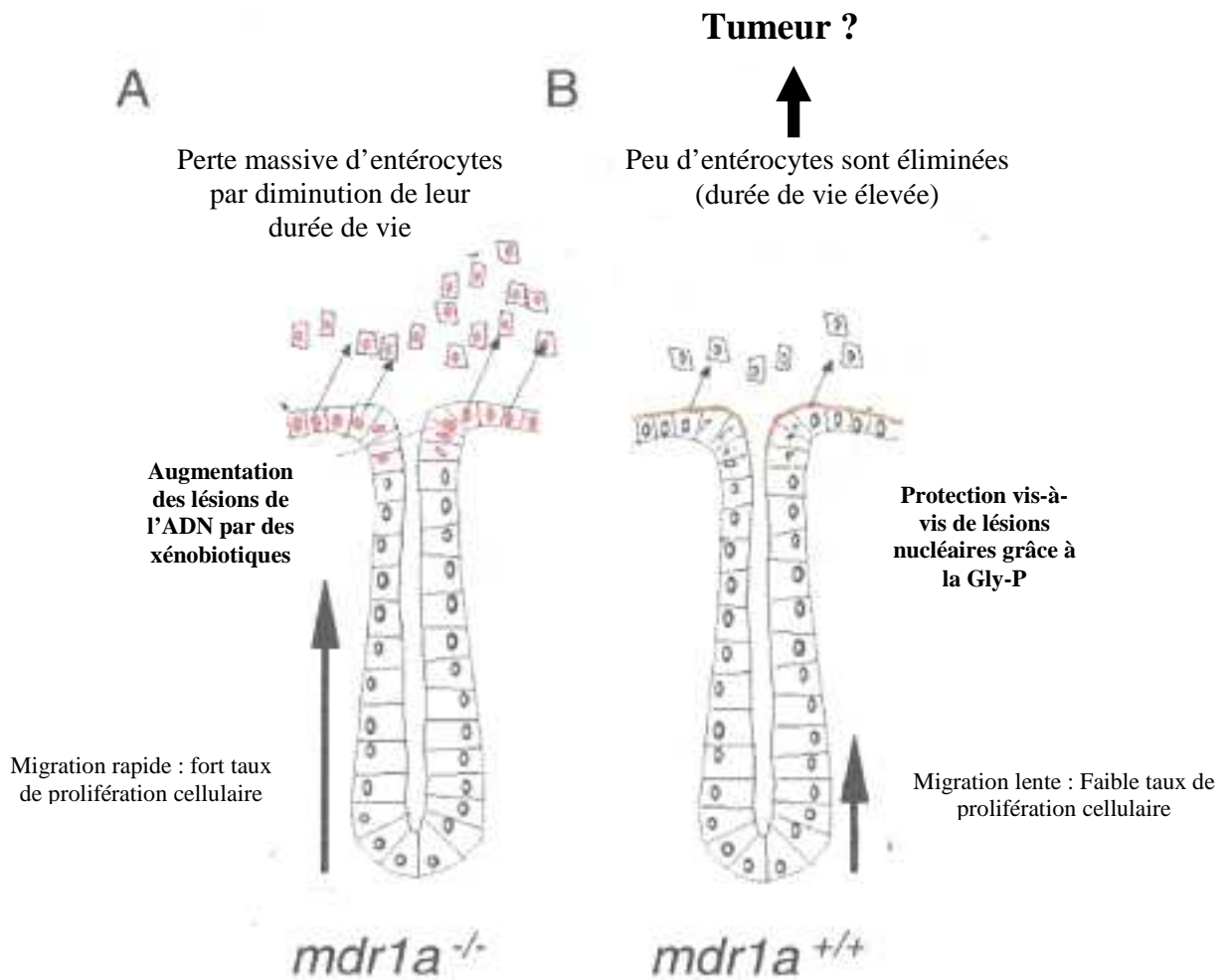
Lors d'infections avec *Helicobacter bilis* chez la souris *mdr1a* (-/-), une expansion clonale de lymphocytes T CD4+, CD8+, lymphocytes B et *Natural Killer* aurait lieu au sein des nœuds lymphatiques mésentériques mais sans corrélation vis-à-vis de la présence ou sévérité de l'inflammation intestinale. Cette réactivité lymphocytaire a été illustrée par la présence de taux élevés en Interferon gamma, *Tumor Necrosis Factor* alpha et interleukine ainsi que par l'augmentation du taux des immunoglobulines sériques IgA et IgG. Il s'emblerait que **certain micro-organismes contenus dans la flore digestive soit des facteurs d'aggravation ou de modération de lésions intestinales chez les souris mutées malades.**

Les équipes de Yamada *et al.* [78] et Mochida *et al.* [45] ont concentré leurs recherches sur la cancérologie intestinale. Ainsi, ils ont démontré qu'il existait une surexpression de la Gly-P associée à une augmentation nucléaire de la protéine β -catenin (protéine responsable de la prolifération cellulaire, normalement inactive) au niveau des adénomes intestinaux des souris mutante *Apc^{min/+}* (souris mutées dans le gène *Adenomatous Polyposis Coli* et prédisposées aux polypes intestinaux). **L'induction du gène *mdr1a* était un événement précoce dans la chronologie du développement des tumeurs intestinales.**

De plus chez ces même souris, le nombre de polypes intestinaux et coliques était réduit de plus de la moitié chez les souris mutante *Apc^{min/+}* invalidées pour les gènes *mdr1a/b* (-/-) comparé à celui des souris *Apc^{min/+}* non invalidés pour les gènes *mdr1*. Enfin l'aspect des polypes semblait différent chez ces souris invalidées (polypes plats, avec plus de matériel nécrotique). L'inhibition incomplète était vraisemblablement due à une compensation par d'autres transporteurs qui ont contribué néanmoins à l'induction des polypes. **L'absence du gène *mdr1a* chez les souris mutante *Apc^{min/+}* a contribué à diminuer le nombre et l'aspect des adénomes intestinaux.**

Ces chercheurs ont démontré *in vitro* que l'ajout d'un inhibiteur de la Gly-P (le vérapamil ou la ciclosporine) à une culture cellulaire IEC-6 (cellules intestinales de rats nouveau-nés) annulait totalement le développement polypoïde de ces cellules. Les équipes ont proposé un modèle hypothétique du rôle de la Gly-P dans le renouvellement cellulaire intestinal (*figure 11*) [78].

Figure 11: Modèle hypothétique du rôle intestinale de la Gly-P d'après Y. Mochida *et al.* [45]



(a) **Intestin d'une souris invalidée pour *mdr1a*** : L'absence fonctionnelle de Gly-P à la surface apicale des entérocytes provoque une augmentation des dommages de l'ADN spontanés et potentiellement une destruction cellulaire. Il en dérive un accroissement du taux de renouvellement du tapis cellulaire à partir des cryptes.

(b) **Intestin d'une Souris sauvage pour *mdr1a*** : L'expression de la Gly-P à la surface apicale des entérocytes évite les lésions de l'ADN provoquées par les xénobiotiques et ralentit ainsi la mort cellulaire. Les couches cellulaires se renouvellent alors plus lentement, laissant ainsi plus de chance à chaque cellule d'entrer dans un processus de tumorigenèse.














Ces nombreuses conclusions d'expériences de délétion génétique de la Gly-P chez la Souris nous permettent de nous orienter vers des conséquences principalement digestives et de toxicité à certains médicaments. Lorsque la Gly-P est absente, les observations décrites ci-dessus peuvent constituer des hypothèses pour certains chiens naturellement mutés au niveau du gène *Mdr1*. Nous pouvons conclure que la Gly-P protège l'organisme contre les composés xénobiotiques toxiques en les excréant dans l'urine, la bile et la lumière intestinale, en prévenant ainsi leur accumulation nocive dans des secteurs tels que le cerveau ou les testicules.

1.4. Anomalie génétique du gène MDR1 dans la race Colley et apparentées

1.4.1. Description de la mutation

L'introduction dans les années 1980 d'un nouvel antiparasitaire (Ivermectine) dans le domaine vétérinaire a mis en évidence une neurotoxicité fatale chez des chiens prédisposés génétiquement.

Cette neurotoxicité s'est traduite cliniquement par les symptômes suivants, qui n'étaient pas tous associés chez un même animal :

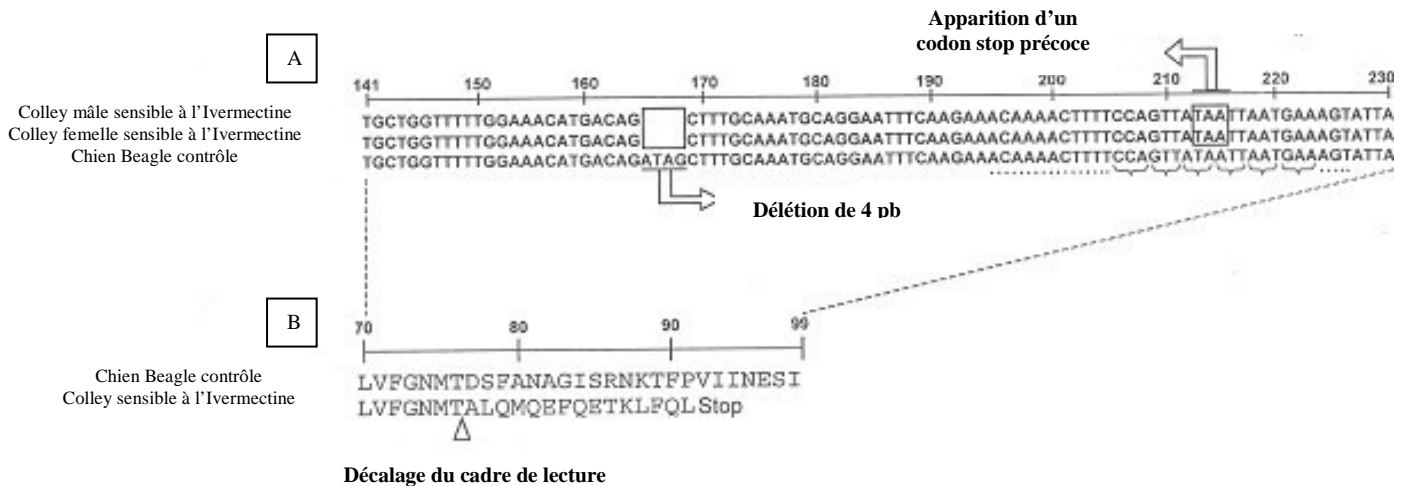
-  Faiblesse musculaire des membres
-  Vocalisations
-  Désorientation
-  Ataxie
-  Salivation
-  Marche en cercle
-  Hyperexcitabilité
-  Sensibilité accrue au bruit
-  Mydriase
-  Tremblements
-  Somnolence
-  Prostration
-  Coma

En 1987, une sensibilité chez le Colley est notée lors d'administration par voie orale dès la dose de 100µg/kg (contre 2000µg/kg pour les chiens Beagle témoin). La concentration en principe actif dans le cerveau des chiens Colley décédés suite à l'administration excédait alors celle du plasma et du foie [51].

Deux hypothèses ont été mises en avant : une diminution de l'expression du gène *MDR1* ou une mutation génétique qui rend le transporteur inactif ou absent.

L'allèle sauvage du gène *MDR1* a par la suite été caractérisé chez le Beagle et la mutation supposée présente chez le Colley sensible à l'Ivermectine a été recherchée. La mutation recherchée chez le Colley a été identifiée comme une **délétion de 4 paires de bases (ATAG) en position 164 dans le 4^{ème} exon du gène.** Cette délétion entraînerait un décalage du cadre de lecture qui provoquerait l'apparition précoce d'un codon stop (*figure 12*). La protéine ainsi codée ne présenterait plus que 91 acides aminés sur les 1281 de la protéine sauvage. Aucune activité de transport n'a été décelable chez la protéine mutée. Cela expliquerait donc la neurotoxicité de l'Ivermectine chez les Colleys homozygotes pour la mutation : **le principe actif traverserait la barrière hémato-méningée des Colleys homozygotes et ne serait pas extrait par l'action de la Gly-P codée par le gène *MDR1*** [56].

Figure 12: Organisation de la délétion des 4 paires de bases sur le chromosome 14 canin d'après Roulet *et al.* [57]



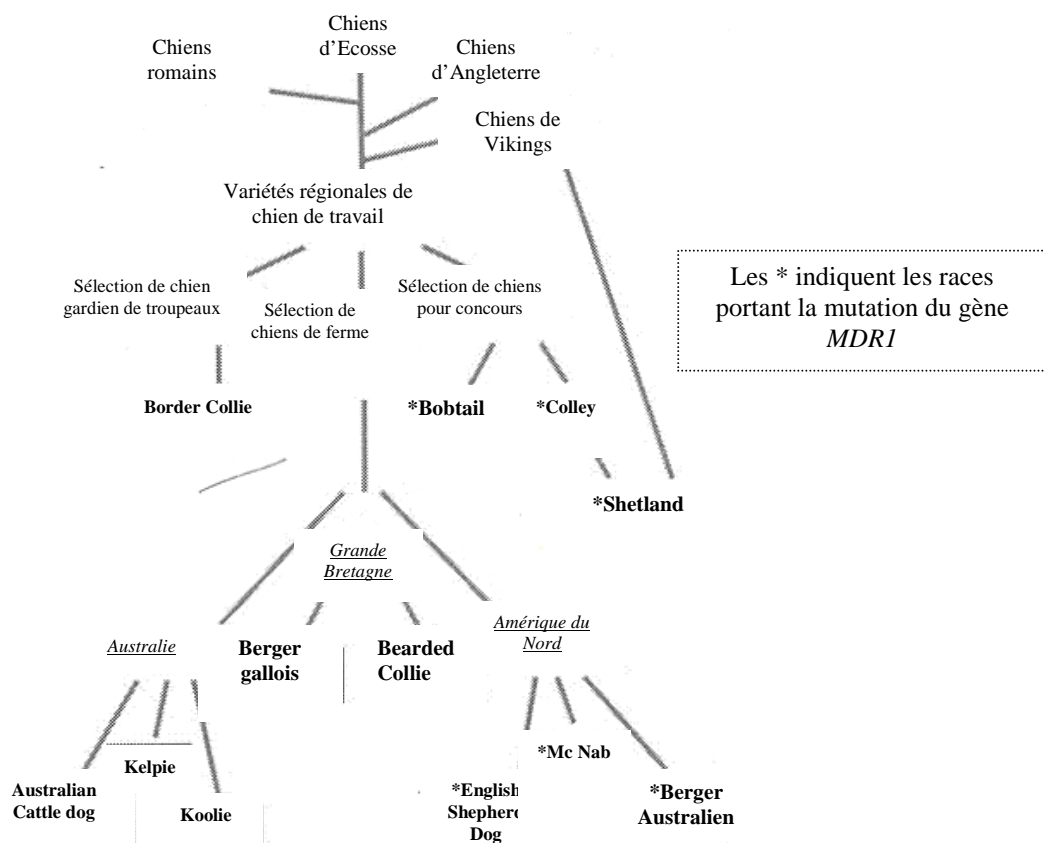
- (a) **Comparaison de la séquence d'ADN complémentaire** : La délétion des 4 paires de base est responsable d'un décalage du cadre de lecture.
- (b) **Séquence peptidique correspondante** : Présence d'un codon stop précoce en position 91 de la glycoprotéine P chez les Colleys mutés

L'équipe de Mealey a découvert que les Colleys sensibles à l'Ivermectine étaient tous homozygotes mutés (*MDR1*^{-/-}), en accord avec un **mode de transmission autosomique récessif de la sensibilité** [41].

1.4.2. Phylogénie de la mutation

La mutation a été retrouvée par Neff *et al.* dans 9 races dont 2 de chiens de chasse qui ne possèdent aucun ancêtre commun avec les bergers auxquels on avait rattaché la mutation (voir plus loin). L'étude concluait, à la lumière de recherches historiques, que tous les chiens porteurs de la délétion *MDR1* étaient des descendants d'un chien qui vivait en Grande Bretagne dans les années 1800 avant la séparations des lignées de chiens en races distinctes. La mise en place du standard officiel de la race Colley aurait permis l'établissement de la mutation dans la race. L'arbre généalogique des races de la famille du Colley est représenté dans la *figure 13* [49].

Figure 13: Arbre généalogique de la lignée des Colleys d'après Neff *et al.* [49]



Neff *et al.* ont mis en évidence la présence de la mutation dans les neuf races suivante [49]:

- ✓ Le Berger Australien (standard et miniature)
- ✓ Le Shetland
- ✓ Le Colley à poils longs et courts
- ✓ Le Border Collie
- ✓ L'English Shepherd
- ✓ Le Bobtail
- ✓ Le McNab
- ✓ Le Whippet à poils longs
- ✓ Le Silken Windhound

Ils ont également calculé la fréquence de l'allèle délétère dans ces races ainsi que la fréquence des 3 classes de génotypes (*tableau 1*).

Tableau 1: Fréquences de l'allèle MDR1 et des génotypes dans l'étude de Neff M. *et al.* [49]

Race	Nombre de chiens	allèle muté (%)	-/- (%)	+/- (%)	+/+ (%)
Berger Australien	178	16,6	1,7	29,8	68,5
Berger Australien miniature	56	25,9	3,6	44,6	51,8
Colley	263	54,6	31,2	46,8	22,0
Berger anglais	91	7,1	0	14,3	85,7
Whippet à poils longs	89	41,6	15,7	51,7	32,6
Mc Nab	35	17,1	2,8	28,6	68,6
Bobtail	151	3,6	0	7,3	92,7
Shetland	190	8,4	1,1	14,7	84,2
Silken Windhound	84	17,9	1,2	33,3	65,5

Il est à noter la présence de races telles que **Silken Windhound** et le **Whippet à poils longs** qui n'appartiennent pas à la lignée du Colley. Alors que la mutation du Whippet à poils longs serait issue d'un mélange avec le Shetland (le seul éleveur qui a reconstruit la race dans les années 50 possédait aussi des Shetlands et la séquence haplotypique de *MDR1* est identique chez le Shetland et le Whippet), le Silken Windhound est directement issu d'un croisement avec le Whippet [51].

La délétion de 4pb du gène *MDR1* a également été mise en évidence chez le **Berger Blanc Suisse** (également appelé Berger Américain). Cette race, issus du Berger Allemand, ne possède pas d'ancêtres communs avec les Colleys. L'haplotype présent chez les Bergers Blancs Suisse mutés dans le gène *MDR1* est identique par descendance à l'un de ceux présent dans les races apparentées au Colley (Whippet, le Silken Windhound, le Shetland et le Berger Australien) mais pas à celui du Colley. **Il est donc fort probable que la mutation *MDR1* du Berger Blanc Suisse provienne des lignés de chiens de chasse (Whippet et Silken Windhound) plutôt que du lignage des bergers** [17].

La race **Elo**, potentiellement concernée par la mutation, est un croisement entre le Bobtail, le Chow-chow, l'Eurasien, le Samoyède, le Dalmatien, le Pékinois, le Loulou de Pomeranie et le Spitz. L'hypothèse a été que les 4 Bobtails responsables de la création de la race aient été porteurs de la mutation (en sachant que 23% du génome de cette nouvelle race provient du Bobtail). Un échantillon de 177 chiens de la race a donc été analysé et n'a néanmoins pas révélé la présence de la mutation *MDR1* dans la race [12].

La fréquence de l'anomalie chez le Colley, principale race porteuse de la mutation, a été décrite dans diverses publications à travers le monde (*tableau 2*):

Tableau 2: Fréquence des génotypes *MDR1* chez le Colleys dans divers pays [16, 25, 34, 42, 44]

Pays	Homozygote <i>MDR1</i> (-/-)	Hétérozygote <i>MDR1</i> (+/-)	Homozygote <i>MDR1</i> (+/+)	Référence et année
France	48%	32%	20%	25 (2004)
Allemagne	33%	48%	19%	16 (2005)
Australie	24%	64%	12%	44 (2005)
USA	35,5%	42%	22,5%	42 (2002)
Japon	42%	33%	25%	34 (2005)

Outre les proportions inégales, on remarque nettement que toutes les lignées de Colleys des 4 continents sont touchées par la mutation du gène *MDR1* et dans des proportions non négligeables.

A partir de ces données, il est possible de calculer la prévalence de l'allèle *MDR1* mutés dans chaque pays pour la race du Colley principalement (*tableau 3*) :

Tableau 3: Prévalence des allèles mutés chez les Colleys et apparentés dans divers pays

Pays	Colley	Bergers Australien	Shetland
France	64%		
Allemagne	54,6%		
Australie	56%		
USA	56%		
Japon	58,3%	33,3%	1,2%

1.4.3. Sensibilité avérée à certains principes actifs et autres anomalies

Dès l'année 1983, il est montré qu'une sensibilité spécifique est retrouvée chez le Colley lors d'administration d'Ivermectine. Cette sensibilité n'est alors pas décrite dans d'autres races [59,67]. Les symptômes observés chez les Colleys sensibles sont essentiellement :

- ↗ Ataxie
- ↗ Vocalisation
- ↗ Excitation
- ↗ Hyper extension de la tête
- ↗ Somnolence
- ↗ Mydriase
- ↗ Ptyalisme
- ↗ Tremblement
- ↗ Dépression
- ↗ Coma

Dans certains cas, l'animal décède.

La neurotoxicité du loperamide chez le Colley est exposée par Hugnet *et al.* en 1996. L'équipe émet l'hypothèse d'un transporteur commun à l'Ivermectine au niveau de la barrière hémato-méningée [26].

D'autres cas d'intoxications suivront et la relation entre les porteurs de la mutation et les symptômes de toxicité est rapidement mise en évidence. Seul un traitement à la Naloxone (antagoniste des récepteurs de la morphine) peut être administré lors de cas sévères [21].

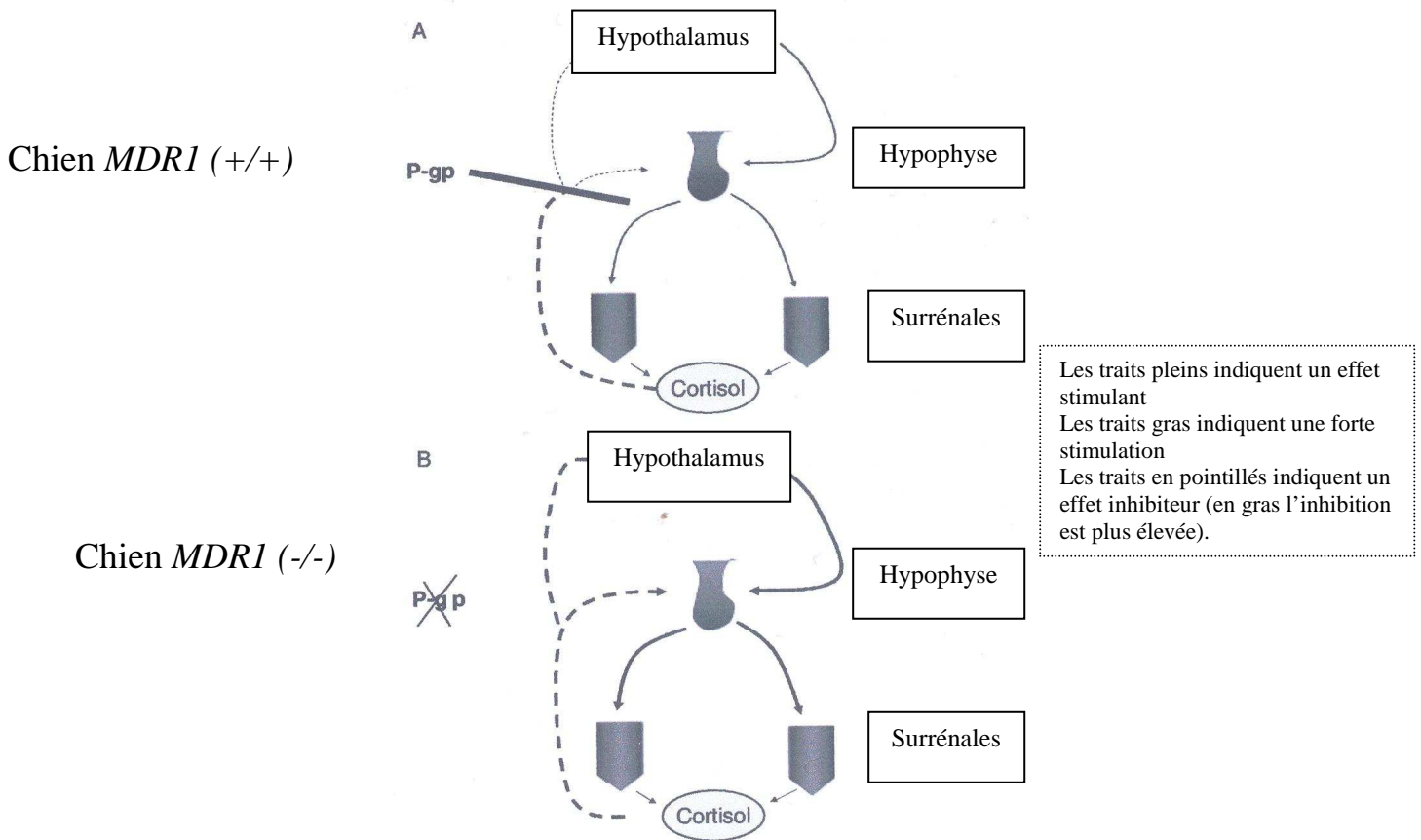
En 2006, le cas d'un Colley ajoute deux molécules à la liste des produits dangereux pour les chiens sensibles à l'Ivermectine. Ainsi l'utilisation à des doses usuelles de digoxine et de mexiletine (antiarythmique), a provoqué des symptômes nerveux (marche en cercle, confusion, anxiété, pousse au mur) chez un individu, qui a alors été génotypé muté *MDR1* (-/-) [21].

