ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON

Année 2009 - Thèse n° 41

L'intoxication héréditaire au cuivre dans la race canine Bedlington Terrier :
mise au point d'un test de diagnostic moléculaire.

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I
(Médecine - Pharmacie)
et soutenue publiquement le 4 décembre 2009
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

Rampaud Audrey Emilie Nicole
Née le 21 Février 1986
à *Guildford (GB)*

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON

Année 2009 - Thèse n° 41

L'intoxication héréditaire au cuivre dans la race canine Bedlington Terrier :
mise au point d'un test de diagnostic moléculaire.

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I
(Médecine - Pharmacie)
et soutenue publiquement le 4 décembre 2009
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

Rampaud Audrey Emilie Nicole
Née le 21 Février 1986
à *Guildford (GB)*

DEPARTEMENT ET CORPS ENSEIGNANT DE L'ENVL

Mise à jour : 22/10/2009

Directeur : Stéphane MARTINOT

	PR EX	PR 1	PR 2	ISPV,MC, MC(HC)	Contractuel, Associé, IPAC	Praticiens hospitaliers
DEPARTEMENT SANTE PUBLIQUE VETERINAIRE						
Microbiologie, Immunologie, Pathologie Générale	Y. RICHARD		A. KODJO	V. GUERIN-FAUBLEE (HC) D. GREZEL	Z.DJELOUADJI	
Pathologie infectieuse		M. ARTOIS		J. VIALARD (HC)		
Parasitologie et Maladies Parasitaires		G. BOURDOISEAU		MP. CALLAIT-CARDINAL L. ZENNER G. BOURGOIN		
Qualité et Sécurité des Aliments			P. DEMONT C. VERNOZY	A. GONTHIER S. COLARDELLE (ISPV) D. SERGENTET		
Législation et Jurisprudence		A. LACHERETZ				
Bio-informatique - Bio-statistique			ML. DELIGNETTE E.GILLOT-FROMONT	P. SABATIER (HC) K. CHALVET-MONFRAY		
DEPARTEMENT ANIMAUX DE COMPAGNIE						
Anatomie		T. ROGER		S. SAWAYA C. BOULOCHER(stagiaire)		
Chirurgie et Anesthésiologie		JP. GENEVOIS E.VIGUIER	D. FAU D. REMY	C.CAROZZO K. PORTIER S. JUNOT		
Anatomie-pathologique/Dermatologie-Cancérologie			C. FLEURY	T. MARCHAL D. PIN S.BELLUCCO(stagiaire)	P. BELLI D.WATRELOT-VIRIEUX	
Hématologie		C. FOURNEL				
Médecine interne		JL. CADORE	L. CHABANNE	F. PONCE M. HUGONNARD C.ESCRIOU	I. BUBLOT C. POUZOT (siamu)	
Imagerie Médicale					J. SONET	
DEPARTEMENT PRODUCTIONS ANIMALES						
Zootechnie, Ethologie et Economie Rurale		M. FRANCK		L. MOUNIER	L. COMMUN	
Nutrition et Alimentation				D. GRANCHER (HC) L. ALVES DE OLIVEIRA G. EGRON		
Biologie et Pathologie de Reproduction		F. BADINAND	P. GUERIN	S. BUFF AC. LEFRANC (HC)		
Pathologie Animaux de Production		T. ALOGNINOUWA		R. FRIKHA M.A. ARCANGIOLI D. LE GRAND C. BECKER(stagiaire)	P.BRUYERE	G. LESOBRE P. DEBARNOT P. OTZ P.BERGERON
DEPARTEMENT SCIENCES BIOLOGIQUES						
Physiologie/Thérapeutique			JM. BONNET-GARIN	J.J. THIEBAULT (HC) V. LOUZIER		
Biophysique/Biochimie		E. BENOIT F. GARNIER		T. BURONFOSSE(HC)		
Génétique et Biologie moléculaire			F. GRAIN	V. LAMBERT		
Pharmacie/Toxicologie Législation du Médicament		G. KECK P.JAUSSAUD	P. BERNY	C. PROUILLAC		
Langues					T. AVISON (IPAC) G. MARTIN (IPAC)	
DEPARTEMENT HIPPIQUE						
Pathologie équine		JL. CADORE		A. BENAMOU-SMITH	I.DESJARDINS	
Clinique équine		O. LEPAGE	A. LEBLOND		M. GANGL	

A mes parents,

pour leur amour, leur soutien, leurs encouragements, les valeurs qu'ils m'ont inculquées et les corrections successives de cette thèse qu'ils ont effectuées.
Votre fille fière de l'être.