Puis la doramectine (antiparasitaire) vient compléter la liste des molécules dangereuses à ne pas administrer aux chiens mutés [17]

En 2007, l'équipe de Mealey *et al.* a montré le rôle de la Gly-P dans l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien. Il a noté des différences significatives dans la physiologie de l'axe entre les chiens homozygotes mutés et les chiens de génotype sauvage. Chez des individus mutés *MDR1* (-/-), le taux basal de cortisol plasmatique et après stimulation à l'ACTH était inférieur à celui des chiens avec le génotype sauvage (+/+) [43]. Ils ont également noté que le taux d'ACTH plasmatique des chiens mutés (-/-), après administration de dexaméthasone à dose forte, était moins élevé que celui des chiens sauvage (+/+). L'hypothèse évoquée était que l'absence de la Gly-P, qui limite normalement le passage des corticostéroïdes dans le cerveau, provoquerait une augmentation cérébrale des concentrations hormonales en stéroïdes. **Ainsi le chien déficitaire en Gly-P cérébrale aurait un rétrocontrôle plus fort sur l'hypothalamus qui bloquerait la sécrétion chronique d'ACTH et de cortisol (figure 14).**

Mais contrairement aux souris, lors des stimulations à la dexaméthasone à dose faible, les chiens mutés ne présentaient pas de réponse cortisolémique significativement inférieure à celle des chiens non mutés.

Figure 14: Représentation schématique de l'axe Hypothalamo-hypophysaire-surrénalien chez les chiens à *MDRI* mutés et sauvages d'après Mealey *et al.* [43]



- (a) **Chien avec un génotype *MDRI* sauvage :** La Gly-P est présente sur la barrière hémato-méningée et limite l'entrée du cortisol à l'intérieur du cerveau. Ceci limite le rétrocontrôle négatif du cortisol sur la sécrétion de la CRH (*corticotropin releasing hormone* ou corticolibérine) et de l'ACTH (*Adrenocortico tropic hormone* ou hormone corticotrope)
- (b) **Chien avec un génotype muté pour *MDRI* :** L'absence de la Gly-P augmente la concentration du cortisol dans le cerveau qui provoque un rétrocontrôle élevé sur la sécrétion de la CRH et de l'ACTH et donc une sécrétion abaissée de cortisol.

Ces constatations permettent d'éclairer certaines observations cliniques réalisées chez les chiens de race Colley et apparentés. Dans certains cas, des chiens de ces races présentent une mauvaise réponse au stress (choc septique, maladie, hospitalisation) et une mauvaise réponse aux thérapeutiques appropriées. Un mauvais fonctionnement de l'axe corticotrope chez les chiens *MDRI* homozygotes mutés pourrait être responsable d'une insuffisance surrénalienne durant les phases de stress ou lors de maladies [43].

2. LES MALADIES INTESTINALES CHRONIQUES INFLAMMATOIRES CHEZ LE CHIEN

Les maladies intestinales chroniques inflammatoires (MICI) sont retrouvées aussi bien chez l'Homme que chez le Chien. La maladie de Crohn et la recto-colite hémorragique sont des maladies qui posent un problème de santé publique en médecine humaine. Chez le Chien on retrouve différentes entités nosologiques :

- ✧ la colite hyperéosinophilique,
- ✧ la colite ulcéraive histocytaire,
- ✧ la colite lymphoplasmocytaire,
- ✧ l'entérite régionale

2.1. Etude clinique

2.1.1. Symptômes

Les principaux symptômes chez le Chien, ont été résumés par Levent [38], ce sont :

- ➔ La diarrhée chronique qui est le signe le plus fréquent (causée par la perturbation de la motilité du côlon, une réduction de l'absorption d'eau et d'électrolytes et une sécrétion active d'eau et d'électrolytes). Elle peut avoir 2 origines topographiques :

- ▣ L'intestin grêle :

- stéatorrhée, méléna et présence d'aliments non digérés
- abattement et perte de poids

- ▣ Le colon :

- augmentation de la fréquence d'émission des selles qui sont glaireuses semi-solides à solides et une dyschésie ou hémochésie.
- absence de perte de poids.

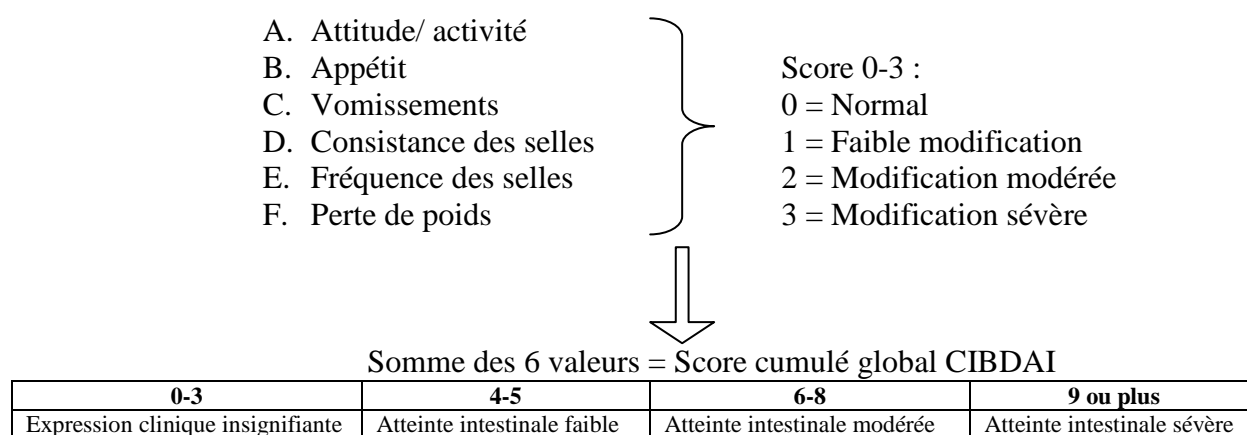
- ◇ Les vomissements brutaux liés à une atteinte de l'estomac ou de l'intestin grêle ou du colon
- ◇ L'anorexie
- ◇ La déshydratation
- ◇ La perte de poids
- ◇ Les douleurs abdominales
- ◇ La léthargie
- ◇ Le changement de comportement
- ◇ Les atteintes hépatiques par contamination ascendante par les voies biliaires ou par bactériémie portale...

2.1.2. Exploration de la gravité de l'inflammation

La difficulté réside dans la relation qui existe entre la sévérité des symptômes et celle de l'inflammation.

L'équipe de Jergens a mis en place un système de gradation des symptômes canins par l'établissement d'un score directement lié à la gravité de l'inflammation (*figure 15*). Il s'agit du **CIBDAI** (*Canine Inflammatory Bowel Disease Activity Index*). Ce score a été corrélé avec la sévérité des lésions histologiques intestinales et aux concentrations en protéine C activée, témoin du stade inflammatoire [30].

Figure 15: Critère de gradation des maladies intestinales chroniques inflammatoires d'après Jergens [30]



D'autres méthodes d'exploration de l'inflammation peuvent également être envisagées [29]:

L'endoscopie gastro-intestinale permet d'explorer l'aspect macroscopique, la friabilité et l'érosion de la muqueuse digestive.

L'analyse histologique de la muqueuse peut grâce à un système de score, évaluer l'inflammation. L'accroissement du nombre des lymphocytes, les altérations de la muqueuse et les modifications de la surface épithéliale sont des critères de gravité.

L'évaluation de marqueurs de l'inflammation a également été proposée. Ainsi il est possible de doser dans les sécrétions coliques chez l'Homme et le Chien des Ig ou les nitrites (marqueur fiable de l'inflammation intestinale), les anticorps cytoplasmiques anti-neutrophiles, les messagers cytokiniques (ARNm) témoins de l'altération de la muqueuse digestive, les lymphocytes T, les lymphocytes B et les mastocytes de la muqueuse mais aussi d'autres molécules dans le sang telle que la protéine C réactive sérique. Ces marqueurs ne sont malheureusement jamais utilisés en médecine vétérinaire courante.

2.2. *Physiopathogénie*

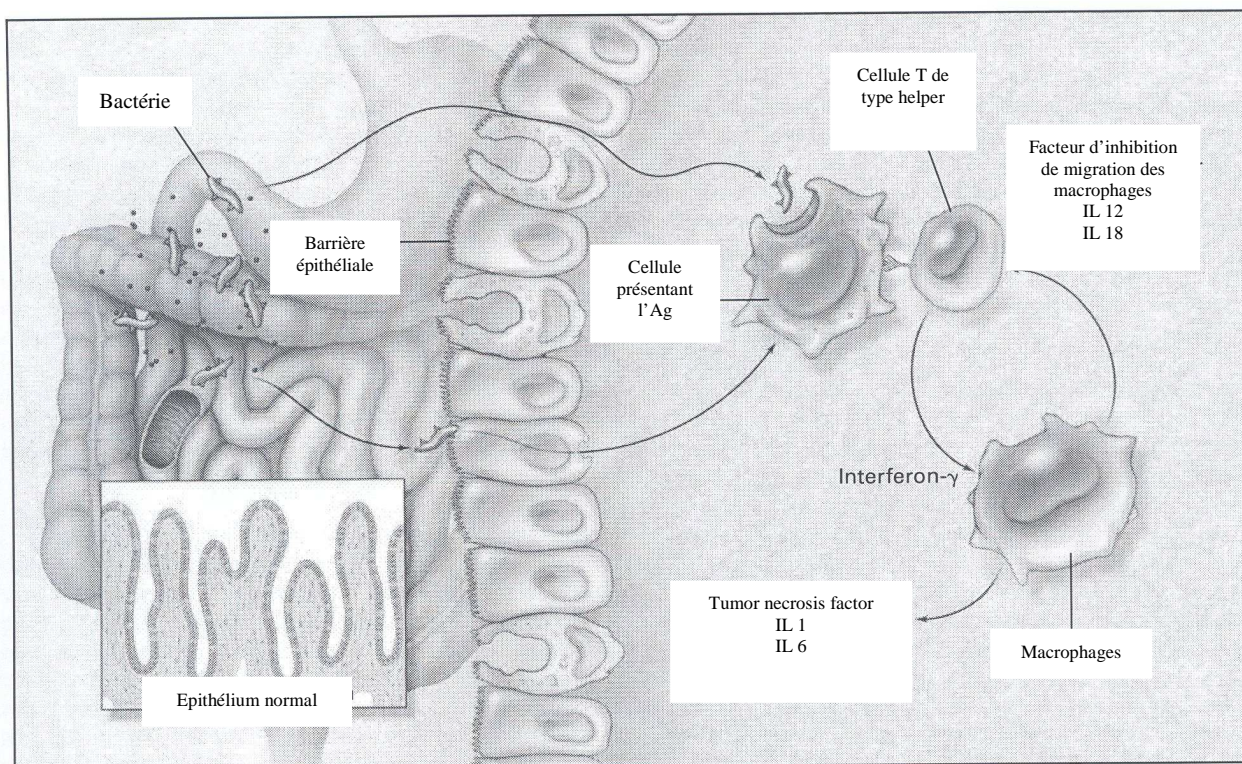
2.2.1. Etiologie

2.2.1.1. Immunopathologie de la muqueuse intestinale :

La pathogénie des maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) reste encore obscure. Il pourrait s'agir d'une activation suite à un défaut intrinsèque de ce système immunitaire (activation constitutive ou défaillance d'un mécanisme de régulation) ou bien d'une activation suite à une stimulation continue, due à un changement dans la barrière épithéliale de la muqueuse. Chez des patients atteints de la maladie de Crohn la réaction inflammatoire est dominée par un phénotype associant la présence de lymphocyte CD4+ avec une production d'interféron γ et interleukine 2 alors que chez les patients atteints de colites ulcéraives chroniques se sont plutôt l'interleukine 5 et le facteur TGF β (*transforming growth factor β*) qui prédominent associés à des lymphocytes CD4+ également [19].

L'intégrité de la barrière peut être compromise par des variations génétiques, lors d'une lésion ou lors de la présence d'agents exogènes (anti-inflammatoire par exemple). Lors d'un phénomène chronique, la réaction inflammatoire excessive est permise par la stimulation du système immunitaire par des composés produits par des bactéries commensales de la lumière ou des antigènes du bol alimentaire. Les antigènes de ces bactéries rentrent des les entérocytes, provoquant ainsi la cascade inflammatoire via les cellules dendritique et les lymphocytes T *helper* de type 1 (*Figure 16*) [52].

Figure 16: Pathogénèse des maladies intestinales chroniques inflammatoires chez la souris d'après Podolsky et al. [19]



L'étude de lignées de souris a montré que l'activation des macrophages provoquerait la production d'interleukine 12, 18, du facteur inhibiteur de migration des macrophages et serait alors responsable de la stimulation des lymphocytes *T helper* de type 1 (Th1). Ces derniers activeraient les macrophages qui produiraient alors des interleukines 1 et 6 et du TNF (*tumor necrosis factor*) en une sorte de « cercle vicieux » inflammatoire au niveau des entérocytes.

2.2.1.2. Eléments immunologiques circulants

On a pu mettre en évidence une augmentation des titres sériques en anticorps (principalement des IgA) dirigés contre les antigènes alimentaires, épithéliaux coliques et les glycoprotéines du mucus dans les maladies digestives chroniques [38].

Contrastant avec ce nombre croissant d'anticorps, les lymphocytes B ont été observés en quantité restreinte. Ceci est dû probablement à une séquestration sur le lieu de l'inflammation dans la muqueuse. En contrepartie leur activité est fortement augmentée. Le nombre de lymphocytes T est constant mais leur activité contre les cellules épithéliales est augmentée.

En résumé, lors de MICI, on observe une augmentation de l'activité des systèmes cellulaires B et T. L'augmentation de la réponse immunitaire des lymphocytes muqueux envers les antigènes de la muqueuse peut provenir soit de l'augmentation de l'exposition du système immunitaire à ces antigènes suite à une perméabilité accrue, soit d'un dérèglement primaire de l'immunité de la muqueuse.

2.2.1.3. Les réponses d'hypersensibilité lors de MICI

Il existe un consensus général concernant la pathogénie de la maladie : elle s'explique par une réponse d'hypersensibilité à des antigènes luminaux (alimentaire, parasitaire, bactérien). Ce sont des réponses inflammatoires exubérantes d'origine immunitaire.

Les quatre types d'hypersensibilité peuvent être envisagée (*figure 17*) :

↳ **Hypersensibilité de type 1**

Cette hypersensibilité immédiate est à l'origine de la production d'IgE suite au contact avec des allergènes. Ces anticorps se fixent au niveau des mastocytes entraînant alors leur dégranulation ainsi que la libération de nombreux facteurs de l'inflammation (histamine, sérotonine, leucotriène, PAF = *platelet activating factor*, protéases) etc. Certains attirent les granulocytes éosinophiles qui libèrent des produits toxiques (radicaux libres). Les entérocytes subissent alors d'important dommage dans ce type de réaction d'hypersensibilité. Il existe des prédispositions génétiques à développer ce genre de réaction. Cette hypersensibilité expliquerait la pathogénie des MICI éosinophiliques.

↳ **Hypersensibilité de type 2**

Cette hypersensibilité cytotoxique, fait intervenir la toxicité dépendante des anticorps, que ce soit suite à l'activation du complément ou grâce à l'activité lytique de cellules cytotoxiques. Cette hypersensibilité expliquerait la pathogénie des MICI lymphoplasmocytaires canines.

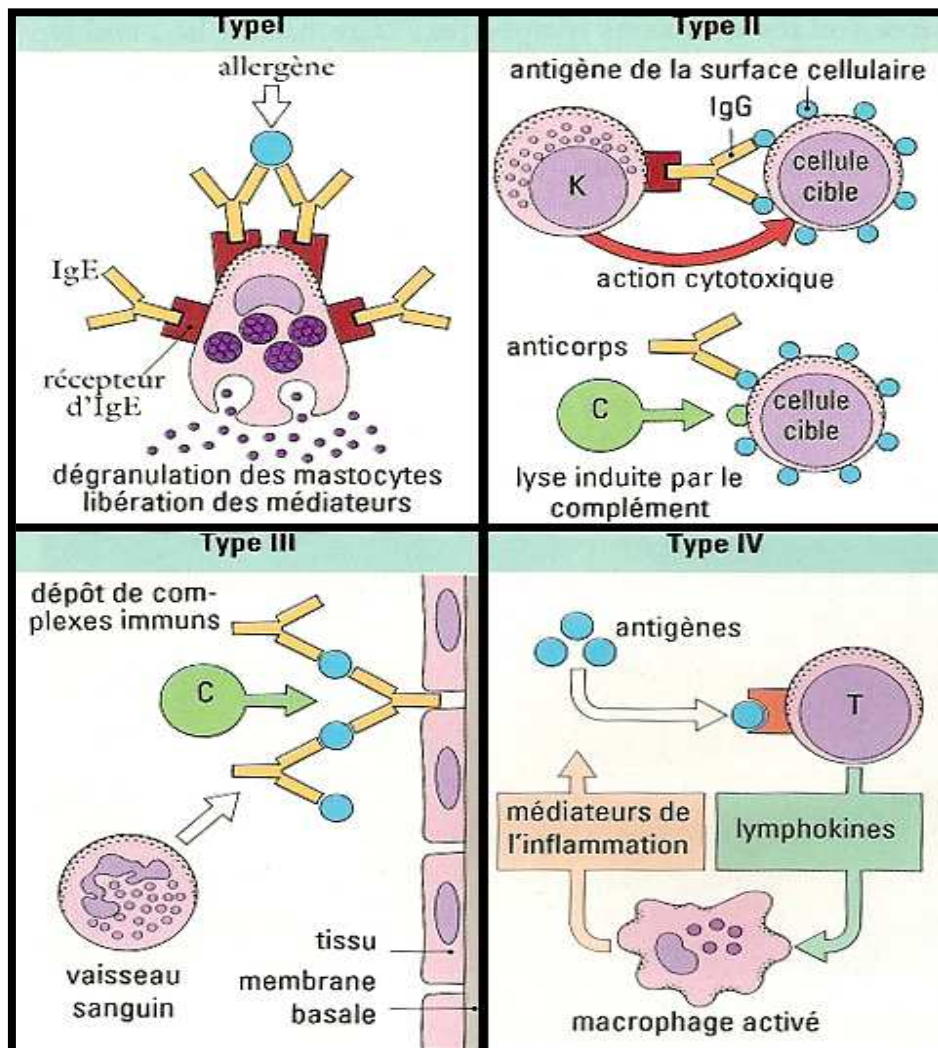
↳ **Hypersensibilité de type 3**

Cette hypersensibilité à immuns complexes est caractérisée par le dépôt de complexes immuns circulants sur les cellules. La fixation du complément entraîne la formation d'un processus inflammatoire au sein du tissu. Cette hypersensibilité n'est pas associée à ce jour à un type de MICI.

↳ **Hypersensibilité de type 4**

Cette hypersensibilité retardée dépend de la libération, par les lymphocytes T sensibilisés, de substances chimiotactiques entraînant l'inflammation, l'infiltration de cellules phagocytaires et la mort cellulaire. Cette hypersensibilité expliquerait la pathogénie des entérites granulomateuses.

Figure 17: Représentation schématique des quatre types d'hypersensibilité d'après Roitt et al. [56]



2.2.2. Déterminisme génétique

D'après Podolsky *et al.*, les facteurs génétiques suivant modulent la maladie [52]:

Chez l'Homme,

- Les mêmes prévalences ne sont pas retrouvées dans les différents types de populations humaines.
- Il y a un risque de développer une MICI plus élevé chez les personnes apparentées au 1^{er} degré d'un patient.
- Les vrais jumeaux sont plus touchés que les faux jumeaux.
- Il existe une similitude entre les sites de lésions chez les membres atteints d'une même famille.

Chez l'animal,

- ✦ l'étude de lignés de souris avec des altérations génétiques a montré une prédisposition à développer des colites.
- ✦ Aucun gène en particulier n'est responsable du développement de MICI, mais il semble impliqué un ensemble de gènes qui codent pour des protéines impliquées l'intégrité de la barrière épithéliale ou la réponse immunitaire.
- ✦ des bactéries commensales sont nécessaires pour le développement des IBD chez des hôtes sensibles génétiquement.

2.2.3. Rôle de la glycoprotéine P

Divers études ont des conclusions opposées sur le rôle potentiel du transporteur dans la formation des colites ulcéraives ou Maladie de Crohn.

Nous avons déjà établi que la Gly-P est un protecteur de la muqueuse intestinale. Il pourrait être, à juste titre, envisagé que la dérégulation ou disparition totale du transporteur puisse être responsable de l'induction de maladie chronique digestive. L'équipe de Panwala *et al.* a déjà proposé cette hypothèse grâce à un modèle de souris délétère pour le gène *mdr1a*. Ainsi la suppression de la Gly-P aurait pour conséquence un envahissement de la muqueuse digestive par des antigènes exogènes [50].

Chez l'Homme, pour certains haplotypes au locus *MDR1* sont associés à une prédisposition à développer des maladies digestives chroniques. Ainsi certains haplotypes sont plus fréquemment retrouvés chez les patients atteints de colites ulcéraives que dans la population générale [23].

Les résultats des travaux de l'équipe de Greger ont montré que le taux d'expression duodénale du gène *MDR1* était plus élevé chez les chiens ayant une diarrhée d'origine alimentaire que chez les chiens ayant une inflammation chronique intestinale ainsi que chez les chiens témoins. L'absence du transporteur pourrait être donc responsable de la présence d'une maladie chronique inflammatoire. Et il serait donc **possible de distinguer une diarrhée d'origine alimentaire d'une maladie inflammatoire chronique de l'intestin à l'aide de ce marqueur** [19].

Le système régulateur de l'expression du gène *MDR1* pourrait également être impliqué. En effet, l'activité du récepteur PXR (*pregnane X receptor*) et une dérégulation du métabolisme des xénobiotiques contribuerait d'après Langman *et al.* au développement des colites ulcéraives humaines [37] (voir 1.1.3.)

Enfin les interactions complexes de la Gly-P avec le système cytochromique P450 (pour l'absorption, le métabolisme et l'excrétion de xénobiotiques) et l'absence de bonnes connaissances des autres récepteurs que la Gly-P expliquent les divergences obtenus dans les études consacrées aux rôles de la Gly-P dans les maladie gastro-intestinales en général [22].

2.2.4. Traitement

Selon les auteurs, la liste des principes actifs élaborés dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques intestinales est longue. On retrouve l'acide aminosalicylique, les corticoïdes, la sulfasalazine, les immunosuppresseurs et immunorégulateurs (azathioprine, mercaptopurine, ciclosporine A...), les Anti-TNF, ou même les antibiotiques (métronidazole). Il est à noter que certaines de ces molécules appartiennent à la liste des substrats de la Gly-P : l'absence ou la présence du transporteur pourrait être en relation avec les résultats mitigés de guérison des MICI [52].

2.3. Conclusion

Les MICI sont caractérisées par une hyperactivation du système immunitaire au niveau de la muqueuse intestinale (réactions d'hypersensibilité envers les antigènes luminaux) et une perturbation de la balance entre facteurs pro et anti-inflammatoires en faveur d'une inflammation néfastes de la muqueuse. L'origine la plus probable de ces anomalies serait une déficience de la fonction suppressive du GALT (*gastro-intestinal associated lymphoid tissue* qui correspond au système immunitaire intestinal), d'origine primaire (génétique avec *MDR1* ?) ou secondaire (dépassement des capacités de protections vis-à-vis d'une surexposition d'antigène).

DEUXIEME PARTIE

ETUDE EXPERIMENTALE

1. BUT DE L'ETUDE

Sur la base de certains résultats effectués sur la Souris, l'apparition de maladies digestives consécutives à la délétion du gène *MDRI* laisse entrevoir la possibilité, pour certains chiens naturellement mutés dans le gène *MDRI* à développer des inflammations chroniques du tube digestive. Nous avons donc testé l'hypothèse d'une relation entre le gène *MDRI* et la physiologie digestive. Nous avons orienté notre étude sur ce point sans oublier que le gène *MDRI* peut être impliqué dans d'autres fonctions organiques.

2. ANIMAUX, MATERIEL ET METHODES

2.1. Sélection des populations échantillons

A partir du logiciel CLOVIS (base de données d'indentification de tous les animaux amenés à l'Ecole Vétérinaire Nationale de Maisons-Alfort à partir de 2004), nous avons sélectionné les chiens pouvant rentrer dans notre étude (critères ci-dessous). Ces derniers étaient venus pour de simples vaccins, pour une consultation générale, pour consultation spécialisée ou pour une chirurgie.

2.1.1. Race

Nous avons sélectionnés les races de Bergers concernées par la mutation du gène *MDRI* en ne gardant que celles retrouvées communément en France métropolitaine soit :

- ↪ **Le Berger Australien**
- ↪ **Le Berger Blanc Suisse ou Berger Américain**
- ↪ **Le Border Collie**
- ↪ **Le Colley**
- ↪ **Le Shetland**

2.1.2. Age

Compte tenu de l'âge maximal estimé de vie des chiens de bergers (environ 15 ans), nous avons sélectionné **tous les animaux nés après 01/01/2001**. Sur **516 chiens contactés**, **25** nous ont été **rapportés décédés** de diverses maladies et n'ont donc pas pu participer à l'étude.

2.1.3. Durée de l'étude

L'étude a porté sur une période allant du 01/10/07 au 29/02/08.

2.1.4. Recrutement supplémentaire

Sur l'ensemble des 516 chiens sélectionnés par le logiciel CLOVIS, **29 personnes ont refusés de participer** à notre enquête, **30 n'habitaient plus à l'adresse indiquée** et seulement **34 chiens ont participé à l'enquête**. Au final, la quantité de **chiens inclus dans l'étude** était trop **peu élevée** pour avoir des résultats exploitables.

Nous avons grâce à Internet contacté divers forums et sites spécialisés dans les races concernées. Cela nous a permis d'élargir au niveau géographique la population recrutée.

Sites contactés sur Internet :

- ⊙ <http://www.collie-online.com/>
- ⊙ <http://www.lovelyshelties.com/>
- ⊙ <http://www.club-berger-australien.org/>

Ainsi nous avons au final recueilli l'information pour **177 chiens** dont :

- **84** de race Berger Australien,
- **14** de race Berger Blanc Suisse ou Berger Américain,
- **9** de race Border Collie,
- **12** de race Colley
- **58** de race Shetland.

2.2. Questionnaire de santé

Une lettre expliquant le but et les modalités de notre travail (*Annexe 1 et 2*) a été remise à chaque propriétaire de chiens en fonction de la nature de leur relation avec l'animal (éleveur ou particulier).

Chaque personne s'est vue remettre un questionnaire de santé (*Annexe 3*) à remplir pour chaque chien. Après quelques questions d'ordre général, le questionnaire se divisait en 3 parties :

- ∇ Des questions sur l'état général du chien
- ∇ Des questions sur l'état digestif du chien
- ∇ Des questions sur l'état extra-digestif du chien

La partie « état général » et la partie « digestive » étaient fondées sur le système de score **CIBDAI** (Cf partie 2.1.2.) [30]. En effet, le score global final, composé de ces deux valeurs, a permis d'apprécier l'atteinte du tube digestif et sa répercussion sur l'état général de l'animal.

Index Général = Appréciation de l'Activité du chien + Perte de poids + Appétit

L'activité, la perte de poids et l'appétit sont chacun égaux à 0 si le statut est normal, 1 si l'atteinte est légère, 2 si elle est modérée et 3 si elle est sévère.

Index Digestif = Appréciation des vomissements (fréquence) + diarrhée (fréquence et consistance)

Les fréquences des vomissements et des diarrhées sont établis sur la même base : 0 si rien n'est observé, 1 si respectivement ils correspondent à 1 fois par semaine/jour, 2 si ils correspondent à 2-3 fois par semaine/jour et 3 si ils correspondent à plus de 3 fois par semaine/jour. La consistance des diarrhées est de 0 si les selles sont moulées, 1 si légèrement molles, 2 si complètement molles et 3 si liquides.

Ainsi un score global final est calculé avec la somme des 2 index [30]. Les résultats (annexe 4) sont alors classés par intervalles :

[0-3] = Atteinte clinique insignifiante

[4-5] = Expression clinique d'une IBD (*Inflammatory Bowel Disease*) bénigne

[6-8] = Expression clinique d'une IBD modérée

[9 et +] = Expression clinique d'une IBD sévère

D'autres questions (questions sur l'état extra-digestif du chien) ont permis d'enquêter sur des maladies où le gène *MDR1* constitue un acteur potentiel ou avéré (tumeurs, sensibilité à certains médicaments ou anesthésiques, épilepsie...).

2.3. Génotypage des chiens

2.3.1. Prélèvement d'ADN

Le test génétique permettant de connaître le génotype d'un chien au locus *MDR1* a été réalisé à partir d'un simple prélèvement de cellules épithéliales par frottis buccal effectué et authentifié par le vétérinaire traitant de chaque animal.

Le frottis buccal présente de nombreux avantages par rapport au prélèvement sanguin :

- Facile, rapide et indolore
- Fiable (utilisé par la police scientifique)
- Se conserve à température ambiante

Il faut glisser l'écouvillon entre la gencive supérieure et la joue puis appuyer avec le pouce et tourner l'écouvillon pendant 20 secondes (en fonction de la coopérativité de l'animal selon *figure 18*). À défaut, il faut broser fermement l'intérieur de la joue en tournant l'écouvillon pendant 20 secondes. Ensuite on casse ou coupe la tige à 1 cm (maximum) de l'écouvillon et on place la brosse dans le tube numéroté contenant de l'éthanol. Le tube est refermé correctement et placé dans un sachet transparent (ou protégé pour le transport postal).

Figure 18: Technique de prélèvement buccal d'ADN chez un chien (d'après www.antagene.com)



2.3.2. Analyse moléculaire

Chaque brochette contient des cellules épithéliales buccales. Elles sont placées dans de l'éthanol à 90% afin d'améliorer leur conservation jusqu'à l'étape d'extraction de l'ADN. Les étapes d'extraction d'ADN et de génotypage ont été effectuées par le laboratoire **ANTAGENE** (www.antagene.com/), partenaire de cette étude. Le laboratoire utilise une technique dérivée de la PCR qui, pour des raisons de confidentialité, ne nous a pas été communiquée. Nous allons cependant résumer la technique de PCR qui constitue la base du génotypage chez le Chien actuellement.

La *Polymerase Chain Reaction* ou **PCR** est une technique de réplication ciblée *in vitro*.

Elle permet d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie. L'ordre de grandeur à retenir est celui du million de copies en quelques heures. C'est, généralement suffisant pour une utilisation ultérieure. Il s'agit donc de réaliser une succession de réactions de réplication d'une matrice double brin d'ADN. Chaque réaction met en oeuvre deux amorces oligonucléotidiques dont les extrémités 3' pointent l'une vers l'autre. Les amorces ou *primers* en anglais définissent alors, en la bornant, la séquence à amplifier.

L'astuce consiste à utiliser les produits de chaque étape de synthèse comme matrices pour les étapes suivantes, au lieu de les séparer afin de ne réutiliser que la matrice originale. Au lieu d'être linéaire, l'amplification obtenue est exponentielle.

Imaginée par K. Mullis en 1985 (Prix Nobel 1993), la technique connaît un essor considérable à partir de la commercialisation (vers 1988), d'une ADN polymérase résistante aux températures élevées (la Taq polymérase), qui permet une automatisation de la technique.

Une PCR classique se déroule dans un petit tube lui même placé dans un appareil programmable appelé thermocycleur. Le thermocycleur se contente de placer le tube aux températures voulues pendant les durées programmées et de recommencer en effectuant des cycles. Un cycle reproduit trois températures différentes pendant des durées différentes. La durée d'un cycle est de l'ordre de la minute.

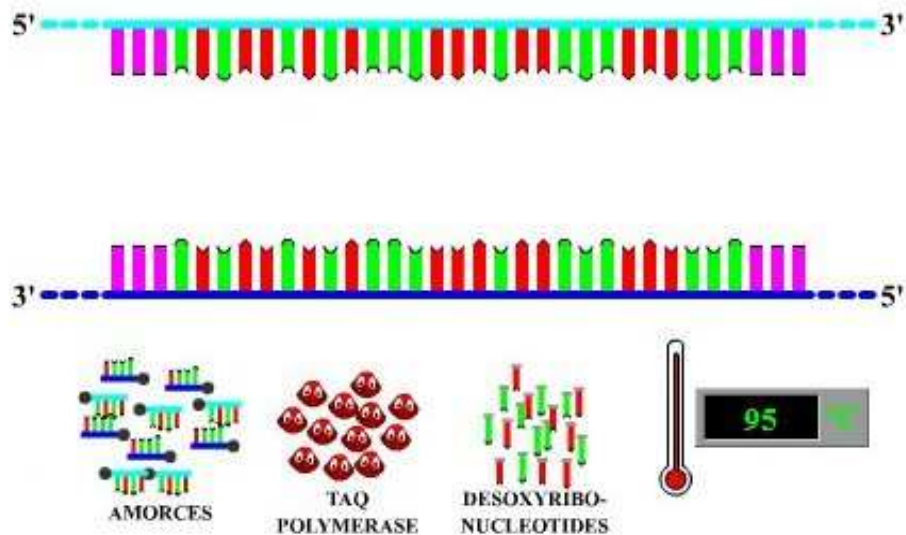
Avant la réaction, tous les substrats de la PCR sont introduits dans le même tube. Il s'agit de l'ADN à amplifier, des oligonucléotides (ou amorces), spécifiques du segment d'ADN voulu (ici la mutation recherchée est en position 294-297 du gène *MDR1*), de l'ADN polymérase (ici la **Taq polymérase**) et enfin du mélange des quatre désoxyribonucléotides constitutifs de l'ADN. Tous sont ajoutés en large excès par rapport à l'ADN. Un tampon de réaction complète le mélange.

La séquence cible représente le segment d'ADN qui sera amplifié (recopié de nombreuses fois). Elle est déterminée lors du choix du couple d'amorces. Les trois étapes constituant un cycle de PCR sont les suivantes :

✧ Dénaturation : Séparation des brins d'ADN

L'ensemble du tube est mis à 95°C (*figure 19*). A cette température, les liaisons faibles qui assuraient la cohésion de la double hélice d'ADN sont rompues pour donner deux simples brins d'ADN.

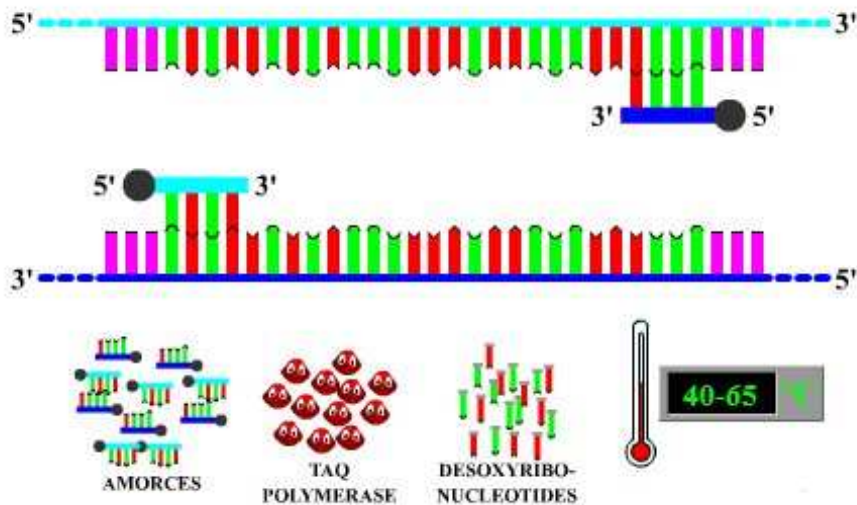
Figure 19: Etape de dénaturation de l'ADN lors de PCR (d'après www.ens-lyon.fr)



✧ Hybridation des amorces :

L'hybridation des amorces sur l'ADN repose sur le principe de l'association des bases complémentaires (*figure 20*). Le choix de la température d'hybridation résulte d'un compromis entre plusieurs paramètres. Elle est calculée en fonction de la longueur et de la séquence des amorces. La température d'hybridation est inférieure à la température de dénaturation.

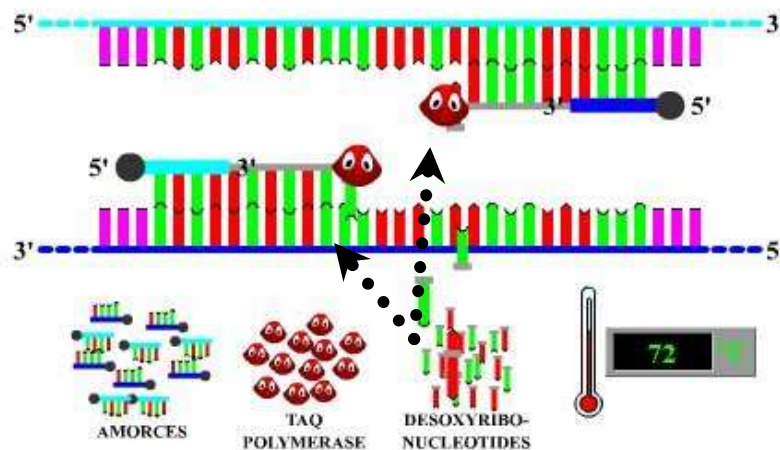
Figure 20: Etape d'hybridation des amorces lors de PCR (d'après www.ens-lyon.fr)



✂ Elongation par la Taq polymérase

Les amorces hybridées à l'ADN servent de point de départ à la polymérisation du brin d'ADN complémentaire de l'ADN matrice (*figure 21*). La polymérisation se fait par ajout successif des désoxyribonucléotides (présents dans le mélange en large excès). Chaque base ajoutée est complémentaire de la base correspondante du brin matrice. Les ADN polymérases sont des enzymes qui synthétisent l'ADN de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3'. Les polymérases utilisées en PCR sont extraites de bactéries vivant naturellement à des températures élevées comme les sources hydrothermales du fond des océans. Ces polymérases ne sont pas dénaturées par la chaleur. La plus connue est la Taq polymérase. La polymérisation ne s'arrête pas lorsque la copie est de la longueur souhaitée. La copie de l'ADN initial génère donc des copies plus longues que souhaitées.

Figure 21: Etape d'élongation à partir des amorces lors de PCR (d'après www.ens-lyon.fr)



A partir du 3ème cycle, les brins d'ADN sont de la longueur recherchée. A chaque fois, la quantité d'ADN double dans le tube. De façon théorique, en partant de deux brins d'ADN initiaux on obtiens 4 segments d'ADN à la fin du premier cycle, 8 à la fin du second, 16 à la fin du troisième et jusqu'à 2^n après n cycles... soit plus d'un million de copies en une vingtaine de cycles ! Très rapidement, le pourcentage d'ADN court (désiré), qui suit une progression exponentielle, tend vers 99,99 %. L'ADN long, qui n'augmente que de façon linéaire, devient très rapidement négligeable.

2.4. Analyses statistiques

Le faible nombre de chiens homozygotes mutés *MDR1* dans les différentes races étudiées ne nous a pas permis d'effectuer toutes les comparaisons statistiques possibles. Nous avons cependant pu comparer la répartition des 3 classes de génotypes dans différentes races à l'aide d'un test Fisher, adapté aux faibles effectifs. Le seul de signification retenu fut de 5%. Le test a été effectué à l'aide du logiciel en libre service sur le serveur Internet de l'Unité U707 de l'Université Paris 6 (<http://www.u707.jussieu.fr/biostatgv/fisher.php>).

Lorsque les effectifs théoriques étaient supérieurs ou égaux à 3, les comparaisons des distributions ont été effectuées à l'aide d'un test du χ^2 en appliquant si nécessaire une correction de Yates en cas d'effectif théorique inférieur ou égal à 5. Nous avons effectué des tests bilatéraux en prenant comme risque d'erreur 5%.

3. RESULTATS

3.1. Toutes races confondues

3.1.1. Description de la population

3.1.1.1. Origine du recrutement

Les Bergers ont été sélectionnés auprès de clients de l'Ecole Vétérinaire d'Alfort, d'éleveurs et propriétaires jamais venus consulter au sein de l'Ecole.

3.1.1.2. Age/Sexe

Au final, nous avons obtenu **177 génotypes** de chiens bergers toutes races confondues. La moyenne d'âge des chiens était de 3 ans (intervalle: 10j - 15ans).

Il y avait **2 fois plus de femelles** que de mâles (112 contre 65).

3.1.1.3. Race

Nous avons obtenus les résultats pour les chiens suivants :

- ↻ **84 Bergers Australiens**
- ↻ **58 Shetlands**
- ↻ **14 Bergers Blancs Suisses**
- ↻ **12 Colleys**
- ↻ **9 Borders Collies.**

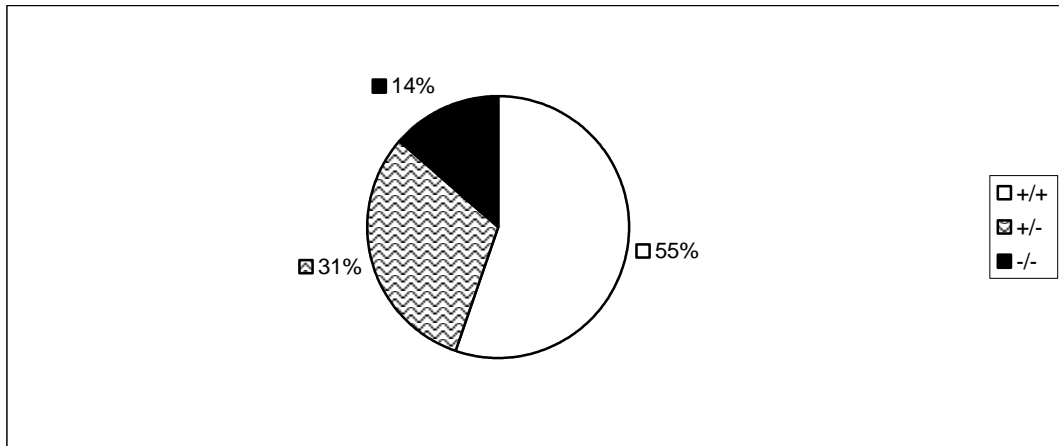
3.1.1.4. Génotype

La répartition générale des génotypes est représentée dans le *tableau 4* et la *figure 22*:

Tableau 4: Répartition numérique des génotypes *MDR1* des 177 chiens bergers.

Génotype <i>MDR1</i>	Nombre de chiens
+/+	98
+/-	55
-/-	24

Figure 22: Répartition des génotypes *MDRI* des 177 chiens bergers



On observe une forte proportion de chiens de génotypes sauvage : plus de la moitié de l'effectif (55%). Le génotype homozygote muté était minoritaire (14%) et ne représentait que 24 chiens dans toutes les races.

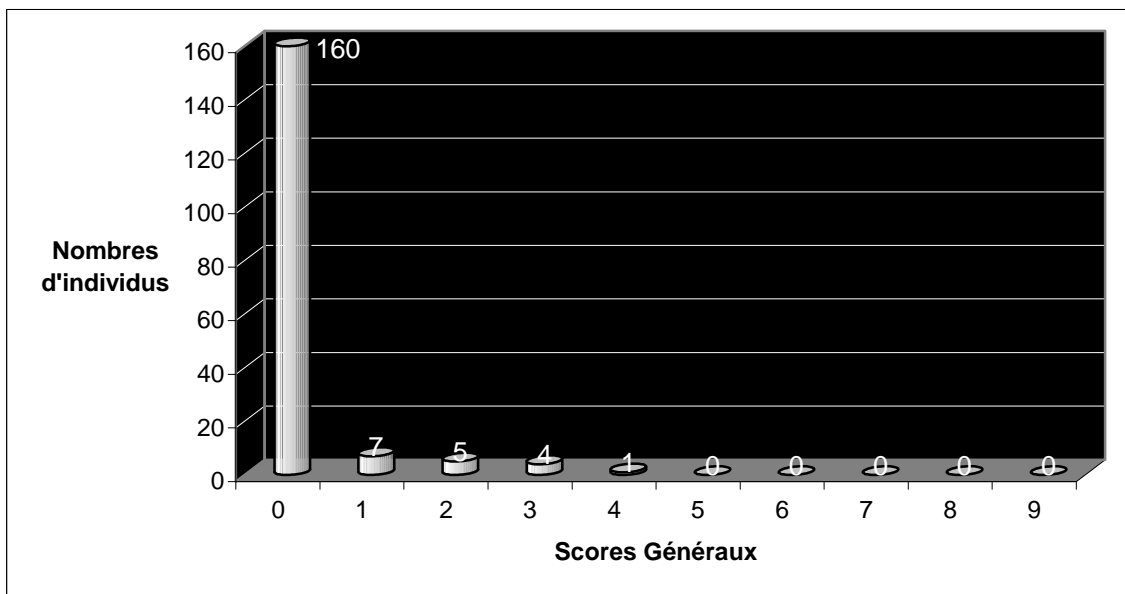
3.1.2. Score

3.1.2.1. Général

Le score général d'un chien correspond à la somme des valeurs données aux réponses des 3 premières questions (activité, perte de poids, appétit) du questionnaire. La somme ne peut en l'occurrence dépasser la valeur de 9 (lors d'une atteinte sévère).

La répartition des scores généraux est illustrée par la *figure 23* :

Figure 23: Répartition des scores généraux des 177 chiens bergers



La *figure 23* indique la répartition des 177 chiens bergers en fonction de leurs scores généraux. En abscisse est indiqué le score, de 0 à 9, et en ordonnée le nombre de chiens.

La médiane du score était de 0 et la moyenne de 0,2 (les scores allant de 0 à 4).

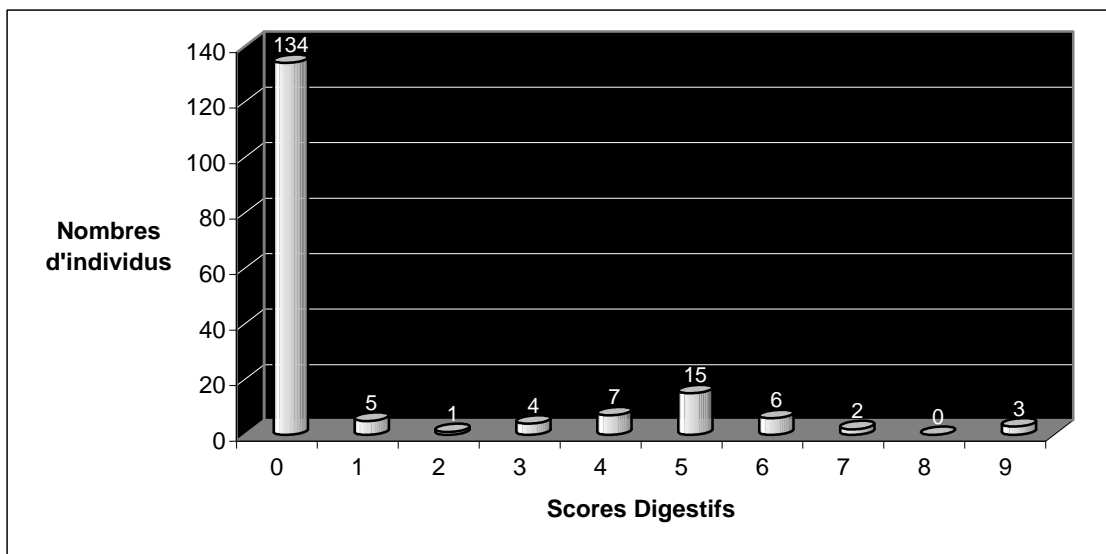
On constate que la très grande majorité des chiens avait un score nul (90,3%) traduisant un excellent état général. De plus 99,4% des chiens présentaient un score inférieur 4 (limite de classification entre des signes cliniques imputables à une inflammation digestive chronique et des symptômes cliniques sans signification d'étiologie).

3.1.2.2. Digestif

Le score digestif est composé de la somme des réponses données pour les questions concernant les vomissements et diarrhées.

La répartition des scores digestifs est illustrée par la *figure 24* :

Figure 24: Répartition des scores digestifs des 177 chiens bergers



La *figure 24* indique la répartition des 177 chiens bergers en fonction de leurs scores digestifs. En abscisse est indiqué le score, de 0 à 9, et en ordonnée le nombre de chiens.

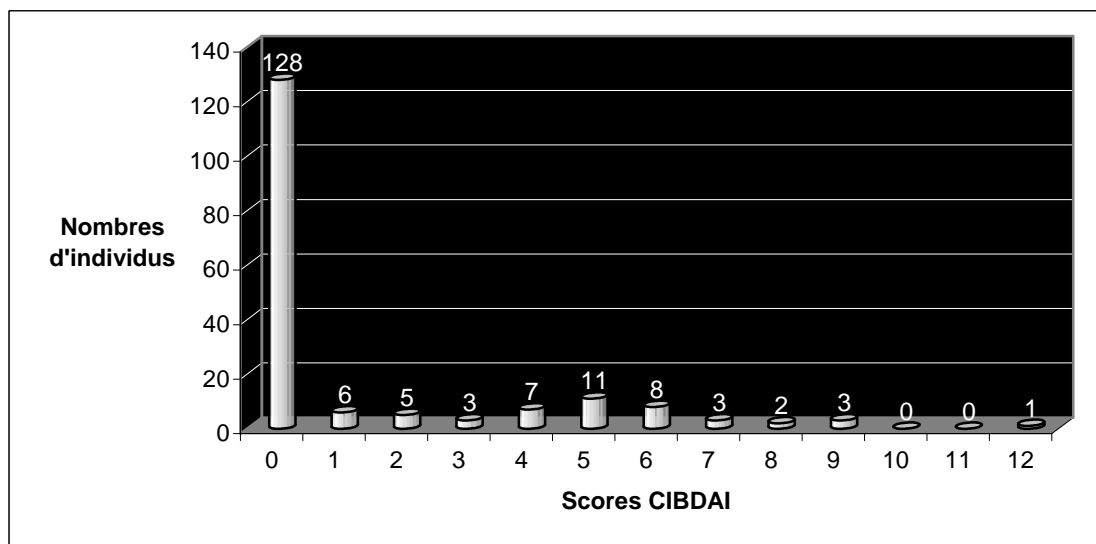
La médiane du score était de 0 et la moyenne de 1,1 (les scores allant de 0 à 9).

On constate que la très grande majorité des chiens avait un score nul (75,7%) traduisant un excellent état général. De plus 81,3% des chiens présentaient un score inférieur 4 (atteinte clinique insignifiante), 12,5% présentaient un score compris entre 4 et 5 (expression d'une atteinte bénigne de l'intestin), 4,5% présentaient un score compris entre 6 et 8 (expression d'une atteinte modérée de l'intestin) et 1,7% présentaient un score égal à 9 (expression d'une atteinte sévère de l'intestin).

3.1.2.3. Score Cumulé ou CIBDAI

La répartition des scores CIBDAI (somme des deux scores précédents) montre que la médiane du score était de 0 et la moyenne de 1,3 (les scores allant de 0 à 12) (*figure 25*).

Figure 25: Répartition des scores CIBDAI des 177 chiens bergers



La *figure 25* indique la répartition des 177 chiens bergers en fonction de leurs scores CIBDAI. En abscisse est indiqué le score, de 0 à 12, et en ordonnée le nombre de chiens.

On constate que la très grande majorité des chiens avait un score nul (72,3%) traduisant un excellent état général. De plus, 80,2% des chiens présentaient un score inférieur 4 (atteinte clinique pas obligatoirement liée à la présence d'une maladie du type chronique), 10,2% présentaient un score compris entre 4 et 5 (expression d'une atteinte bénigne de l'intestin), 7,4% présentaient un score compris entre 6 et 8 (expression d'une atteinte modérée de l'intestin) et 2,2% présentaient un score supérieur ou égal à 9 (expression d'une atteinte sévère de l'intestin).

3.1.3. Distribution des génotypes *MDR1* chez les bergers

3.1.3.1. Prévalence de allèle muté dans chaque race

La répartition des génotypes, par race, permet de calculer la présence de l'allèle muté *MDR1* dans chaque race. Un individu homozygote sain (+/+) ne présente aucun allèle muté, un individu hétérozygote (+/-) présente un allèle muté et un allèle sauvage, et, un individu homozygote muté (-/-) présente deux allèles mutés.