A ma famille,

pour leur présence à mes cotés dans tous les moments importants de ma vie.
Merci pour votre soutien.

A mes amis du monde entier,

loin des yeux n'est pas forcément loin du cœur.
Je ne vous oublie pas.

A ma belle famille,

pour leur accueil chaleureux et sans réserves.
Merci du fond du cœur.

A Aurélien,

pour son amour et ses petites attentions de tous les jours, pour son soutien, son aide, sa persévérance, pour toutes les belles choses que nous avons vécues et toutes celles qu'il nous reste à vivre ensemble.
Je t'aime.

A ***Monsieur le Professeur Alain CALENDER***
de la Faculté de Médecine de Lyon,

qui nous fait l'honneur d'accepter la présidance de notre jury de thèse.
Nos hommages les plus respectueux.

A ***Madame le Professeur Françoise GRAIN***
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon.

Nous vous remercions pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail,
pour vos conseils avisés et votre patience.
Veuillez trouver ici l'expression de toute notre gratitude.

A ***Monsieur le Professeur Philippe BERNY***
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon,

qui a accepté de faire partie de notre jury de thèse.
Très sincères remerciements.

Aux éleveurs français de Bedlington Terriers qui ont collaboré à cette thèse.

Merci pour votre aide et votre patience.

En espérant que vous trouverez ici une réponse à vos attentes.

Table des matières

Introduction....15
1ère partie : Etude bibliographique....17
I)Le Bedlington Terrier....19
A)Description du chien....19
1)Le Bedlington Terrier de beauté [52]....19
a)Comportement / caractère....19
b)Aspect général. 19
c)Tête....20
d)Cou....20
e)Corps....20
f)Queue....20
g)Membres....20
h)Pieds....21
i)Allures....21
j)Robe....21
k)Taille et poids....22
l)Défauts....22
2)Le Bedlington Terrier de travail [49]....22
B)Historique de la race [49]....22
C)Répartition géographique de la race [49]....23
D)Les principales maladies du Bedlington Terrier....23
II)Quelques notions de physiologie et physiopathologie du cuivre....24
A)Métabolisme du cuivre....24
1)L'absorption du cuivre [56]....24
2)Le transport du cuivre....25
3)Le cuivre cellulaire....25
a)Transfert du cuivre du sang jusqu'aux protéines cibles....25
b)Les protéines de la cellule contenant du cuivre....25
i)Le cuivre coenzyme de la cytochrome oxydase....25
ii)Le cuivre coenzyme de l'uricase....26
iii)Le cuivre coenzyme de la Cu/Zn-superoxyde dismutase....26
iv)Le cuivre constituant de la céruloplasmine....26
v)Le cuivre coenzyme de nombreuses autres enzymes....26
vi)Les métallothionéines....27
vii)les facteurs de coagulation V et VIII....27
4)L'excrétion du cuivre [56]....27
B)Les maladies liées au cuivre....28
1)Déficit en cuivre....28
a)Par carence alimentaire....28
b)Par mutation génétique : exemple de la maladie de Menkes chez l'Homme....28
2)Intoxication au cuivre....28
a)Intoxication accidentelle....28
i)Intoxication aiguë....29
ii)Intoxication suite à une affection hépatique....29
b)Intoxication liée à une maladie génétique....29
i)La maladie de Wilson chez l'Homme....29
ii)L'intoxication au cuivre chez d'autres espèces....30

Les rats LEC [13]. 30
Les souris « toxic milk » [13]. 30
Les Doberman pinchers.....30
Les Skye Terriers.....31
Les Dalmatiens [13].....31
Les West Hilghland White Terriers et les Bedlington Terriers.....31
III)L'intoxication au cuivre chez le Bedlington Terrier.....31
A)Les signes cliniques et leur intérêt pour le diagnostic.....31
1)Les signes de l'intoxication.....32
a)Signes au chevet de l'animal.....32
b)Examens complémentaires.....32
i)Analyse de l'excrétion biliaire et biochimie.....32
ii)Histopathologie et histochimie 32
iii)Dosage tissulaire du cuivre.....34
2)Intérêt de ces signes dans le diagnostic de la maladie.....34
a) Diagnostic à partir des signes cliniques et examens biochimiques.....34
b)Diagnostic à partir d'une biopsie du foie.....35
c)Diagnostic à partir d'une cytoponction du foie [10].....36
B)Une maladie d'origine génétique.....36
1)Comparaison avec la maladie de Wilson chez l'Homme.....36
2)La recherche du gène responsable de l'intoxication au cuivre chez le Bedlington Terrier....37
a)L'utilisation de la méthode des gènes candidats.....37
b)La découverte du microsatellite C04107.....37
c) La découverte d'un gène en cause : le gène COMMD1.....38
i)Localisation du gène COMMD1 [5][44][45][46][51].....38
ii) Localisation de l'anomalie dans le gène [11].....38
iii) Le rôle de la protéine codée par le gène COMMD1 [8].....39
d)L'existence d'une autre anomalie [6][8][21].....39
3)La détection de la maladie à travers le monde.....39
a)Aux Etats-Unis, au Canada et en Australie.....39
b)Aux Pays-Bas.....40
c)Au Royaume-Uni.....40
d)Dans les autres pays.....40
4) Les différents tests rapides de diagnostic moléculaire utilisables pour détecter une mutation responsable d'une maladie génétique.....40
a)Principe général.....41
b)La PCR point final.....41
c)La PCR quantitative.....41
C) Comment gérer l'intoxication au cuivre chez les Bedlington Terriers?.....42
1) La gestion du chien atteint.....42
a)Traitements symptomatiques.....42
b)La réduction des apports en cuivre.....42
i)L'utilisation de rations ménagères [19].....42
ii)La supplémentation orale en Zinc [19].....42
c)Favoriser l'excrétion du cuivre.....43
i)La D-pénicillamine.....43
ii)La 2,3,2-tetramine.[42].....43
iii)Autres chélateurs du cuivre [19].....44
2) La gestion au niveau de la race.....44
a)Cas d'un chien atteint.....44

b)Cas d'un chien porteur....45
IV)Synthèse....45
2ème partie : Etude expérimentale : mise au point d'un test diagnostique moléculaire....47
Objectifs de l'étude expérimentale....49
I) Matériel et méthodes....51
A)Matériel....51
1)Matériel biologique....51
2)Amorces....52
a)Pour la PCR point final ciblant les exons 2 et 3....52
b)Pour la PCR point final ciblant la présence ou l'absence de l'exon 2....53
c)Pour la PCR temps réel....53
3)Réactifs....53
4)Thermocycleurs....54
a)Pour les PCR point final ciblant les exons 2 et 3....54
b)Pour les PCR point final ciblant la présence ou l'absence de l'exon 2....54
c)Pour les PCR temps réel....54
B)Méthodes....54
1)Prélèvements....54
a)Prélèvements sanguins....54
b)Prélèvement de cellules buccales....54
2)Définition des amorces....54
3)Extractions....55
a)A partir d'échantillons de sang....55
b)A partir d'écouvillons buccaux....55
c)A partir de gels d'agarose....55
4)Préparation du mélange de réactifs pour l'amplification....55
a)Pour les PCR point final....55
a)Pour les PCR temps réel....56
1)Amplification....56
a)Programmes pour les PCR point final....56
b)Cas des PCR temps réel....56
1)Analyse des produits amplifiés....56
a)Cas des PCR point final....56
b)Cas des PCR temps réel....57
II)Résultats....57
A)Stratégie 1....57
1)PCR sur échantillons sanguins....57
a)PCR simplex ciblant l'exon 2....57
i)PCR utilisant le couple CT2s1-CT2as2....57
ii)PCR utilisant le couple CT1s1-CT1as2....58
iii)PCR utilisant le couple CT1s1-CT2as2....59
iv)PCR utilisant le couple CT2s1-CT1as2....59
b)PCR simplex ciblant l'exon 3....59
c)PCR duplex....60
i)Concentrations d'amorces identiques pour les deux couples....60
0,4µM....60
0,3µM....61
ii)Concentration en amorces plus élevée pour le couple ciblant l'exon 2 que pour celui ciblant l'exon 3....62
0,3µM / 0,2µM....62