Le *tableau 5* récapitule les génotypes de tous les chiens de l'étude et présente le nombre d'allèle mutés total ainsi que la prévalence de l'allèle muté dans chaque race.

Tableau 5: Répartition des génotypes *MDRI* et fréquence de l'allèle *MDRI* muté dans chaque race

Race	Génotypes <i>MDRI</i> +/+ (nombre de chiens)	Génotypes <i>MDRI</i> +/- (nombre de chiens)	Génotypes <i>MDRI</i> -/ (nombre de chiens)	Nombre total d'allèles	Fréquence de l'allèle muté (%)
Colley	2	6	4	24	58,3
Border Collie	9	0	0	18	0
Berger Australien	44	27	13	168	31,5
Berger Blanc Suisse	13	0	1	28	7,1
Shetland	30	22	6	116	29,3

3.1.3.2. Comparaison des résultats obtenus

Afin d'effectuer la comparaison statistique entre les 3 classes de génotypes *MDRI*, nous avons retenu les 3 races les plus touchées et/ou représentées par les plus grands effectifs de chiens. Nous n'avons donc pas retenu le Border Collie dont aucun chien n'était porteur de la mutation et le Berger Américain, qui sur les 14 chiens, ne présentait qu'un seul individu porteur.

Le *tableau 6* présente les valeurs numériques utilisées pour la comparaison.

On pose l'hypothèse H_0 = **il n'existe pas de différence statistiquement significative de répartition des 3 classes de génotypes entre les races de chiens bergers.**

Tableau 6 : Tableau permettant la comparaison des fréquences génotypiques observées dans les échantillons de Colley, Berger Australien et Shetland

	+/+	+/-	-/-	Total
Colley	2 (6,7)	6 (3,7)	4 (1,6)	12
Berger Australien	44 (41,5)	27 (30)	13 (12,5)	84
Shetland	30 (28,6)	22 (20,7)	6 (8,6)	58
Total	76	55	23	154

Entre parenthèses sont indiquées les valeurs théoriques en fonction des effectifs totaux de chaque catégorie.

Nous appliquons le test de Fisher car certains des effectifs théoriques (indiqués entre parenthèses) sont inférieurs à 3. On obtient une *p-value* = 0,09 qui est supérieur au seuil fixé à 0,05.

Il n'existe donc pas de différence statistiquement significative dans la répartition des génotypes au locus *MDRI* dans les trois races de chiens de Bergers : Colley, Berger Australien et Shetland de notre étude.

Nous avons décidé enfin d'étudier l'influence de divers paramètres sur la pathologie digestive (sélection des chiens à score digestif non nul donc ayant une atteinte digestive en comparaison avec les chiens à score digestif nul (non malades). Nous avons préféré choisir le score digestif et non le CIBDAI car plus représentatif d'un trouble intestinal (peu de chiens avaient une score nul à l'item digestif et non nul à l'item état général). De plus, à la vue des effectifs restreints, il était difficilement envisageable de faire la distinction entre les chiens à score CIBDAI compris entre 0 et 3 (expression clinique insignifiante) et le reste des chiens.

3.1.4. Influence de différents paramètres sur la pathologie digestive

Quarante trois chiens avaient des scores digestifs non nuls (strictement supérieurs à 0).

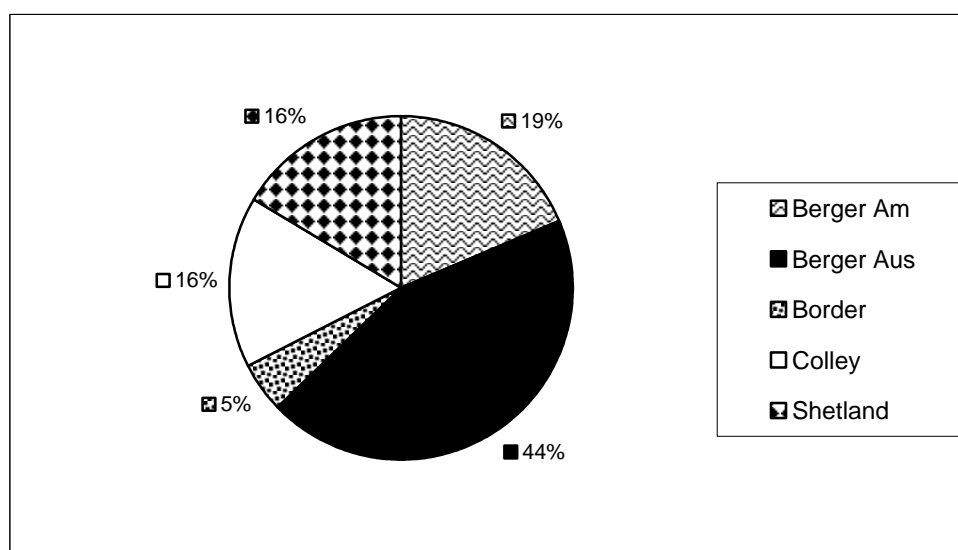
3.1.4.1. Influence de la race sur la pathologie digestive.

Sur les 177 chiens, 43 chiens avaient des scores digestifs non nuls. Le *tableau 7* et la *figure 26* présentent la répartition race par race de ces 43 chiens.

Tableau 7: Répartition numérique des races des 43 chiens bergers ayant un score digestif non nul.

Race	Nombre de chiens
Berger Blanc Suisse	8
Berger Australien	19
Border Collie	2
Colley	7
Shetland	7

Figure 26: Répartition par race des 43 chiens bergers ayant un score digestif non nul.



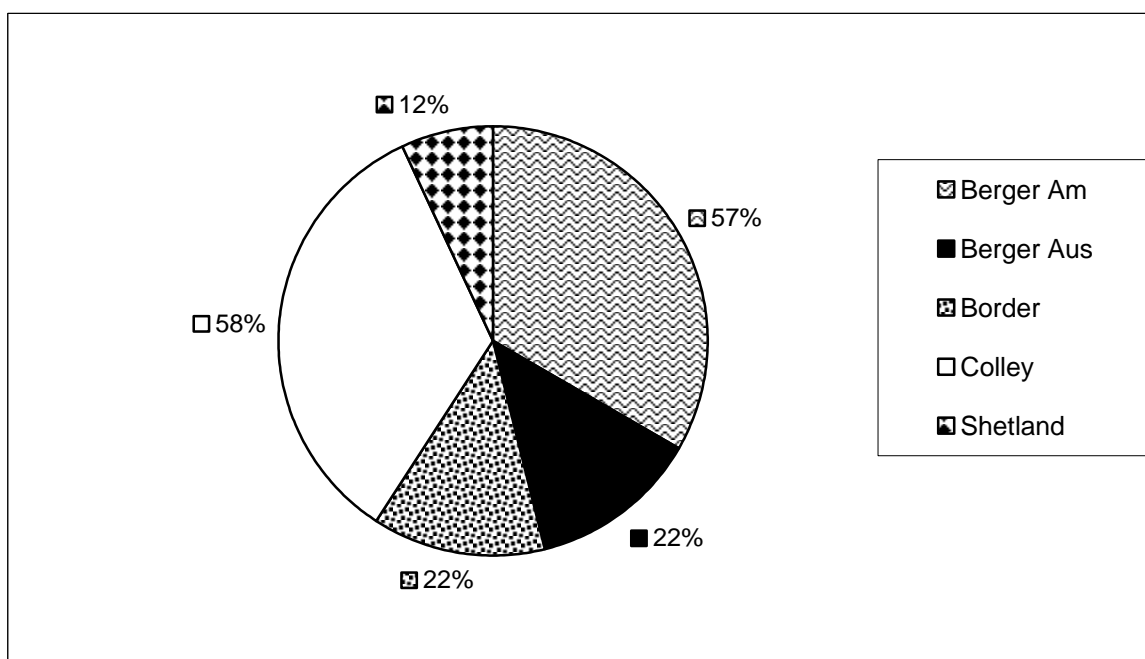
On observe une surreprésentation de la race des Bergers australiens.

Mais afin de pouvoir comparer les chiffres des différentes races entre elles, il était nécessaire de les rapporter à l'effectif général de chaque échantillon. Le *tableau 8 et la figure 27*, présentent le nombre et le pourcentage de chiens, par race, ayant un score digestif non nul, rapporté à l'effectif de l'échantillon racial.

Tableau 8: Nombre de chiens, par race, ayant un score digestif non nul, rapporté à l'effectif de l'échantillon racial.

Race	Nombre de chiens	Effectif	%
Berger Blanc Suisse	8	14	57,1
Berger Australien	19	86	22,1
Border Collie	2	9	22,2
Colley	7	12	58,3
Shetland	7	58	12,1

Figure 27: Répartition par race, des 43 chiens bergers ayant un score digestif non nul, rapporté à l'effectif de l'échantillon racial.



Au final, on constate que la race la plus touchée par des maladies digestives était le Colley (58%). La race la moins touchée était le Shetland (12%), mais les individus de cette race étaient pour la plupart très jeunes.

3.1.4.2. Influence du sexe sur la pathologie digestive

Il y avait 23 femelles atteintes de troubles digestifs contre 20 mâles. Le tableau 9 permet de comparer les proportions de mâles et femelle touchées par les troubles digestifs dans notre étude. On pose **Ho : il n'existe pas de différence statistiquement significative de répartition des mâles et femelles selon la présence ou absence d'atteinte digestive.**

Tableau 9: Test χ^2 pour comparer la proportion des mâles et femelles touchés par des troubles digestifs chez les 177 chiens bergers

	Mâle	Femelle	Total
Chiens à score digestif non nul	20 (15,8)	23 (27,2)	43
Chiens à score digestif nul	45 (49,2)	89 (84,8)	134
Total	65	112	177

Entre parenthèses sont indiquées les valeurs théoriques en fonction des effectifs totaux de chaque catégorie.

Le test χ^2 donne une valeur de $\chi^2 = 2,33$ soit inférieure à 3,84 (test à 1 degré de liberté et 5% d'erreur). On ne constate donc pas de différence significative dans les répartitions des femelles et des mâles dans les 2 catégories (à 5% d'erreur près).

Il n'y a pas d'influence du sexe sur les maladies digestives dans notre cohorte de chiens bergers.

3.1.4.3. Influence de l'âge sur la pathologie digestive

L'âge des 43 bergers avec score digestif non nul était en moyenne de 4 ans et allait de 6 mois à 15 ans (*tableau 10*).

Tableau 10: Répartition des âges des 43 chiens à score digestif non nul

Age	Nombre de chiens
Indéterminé	1
<1 an	5
[1-5ans [24
[5-10ans [8
[10ans et +	5

Le *tableau 10* indique la répartition, par tranche d'âge, du nombre de chiens ayant un score digestif non nul.

On peut noter que 67,4% des chiens à score digestifs non nul étaient âgés de moins de 5 ans, soit relativement jeunes.

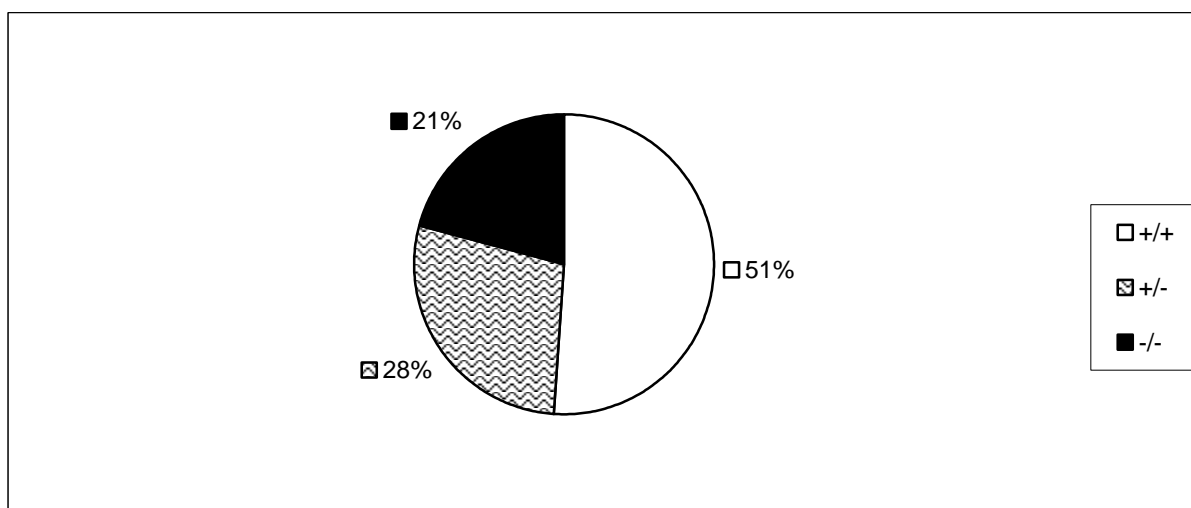
3.1.4.4. Influence du génotype sur la pathologie digestive

Chez les 43 chiens ayant un score digestif non nul, la répartition des génotypes (toutes races confondues) est illustrée par le *tableau 11* et la *figure 28*.

Tableau 11: Répartition numérique des génotypes *MDRI* des 43 chiens bergers ayant un score digestif non nul

Génotype	Nombre de chiens ayant un score digestif non nul
+/+	22
+/-	12
-/-	9

Figure 28: Répartition des génotypes *MDRI* des 43 chiens bergers ayant un score digestif non nul



On constate que 51% des chiens (22/43) à score digestif non nul étaient homozygotes sauvages (+/+) au locus *MDRI* alors que 28% d'entre eux (12/43) étaient hétérozygotes (+/-) et 21% (9/43) d'entre eux étaient homozygotes mutés (-/-).

Il est intéressant de comparer ces pourcentages à ceux observés dans la population des chiens à score digestif nul. Le *tableau 12* présente les valeurs chiffrées nécessaires à cette comparaison. Les effectifs théoriques sont indiqués entre parenthèses.

Tableau 12: Répartition des génotypes *MDRI* chez les 177 chiens à score digestif non nul et nul

	+/+	+/-	-/-	Total
Chiens à score digestif nul	76 (74,2)	43 (41,6)	15 (18,2)	134
Chiens à score digestif non nul	22 (23,8)	12 (13,4)	9 (5,8)	43
Total	98	55	24	177

Entre parenthèses sont indiquées les valeurs théoriques calculées en fonction des effectifs totaux.

Nous appliquons le test du χ^2 . On obtient une valeur de $\chi^2 = 2,70$ qui est inférieure au seuil de la table égal à 5,99 (2 degrés de liberté et 5% d'erreur).

Il n'existe donc pas de différence statistiquement significative dans la répartition des génotypes au locus *MDR1* selon que les chiens bergers de notre cohorte soient atteints de maladies digestives ou non.

Le génotype au locus *MDR1* ne semble donc pas influencer la proportion de chiens atteints de maladies digestives chez les races étudiées.

Chez les 43 individus présentant des symptômes digestifs (score digestif non nul), l'explication du propriétaire fut :

- ↗ une gastroentérite chez 7 d'entre eux (âge de 1 à 5 ans)
- ↗ le stress pour 8 chiens (âge de 1 à 15 ans)
- ↗ un changement alimentaire chez 11 individus (de quelques mois à 13 ans)
- ↗ de la boulimie pour 3 chiens
- ↗ des traitements vermifuges pour 2 chiens
- ↗ un syndrome de dilatation torsion stomacale pour 1 seul individu.
- ↗ est absente chez 5 chiens.

Chez 11 individus où les vomissements étaient présents, la moyenne d'âge d'apparition de ces derniers était de 7,3 mois (intervalle: 2 mois à 5 ans). La durée des épisodes de vomissements était variable, entre tous les jours à une fois tous les mois (ces vomissements sont alors moins représentatifs d'une inflammation chronique de l'intestin).

Aucun des problèmes digestifs n'a rétrocedé avec un traitement à base d'antibiotiques (généralement résolution spontanée). Chez 30 individus où les diarrhées étaient présentes, la moyenne d'âge d'apparition de ces diarrhées était de 13 mois mais il existait une très grande variabilité (de 7 semaines à 3 ans).

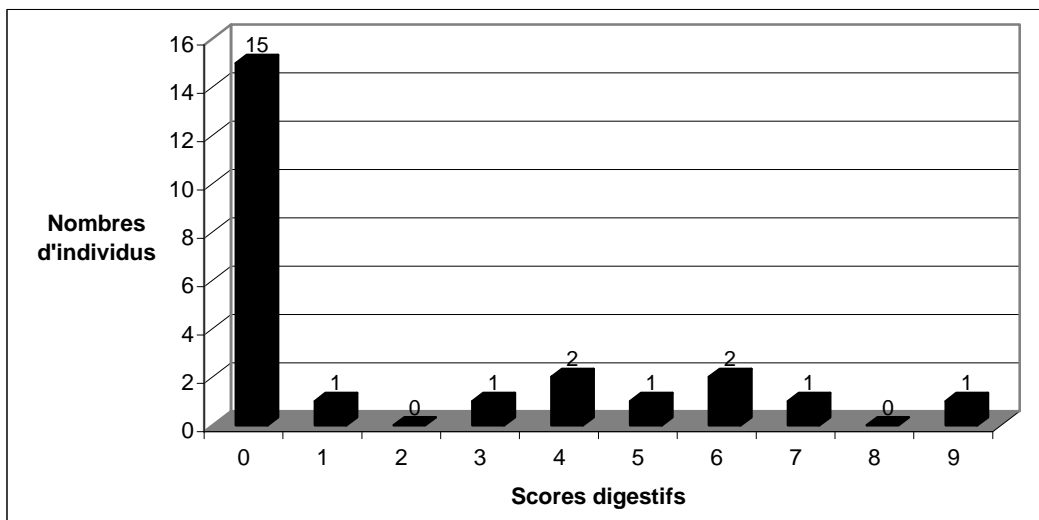
Seuls 7 individus sur 30 présentaient des vomissements en plus de la diarrhée. Ces derniers se répartissaient de la façon suivant :

- 2 homozygotes mutés
- 4 hétérozygotes
- 1 homozygote sain.

Répartition des scores digestifs en fonction du génotype :

Toutes races confondues, sur les 24 chiens bergers homozygotes mutés au locus *MDR1* la répartition des scores digestifs était très variable (*figure 29*).

Figure 29: Répartition des scores digestifs des 24 chiens bergers homozygotes mutés

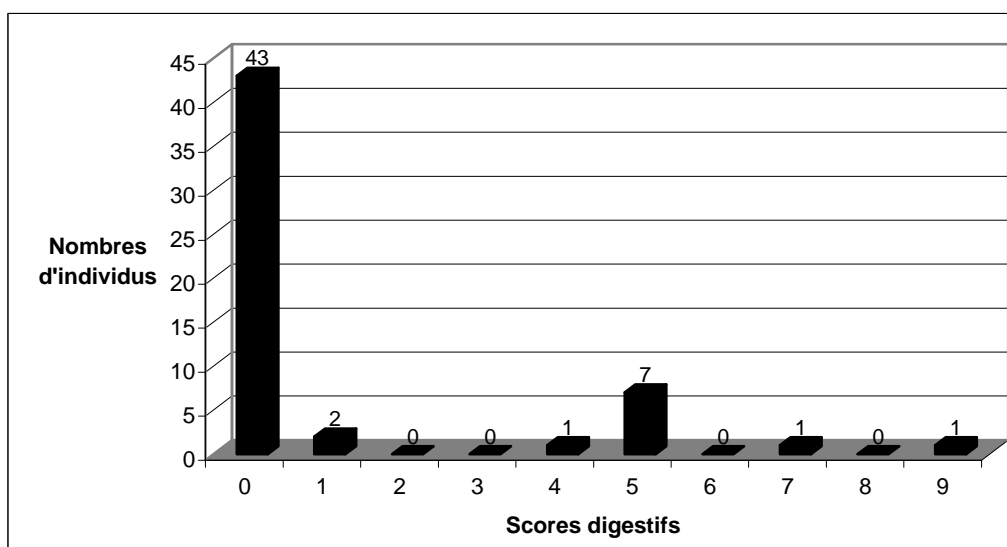


La *figure 29* indique la répartition des individus homozygotes mutés en fonction de leurs scores digestifs. En abscisse est indiqué le score, de 0 à 9, et en ordonnée le nombre de chiens.

Une grande majorité de chiens avaient un score digestif nul (62%). On observe une proportion non négligeable de chiens (25%) avec un score intermédiaire compris entre 4 et 7 traduisant une atteinte soit faible soit modérée des intestins. Un seul chien avait un score égal à 9.

Sur les 55 bergers hétérozygotes, la répartition des scores digestifs était variable (*figure 30*).

Figure 30: Répartition des scores digestifs des 55 bergers hétérozygotes

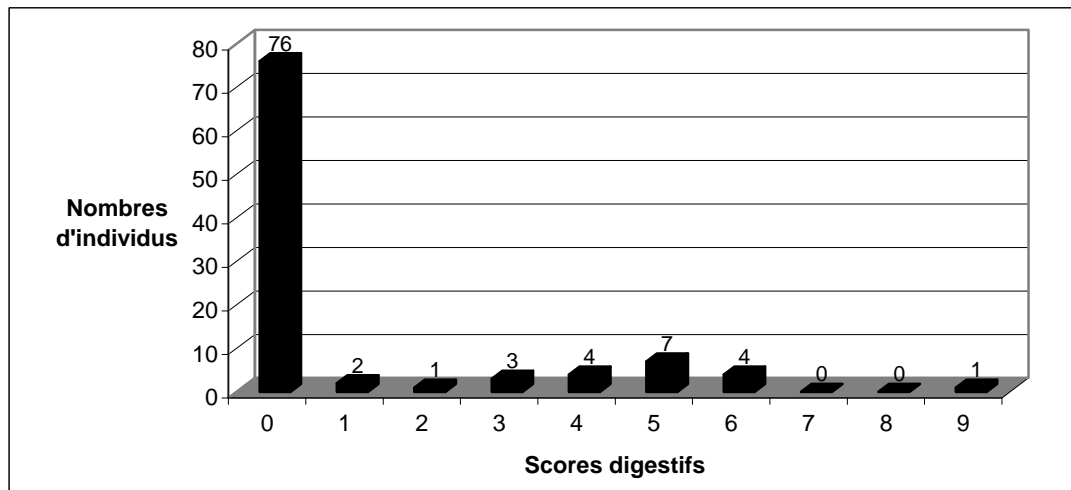


La *figure 30* indique la répartition des chiens hétérozygotes en fonction de leurs scores digestifs. En abscisse est indiqué le score, de 0 à 9, et en ordonnée le nombre de chiens.

Une grande majorité de chiens avait un score digestif nul (78,1%). On observe une faible proportion de chiens (16,3%) avec un score intermédiaire compris entre 4 et 5 traduisant une atteinte faible de l'appareil digestif, alors qu'un seul chien avait un score égal à 9.

Sur les 98 bergers homozygotes sauvages, la répartition des scores digestifs était variable (figure 31).

Figure 31: Répartition des scores digestifs des 98 bergers homozygotes sauvages



La figure 31 indique la répartition des individus homozygotes sauvages en fonction de leurs scores digestifs. En abscisse est indiqué le score, de 0 à 9, et en ordonnée le nombre de chiens.

Une grande majorité de chiens avaient un score digestif nul (77,5%). On observe une proportion non négligeable de chiens (15,3%) avec un score intermédiaire compris entre 4 et 7 traduisant une atteinte soit faible soit modérée des intestins, alors qu'un seul chien avait un score égal à 9.

3.1.5. Autres maladies présentes chez les chiens de l'étude

Sur les 177 chiens génotypés, 1 chien présentait une douleur à la défécation, 8 chiens des douleurs abdominales d'étiologie inconnue et 9 des flatulences considérables. Aucune fistule anale n'a été rapportée.

Quatre chiens ont présentés des tumeurs dont 2 des tumeurs mammaires, 1 une tumeur de la mandibule, et 1 liposarcome.

Treize bergers ont présentés des symptômes attribués à une intolérance médicamenteuse dont l'imputation est variable :

- ▣ Antiparasitaire : 4
- ▣ Vaccin : 3
- ▣ AINS : 2

- ▣ Antibiotique : 2
- ▣ Kétamine : 1
- ▣ Métopropramide : 1
- ▣ Cabergoline : 1.

Chez 27 bergers des infections divers ont été rapportées dont :

- ✧ 7 otites
- ✧ 2 dermatites par hypersensibilité aux piqûres de puces
- ✧ 3 conjonctivites
- ✧ 3 trachéites
- ✧ 1 démodécie, Hotspot, Eczéma, Atopie Canine, pathologie gingivale

Chez 10 chiens des troubles de l'appareil reproducteur ont été rapportés:

- ✧ 3 cryptorchidie
- ✧ 3 pyomètres
- ✧ 1 cystite oestrale
- ✧ 1 scrotite
- ✧ 1 mammite
- ✧ 1 métrite
- ✧ 1 kyste ovarien

Aucun chien n'a présenté de symptômes convulsifs.

3.2. Etude chez le Berger Blanc Suisse

3.2.1. Description de la population

Sur les 14 chiens analysés, il y avait 50% de mâle et 50% de femelles. La moyenne d'âge était de 3 ans (intervalle: 5 mois à 10 ans).