0,4µM / 0,2µM....63
0,3µM / 0,1µM....63
iii)La PCR duplex réalisée sur l'ensemble des Bedlington Terriers....64
2)PCR à partir d'écouvillons buccaux....65
B)Stratégie 2....66
1)Amplification des exons 2 et 3....66
2)Gammes de dilutions....66
a)Q-PCR 1 : gamme pour l'exon 3....66
b)Q-PCR 2 : gamme pour l'exon 2....67
3)Q-PCR 3....67
4)Q-PCR 4....68
C)Stratégie 3....70
1)Mise au point....70
a)Essai du couple INTs1-INTas2....70
i)Sur un Bedlington Terrier homozygote malade....70
ii)Sur l'ensemble des statuts génétiques possibles....71
b)Essai de la PCR duplex INTs1-INTas2 / CT2s1-CT1as2....71
i)Variation des concentrations d'amorces à 56°C et pour [MgCl2]=1mM....71
ii)Variation de la température avec concentrations en amorces et MgCl2 fixes....73
2)Application des conditions retenues à tous les chiens....74
III)Discussion....75
A)Technique....75
1)La cible....75
2)Les animaux....75
3)Prélèvement....75
4)La PCR....76
a)Répétabilité....76
b)Stringence....77
c)Sensibilité....77
d)Spécificité....77
B)Résultats....78
1)Stratégie par stratégie....78
a)Stratégie 1....78
i)Considérations générales....78
ii)PCR simplex pour l'exon 2....79
iii)PCR simplex pour l'exon 3....79
iv)PCR en duplex....79
b)Stratégie 2....79
i)Les courbes d'étalonnage....79
ii)Essai du test....80
c)Stratégie 3....80
i)Considérations générales....80
ii)PCR simplex pour la délétion....80
iii)PCR duplex....81
2)Application des tests aux échantillons de chiens....81
C)Le test mis en place au LVD 69 et la race Bedlington Terrier en France....83
1)Une réponse à la demande des éleveurs français de Bedlington Terriers....83
2)Comparaison du test conçu dans cette thèse avec les tests existants....83
3)Conseil quant à l'application du test et au devenir des chiens....85
a)Quand réaliser ce test?....85

b)Devenir des chiens....85
i)Chien atteint....85
ii)Chien porteur de la délétion....85
iii)Chien non porteur de la délétion....85
IV)Synthèse....86
Conclusion....87
Bibliographie....89
Annexes....95

Index des illustrations

Figure 1 : Aspect général d'un chien appartenant à la race Bedlington Terrier.....19
Figure 2 : Chiots Bedlington Terriers, 2 « bleus » et 1 » sable ».....21
Figure 3 : Chiots Bedlington Terriers, un « bleu » et un « marron ».....21
Figure 5 : Bedlington Terrier « marron » adulte.....21
Figure 4 : Bedlington Terrier « bleu » adulte 21
Figure 6 : Bedlington Terrier « sable » adulte 21
Figure 7 : Deux jeunes Bedlington Terriers de travail, un de couleur bleu et un de couleur sable....22
Figure 8 : Coussinet présentant une hyperkératose sévère 24
Figure 9 : Représentation de la Cu/Zn superoxyde dismutase.....26
Figure 10 : Schéma récapitulatif du métabolisme du cuivre dans l'hépatocyte.....27
Figure 11 : Coloration à l'Hémalun-Eosine d'un échantillon, provenant d'une biopsie hépatique réalisée sur un Bedlington Terrier malade ([Cu]=5,438µg/g) (microscope X250).....33
Figure 12 : Détail du cytoplasme d'un hépatocyte d'un chien atteint (microscope électronique X80000).....33
Figure 13 : Analyse spectrale de zones du foie d'un Bedlington Terrier malade.....34
Figure 14 : Marquage a l'aide de rhodanine d'échantillons de foie de Bedlington Terriers atteints d'intoxication au cuivre. De gauche à droite : grade 3, 4 et 5.....35
Figure 15 : Visualisation d'un frottis réalisé après une cytoponction hépatique chez un Bedlington Terrier présentant un stade avancé de la maladie.....36
Figure 16 : Schéma du gène *COMMD1*, localisation des exons.....38
Figure 17 : Généalogie des 3 familles auxquelles appartiennent les chiens présents dans l'expérimentation.....52
Figure 18 : Localisation sur le gène *COMMD1* des amorces utilisées dans la PCR point final ciblant l'exon 2 et l'exon 3.....53
Figure 19 : Localisation du couple d'amorces INTs1-INTas2 sur le gène *COMMD1*.....53
Figure 20 : Photographie d'une cytobrosse utilisée pour réaliser un prélèvement de cellules buccales.....54
Figure 21 : Résultats de la PCR 1.....58
Figure 22: Résultats de la PCR 5.....59
Figure 23 : Résultat de la PCR 6.....60
Figure 24 : Résultats de la PCR 8.....61
Figure 25 : Résultats de la PCR 11.....62
Figure 26 : Première partie des résultats de la PCR 12.....63
Figure 27 : Deuxième partie des résultats de la PCR 12.....64
Figure 28: Résultats de la PCR 13.....65
Figure 29 : Résultat de la PCR 14.....66
Figure 30 : Résultat de la courbe d'étalonnage pour la gamme de dilution de l'exon 3.....66
Figure 31 : Courbes d'amplification obtenues lors de la Q-PCR1.....67
Figure 32 : Courbes d'amplification pour l'exon 2 lors de la Q-PCR3.....67
Figure 33 : Courbes d'amplification pour l'exon 3 lors de la Q-PCR3.....68
Figure 34 : Courbe d'amplification pour l'exon 2 lors de la Q-PCR4.....69
Figure 35 : Courbes d'amplification pour l'exon 3 lors de la Q-PCR4.....70
Figure 36 : Résultats de la PCR 17.....70
Figure 37 : Résultats de la PCR 18.....71
Figure 38 : Résultats de la PCR 19.....72
Figure 39 : Résultats de la PCR 20.....72
Figure 40: Résultats de la PCR 21.....73
Figure 41 : Résultats de la PCR 22.....73

Figure 42 : Résultats de la PCR 23.....74
Figure 43 : Résultats de la PCR 8.....76
Figure 44 : Résultats de la PCR 9.....76
Figure 45 : Résultats théoriquement attendus avec la stratégie 1.....76
Figure 47 : profil obtenu en fonction du statut du chien avec la PCR retenue pour la stratégie 3.....80
Figure 47 : Profil obtenu en fonction du statut du chien avec la PCR retenue pour la stratégie 3.....83

Index des tableaux

Tableau I : Différents couples d'amorces utilisés pour localiser la délétion de l'exon 2 du gène *COMMD1*.....38
Tableau II : Amorces utilisées dans le test PCR d'une équipe de chercheurs des Pays-Bas.....40
Tableau III : Amorces utilisée dans le test diagnostique du laboratoire Animal Health Trust.....40
Tableau IV : Choix des aliments pour le régime d'un chien atteint.....42
Tableau V : Statut des chiots en fonction du statut des parents.....44
Tableau VI : Caractéristiques des chiens utilisés dans l'expérimentation : race, sexe, statut génétique et prélèvements effectués.....51
Tableau VII : Les différents couples d'amorces utilisés et la taille respective des séquences amplifiées.....53
Tableau VIII : Résultats de la Q-PCR3.....68
Tableau IX : Résultats de la Q-PCR4.....69
Tableau X : Les différentes évaluations du statut des chiens utilisés dans l'expérimentation.....82
Tableau XI : Réponses données aux propriétaires des Bedlington Terriers utilisés dans l'expérimentation.....83
Tableau XII : Comparaison des différentes techniques utilisables pour diagnostiquer l'intoxication au cuivre chez le Bedlington Terrier.....84

Index des annexes

Annexe 1 : Liste des réactifs utilisés.....97
Annexe 2 : Mode d'emploi des kits d'extraction.....99
Annexe 3 : Tableaux indiquant le numéro de la PCR, le(s) chien(s) utilisé(s), les conditions de PCR (nature et concentration des amorces, concentration en MgCl2, température d'hybridation) et la taille attendue des fragments amplifiés.....103
Annexe 4 : Tableau indiquant le numéro de la PCR, les échantillons analysés et les amorces utilisées pour chaque Q-PCR.....105
Annexe 5 : Protocole du test PCR pour la recherche de l'intoxication au cuivre du Bedlington Terrier.....107

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire, ADN obtenu par rétrotranscription de l'ARN

AlAT : Alanine amino-transférase

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messager, ARN qui sera traduit en protéine

AsAT : Aspartate amino-transférase

ATPase : enzyme liée au métabolisme énergétique (hydrolysant ou synthétisant de l'ATP) et permettant le transfert de divers ions.

ddNTP : didésoxyribonucléotide

dNTP : désoxyribonucléotide

FISH : Fluorescence In Situ Hybridization

LOD score : c'est un score qui permet de quantifier la probabilité que deux séquences soient transmises ensemble à la descendance. S'il est supérieur ou égal à trois la liaison entre les deux séquences est considérée comme significative. S'il est inférieur à -2, les deux séquences sont transmises de façon indépendante l'une de l'autre.