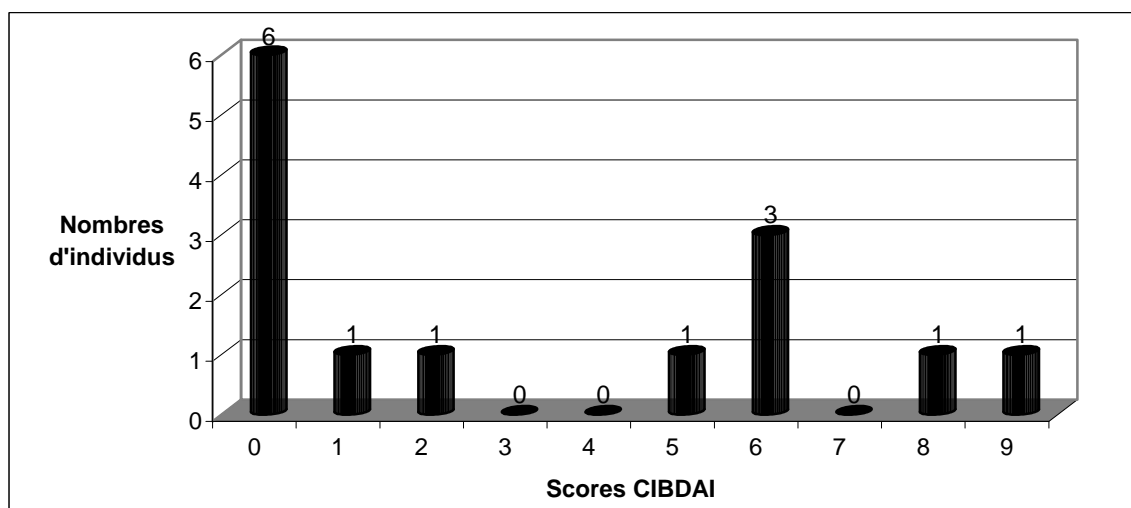
3.2.2. Répartition des génotypes

Treize chiens étaient homozygotes sains et un de génotype est homozygote muté.

3.2.3. Score CIBDAI

La médiane du score CIBDAI était de 1,5 et la moyenne de 3,0 (intervalle: 0 à 9). La répartition des scores généraux est illustrée dans la *figure 32*.

Figure 32: Répartition des scores CIBDAI chez les 14 Bergers Blancs Suisses



La figure 32 indique la répartition des 14 Bergers Blancs Suisses en fonction de leurs scores CIBDAI. En abscisse est indiqué le score, de 0 à 9, et en ordonnée le nombre de chiens (aucun chien n'avait de score allant de 10 à 12).

Six des quatorze Bergers Blancs Suisses étaient atteints d'une IBD dont le score était supérieur ou égale 4, dont l'origine était le stress pour 1/3, des gastro-entérites pour 1/3 et le reste non déterminée. Les deux individus dont les scores étaient les plus élevés ont développé des tumeurs bénignes mammaires.

Deux chiens ont présenté une intolérance à des médicaments tels que le Rimadyl et le Ronaxan. Leur score CIBDAI était de 2 ou 6. Cinq chiens présentaient des problèmes divers allant de la simple otite à la dermatite atopique en passant par la conjonctivite.

3.2.4. Influence de différents paramètres sur les troubles digestifs

Huit chiens avaient un score digestif non nul.

3.2.4.1. Sexe

Sur les 8 individus ayant un score digestif non nul, il y avait 3 mâles et 5 femelles.

Nous n'effectuons pas de comparaison de ces chiffres avec les effectifs rencontrés chez les chiens à score nul le nombre de chiens étant trop restreint.

3.2.4.2. Age

L'âge moyen des 8 chiens à score digestif non nul était de 4 ans avec un intervalle allant de 6 mois à 10 ans. La liste des âges des chiens est représentée dans le *tableau 13* :

Tableau 13: Répartition numérique des âges des 8 Bergers Blancs Suisses avec un score digestif non nul

Nom du chien	Date de naissance	âge
BBS N°1	17/08/2007	6 mois
BBS N°2	10/12/2005	2 ans
BBS N°3	12/02/2006	2 ans
BBS N°4	20/12/2004	3 ans
BBS N°5	11/01/2005	3 ans
BBS N°6	17/05/2003	4 ans
BBS N°7	14/09/2002	5 ans
BBS N°8	23/04/1997	10 ans

3.2.4.3. Génotype

Chacun des 8 chiens atteints de maladies digestives étaient homozygotes sauvages.

Nous remarquerons que le seul chien homozygote muté avait un score CIBDAI nul.

3.3. Etude chez le Berger Australien

3.3.1. Description de la population

Sur 84 chiens génotypés, il y avait 54 femelles et 30 mâles.

La moyenne d'âge était de 3 ans (écart allant de 5 mois à 15 ans).

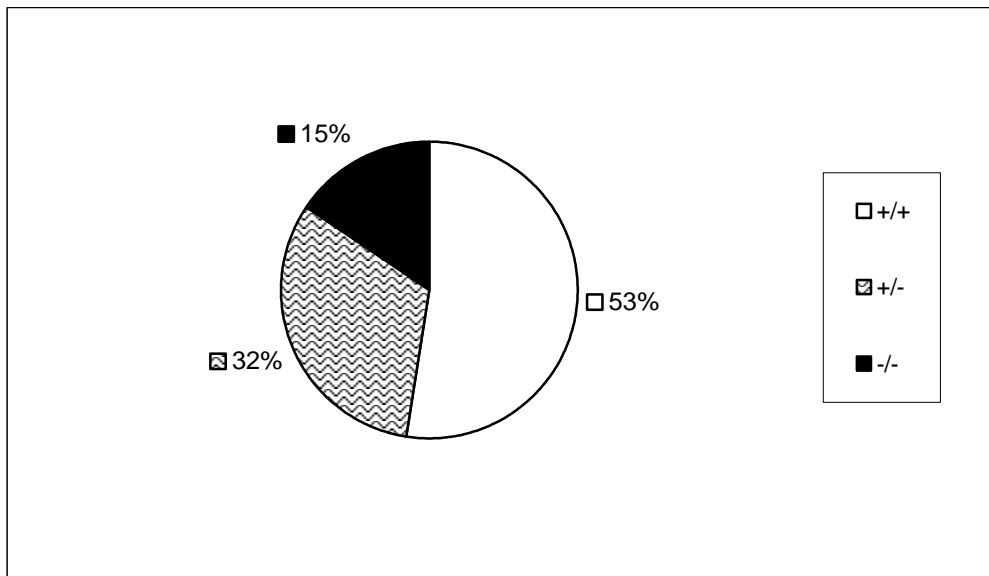
3.3.2. Répartition des génotypes

Les génotypes des 84 chiens sont présentés dans le *tableau 14* et la *figure 33*:

Tableau 14: Répartition numérique des génotypes chez les 84 Bergers Australiens

Génotype	Nombre de chiens
+/+	44
+/-	27
-/-	13

Figure 33: Répartition des génotypes *MDRI* chez les 84 Bergers Australiens

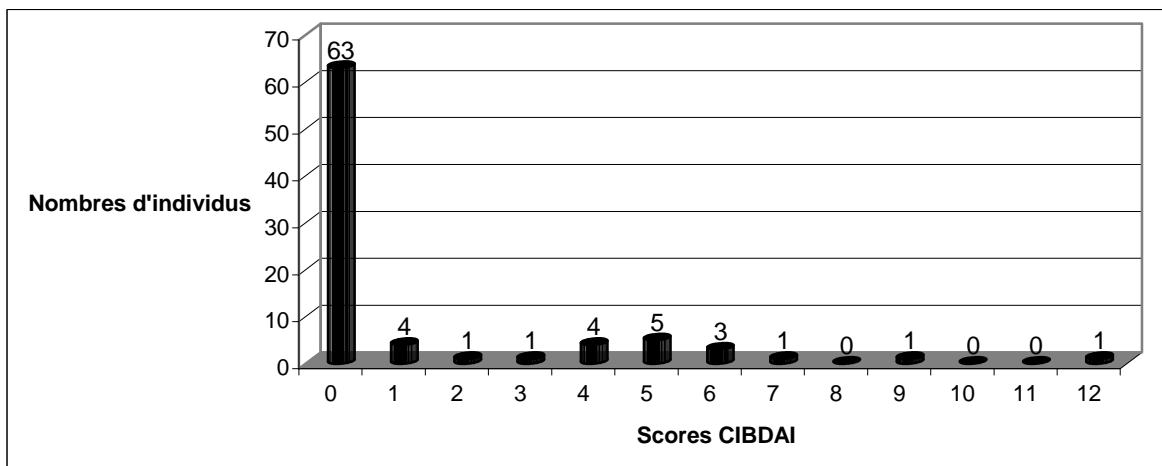


On constate que plus de la moitié des chiens était homozygotes sains (53%) mais que 15% d'entre eux étaient homozygotes mutés. La comparaison de ces proportions avec celles des Shetlands et des Colleys a été effectuée dans le paragraphe 3.1.3.2.

3.3.3. Score CIBDAI

Les scores CIBDAI étaient répartis selon la *figure 34*: La médiane était de 1,1 et la médiane de 0.

Figure 34: Répartition des scores CIBDAI chez les 84 Bergers Australiens



La *figure 34* indique la répartition des 84 Bergers Australiens en fonction de leurs scores CIBDAI. En abscisse est indiqué le score, de 0 à 12, et en ordonnée le nombre de chiens.

Vingt trois pour cent des Bergers Australiens présentaient des scores digestifs non nuls, soit 19 chiens. Ces chiens présentaient des vomissements (5/19) qui présentaient de grandes variabilités

dans la durée et avaient en moyenne 18 mois au moment des 1^{ers} symptômes. Aucune guérison sous antibiotiques n'a été rapportée.

Les bergers avec des symptômes de diarrhées étaient au nombre de 16 et présentaient un 1^{er} épisode en moyenne vers 1 an (écart entre 3 mois et 3 ans). Les raisons rapportées étaient des gastro-entérites, le stress, des changements alimentaires trop brusques, certains médicaments, des purges régulières et un parasitisme digestif élevé.

Quatre chiens dévoilant des douleurs diffuses abdominales d'étiologies non identifiées étaient tous homozygotes sains.

Six chiens avaient des flatulences (inacceptables pour les propriétaires) et parmi eux seul 1 chien était hétérozygote *MDR1*.

3.3.4. Influence de différents paramètres sur les troubles digestifs

Dix chiens avaient un score digestif non nul.

3.3.4.1. Sexe

Sur les 19 chiens ayant des scores digestifs non nuls, 11 étaient des femelles et 8 des mâles.

Nous pouvons comparer ces proportions à celles théoriques obtenues par calcul lors de non influence du sexe sur la pathologie digestive (*tableau 15*). **Ho : il n'existe pas de différence statistiquement significative de répartition des mâles et femelles selon la présence ou absence d'atteinte digestive.**

Tableau 15: Test χ^2 pour comparer la proportion des mâles et femelles touchés par des troubles digestifs chez les 84 Bergers Australiens

	Mâle	Femelle	Total
Chiens à score digestif non nul	8 (7,6)	11 (12,2)	19
Chiens à score digestif nul	22 (23,2)	43 (41,8)	65
Total	30	54	84

Entre parenthèses sont indiquées les valeurs obtenues pour les effectifs théoriques.

Le test χ^2 donne une valeur de $\chi^2 = 0,15$ soit inférieure à 3,84 (test à 1 degré de liberté et 5% d'erreur).

On ne constate donc pas de différence significative dans les répartitions des femelles et des mâles dans les 2 catégories (à 5 % d'erreur près).

Il n'y a pas d'influence du sexe sur les maladies digestives dans notre cohorte de chiens de race Berger Australien.

3.3.4.2. Age

La moyenne d'âge est de 3 ans avec un écart-type allant de 7 mois à 15 ans. Le *tableau 16* présente la liste des chiens classés par âge croissant.

Tableau 16: Répartition numérique des âges des 19 Bergers Australiens avec un score digestif non nul

Nom du chien	Date de naissance	Age
BA N°1	02/07/2007	6 mois
BA N°2	31/03/2007	10 mois
BA N°3	10/06/2007	7 mois
BA N°4	26/01/2007	1 an
BA N°5	20/04/2006	1 an
BA N°6	25/01/2007	1 an
BA N°7	16/03/2006	1 an
BA N°8	07/03/2006	1 an
BA N°9	30/10/2005	2 ans
BA N°10	05/12/2004	3 ans
BA N°11	03/03/2004	3 ans
BA N°12	13/12/2004	3 ans
BA N°13	02/09/2004	3 ans
BA N°14	02/12/2004	3 ans
BA N°15	14/08/2002	5 ans
BA N°16	23/04/2001	6 ans
BA N°17	27/08/2001	6 ans
BA N°18	13/10/2000	7 ans
BA N°19	15/11/1992	15 ans

On constate que les chiens présentant des symptômes digestifs étaient relativement jeunes, 74% des chiens avaient un âge inférieur à 4 ans.

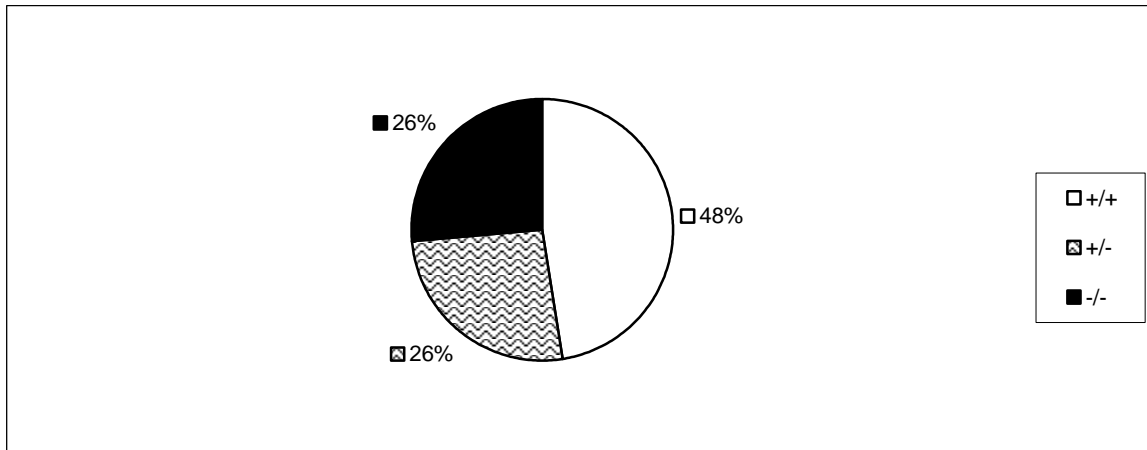
3.3.4.3. Génotype

Sur les 19 chiens présentant des scores digestifs non nuls, la proportion d'homozygotes mutés était de 26% (*Tableau 17* et *figure 35*) :

Tableau 17: Répartition numérique des génotypes des 19 Bergers Australiens ayant un score digestif non nul

Génotype	nb
+/+	9
+/-	5
-/-	5

Figure 35: Répartition des génotypes *MDRI* des 19 Bergers Australiens ayant un score digestif non nul



On constate que la moitié des chiens étaient homozygotes sains et que environ $\frac{1}{4}$ des chiens étaient homozygotes mutés.

Nous pouvons comparer ces proportions à celles observées chez les chiens à score digestif nul (tableau 18).

Tableau 18: Répartition des génotypes *MDRI* chez les chiens de race Berger Australien à score digestif non nul et nul

	+/+	+/-	-/-	Total
Chiens à score digestif non nul	9 (9,9)	5 (6,1)	5 (2,9)	19
Chiens à score digestif nul	35 (34,0)	22 (20,9)	8 (10,0)	65
Total	44	27	13	84

Entre parenthèses sont indiquées les valeurs obtenues pour les effectifs théoriques.

Nous appliquons le test de Fisher, l'un des effectifs théoriques étant inférieur à 3. On obtient une valeur de $p\text{-value} = 0,37$ qui est supérieure au seuil fixé de 0,05. Il n'y a donc pas de différence statistiquement significative entre la répartition des génotypes au locus *MDRI* chez les chiens à score digestif nul et chez les chiens à score digestif non nul.

Il n'existe donc pas de différence statistiquement significative dans la répartition des génotypes au locus *MDRI* selon que les chiens de race Berger Australien de notre cohorte sont atteints de maladie digestive ou non.

Dix chiens présentaient des problèmes annexes : dermatite par allergie aux piqûres de puces, mycose, trachéite, otites, démodécie et dermatite pyotraumatique.

3.4. Etude chez le Border Collie

3.4.1. Description de la population

Sur les 9 prélèvements effectués, il y avait 4 mâles et 5 femelles. La moyenne d'âge était de 6 ans (intervalle: 2 ans à 13ans).

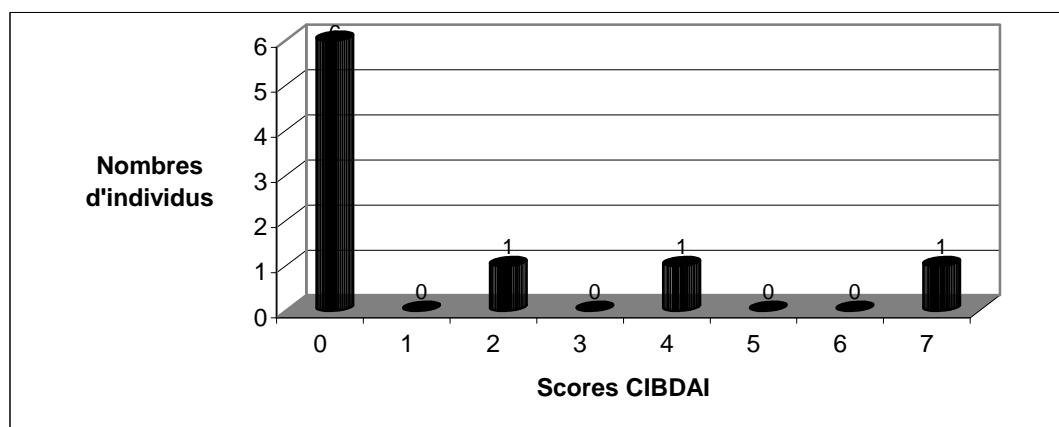
3.4.2. Répartition des génotypes

Tous les chiens étaient homozygotes sauvages.

3.4.3. Scores

L'ensemble des scores CIBDAI est présenté dans la *figure 36* :

Figure 36: Répartition des scores CIBDAI chez les 9 Border Collies



La *figure 36* indique la répartition des 9 Borders Collies en fonction de leurs scores CIBDAI. En abscisse est indiqué le score, de 0 à 7, et en ordonnée le nombre de chiens (aucun chien n'avait de score allant de 8 à 12).

La médiane des scores CIBDAI était de 0, la moyenne de 1,44.

Seul deux des Border Collies ont présenté des scores CIBDAI de 4 et 7. L'étiologie des troubles digestifs des deux chiens était vraisemblablement du, d'après les propriétaires, à un changement alimentaire et à de la polyphagie. Le score de 2 visible sur la *figure 35* appartenait à un chien ayant perdu beaucoup de poids sans raison digestive (l'augmentation du score CIBDAI est due à la seule augmentation de son index général et non digestif).

3.4.4. Influence de différents paramètres sur les troubles digestifs

Deux Border Collies avaient un score digestif non nul.

3.4.4.1. Sexe

Les deux chiens à score digestif non nul présentant des symptômes digestifs étaient un mâle et une femelle.

3.4.4.2. Age

Les deux chiens à score digestif non nul étaient âgés de 6 ans et de 13 ans.

3.4.4.3. Génotype

Les deux chiens étaient homozygote sauvage comme tous les Border Collies de l'étude.

3.5. Etude chez le Colley

3.5.1. Description de la population

Sur les 12 prélèvements, nous avons obtenu 5 femelles et 7 mâles.

La moyenne d'âge était de 7 ans (intervalle: 1 an à 14 ans). Le *tableau 19* représente l'ensemble des âges des Colleys de l'étude :

Tableau 19: Répartition numérique des âges des 12 Colleys

Nom chien	Naissance	âge
C N°1	31/03/06	1 an
C N°2	10/06/04	3 ans
C N°3	11/10/04	3 ans
C N°4	27/09/04	3 ans
C N°5	15/07/02	5 ans
C N°6	07/09/00	7 ans
C N°7	01/01/00	8 ans
C N°8	22/11/99	8 ans
C N°9	15/07/97	10 ans
C N°10	01/01/96	12 ans
C N°11	15/06/93	14 ans
C N°12	inconnue	indéterminé

Nous avons environ 1/3 de jeunes chiens (d'âge inférieur 4 ans) et 50% de chiens âgés (d'âge supérieur ou égal à 7).

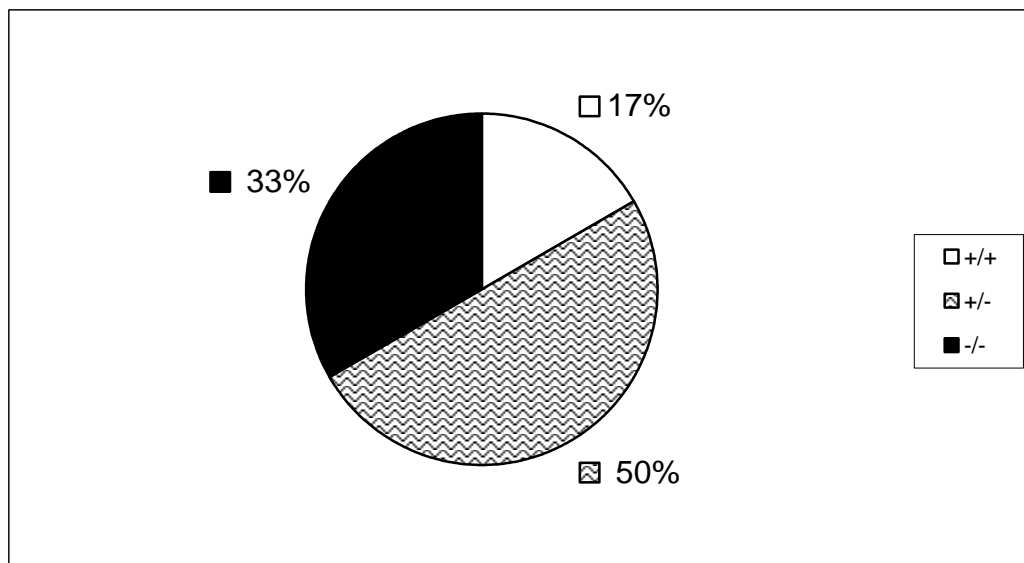
3.5.2. Répartition des génotypes

La répartition des génotypes est illustrée par le *tableau 20* et la *figure 37*:

Tableau 20: Répartition numérique des génotypes *MDRI* des 12 Colleys

Génotype	Nombre de chiens
+/+	2
+/-	6
-/-	4

Figure 37: Répartition des génotypes *MDRI* des 12 Colleys



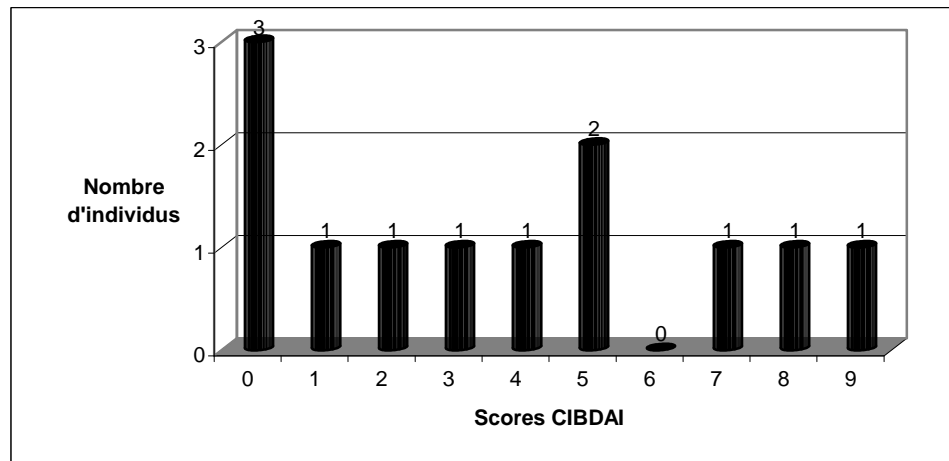
On constate que, contrairement aux autres races étudiées, la proportion de chiens homozygotes sains n'est que de 17% (2/12) soit bien inférieur à la moitié. La majorité des chiens est hétérozygote alors qu'un tiers est homozygote muté. Cette situation contraste avec celle observée dans les autres races étudiées.

La comparaison de ces proportions à celles observées chez le Berger Australien et le Shetland a été effectuée dans le paragraphe 3.1.3.2.

3.5.3. Score

La médiane des scores était de 3,5 et la moyenne de 3,7 (*figure 38*).

Figure 38: Répartition des scores CIBDAI chez les 12 Colleys



La figure 38 indique la répartition des 12 Colleys en fonction de leurs scores CIBDAI. En abscisse est indiqué le score, de 0 à 9, et en ordonnée le nombre de chiens (aucun chien n'avait de score allant de 10 à 12).

On constate que 25% des chiens avait un score nul traduisant un excellent état général. De plus 25% des chiens présentaient un score strictement inférieur 4 (atteinte clinique quasi insignifiante), 25% présentaient un score compris entre 4 et 5 (expression d'une atteinte bénigne de l'intestin) et 25% présentaient un score compris entre 6 et 12 (expression d'une atteinte modérée ou sévère de l'intestin).

Sept individus avaient des scores digestifs non nuls. Ces derniers présentaient des troubles lors de changement alimentaire (3 d'entre eux), un stress (2 d'entre eux), une gastro-entérite ou un trouble d'étiologie non connue. Un même chien, hétérozygote pour la mutation, présentait une douleur diffuse abdominale, des flatulences notables et une sensibilité au Lopatol et au Primpérid.

Deux colleys présentaient des tumeurs : une de la mandibule et un liposarcome. Cinq chiens ont présenté des troubles annexes tels que des otites, une dermatite atopique, une hyperplasie gingivale et de l'eczéma. Quatre chiens ont eu des problèmes génitaux dont 2 pyromètres, une cryptorchidie et des cystites pendant des chaleurs.

3.5.4. Influence de différents paramètres sur les troubles digestifs

Sept Colleys avaient un score digestif non nul.

3.5.4.1. Sexe

Sur les 7 chiens ayant des scores digestifs non nuls, il y avait 5 mâles et 2 femelles.

Nous pouvons comparer ces proportions à celles théoriques lors de non influence du sexe sur la pathologie digestive. Le *tableau 21* présente les données nécessaires à cette comparaison. **Ho : il n'existe pas de différence statistiquement significative de répartition des mâles et femelles selon la présence ou absence d'atteinte digestive.**

Tableau 21: Tableau du test de Fisher pour comparer la proportion des mâles et femelles touchés par des troubles digestifs chez les 12 Colleys

	Mâle	Femelle	Total
Chiens à score digestif non nul	7 (6,7)	2 (3,7)	9
Chiens à score digestif nul	2 (3,7)	3 (2,1)	5
Total	9	5	12

Entre parenthèses sont indiquées les valeurs calculées pour les effectifs théoriques.