Pal : Phosphatase Alcaline

PAS : acide périodique de Schiff, c'est une coloration utilisée en histologie.

pb : paires de bases

PCR : Polymerase Chain Reaction ou réaction de polymérisation en chaîne

RFLP : polymorphisme de longueur des fragments de restriction

RT-PCR : PCR réalisée après une étape de conversion de l'ARN en ADNc.

Q-PCR : PCR quantitative

qsp : quantité suffisante pour

Introduction

Le cuivre est un oligoélément essentiel. C'est un cofacteur de nombreuses enzymes impliquées dans des réactions d'oxydoréduction car il peut exister sous deux formes d'oxydation. S'il est bénéfique à petite dose, à des concentrations élevées le cuivre est toxique. Les ions cuivre libres ont un effet catalyseur dans la réaction de Haber Weiss qui aboutit à la formation de radicaux libres.
Pour éviter ces phénomènes de toxicité par le cuivre, notre organisme excrète l'excès de cuivre dans la bile. Mais chez certains individus une anomalie génétique rend ce mécanisme déficient, et le cuivre s'accumule dans le foie puis dans d'autres organes. Les individus finissent par atteindre des doses toxiques pour cet oligoélément et on peut voir apparaître un ensemble varié de symptômes évoluant soit de façon chronique avant que la mort ne survienne, soit de façon aiguë et tuant les individus en quelques jours. La maladie de Wilson, chez l'Homme, en est l'illustration. Mais on retrouve des intoxications au cuivre à déterminisme génétique chez d'autres espèces telles que le rat (lignée LEC), la souris (lignée « toxic milk ») ou le chien (Doberman pinsher, Skye Terrier, West Highland White Terrier, Bedlington et Dalmatien). Toutes n'ont pas la même étiologie mais sont souvent des maladies autosomales récessives : on peut donc rencontrer des chiens atteints, des chiens sains et des chiens porteurs.

Chez le Bedlington Terrier, à l'heure actuelle, de nombreux chiens sont concernés par cette maladie, étant soit atteints soit porteurs. L'intoxication au cuivre est problématique dans cette race pour deux raisons:

- il a été estimé que les prévalences des formes cliniques étaient de 28%, 69% et 34% respectivement en Australie, aux Etats Unis et au Royaume Uni. Le nombre d'animaux porteurs est encore plus élevé. Ainsi, du fait de cette forte prévalence et du nombre limité de chiens constituant la race, pour faire diminuer la prévalence de la maladie il faut éliminer progressivement de la reproduction les animaux atteints, puis les porteurs : si un retrait brutal de tous les animaux porteurs ou malades était réalisé, la race n'y survivrait peut être pas.
- les chiens ont déjà été mis à la reproduction lorsque les symptômes apparaissent (la mort ne survient qu'entre 2 et 6 ans en général) et ont donc pu transmettre l'allèle muté à leur descendance. De plus les animaux porteurs ne présentent pas de symptômes.

C'est ainsi qu'apparaît tout l'intérêt de mettre au point un test diagnostique pouvant être réalisé très tôt dans la vie de l'animal et détectant les chiens porteurs.

La mise au point de ce test diagnostique est facilitée par la bonne connaissance de l'étiologie de cette maladie. En effet, l'intoxication au cuivre chez les Bedlington Terriers a été largement étudiée du fait de sa ressemblance avec la maladie de Wilson chez l'Homme ; diverses méthodes ont été utilisées pour attester du statut d'un chien : dosage du cuivre hépatique après biopsie, détermination des allèles d'un microsatellite ségrégeant avec la maladie,.... Mais, jusqu'à récemment, il n'existait pas de test permettant de certifier facilement et de façon fiable qu'un chien est atteint, porteur ou sain.

La découverte du gène *COMMD1*, fortement impliqué dans cette maladie (une délétion de son exon 2 est responsable à environ 95% de cette intoxication), a entraîné la mise au point dans différents pays, comme par exemple les Etats Unis ou le Royaume Uni, de tests ciblant ce gène et sa mutation.