Le test de Fisher (valeur d'effectif inférieur à 3) donne une p value = 0,26 qui est supérieur au seuil fixé à 0,05.

Il n'existe donc pas de différence statistiquement significative dans la répartition du sexe chez les Colleys atteints de maladies digestives ou non.

3.5.4.2. Age

La moyenne d'âge des 7 chiens était de 7 ans (intervalle: 1an à 12ans). Le *tableau 22* récapitule les données.

Tableau 22: Répartition numérique des âges des 7 Colleys ayant un score digestif non nul

Nom chien	Date de Naissance	âge
C N°1	31/03/06	1 an
C N°4	27/09/04	3 ans
C N°5	15/07/02	5 ans
C N°8	22/11/99	8 ans
C N°9	15/07/97	10 ans
C N°10	01/01/96	12 ans
C N°12	inconnue	indéterminé

On constate qu'une moitié des Colleys étaient âgés de plus de 8 ans et que les autres étaient âgés de moins de 5 ans.

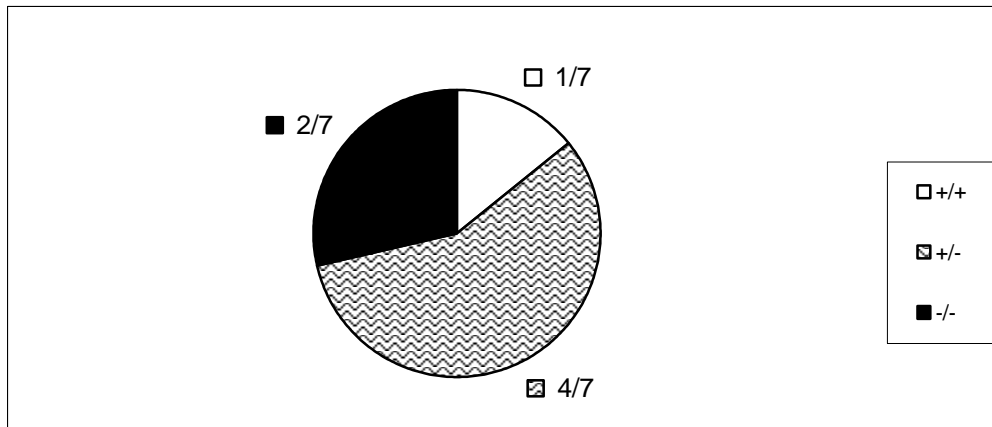
3.5.4.3. Génotype

Sur les 7 chiens présentant des scores digestifs non nuls, la proportion d'homozygotes mutés était de 2/7 (*tableau 23* et *figure 39*):

Tableau 23: Répartition numérique des génotypes *MDR1* des 7 Colleys ayant un score digestif non nul

Génotype	Nombre de chien
+/+	1
+/-	4
-/-	2

Figure 39: Répartition des génotypes *MDRI* des 7 Colleys ayant un score digestif non nul



Nous avons comparé ces proportions à celles observées chez les chiens à score digestif nul (tableau 24).

Tableau 24: Répartition des génotypes *MDRI* chez les chiens de race Berger Australien à score digestif non nul et nul

	+/+	+/-	-/-	Total
Chiens à score digestif non nul	1 (1,2)	4 (3,5)	2 (2,3)	7
Chiens à score digestif nul	1 (0,8)	2 (2,5)	2 (1,7)	5
Total	2	6	4	12

Entre parenthèses sont indiquées les valeurs calculées pour les effectifs théoriques.

Ho : il n'existe pas de différence statistiquement significative de répartition des génotypes selon la présence ou absence d'atteinte digestive.

Le test de Fisher (valeur d'effectif inférieur à 3) donne une *p value* = 1 qui est supérieur au seuil fixé à 5%. **Il n'existe donc pas de différence statistiquement significative dans la répartition du sexe chez les Colleys malades ou non malades.**

3.6. Etude chez le Shetland

3.6.1. Description de la population

Sur 58 Shetland génotypés, les âges se répartissaient entre 10 jours et 11 ans (moyenne de 3 ans). Il y avait 40 femelles pour 18 mâles dans l'échantillon.

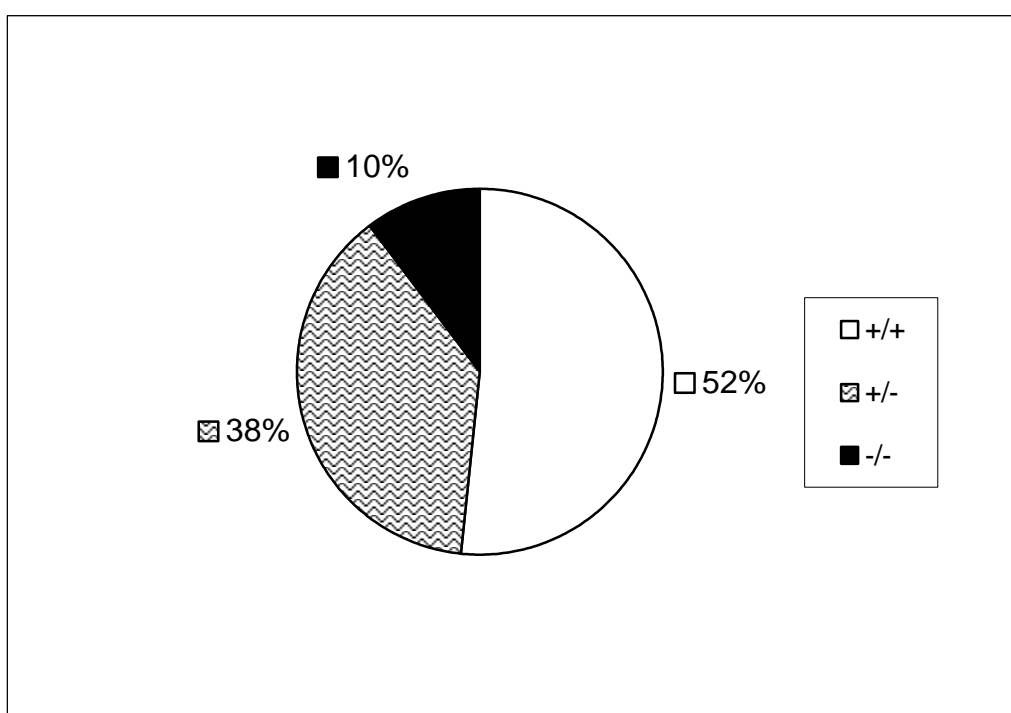
3.6.2. Répartition des génotypes

La répartition des génotypes dans l'échantillon est présentée dans le *tableau 25* et la *figure 40* :

Tableau 25: Répartition numérique des génotypes *MDR1* chez les 58 shetlands

Génotype	Nombre de chiens
+/+	30
+/-	22
-/-	6

Figure 40: Répartition des génotypes *MDR1* chez les 58 shetlands



On constate qu'une moitié des chiens étaient homozygotes sauvages (52%) comme ce qui a été observé chez le Berger Australien. La comparaison de ces proportions avec celles du Colley et du Berger Australien a été effectuée dans le paragraphe 3.1.3.2.

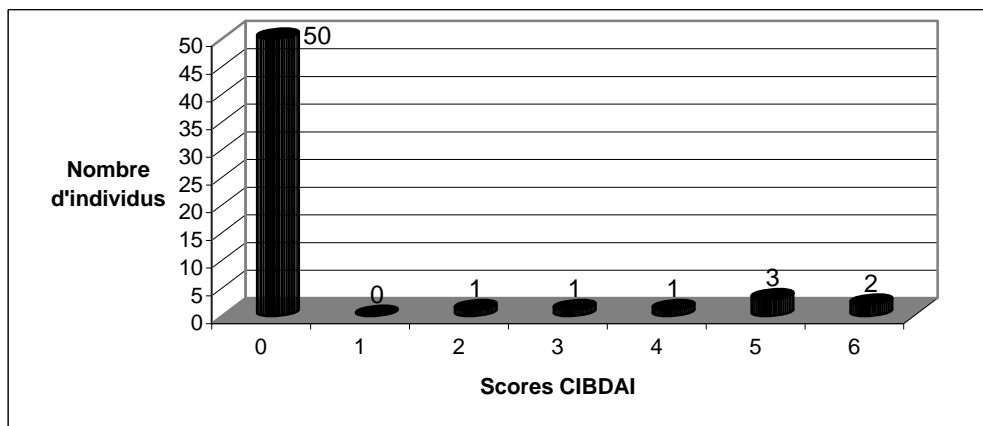
Sur les 6 chiens homozygotes mutés, 2 seulement exprimaient des symptômes digestifs. Trois chiens ont révélé des sensibilités médicamenteuses : 1 homozygote muté au fipronil et advantix, 1 hétérozygote à un vermifuge et 1 homozygote sain à un antibiotique (nature inconnue).

Quatre shetlands homozygotes sauvages ont exprimé des symptômes divers (trachéites, DHPP...). Deux hétérozygotes étaient cryptorchides.

3.6.3. Score

Les scores sont répartis selon l'histogramme de la *figure 41*:

Figure 41: Répartition des scores CIBDAI des 58 Shetlands



La *figure 41* indique la répartition des 58 Shetland en fonction de leurs scores CIBDAI. En abscisse est indiqué le score, de 0 à 6, et en ordonnée le nombre de chiens (aucun chien n'avait de score compris entre 7 et 12).

On constate que la très grande majorité des chiens avait un score nul (86 %) traduisant un excellent état général. Peu de chiens étaient malades et la répartition était la suivante : 4% des chiens présentaient un score inférieur 4 (atteinte clinique insignifiante), 7% présentaient un score compris entre 4 et 5 (expression d'une atteinte bénigne de l'intestin) et 3% présentaient un score compris entre 6 et 8 (expression d'une atteinte modérée de l'intestin).

Seuls 7 individus ont exprimés des symptômes digestifs dont 2 plutôt des troubles du haut appareil et 5 du bas appareil digestif. Ces 5 individus ont été touchés dès l'âge de 3 mois et jusqu'à 3 ans, les facteurs favorisants étaient des changements alimentaires et du stress autour de l'alimentation (en élevage).

3.6.4. Influences de différents paramètres sur les troubles digestifs

Sept Shetland avaient un score digestif non nul.

3.6.4.1. Sexe

Sur 7 Shetlands ayant présenté des scores digestifs non nuls, il y avait 3 mâles pour 4 femelles.

Nous pouvons comparer ces proportions à celles théoriques lors de non influence du sexe sur la pathologie digestive (*tableau 26*).

Tableau 26: Tableau du test de Fisher pour comparer la proportion des mâles et femelles touchés par des troubles digestifs chez les 48 Shetlands

	Mâle	Femelle	Total
Chiens à score digestif non nul	3 (2,2)	4 (4,8)	7
Chiens à score digestif nul	15 (15,8)	36 (35,2)	51
Total	18	40	58

Entre parenthèses sont indiquées les valeurs calculées pour les effectifs théoriques.

Le test de Fisher (valeur d'effectif inférieur à 3) donne une p value = 0,6 qui est supérieur au seuil fixé à 0,05. **Il n'existe donc pas de différence statistiquement significative dans la répartition du sexe chez les Colleys malades ou non malades.**

3.6.4.2. Age

L'âge des chiens ayant un score digestif non nul allait de 5 mois à 4 ans avec une moyenne de 2 ans. Le *tableau 27* représente la liste des âges des individus malades.

Tableau 27: Répartition numérique des âges des 7 Shetlands ayant un score digestif non nul

Nom du chien	Date de Naissance	Age
S N°1	03/09/2007	0 an
S N°2	02/04/2006	1 an
S N°3	17/02/2007	1 an
S N°4	03/07/2004	3 ans
S N°5	28/03/2004	3 ans
S N°6	31/10/2003	4 ans
S N°7	29/02/2004	4 ans

On remarque que 100% des individus malades avaient moins de 5 ans.

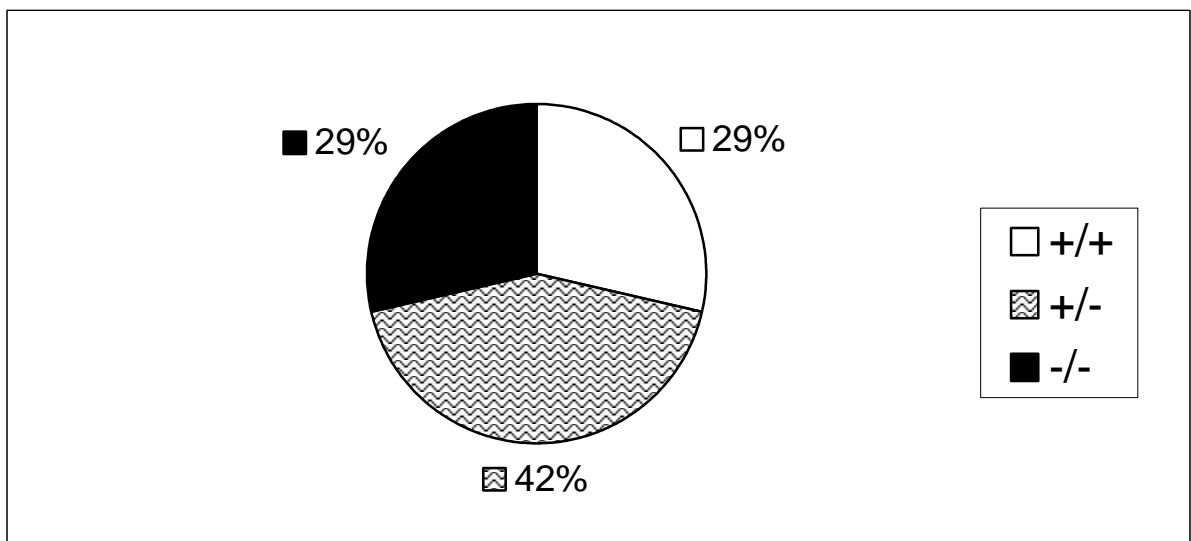
3.6.4.3. Génotype

La répartition des génotypes des 7 shetlands à score digestif non nul est présentée dans le *tableau 20* et la *figure 42* :

Tableau 28: Répartition numérique des génotypes MDRI chez les 7 Shetlands à score digestif non nul

Génotype	Nombre de chiens
+/+	2
+/-	3
-/-	2

Figure 42: Répartition des génotypes *MDRI* des 7 Shetlands à score digestif non nul



Sur ces 7 individus avec des symptômes digestifs, 2 étaient homozygotes sains, 2 homozygotes mutés et 3 hétérozygotes.

Les deux chiens homozygotes sains ont exprimé des douleurs abdominales et à la défécation.

4. DISCUSSION

La glycoprotéine P (Gly-P), transporteur membranaire de la famille des transporteurs ABC (*ATP-binding cassette*), et codée par le gène *MDR1*, a dans un premier temps été décrite au niveau des cellules tumorales, où elle participe au phénomène de résistance aux chimiothérapies anticancéreuses (*MDR* signifie *Multi Drug Resistance*). Elle agit comme une protéine transmembranaire qui expulse le médicament hors des cellules.

Chez l'Homme, la Souris et parfois le Chien, on la trouve également localisée sur la surface apicale des cellules épithéliales du côlon et du jéjunum, sur les hépatocytes proches des canaux biliaires, sur la surface apicale des cellules épithéliales du pancréas et des tubules proximaux rénaux. L'expression de la Gly-P à ces points stratégiques contribue à réduire l'absorption de xénobiotiques à partir du tractus gastro-intestinal et favorise l'élimination de substances toxiques endogènes et exogènes par l'urine et la bile. On retrouve aussi la Gly-P sur la surface luminale de l'endothélium des capillaires sanguins des testicules, du cerveau et du placenta. Elle protège ainsi le système nerveux central et le fœtus en participant aux barrières hémato-encéphalique et placentaire [13, 18, 73].

Schinkel *et al.* ont montré que des souris artificiellement invalidées pour les gènes *Mdr1a* et *Mdr1b* ne présentaient pas de réduction de leur viabilité et de leur fertilité, ni de gestation anormale. Une expression uniquement hépatique compensatrice du gène *Mdr1b* a été mise en évidence lors de l'invalidation du gène *Mdr1a* [61].

Divers études, menées chez la Souris, ont cependant révélé que la Gly-P, dont un des rôles est la protection de la muqueuse intestinale, pouvait être responsable, en cas de sous-expression ou de non expression, de colites hémorragiques chroniques [10, 49].

La forte homologie structurale qui existe entre les gènes de la classe des *MDR* peut permettre de transposer les résultats obtenus chez la Souris à l'espèce canine. Celle-ci ne présente qu'un seul transporteur le **cMdr1**.

Le Colley est connu pour être porteur depuis de nombreuses générations d'une délétion de 4 paires de bases dans le gène *MDR1*, appelée mutation *MDR1*. Cette délétion a été retrouvée dans différentes races apparentées au Colley [56].

Notre étude a donc porté sur l'exploration de l'influence du génotype au locus *MDR1* sur le développement de maladies intestinales chroniques chez le Chien. Nous nous sommes focalisés sur les différentes races porteuses de la mutation *MDR1* décrites dans la littérature vétérinaire et scientifique, soit le Colley, le Shetland, le Berger Blanc Suisse, le Berger Australien et le Border Collie. D'autres races de bergers ont été décrites comme porteuses de la mutation *MDR1* tel le Bobtail ou le Whippet à poil long, mais ces races étaient trop peu représentées en France pour que nous les retenions pour notre étude.

Echantillonnage

Nous avons utilisé la base de données CLOVIS des consultations de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort (ENVA) pour sélectionner les chiens de ces différentes races, potentiellement toujours vivants (date de naissance postérieure au 01/01/2001). Un total de 516 chiens répondait à ce critère. Ces chiens avaient été vus en consultation de médecine générale, en consultation spécialisée, en chirurgie ou pour une simple vaccination à l'ENVA.

Les propriétaires de ces 516 chiens ont été contactés par courrier mais seulement 34 d'entre eux ont participé à la totalité de l'étude (réponse au questionnaire plus génotypage *MDR1*). Nous avons donc élargi notre recrutement à l'aide des forums internet et clubs de race des bergers

apparentés au Colley (essentiellement Colley, Shetland et Berger Australien) et grâce au club de race du Berger Blanc Suisse.

Au final, un total de 177 chiens a ainsi été inclus dans l'étude. Les cinq races sélectionnées initialement ont ainsi été représentées, dans des proportions variables. Notre effectif était en effet essentiellement constitué de chiens Berger Australien (47% soit 84 individus sur 177) et de chiens Shetland (33% soit 58 individus sur 177). La forte proportion de femelle (112/177) est directement liée à l'origine de certains individus qui provenaient d'élevages.

Le recours à un recrutement additionnel qui participe à hauteur de 81% à l'effectif global des chiens de l'étude (145 chiens sur 177) nous permet de postuler que l'échantillonnage de nos chiens est représentatif de la population générale des chiens de bergers en France. En effet, la part des chiens vus à l'ENVA étant minoritaire (19%), il est peu probable que les chiens « à problèmes » soient surreprésentés dans l'échantillon. Enfin, ces 19% de chiens vus à l'ENVA ne l'avaient pas forcément été pour un problème médical mais également dans le cadre de simples vaccinations annuelles.

Le questionnaire a été correctement rempli par la plupart des propriétaires mais certaines personnes l'ont trouvé trop long. Les prélèvements de cellules buccales, pour le génotypage *MDR1*, n'ont pas posé de problèmes particuliers, tous étaient exploitables.

Génotypes au locus *MDR1* dans les cinq races étudiées

Nous avons calculé la prévalence de l'allèle délétère et la fréquence des génotypes *MDR1* dans les cinq races représentées mais nous n'avons pu comparer ces fréquences que pour les 3 races suffisamment bien représentées (Colley, Berger Australien et Shetland). Nous n'avons pas observé de différence significative dans la répartition des génotypes, dans ces 3 races (*p-value* du test de Fisher > 0,05).

Cependant, c'est dans la race Colley, malgré un échantillonnage réduit (12 chiens), que nous avons observé la plus grande proportion de chiens porteurs de la mutation *MDR1*, avec une prévalence de l'allèle délétère de 58% (33% d'homozygotes mutés et 50% d'hétérozygotes). Ces résultats peuvent être comparés à ceux publiés par Hugnet *et al.*, en 2004, qui concluent à une prévalence de l'allèle délétère de 64% dans la race Colley, en France [25]. Dans cette étude, la fréquence du génotype homozygote sain a été estimée à 20%, celle du génotype hétérozygote à 32% et celle du génotype homozygote muté à 48%. Un test de Fisher (effectifs théoriques inférieurs à 3) effectué pour comparer cette distribution à notre distribution permet de conclure qu'il n'existe pas de différence significative entre ces deux distributions (*p-value* = 0,66 > 0,05).

Chez le Border Collie, dans le petit effectif de chiens recrutés (9 chiens) nous n'avons observé aucun individu porteur de la mutation *MDR1* (homozygote muté ou hétérozygote). Tous les chiens étaient homozygotes sains.

Chez les Bergers Blancs Suisses, le faible nombre d'individus recrutés (14 chiens) ne permet pas non plus de dresser un bilan dans la race. Nous n'avons observé qu'un individu homozygote muté et aucun individu hétérozygote.

Notre étude a montré une prévalence de l'allèle muté chez les chiens Berger Australien de 32%, avec 53% d'individus homozygotes sains, 32% d'individus hétérozygotes et 15% d'individus homozygotes mutés. Ces pourcentages ont été calculés sur un effectif conséquent de 84 chiens. Ces résultats peuvent être comparés à ceux publiés par Kawabata *et al.*, en 2005, qui concluent à une prévalence de l'allèle délétère de 33,3% dans la race Berger Australien, au Japon. Dans cette étude,

la fréquence du génotype homozygote sain a été estimée à 44,4%, celle du génotype hétérozygote à 44% et celle du génotype homozygote muté à 11,2% [34]. Un test du χ^2 effectué pour comparer cette distribution à notre distribution permet de conclure qu'il n'existe pas de différence significative entre ces deux distributions au risque 5% d'erreur ($\chi^2 = 0,023$).

Nous avons calculé une prévalence de l'allèle muté de 29% dans l'échantillon des Shetlands (58 chiens recrutés), avec 54% de chiens homozygotes sains, 39% de chiens hétérozygotes et 7% de chiens homozygotes mutés. Ces résultats peuvent être comparés à ceux publiés par Kawabata *et al.*, en 2005, qui concluent à une prévalence de l'allèle délétère de 1,2% dans la race Shetland, au Japon. Dans cette étude, la fréquence du génotype homozygote sain a été estimée à 98%, celle du génotype hétérozygote à 2% et celle du génotype homozygote muté à 0% [34]. Un test du χ^2 effectué pour comparer cette distribution à notre distribution permet de conclure qu'il existe une différence très significative entre ces deux distributions au risque 5% d'erreur ($\chi^2 = 562$). Il semble que la prévalence de la mutation *MDR1* soit beaucoup plus importante en France qu'au Japon. Il serait intéressant de comparer la généalogie des lignées de Shetland importées au Japon pour voir si ces chiens appartiennent aux mêmes lignées que les chiens français. Une représentation partielle de la race Shetland au Japon (sélection de quelques lignées) pourrait alors expliquer cette différence très nette de prévalence de l'allèle délétère *MDR1* entre France et Japon.

Score digestif et influence de différents paramètres

Score digestif

Le score digestif des 177 chiens de l'étude se rapproche fortement du score cumulé (médiane de 1,1 et 1,3 respectivement). Ceci s'explique par des scores d'atteinte de l'état général essentiellement nuls (médiane de 0). Il nous a donc paru judicieux de fonder notre étude sur le score digestif, le plus représentatif de l'atteinte intestinale.

Sur les 43 chiens bergers à score digestif non nul, la répartition des proportions des cinq races est proche de la répartition globale de l'échantillon, excepté pour les Colleys qui passent en 2^{ème} position (16% de l'effectif des chiens à score digestif non nul) par rapport à la 4^{ème} position occupée par la race représentée dans sa globalité (7% de l'effectif global). C'est en effet chez le Colley que l'on a observé la plus grande proportion de chiens à score digestif non nul (58% dans la race). Par ordre décroissant, on observe ensuite le Berger Blanc Suisse (57%), le Border Collie (22%), le Berger Australien (22%) et enfin le Shetland (12%). Ces pourcentages doivent cependant être comparés avec précaution, compte tenu de la grande hétérogénéité dans la taille des échantillons (86 Bergers Australiens et seulement 9 Borders Collies au total).

Influence du sexe

Dans notre échantillon de chiens à score digestif non nul, il y avait plus de femelles (23/43 soit 54%) touchées par les maladies digestives que de mâles (20/43 soit 46%). Cette forte proportion de femelles se retrouvait dans la population générale des chiens (112/177 chiens soit 63,2%). Ceci s'explique par la forte proportion de chiens d'éleveurs dans l'échantillon (valable avec toutes les races sauf pour Berger Blanc Suisse). Il est possible de savoir, à l'aide d'un test du χ^2 , s'il existe une différence entre la répartition des sexes chez les animaux à score digestif nul (43 chiens sont 23 femelles et 20 mâles) et chez les animaux à score digestif non nul (134 chiens dont 89 femelles et 45 mâles). On constate qu'il n'existe pas de différence statistiquement significative entre ces deux répartitions, au risque d'erreur de 5% ($\chi^2 = 2,33$).

Il ne semble donc pas y avoir d'influence du sexe sur la fréquence des maladies digestives chroniques dans les cinq races de chiens étudiées.

Influence du génotype

Vingt et un pourcent des 43 bergers avec score digestif non nul étaient homozygotes mutés, contre 14% dans l'échantillon total des chiens.

Chez le Colley (12 chiens au total), plus de la moitié des individus étaient atteints au niveau digestif (7 individus) et la proportion d'homozygotes mutés est de 2/7 (29%) chez les chiens atteints de troubles digestifs et de 4/12 (33%) dans l'ensemble de la race.