L'objet de cette thèse est de réaliser dans le contexte français, avec l'aide du Laboratoire Vétérinaire Départemental du Rhône (LVD 69), un test diagnostique en biologie moléculaire ciblant la délétion de l'exon 2 du gène *COMMD1* (responsable de cette maladie du Bedlington Terrier) et permettant de la détecter de façon fiable et précocement.

Dans un premier temps, l'étude bibliographique nous fera découvrir la race Bedlington Terrier, la physiologie du cuivre et l'intoxication par cet oligoélément dans cette race . Dans un deuxième temps, nous présenterons l'étude expérimentale au travers des différentes étapes qui ont permis d'aboutir à un test diagnostique.

1ère partie : Etude bibliographique.

I) Le Bedlington Terrier.

Cette race à été créée en Angleterre surtout pour l'aptitude des chiens au travail. Puis, cette race de taille moyenne ayant conquis de nombreuses personnes, sont apparus des chiens de beauté et de compagnie même si certains éleveurs continuent à produire des chiens de travail. Seront envisagés dans la suite le standard de cette race, son histoire, sa répartition géographique et les principales maladies l'affectant.

A) Description du chien.

1) Le Bedlington Terrier de beauté [52].

Le Bedlington Terrier est un chien originaire d'Angleterre, appartenant à la catégorie des Terriers de grande et moyenne taille (groupe 3 section 1). Le standard F.C.I. actuel valable en France datant de 1998 est présenté ci-dessous. Ce n'est pas le seul standard utilisé de nos jours, il en existe un autre aux Etats Unis.

a) Comportement / caractère.

Chien vif, plein d'allant et d'assurance. C'est un compagnon intelligent possédant un solide instinct de chasseur. Doué d'un bon caractère, d'une nature affectueuse, digne, il n'est ni craintif ni nerveux. C'est un chien doux au repos mais plein de courage quand il est excité.

b) Aspect général.

Chien gracieux, souple, musclé, sans aucune trace de faiblesse, ni de manque de distinction. L'ensemble de la tête est en forme de poire ou cunéiforme et l'expression au repos est toute douceur (figure 1).

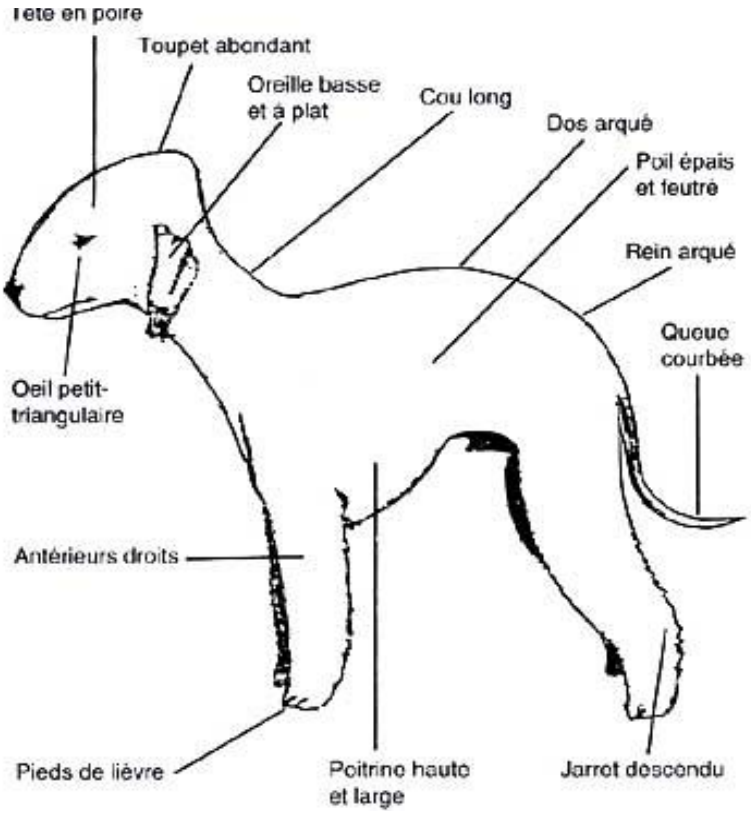


Figure 1 : Aspect général d'un chien appartenant à la race Bedlington Terrier [52].

c) *Tête.*

Elle est couverte d'un toupet abondant et soyeux qui doit être presque blanc.

Région crânienne:

Crâne : Etroit mais haut et arrondi. La mâchoire est longue et va en s'amincissant.