Chez les Bergers Australiens (84 chiens au total), les chiens homozygotes mutés passent de 14% à 24% lorsque l'on compare l'échantillon global avec celui des chiens ayant eu des symptômes digestifs.

Chez les Shetlands 12% d'individus présentaient des symptômes digestifs (7/58) mais la population est très jeune (moyenne de 3 ans). La proportion de chiens homozygotes mutés passe de 7% (4/58) à 29% (2/7) chez les chiens ayant des symptômes digestifs.

Pour mémoire, chez le Berger Blanc Suisse nous n'avons observé qu'un seul individu homozygote muté sur les 14 chiens de l'échantillon. Ce chien était en parfaite santé au moment de l'étude (score cumulé nul). Chez le Border Collie, tous les 9 individus de la race étaient homozygotes sains.

Nous pouvons cependant comparer la répartition des 3 classes de génotypes, entre les chiens à score digestif nul et les chiens à score digestif non nul, pour les trois races Colley, Shetland et Berger Australien, à l'aide d'un test de Fisher. On obtient alors une différence non significative ($p\text{-value} = 0,09$).

Il ne semble donc pas y avoir d'influence significative du génotype au locus *MDR1* sur la pathologie digestive des chiens de races bergers de notre effectif.

Cette constatation peut être expliquée par 3 commentaires : L'échantillon de chiens était vraisemblable trop petit et les chiens beaucoup trop jeunes pour exprimer une sensibilité aux maladies digestives. En effet, les propriétaires ne peuvent juger d'une sensibilité qu'après un certain âge (âge adulte) car le chiot et le chien âgé sont plus sujets à des troubles intestinaux. De plus, il a été observé chez la souris homozygote mutée *mdr1a* (-/-) une surexpression du gène *mdr1b* au niveau hépatique. Il est donc probable que les individus homozygotes mutés *MDR1* (-/-), d'autres transporteurs se sont substitués à la Gly-P absente.

CONCLUSION

Les transporteurs membranaires, tout comme les systèmes enzymatiques tels que les cytochromes, sont des facteurs déterminants dans le devenir des médicaments dans l'organisme. La glycoprotéine P (Gly-P) appartient à la superfamille des transporteurs ABC (*ATP-binding cassette*) et est probablement l'un des transporteurs les plus importants impliqués dans la biodisponibilité de xénobiotiques chez différentes espèces de mammifères, dont l'Homme, la Souris et le Chien. La Gly-P est localisée dans plusieurs tissus, tels que les intestins, les reins, le foie, le système immunitaire, au niveau de la barrière hémato-encéphalique et placentaire et possède une grande variabilité de substrats.

L'étiologie exacte des maladies inflammatoires intestinales telles que les colites ulcéraives et hémorragiques ou la maladie de Crohn de l'Homme reste encore floue. Il y a quelques évidences indiquant que la flore intestinale endogène pourrait être un des facteurs impliqués dans la pathogenèse de l'inflammation intestinale et qu'une perturbation de la barrière cellulaire protectrice encourage le développement d'une maladie inflammatoire. Le rôle physiologique de la Gly-P, en participant à la barrière intestinale, pourrait être de prévenir l'entrée de toxines bactériennes dans la muqueuse de la paroi intestinale et d'offrir une protection contre une réponse immunologique exagérée vis-à-vis de la flore endogène.

Des études menées chez la souris ont montré que les animaux invalidés dans le gène codant pour la Gly-P (*Mdr1a*) étaient prédisposés aux colites inflammatoires chroniques. De même, des études menées chez l'Homme semblent indiquer que certains allèles au locus *MDR1* sont retrouvés dans des proportions significativement différentes chez les personnes atteintes de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et chez les personnes indemnes.

Nous avons voulu étudier le rôle potentiel de la mutation *MDR1*, touchant les chiens de race Colley et bergers apparentés, dans le développement de maladies digestives chroniques. Notre étude a porté sur 177 chiens de race Colley, Shetland, Border Collie, Berger Australien et Berger Blanc Suisse. Nous n'avons pas mis en évidence une influence du génotype au locus *MDR1* dans le développement de maladies digestives chroniques, dans notre échantillon de chiens. Nous avons cependant pu établir la prévalence de l'allèle délétère dans les cinq races étudiées. Une étude effectuée sur des effectifs de chiens plus importants et plus âgés permettrait certainement d'effectuer les tests statistiques que nous n'avons pu mettre en œuvre pour certaines races, à cause de la taille réduite de l'échantillon racial, et de répondre de façon plus juste à la question du rôle de la mutation *MDR1* dans la pathologie digestive chronique chez le Chien.

Dans le cas hypothétique d'une surexpression d'un autre transporteur que la Gly-P, il serait envisageable, chez les chiens homozygotes mutés pour *MDR1*, de mesurer l'activité de tous les récepteurs connus pour leur rôle dans l'élimination cellulaire de xénobiotiques.

ANNEXES



Annexe 1 : Lettre d'accompagnement aux propriétaires

Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

A Maisons-Alfort, le 25 novembre 2007

Unité de
Génétique Médicale et Moléculaire

Unité de
Parasitologie – Mycologie
Maladies parasitaires et fongiques
7 Avenue du Général de Gaulle
94704 Maisons Alfort cedex

Objet : Étude de la prédisposition héréditaire des chiens de race Colley à des réactions d'intolérance à certains médicaments et incidence sur leur santé.

Je me permets de vous recommander Mlle Karen Burger, étudiante en dernière année à l'École Vétérinaire d'Alfort, qui prépare sa thèse de fin d'études sous ma direction. Chez les chiens de race Colley, le gène *MDR1* (*Multi Drugs Resistance-1*) est très souvent modifié (c'est à dire : atteint d'une mutation) ce qui explique que divers médicaments (Ivermectine, loperamide...) ne puissent pas être utilisés dans cette race. Un test génétique est actuellement disponible en routine qui permet de savoir si un animal est sensible ou non (34 % des Colley, 17 % des Berger Australien, source Antagene 2007).

Dans l'espèce Homme, cette mutation est connue aussi. En plus d'intolérance à certains médicaments, il a été observé que les personnes touchées étaient prédisposées à certaines maladies, en particulier digestives. La thèse de Karen Burger nous permettra de savoir si les mêmes problèmes sont rencontrés chez les chiens présentant cette mutation afin de mieux les prévenir et mieux les guérir. Nous nous adressons à vous car vous êtes vous-même venu à l'École d'Alfort afin de faire soigner votre chien ou simplement pour une vaccination.

Pourriez-vous accorder un peu de votre temps (dix minutes environ) afin de répondre au questionnaire joint ? Pour la plupart de ces questions, il s'agira de cocher la (les) case (s) correspondant à votre réponse.

D'autre part, nous vous proposons d'effectuer le test de dépistage génétique de dépistage de la mutation *MDR1* sur votre chien. Afin de vous remercier de votre aide, nous avons négocié avec le laboratoire d'analyse génétique **ANTAGENE** le test à moitié prix (soit 27,50 euros) pour les chiens participant à l'étude. Au delà du propos de la présente recherche, savoir si votre chien est porteur ou non est intéressant pour sa santé : en effet, certains médicaments ne devront jamais être administrés à votre chien s'il s'avère génétiquement sensible.

Dans l'attente de vous lire, je vous prie d'agréer, Madame, Monsieur, mes remerciements pour la contribution que vous aurez bien voulu apporter à notre étude.

Dr. Marie Abitbol

** Il est possible que votre compagnon soit décédé et que nous ne l'ayons pas su. Si tel était le cas, je vous prie de nous excuser et de nous le faire savoir.*

Condition de l'étude : cette étude se fait dans le cadre de la thèse de Doctorat Vétérinaire d'une étudiante en dernière année d'étude à l'École Vétérinaire.

Étudiante : Mlle Karen Burger

Directeur : Dr Marie Abitbol, Maître de Conférences, Unité de Génétique Moléculaire

Assesseur : Dr Geneviève Marignac, Maître de Conférences, Unité de Parasitologie

Le laboratoire ANTAGENE, partenaire de l'étude, vous propose de réaliser le test de génotypage *MDR1* pour 50% de son prix éleveur soit 27,50 euros. Le laboratoire offre le complément dans le cadre de la recherche sur la santé du Chien. Tout le reste de l'étude est financé de façon interne par l'Unité de Génétique Médicale et Moléculaire. Le prélèvement ne prend que quelques secondes et est totalement indolore. Il s'agit de frotter une simple brosse souple à l'intérieur de la joue de votre compagnon afin de récupérer un échantillon de cellules buccales. Si vous souhaitez effectuer ce test, laissez nous vos coordonnées téléphoniques, nous vous contacterons dans les plus brefs délais.

Les informations nominatives que vous nous enverrez resteront strictement confidentielles. L'ensemble des informations médicales sera rassemblé de façon anonyme et fera l'objet d'une publication dans une revue scientifique afin d'améliorer la compréhension, la prévention et le traitement des maladies canines.

La réponse au questionnaire n'implique pas d'accepter de participer à la détection de la mutation *MDR1*.

Sans votre participation, cette recherche ne pourrait pas aboutir et les retombées éventuelles pour la médecine canine seraient encore repoussées. Nous vous remercions par avance pour votre participation.

Dr. Marie Abitbol : 01-43-96-70-01 et Mlle Karen Burger : 06-74-34-40-74



Annexe 2 : Lettre d'accompagnement aux éleveurs

Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

A Maisons-Alfort, le 25 novembre 2007

Unité de
Génétique Médicale et Moléculaire
Unité de
Parasitologie – Mycologie
Maladies parasitaires et fongiques
7 Avenue du Général de Gaulle
94704 Maisons Alfort cedex

Madame, Monsieur,

Objet : Étude de la prédisposition héréditaire des chiens de race Colley et apparentées à des réactions d'intolérance à certains médicaments et incidence sur leur santé.

Je me permets de vous recommander Mlle Karen Burger, étudiante en dernière année à l'École Vétérinaire d'Alfort, qui prépare sa thèse de fin d'études sous ma direction. Chez les chiens de race Colley, le gène *MDR1* (*Multi Drugs Resistance-1*) est très souvent modifié (c'est à dire: atteint d'une mutation) ce qui explique que divers médicaments (Ivermectine, loperamide...) ne puissent pas être utilisés dans cette race. Un test génétique est actuellement disponible en routine qui permet de savoir si un animal est sensible ou non (34 % des Colley, 17 % des Berger Australien, source Antagene 2007).

Dans l'espèce Homme, cette mutation est connue aussi. En plus d'intolérance à certains médicaments, il a été observé que les personnes touchées étaient prédisposées à certaines maladies, en particulier digestives. La thèse de Karen Burger nous permettra de savoir si les mêmes problèmes sont rencontrés chez les chiens présentant cette mutation afin de mieux les prévenir et mieux les guérir. Nous nous adressons à vous car vous êtes vous-même concerné par la question, étant éleveur de la race.

Pourriez-vous accorder un peu de votre temps (dix minutes environ) afin de répondre au questionnaire joint ? Pour la plupart de ces questions, il s'agira de cocher la (les) case (s) correspondant à votre réponse.

D'autre part, nous vous proposons d'effectuer le test de dépistage génétique de la mutation *MDR1* sur votre/vos chiens. Afin de vous remercier de votre aide, nous avons négocié avec le laboratoire d'analyse génétique **ANTAGENE** le test à moitié prix (soit 27,50 euros) pour les chiens participant à l'étude. Au delà du propos de la présente recherche, savoir si votre chien est porteur ou non est intéressant pour sa santé et son potentiel reproducteur : en effet, certains médicaments ne devront jamais être administrés à votre chien s'il s'avère génétiquement sensible et l'absence de la mutation confère une sécurité pour les futures portées.

Dans l'attente de vous lire, je vous prie d'agréer, Madame, Monsieur, mes remerciements pour la contribution que vous aurez bien voulu apporter à notre étude.

Dr. Marie Abitbol

Condition de l'étude : cette étude se fait dans le cadre de la thèse de Doctorat Vétérinaire d'une étudiante en dernière année d'étude à l'École Vétérinaire.

Étudiante : Mlle Karen Burger

Directeur : Dr Marie Abitbol, Maître de Conférences, Unité de Génétique Médicale et Moléculaire

Assesseur : Dr Geneviève Marniac, Maître de Conférences, Unité de Parasitologie

Le laboratoire **ANTAGENE**, partenaire de l'étude, vous propose de réaliser le test de génotypage *MDR1* pour 50% de son prix éleveur soit 27,50 euros. Le laboratoire offre le complément dans le cadre de la recherche sur la santé du Chien. Tout le reste de l'étude est financé de façon interne par l'Unité de Génétique Médicale et Moléculaire. Le prélèvement ne prend que quelques secondes et est totalement indolore. Il s'agit de frotter une simple brosse souple à l'intérieur de la joue de votre animal afin de récupérer un échantillon de cellules buccales. Si vous souhaitez effectuer ce test, laissez nous vos coordonnées téléphoniques, nous vous contacterons dans les plus brefs délais.

Les informations nominatives que vous nous enverrez resteront strictement confidentielles. L'ensemble des informations médicales sera rassemblé de façon anonyme et fera l'objet d'une publication dans une revue scientifique afin d'améliorer la compréhension, la prévention et le traitement des maladies canines.

La réponse au questionnaire n'implique pas d'accepter de participer à la détection de la mutation *MDR1*.

Sans votre participation, cette recherche ne pourrait pas aboutir et les retombées éventuelles pour la médecine canine seraient encore repoussées. Nous vous remercions par avance pour votre participation.

Dr. Marie Abitbol : 01-43-96-70-01 et Mlle Karen Burger : 06-74-34-40-74



Annexe 3 : Questionnaire de santé

Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

Questionnaire de santé concernant votre chien

Nom :
Adresse :
Téléphone (où nous pouvons vous joindre facilement) :
Votre chien s'appelle :
Race : Sexe :
Date de naissance : Poids actuel :

1-ETAT GENERAL : (Cochez la case adéquate)

- Comment qualifieriez-vous l'activité de votre chien en fonction de son âge?

- Normal
- Légèrement diminuée
- Moyennement diminuée
- Sévèrement diminuée

- A-t-il perdu du poids (lié à une maladie et non à un régime alimentaire)?

- Non
- Faiblement (<5% de son poids)
- Modérément (5 à 10%)
- Sévèrement (>10%)

- Comment qualifieriez-vous l'appétit de votre animal ?

- Normal
- Légèrement diminué
- Moyennement diminué
- Sévèrement diminué

- Commentaires libres :

2 - ASPECT DIGESTIF : (Cochez la case adéquate)

- Votre chien a-t-il présenté (ou présente) des épisodes de vomissements aigus ?

- OUI
- NON

Si oui, quel a été l'âge du début des symptômes ? _____

- Combien de vomissements par jour votre chien avait (ou a) - il ?

- 1 fois par semaine
- 2 à 3 fois par semaine
- Plus de 3 fois par semaine

- Quelle était (ou est) la durée de ces épisodes avant guérison?

Réponse :

- Guérison sous traitements antibiotiques : OUI NON

- Votre chien a-t-il présenté (ou présente) des épisodes de diarrhées aiguës ?

- OUI
- NON

Si oui, quel a été l'âge du début des symptômes ? _____

- Y avait-il un facteur déclenchant comme le stress, un changement alimentaire... ?

Réponse :

- Combien de selles liquides ou molles votre chien avait (ou a) t-il ?

- 1 fois par jour
- 2 à 3 fois par jour
- Plus de 3 fois par jour

- Quel était (ou est) l'aspect de ses selles (présence de sang, couleur, odeur, présence d'aliments non digérés, de glaires...)?

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> Normales | <input type="checkbox"/> Présence de sang |
| <input type="checkbox"/> Légèrement molles | <input type="checkbox"/> Absence de sang |
| <input type="checkbox"/> Complètement molles | <input type="checkbox"/> Présence de mucus |
| <input type="checkbox"/> Liquides | <input type="checkbox"/> Absence de mucus |

- Votre chien présentait (ou présente) – il des douleurs à la défécation ?

- OUI NON

- Votre chien présentait (ou présente) - il une douleur abdominale (caractérisée par un dos voûté, une sensibilité tactile aiguë du ventre) ?

- OUI NON

- Même chose pour des flatulences ?

- OUI NON

- A-t-il présenté des fistules anales ou abcès anaux ?

- OUI NON

Commentaires libres :

3 - ASPECT EXTRA DIGESTIF : (Cochez la case adéquate)

- Votre chien a-t-il souffert de cancer ? OUI NON

Si oui, quand, quel organe, une analyse a-t-elle été réalisée ?

Réponse :

- Votre chien a-t-il présenté des effets indésirables à un ou plusieurs médicaments ?

- OUI NON

- Si votre chien a été anesthésié, a-t-il eu des réactions particulières durant ou après cette anesthésie ?

- OUI NON

- Votre chien a-t-il présenté des infections à répétition (rhinites, otites, problèmes de peau...)?

- OUI NON

Si oui de quel type ?

Réponse :

- Votre chien a-t-il eu des anomalies des organes génitaux (testicules ou ovaires en particulier) ?

- OUI NON

Si oui de quel type ?

Réponse :

- Votre chien présente-t-il des troubles neurologiques réguliers de type épilepsie ? OUI NON

MERCI

Merci de nous indiquer votre souhait concernant le test génétique *MDRI* :

Je souhaite aider la recherche sur la santé de mon compagnon et obtenir le statut génétique de mon chien vis-à-vis de la mutation *MDRI*, de façon à savoir si je prends un risque en lui administrant certains médicaments. Je vous retourne le questionnaire accompagné de mes coordonnées de façon à être contacté par Mlle Karen Burger qui m'expliquera les modalités de réalisation du test.

Nom et Prénom :

Téléphone fixe :

Téléphone mobile :

Je ne souhaite pas connaître le statut de mon chien vis-à-vis de la mutation *MDRI* et vous retourne simplement le questionnaire complété.

Mon compagnon a déjà été testé pour la mutation du gène *MDRI*, je vous renvoie le questionnaire accompagné d'une photocopie du test et je vous indique le statut de mon chien :

- homozygote sain hétérozygote homozygote muté

Nous vous remercions infiniment pour l'aide que vous apportez à l'étude des maladies du Chien.

Dr. Marie Abitbol Mlle Karen Burger

Annexe 4 : Listes des résultats bruts des 177 chiens

Berger Blanc Suisse:

Chien	Sexe	Naissance	âge	Résultat	Score état général	Score digestif	CIBDAI
1	M	30/08/06	1 an	+/+	0	0	0
2	M	25/01/03	5 ans	+/+	0	0	0
3	M	15/09/05	2 ans	+/+	0	0	0
4	F	12/02/06	2 ans	+/+	1	5	6
5	F	24/12/06	1 an	+/+	0	0	0
6	F	20/12/04	3 ans	+/+	0	1	1
7	F	23/04/97	10 ans	+/+	3	5	8
8	F	28/06/05	2 ans	+/+	0	0	0
9	M	10/12/05	2 ans	+/+	0	2	2
10	M	17/08/07	0 an	+/+	3	6	9
11	F	17/05/03	4 ans	+/+	0	6	6
12	M	14/09/02	5 ans	+/+	0	6	6
13	F	11/01/05	3 ans	+/+	0	5	5
14	M	02/10/07	0 an	-/-	0	0	0

Berger Australien

Chien	Sexe	Naissance	âge	Résultat	Score état général	Score digestif	CIBDAI
1	M	13/10/00	7 ans	+/-	0	5	5
2	M	17/01/06	2 ans	+/+	0	0	0
3	F	26/01/07	1 an	-/-	0	1	1
4	F	05/12/04	3 ans	+/-	0	1	1
5	M	23/08/05	2 ans	+/-	0	0	0
6	F	01/12/06	1 an	+/+	0	0	0
7	M	25/06/04	3 ans	+/-	0	0	0
8	F	20/11/06	1 an	+/+	0	0	0
9	F	01/01/05	3 ans	+/-	0	0	0
10	M	16/09/07	0 an	-/-	0	0	0
11	F	28/08/01	6 ans	+/+	0	0	0
12	F	25/01/07	1 an	+/+	0	0	0
13	F	27/05/02	5 ans	+/+	0	0	0
14	F	26/11/06	1 an	+/-	0	0	0
15	M	07/05/05	2 ans	+/-	0	0	0
16	F	30/03/07	0 an	+/+	0	0	0
17	M	16/09/02	5 ans	+/-	0	0	0
18	F	20/07/99	8 ans	+/+	0	0	0
19	F	21/07/01	6 ans	+/+	0	0	0
20	F	16/09/02	5 ans	+/+	0	0	0
21	F	02/02/07	1 an	+/-	0	0	0
22	M	08/05/07	0 an	+/+	0	0	0
23	M	23/03/01	6 ans	+/-	0	0	0
24	F	29/09/01	6 ans	+/-	0	0	0
25	F	11/08/02	5 ans	+/+	0	0	0

26	M	13/12/04	3 ans	+/+	0	0	0
27	F	29/07/06	1 an	+/+	0	0	0
28	F	07/07/03	4 ans	+/+	0	0	0
29	M	13/12/04	3 ans	+/+	0	5	5
30	M	25/01/07	1 an	+/+	0	4	4
31	F	16/03/06	1 an	+/-	0	5	5
32	F	02/07/07	0 an	+/+	0	1	1
33	F	25/03/05	2 ans	+/-	0	0	0
34	F	10/04/02	5 ans	+/+	0	0	0
35	M	15/11/92	15 ans	+/+	1	4	5
36	F	30/10/05	2 ans	+/+	0	9	9
37	F	16/09/02	5 ans	+/+	1	0	1
38	F	12/11/04	3 ans	+/+	0	0	0
39	F	31/03/07	0 an	+/+	0	5	5
40	M	27/08/01	6 ans	+/-	0	7	7
41	F	28/05/07	0 an	+/-	0	0	0
42	M	11/11/06	1 an	+/-	0	0	0
43	F	18/01/05	3 ans	+/+	0	0	0
44	F	17/03/06	1 an	+/+	0	0	0
45	F	05/06/06	1 an	+/-	0	0	0
46	F	07/08/05	2 ans	+/+	0	0	0
47	F	25/05/05	2 ans	+/-	0	0	0
48	F	04/08/06	1 an	+/+	0	0	0
49	M	27/12/06	1 an	+/+	0	0	0
50	F	21/09/02	5 ans	+/-	0	0	0
51	M	03/09/06	1 an	+/-	0	0	0
52	M	02/09/07	0 an	+/+	0	0	0
53	F	20/04/06	1 an	+/+	0	3	3
54	M	10/06/07	0 an	+/+	0	0	0
55	M	11/07/07	0 an	+/-	0	0	0
56	F	29/05/07	0 an	+/-	0	0	0
57	F	27/12/03	4 ans	+/+	0	0	0
58	M	28/05/07	0 an	+/+	0	0	0
59	M	02/12/04	3 ans	-/-	3	9	12
60	M	20/02/06	2 ans	-/-	0	0	0
61	F	04/02/07	1 an	+/-	0	0	0
62	F	15/01/01	7 ans	+/+	0	0	0
63	F	13/08/02	5 ans	+/+	0	0	0
64	F	14/05/04	3 ans	+/+	0	0	0
65	F	04/03/07	0 an	+/+	0	0	0
66	F	13/08/02	5 ans	+/+	0	0	0
67	M	14/08/02	5 ans	+/-	0	4	4
68	F	30/04/07	0 an	+/-	0	0	0
69	F	03/03/04	3 ans	+/+	0	4	4
70	F	02/09/04	3 ans	+/+	0	6	6
71	M	23/12/05	2 ans	+/-	0	0	0
72	M	30/03/04	3 ans	+/-	0	0	0
73	F	12/10/96	11 ans	-/-	2	0	2
74	M	23/04/01	6 ans	-/-	0	0	0
75	F	06/11/06	1 an	-/-	0	0	0
76	F	06/11/06	1 an	-/-	0	0	0
77	M	23/04/01	6 ans	-/-	0	0	0
78	F	23/04/01	6 ans	-/-	1	3	4

79	F	01/09/07	0 an	-/-	0	0	0
80	F	24/08/06	1 an	+/+	0	0	0
81	F	11/06/06	1 an	+/+	0	0	0
82	M	30/11/06	1 an	+/+	0	0	0
83	M	10/06/07	0 an	-/-	0	6	6
84	F	07/03/06	1 an	-/-	1	5	6

Border Collie:

Chien	Sexe	Naissance	Age	Résultat	Score état général	Score digestif	CIBDAI
1	F	24/06/1996	11 ans	+/+	0	0	0
2	F	13/03/2005	2 ans	+/+	0	0	0
3	F	08/02/1999	9 ans	+/+	0	0	0
4	F	01/12/1999	8 ans	+/+	2	0	2
5	M	15/08/2004	3 ans	+/+	0	0	0
6	M	22/03/2005	2 ans	+/+	0	0	0
7	F	22/03/2005	2 ans	+/+	0	0	0
8	M	30/01/1995	13 ans	+/+	2	5	7
9	F	01/01/2002	6 ans	+/+	0	4	4

Colley:

Chien	Sexe	Naissance	âge	Résultat	Score état général	Score digestif	CIBDAI
1	M	01/01/00	8 ans	+/-	0	0	0
2	M	10/06/04	3 ans	-/-	3	0	3
3	M			+/-	0	1	1
4	F	07/09/00	7 ans	-/-	0	0	0
5	F	11/10/04	3 ans	+/+	0	0	0
6	F	31/03/06	1 an	+/-	0	5	5
7	M	15/07/02	5 ans	-/-	1	7	8
8	F	15/07/97	10 ans	+/+	4	3	7
9	M	27/09/04	3 ans	-/-	0	4	4
10	M	22/11/99	8 ans	+/-	0	5	5
11	M	01/01/96	12 ans	+/-	0	9	9
12	F	15/06/93	14 ans	+/-	2	0	2

Shetland:

Chien	Sexe	Naissance	âge	Résultat	Score état général	Score digestif	CIBDAI
1	F	03/07/04	3 ans	-/-	0	4	4
2	M	03/09/07	0 an	+/-	0	5	5
3	F	01/07/04	3 ans	+/-	0	0	0
4	M	01/09/98	9 ans	+/+	2	0	2
5	M	01/03/98	9 ans	+/+	0	0	0
6	M	03/06/97	10 ans	+/+	0	0	0
7	F	07/11/04	3 ans	+/-	0	0	0
8	F	19/03/05	2 ans	+/+	0	0	0
9	F	03/05/07	0 an	+/+	0	0	0
10	F	02/04/06	1 an	+/-	0	5	5
11	M	31/03/06	1 an	+/-	0	0	0

12	F	01/06/02	5 ans	+/-	0	0	0
13	F	07/03/05	2 ans	+/+	0	0	0
14	F	08/11/99	8 ans	+/+	0	0	0
15	F	13/06/07	0 an	+/+	0	0	0
16	F	09/05/02	5 ans	+/+	0	0	0
17	F	24/04/02	5 ans	+/+	0	0	0
18	F	01/07/07	0 an	+/+	0	0	0
19	F	01/06/03	4 ans	+/-	0	0	0
20	M	11/07/96	11 ans	+/-	0	0	0
21	F	22/05/06	1 an	+/+	0	0	0
22	F	14/12/03	4 ans	+/+	0	0	0
23	M	29/01/05	3 ans	+/+	0	0	0
24	F	11/11/06	1 an	+/+	0	0	0
25	F	24/02/05	3 ans	+/-	0	0	0
26	F	19/03/05	2 ans	+/+	0	0	0
27	M	12/04/02	5 ans	+/+	0	0	0
28	M	18/01/04	4 ans	+/+	0	0	0
29	M	01/06/04	3 ans	+/-	0	0	0
30	F	31/10/03	4 ans	+/+	0	3	3
31	M	02/09/02	5 ans	+/-	0	0	0
32	F	11/07/06	1 an	+/-	0	0	0
33	F	19/04/04	3 ans	-/-	0	0	0
34	M	17/05/07	0 an	+/-	0	0	0
35	M	28/03/04	3 ans	-/-	0	6	6
36	F	15/08/02	5 ans	+/-	0	0	0
37	F	19/02/08	0 an	-/-	0	0	0
38	F	19/02/08	0 an	+/-	0	0	0
39	F	19/02/08	0 an	+/-	0	0	0
40	F	19/02/08	0 an	+/+	0	0	0
41	F	19/02/08	0 an	+/+	0	0	0
42	F	09/01/03	5 ans	+/-	0	0	0
43	M	17/02/07	1 an	+/-	0	5	5
44	M	12/01/06	2 ans	+/-	0	0	0
45	F	16/01/06	2 ans	+/-	0	0	0
46	F	19/06/06	1 an	+/+	0	0	0
47	F	04/02/99	9 ans	+/+	0	0	0
48	F	01/11/07	0 an	+/-	0	0	0
49	F	08/01/01	7 ans	-/-	0	0	0
50	F	11/05/03	4 ans	-/-	0	0	0
51	F	13/06/07	0 an	+/-	0	0	0
52	F	18/10/01	6 ans	+/+	0	0	0
53	F	05/01/05	3 ans	+/+	0	0	0
54	M	21/08/06	1 an	+/+	0	0	0
55	F	01/06/99	8 ans	+/+	0	0	0
56	M	04/07/04	3 ans	+/+	0	0	0
57	F	29/02/04	4 ans	+/+	1	5	6
58	M	10/07/06	1 an	+/+	0	0	0

BIBLIOGRAPHIE

1 – **Bailly JD., Laurent G., Delverbier M. (1995)**

La Gly-P : rôle physiologique et implication en cancérologie.
Rev. Med. Vét., Vol 146 (11), p732-730

2 – **Bommhardt U., Cerottini JC., MacDonald HR. (1994)**

Heterogeneity in P-glycoprotein (multidrug resistance) activity among murine peripheral T cells: correlation with surface phenotype and effector function.
Eur. J. Immunol., Vol 24 (12), p2974-81

3 – **Burk O., Arnold KA., Geick A., Tegude H., Eichelbaum M. (2005)**

A role for constitutive androstane receptor in the regulation of human intestinal *MDR1* expression.
Biol. Chem., Vol 386 (6), p503-13

4 – **Chen C.J., Chin J.E., Ueda K., Clark D.P., Pastan I., Gottesman M.M. et al. (1986)**

Internal duplication and homology with bacterial transport protein in the *MDR1* (P-glycoprotein) gene from multidrug resistant human cells.
Cell (Cambridge), Vol 47 (3), p381-389

5 – **Chen C.J., Clark D.P., Ueda K., Pastan I., Gottesman M.M.; Roninson I.B.(1990)**

Genomic organization of the human multidrug resistance gene and origin of P-glycoprotein.
J.Biol.Chem., Vol 265 (1), p 506-514

6 – **Clifford S., Neal D., Lunec J. (1996)**

High level expression of the multidrug resistance(*MDR1*) gene in the normal bladder urothelium: a potential involvement in protection against carcinogens?
Carcinogenesis, Vol 17 (3), p 601-604

7 – **Cordon-Cardo C., O'Brien J.P., Boccia J., Casals D., Bertino J.R., Melamed M.R. (1990)**

Expression of the multidrug resistance gene product (P-Glycoprotein) in human normal and tumor tissues.
J. Histochem. Cytochem., Vol 38 (9), p1277-1287

8 – **Cordon-Cardo C., O'Brien J.P., Casals D., Rittman-Grauer L., Biedler J.L. et al. (1989)**

Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol 86 (2), p 695-698

9 – **Dano K. (1973)**

Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells.
Biochim. Biophys. acta, Vol 323 (3), p466-483

10 – **Eisenbraun M., Mosley R., Teitelbaum D., Miller R. (2000)**

Altered development of intestinal intraepithelial lymphocytes in P-glycoprotein-deficient mice.
Devel. Comp. Immunol., Vol 24, p783-795

- 11 – **Endicott J.A., Ling V. (1989)**
The biochemistry of P-glycoprotein mediated multidrug resistance.
Ann. Rev. Biochem, **Vol 58**, p137-171
- 12 – **Fecht S., Wohke A., Hamann H., Distl O. (2007)**
Analysis of the canine *MDR1*-1 Δ mutation in the Dog Breed Elo.
J. Vet. Med., **Vol 54**, p401-405
- 13 – **Fojo A.T., Ueka K., Slamon D.J., Poplack D.G., Gottesman M.M., Pastan I. (1986)**
Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **Vol 84**, p265-269
- 14 – **Geick A., Eichelbaum M., Burk O. (2001)**
Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal *MDR1* by rifampin.
J. Biol. Chem., **Vol 276** (18), p14581-14587
- 15 – **Georges E., Tsuruo T., Ling V. (1993)**
Topology of P-glycoprotein and a bacterial haemolysin transport protein suggests a model for multidrug resistance
J. Biol. Chem., **Vol 268** (3), p 1792-1798
- 16 – **Geyer J., Döring B., Godoy J., Leidolf R., Moritz A., Petzinger E. (2005)**
Frequency of the nt230 (del4) *MDR1* mutation in collies and related dog breeds in Germany.
J. Vet. Pharmacol. Therap., **Vol 28**, p545-551
- 17 – **Geyer J., Klintzsch S., Meerkamp K., Wohlke A., Distl O., Petzinger A. (2007)**
Detection of the nt230(del4) *MDR1* mutation in White Swiss Shepherd dogs: case reports of doramectin toxicosis, breed predisposition, and microsatellite analysis.
J. Vet. Pharmacol. Therap., **Vol 30**, p482-485
- 18 – **Ginn P.E. (1996)**
Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in formalin-fixed and paraffin-embedded normal and neoplastic canine tissues.
Vet. Pathol., **Vol 33** (5), p 533-541
- 19 – **Greger D., Gropp F., Morel C., Sauter S., Blum J. (2006)**
Nuclear receptor and target gen mRNA abundance in duodenum and colon of dogs with chronic enteropathies.
Domest. Anim. Endocrinol., **Vol 31**, p327-339
- 20 – **Gros P., Croop J., Housman D. (1986)**
Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence strong homology to bacterial transport proteins.
Cell (Cambridge), **Vol 47** (3), p371-380
- 21 – **Henik R., Kellum H., Bentjen S., Mealey K. (2006)**
Digoxine and mexiletine sensitivity in a collie with the *MDR1* mutation.
J. Vet. Intern. Med., **Vol 20**, p415-417

22 – **Ho G., Moodie F., Satsangi J. (2003)**

Multidrug resistance 1 gene (P-glycoprotein 170): an important determinant in gastro-intestinal disease?

Gut, Vol 52, p759-766

23 – **Ho G., Soranzo N., Nimmo E., Tenesa A., Goldstein D., Satsangi J. (2006)**

ABCB1/*MDR1* gene determines susceptibility and phenotype in ulcerative colitis: discrimination of critical variants using a gene-wide haplotype tagging approach.

Hum. Mol. Genet., Vol 15 (5), p797-805

24 - **Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O. et al. (2000)**

Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene : multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo.

Proc Natl Acad Sci USA; Vol 97, p3473-8.

25 – **Hugnet C., Bentjen S., Mealey K. (2004)**

Frequency of the mutant *MDR1* allele associated with multidrug sensitivity in a sample of collies from France.

J. Vet. Pharmacol. Therap., Vol 27, p227-229

26 – **Hugnet C., Cadore J., Buron-Fosse F. (1996)**

Loperamide poisoning in the dog

Vet. Human. Toxicol., Vol 38, p31-33

27 – **Husing S., Gatmaitan Z., Arias IM. (1992)**

The function of Gp170, the Multidrug-resistance gene product, in the brush border of rat intestinal mucosa.

Gastroenterology, Vol 102 (3), p879-885

28 – **Idriss H.T., Hannun Y.A., Boulpaep E., Basavappa S. (2000)**

Regulation of volume-activated chloride channels by P-glycoprotein: phosphorylation has the final say.

J. Physiol. (Lond., Print), Vol 524 (part 3), p 629-636

29 – **Jergens A. (2004)**

Clinical assessment of disease activity for canine inflammatory bowel disease

J. Am. Anim. Hosp. Assoc., Vol 40, p437-445

30 – **Jergens A., Schreiner C., Frank D., Niyo Y., Ahrens F., Eckersall P. et al. (2003)**

A scoring index for disease activity in canine inflammatory bowel disease

J. Vet. Intern. Med., Vol 17, p291-297

31 – **Johnstone R., Ruefli A., Smyth M. (2000)**

Multiple physiological functions for multidrug transporter P-Glycoprotein?

Tibs, Vol 25, p1-6

32 – **Kankesan J., Vanama R., Yusuf A., Thiessen J., Ling V., Rao P. et al. (2004)**

Effect of PSC 833, an inhibitor of P-glycoprotein on N-methyl-N-nitrosourea induced mammary carcinogenesis in rats.

Cancerogenesis, Vol 25 (3), p425-430

- 33 – **Kankesan J., Yusuf A., Laconi E., Vanama R., Bradley G., Thiessen J. et al. (2003)**
Effect of PSC 833, an inhibitor of P-glycoprotein, on 1,2-dimethylhydrazine-induced liver carcinogenesis in rats.
Cancerogenesis, Vol 24 (12), p1977-1984
- 34 – **Kawabata A., momoi Y., Inoue-Murayama M., Iwasaki T. (2005)**
Canine *MDR1* gene Mutation in Japan.
J. Vet. Med. Sci., Vol 67 (11), p1103-1107
- 35 – **Klimecki W., Futscher B., Grognan T., Dalton W. (1994)**
P-glycoprotein expression and function in circulating blood cells from normal volunteers.
Blood, Vol 83 (9), p2451-2458
- 36 – **Kohno K., Sato S., Takano H., Matsuo K., Kuwano M. (1989)**
The direct activation of human multidrug resistance gene (*MDR1*) by anticancer agents.
Biochem. Biophys. Res. Commun, Vol 165 (3), p1415-1421
- 37 – **Langmann T., Moehle C., Mauerer R., Scharl M., Liebisch G., Zahn A. et al. (2004)**
Loss detoxification in inflammatory bowel disease: dysregulation of pregnane X receptor target genes.
Gastroenterology, Vol 127 (1), p26-40
- 38 – **Levent C. (2002)**
Contribution à l'étude des maladies inflammatoires intestinales chroniques du chien et du chat; comparaison avec les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin de l'Homme (maladie de Crohn's, colite ulcérate).
Thèse Méd. Vét, Lyon, n°145, 212p
- 39 – **Lieberman D.H., Reithmeiner R.A., Ling V., Charuk J.H., Goldberg H., Skorecki K.L. (1989)**
Identification of P-glycoprotein in renal brush border membranes.
Bioch. biophys. res. commun., Vol 162 (1), p244-252
- 40 – **Litman T., Druley T.E., Stein W.D., Bates S.E. (2001)**
From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance.
Cell. mol. life. sci. (Print.ed.), Vol 58 (7), p931-959
- 41 – **Maggio-Price L., Shows D., Waggie K., Burich A., Zeng W., Escobar S. et al. (2002)**
Helicobacter bilis infection accelerates and H. Hepaticus delays the development of colitis in multiple drug resistance-deficient (*mdr1a* -/-).
Am. J. Pathol., Vol 160, p739-751
- 42 – **Mealey K., Bentjen S., Waiting D. (2002)**
Frequency of the mutant *MDR1* allele associated with Ivermectine sensitivity in a sample population of Collies from the northwestern United States.
Am. J. Vet. Res., Vol 63 (4), p479-481
- 43 – **Mealey K., Gay J., Martin L., Waiting D. (2007)**
Comparison of the hypothalamic pituitary adrenal axis in *MDR1*-1 Δ and *MDR1* wildtype dogs.
J. Vet. Emerg. Crit. Care., Vol 17 (1), p61-66

44 – **Mealey K., Munyard K., Bentjen S. (2005)**

Frequency of the mutant *MDR1* allele associated with multidrug sensitivity in a sample of herding breed dogs living in Australia.

Vet. Parasit., **Vol 131**, p193-196

45 – **Mochida Y., Taguchi K., Taniguchi S., Tsuneyoshi M., Kuwano H., Tsuzuki T. et al. (2003)**

The role of P-glycoprotein in intestinal tumorigenesis: disruption of *mdr1a* suppresses polyp formation in *Apc^{min/+}* mice.

Carcinogenesis, **Vol 24** (7), p1219-1224

46 – **Moore AS., Leveille CR., Reimann KA., Shu H., Arias IM. (1995)**

The expression of P-glycoprotein in canine lymphoma and its association with multidrug resistance.

Cancer Invest., **Vol 13** (5), p475-479

47 – **Musset S. (2002)**

Etude bibliographique de l'expression du phénotype MDR dans les espèces Humaine et canine.

Thèse Méd. Vét., Lyon, n°169, 219p

48 – **Nakaichi M., Takeshita Y., Okuda M., Nakamoto Y., Itamoto K., Une S. et al. (2007)**

Expression of *MDR1* gene and P-glycoprotein in canine mast cell tumor cell lines.

J. Vet. Med. Sci., **Vol 69** (2), p111-115

49 – **Neff M., Robertson K., Wong A., Safra N., Broman K., Slatkin M. et al. (2004)**

Breed distribution and history of canine *MDR1-1Δ*, a pharmacogenetic mutation that marks the emergence of breeds from the collie lineage.

PNAS, **Vol 101** (32), p11725-11730

50 – **Panwala C., Jones J., Viney J. (1998)**

A novel model of inflammatory bowel disease: mice deficient for the multiple drug resistance gene, *mdr1a*, spontaneously develop colitis.

J. Immunol., **Vol 161**, p5733-5744

51 – **Paul A., Tranquilli W., Seward R., Todd K., DiPietro J. (1987)**

Clinical observations in collies given Ivermectine orally.

Am. J. Vet. Res., **Vol 48**, p684-685

52 – **Poldosky D. (2002)**

Inflammatory bowel disease.

N. Engl. J. Med., **Vol 347** (6), p417-429

53 – **Rakesh C., Inoue S., Roitelman J., Schimke R., Simoni R. (1991)**

Peptide transport by the multidrug resistance pump.

J. Biol. Chem., **Vol 267** (9), p5731-5734

54 – **Randolph G., Beaulieu S., Pope M., Sugawara I., Hoffman L., Steinman R. et al. (1998)**

A physiologic function for P-glycoprotein (*MDR1*) during the migration of dendritic cells from skin via afferent lymphatic vessels.

Proc. Natl. Acad. USA, **Vol 95**, p 6924-6929

55 – **Raymond M., Gros P. (1989)**

Mammalian multidrug resistance gene: correlation of exon organization with structural domains and duplication ancestral gene.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **Vol 186** (17), p6488-6492

56 - **Roitt IM, Brostoff J, Male DK. (1993)**

Immunologie, 3^{ème} ed., Issy Les Moulineaux, 600p

57 – **Roulet A., Puel O., Gesta S., Lepage J., Drag M., Soll M. et al. (2003)**

MDR1-deficient genotype in collie dogs hypersensitive to the P-glycoprotein substrate ivermectin.

Europ. j. Phar., **Vol 460**, p85-91

58 – **Sadanand V., Kankesan J., Yusuf A., Stewart C., Rutka J.T., Thiessen J.J. et al. (2003)**

Effect of PSC 833, a potent inhibitor of P-glycoprotein, on the growth of astrocytoma cells in vitro.

Cancers Lett., **Vol 198**, p21-27

59 – **Sartor L., Bentjen S., Trepanier L., Mealey K. (2004)**

Loperamide toxicity in a Collie with the *MDR1* Mutation associated with Ivermectine Sensitivity.

J. Vet. Intern. Med., **Vol 18**, p117-118

60 – **Schinkel A., Kemp S., Dollé M., Rudenko G., Wagenaar E. (1993)**

N-Glycosylation and deletion mutants of the human *MDR1* P-glycoprotein.

J. Biol. Chem., **Vol 268**, p7474-7481

61– **Schinkel A., Mayer U., Wagenaar E., Mol C., Van Deemter L., Smit J. et al. (1997)**

Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking *MDR1*-type (drug-transporting) P-glycoproteins.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **Vol 94**, p4028-4033

62 – **Schinkel A., Mol C., Van Deemter L., Smit J., Borst P. (1995)**

Multidrug resistance and the role of P-glycoprotein knockout mice

Eur. J. Cancer., **Vol 31** (7-8), p1295-1298

63 – **Schinkel A., Smitt J., Van Tellingen O., Beijnen J., Wagenaar E., Van Deemter L. et al. (1994)**

Disruption of the mouse *mdr1a* P-Glycoprotein gene leads to deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs.

Cell., **Vol 77**, p491-502

64 – **Schinkel A., Wagenaar E., Mol C., Van Deemter L. (1996)**

P-Glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs.

J. Clin. Invest., **Vol 97**, p2517-2524

65 – **Schinkel A., Wagenaar E., Van Deemter L., Mol C., Borst P. (1995)**

Absence of *MDR1a* P-glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, Digoxine, and Cyclosporine A.

J. Clin. Invest., **Vol 96**, p1698-1705

- 66 – **Schuetz E., Umbenhauer D., Yasuda K., Brimer C., Nguyen L., Relling M. et al. (1999)**
Altered expression of hepatic cytochromes P-450 in mice deficient in one or more *MDR1* genes.
Mol. Pharmacol., Vol 57, p188-197
- 67 – **Seward R. (1983)**
Reactions in dogs given Ivermectine.
J. Am. Vet. Med. Assoc., Vol 183 (5), p493
- 68 – **Siddiqui A., Kerb R., Weale M., Brinkman U., Smith A., Goldstein D. et al. (2003)**
Association of multidrug resistance in epilepsy with a polymorphism in the drug-transporter Gene ABCB1.
N. Engl. J. Med., Vol 348, p1442-1448
- 69 – **Steingold S.F., Sharp N.J., McGahan M.C., Hugues C.S., Dunn S.E., Page R.L. (1998)**
Characterization of canine *MDR1* mRNA: its abundance in drug resistant cell lines in vivo.
Anticancer res., Vol 18 (1), p393-400
- 70 – **Stephens R.H., O'Neill C.A., Bennett J., Humphrey M., Henry B., Rowland M. et al. (2002)**
Resolution of P-glycoprotein and non – P-glycoprotein effects on drug permeability using intestinal tissues from *mdr1a* (-/-) mice.
Br. J. Pharmacol., Vol 135, p2038-2046
- 71 – **Strachan Tom, Read Andrew P. (1998)**
Génétique Moléculaire Humaine, Médecine-Sciences Flammmarion.
- 72 – **Tishler D., Weinberg K., Hinton D., Barbaro N., Annet G., Raffel C. (1995)**
MDR1 gene expression in brain of patients with medically intractable epilepsy.
Epilepsia., Vol 36, p1-6
- 73 – **Ushigome F., Takanaga H., Matsuo H., Yanai S., Tsukimori K., Nakano H. e al. (2000)**
Human placental transport of vinblastine, vincristine, digoxin and progesterone: contribution of P-glycoprotein.
Eur. j. pharmacol., Vol 408 (1), p1-10
- 74 – **Van Asperen J., Schinkel A., Beijnen J., Nooijen W., Borst P., Van Tellingen O. (1996)**
Altered pharmacokinetics of vinblastine in *MDR1a* P-Glycoprotein deficient mice.
J. Natl. Canc. Inst., Vol 88 (14), p994-999
- 75 – **Van Kalken C., Giaccone G., Van der Valk P., Kuiper C., Hadisaputro M., Bosma S. et al. (1992)**
Multidrug resistance gene (P-glycoprotein) expression in the human fetus.
Am. J. Patho., Vol 141, p1063-1072
- 76 – **Walter J.E., Saraste M., Runswick M.J., Gay N.J. (1982)**
Distantly related sequences in the alpha and beta subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and common nucleotide binding fold.
EMBO j., Vol 1 (8), p945-951

77 – **Willingham M.C., Cornwell M.M., Cardarelli C.O., Gottesman M.M., Pastan I. (1986)**
Single cell analysis of daunomycin uptake and efflux in multidrug-resistant and sensitive KB cells:
effects of verapamil and other drugs.
Cancer res. (Baltimore), **Vol 46** (11), p5941-5946

78 – **Yamada T., Mori Y., Hayashi R., Tayaka M., Ino Y., Naishiro Y. et al. (2003)**
Suppression of intestinal polyposis in *Mdr1*-deficient $Apc^{min/+}$ mice.
Cancer Res., **Vol (63)**, p895-901

ROLE DU GENE *MDR1* DANS LA PREDISPOSITION AUX MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES INTESTINALES CHEZ LES COLLEYS ET APPARENTES.

NOM et Prénom : BURGER Karen

Résumé :

La glycoprotéine P, codé par le gène *MDR1*, est connue pour son rôle d'élimination de xénobiotiques du compartiment intra-cellulaire. Son impact sur la physiologie du Chien a été mis en évidence lors d'intoxication par administration d'Ivermectine chez les chiens de race Colley, naturellement mutés pour le gène *MDR1*.

L'étude en laboratoire de souris artificiellement invalidées pour le gène *Mdr1* a révélé une prédisposition génétique à développer des inflammations chroniques intestinales (identiques à la maladie de Crohn de l'Homme).

Cette thèse visait à rechercher s'il existait cette même prédisposition aux maladies digestives inflammatoires chroniques, chez les Colleys et d'autres races de bergers, mutés pour le gène *MDR1*. Pour cela, le génotypage de 177 chiens, au locus *MDR1*, a été réalisé et mise en relation avec les réponses à un questionnaire individuel portant sur les troubles digestifs potentiellement présentés par chaque chien de l'enquête. Nous n'avons pas pu mettre en évidence une influence du génotype au locus *MDR1* dans le développement des maladies digestives chroniques dans notre échantillon de chiens.

Mots clés :

GENE MDR1 / GLY-P / MALADIE INTESTINALE CHRONIQUE INFLAMMATOIRE / CARNIVORE / CHIEN / RACE CANINE / COLLEY / BERGER BLANC SUISSE / BERGER AUSTRALIEN / BORDER COLLIE / SHETLAND

Jury :

Président : Pr.

Directeur : Dr. Marie ABITBOL

Assesseur : Dr. Geneviève MARIGNAC

Adresse de l'auteur :

Mlle Karen BURGER

27 rue de l'égalité

92130 Issy les Moulineaux

INFLUENCE OF THE *MDR1* GENE IN THE PREDISPOSITION TO INFLAMMATORY BOWEL DISEASES IN COLLIE DOGS AND RELATED BREEDS.

SURNAME: BURGER Karen

Summary:

The P-glycoprotein, product of the *MDR1* gene, is known to be an efflux pump which removes xenobiotics from the intracellular compartment. Its impact on the physiology of the dog was highlighted when administration of ivermectin to Collie dogs, naturally mutated in the *MDR1* gene, produced neurologic disorders.

Studies on *Mdr1* knock-out mice revealed the genetic predisposition of these mice to develop inflammatory bowel diseases (identical to the human Crohn's disease).

The purpose of this thesis was to seek if there was the same predisposition to chronic inflammatory bowel diseases in Collie dogs and in other related shepherd breeds carrying a mutation in the *MDR1* gene. Genotypes of 177 dogs for the *MDR1* locus were obtained and compared with answers to an individual questionnaire focusing on putative digestive disorders in every dog included in the study. We have concluded to a lack of correlation between the genotype at *MDR1* locus and the development of digestive disorders in the 177 dogs of our studies.

Keywords:

MDR1 GENE / GLY-P / INFLAMMATORY BOWEL DISEASE / CARNIVORE / DOG / COLLIE / DOG BREED / WHITE SWISS SHEPHERD / AUSTRALIAN SHEPHERD / BORDER COLLIE / SHETLAND

Jury:

President: Pr.

Director: Dr. Marie ABITBOL

Assessor: Dr. Genevieve MARIGNAC

Author's address:

Mlle Karen BURGER

27 rue de l'égalité

92130 Issy les Moulineaux

BURGER K. Rôle du gène *mdr1* dans la prédisposition aux maladies inflammatoires chroniques intestinales chez les colleys et apparentes. 2008