Stop : Il ne doit pas y avoir de stop; la ligne de l'occiput à l'extrémité du nez est droite et ininterrompue.

NB : le Bedlington Terrier possédant, comme tout terrier, un stop marqué, l'aspect de la tête en forme de poire est donc obtenu grâce au toilettage.

Région faciale:

Truffe : Narines grandes et bien dessinées. Les bleus et les bleu et feu doivent avoir la truffe noire. Les marron et les sables doivent avoir la truffe marron.

NB : chez les Bedlington Terrier le gène de grisonnement est présent sous forme de l'allèle G. Ainsi le « bleu », le « marron » et le « sable » correspondent au gris, au grège et à l'aubère en génétique.

Museau : Bien rempli sous l'œil.

Lèvres : bien adaptées; pas de babines pendantes.

Mâchoires/Dents : La mâchoire est longue et va en s'amincissant, les dents sont grandes et fortes, articulées en ciseaux, c'est-à-dire que les incisives supérieures recouvrent les inférieures dans un contact étroit et sont implantées à l'aplomb des mâchoires.

Yeux : petits, brillants et bien enfoncés dans l'orbite. L'œil idéal a un aspect triangulaire. Les chiens bleus ont l'œil foncé; les bleu et feu ont un œil plus clair avec des reflets ambre, les marron et les sables ont l'œil noisette clair.

Oreilles : de taille modérée, de forme oblongue, attachées bas et tombant à plat contre les joues. Minces et veloutées de texture; couvertes d'un poil court et fin avec une frange de poils soyeux de couleur blanchâtre à l'extrémité.

d) *Cou.*

Long, il va en s'amincissant; il est attaché bas, sans aucune tendance à présenter de fanon. Belle sortie d'encolure; la tête est portée haut.

e) *Corps.*

Il doit être musclé et manifestement flexible. La longueur du corps est légèrement supérieure à la hauteur au garrot.

Dos : Il présente avec le rein une arcure naturelle.

Rein : Arqué avec courbure de la ligne du dos immédiatement au-dessus du rein.

Poitrine : Haute et assez large. Les côtes sont plates. La poitrine est bien descendue dans la région sternale qui atteint le coude.

Ligne du dessous : L'arcure du rein fait remonter nettement la ligne du dessous.

f) *Queue.*

De longueur modérée, épaisse à la naissance, elle va en s'effilant en une pointe et forme une courbe gracieuse. Attachée bas, elle n'est jamais portée sur le dos.

g) *Membres.*

Membres antérieurs : les antérieurs sont droits, plus écartés au niveau de la poitrine qu'au niveau des pieds.

Epaules : plates et obliques.

Métacarpe : Long et légèrement incliné, sans faiblesse.

Membres postérieurs : Musclés et de longueur modérée. Les membres postérieurs donnent l'impression d'être plus longs que les antérieurs.

Jarret : Solide et bien descendu, ne tournant ni en dedans ni en dehors.

h) *Pieds.*

Longs pieds de lièvre aux coussinets épais et bien serrés.

i) *Allures.*

Chien capable de galoper à grande vitesse et qui en donne l'impression.
Mouvement très caractéristique plutôt raccourci, léger et élastique aux allures lentes et avec un léger roulis dans les allures rapides.

j) *Robe.*

Poil :
Très caractéristique. Epais et feutré, se redressant bien par rapport à la peau mais pas dur «fil de fer ». Nette tendance à boucler, en particulier sur la tête et la région faciale.
Couleur :
bleu, marron ou sable avec ou sans feu (figures 2, 3, 4, 5 ,et 6). La pigmentation plus foncée est à encourager.
NB : chez les Bedlington Terriers le gène de grisonnement est présent sous forme de l'allèle G. Ainsi le « bleu », le « marron » et le « sable » correspondent au gris, au grège et à l'aubère en génétique.

Figure 2 : Chiots Bedlington Terries, 2 « bleus » et 1 » sable » [62].

Figure 3 : Chiots Bedlington Terriers, un « bleu » et un « marron » [60].

Figure 4 : Bedlington Terrier « bleu » adulte [64].

Figure 5 : Bedlington Terrier « marron » adulte [64].

Figure 6 : Bedlington Terrier « sable » adulte [60]

k) Taille et poids.

Hauteur d'environ 16 pouces au garrot (41cm), avec une légère variation admise en moins chez la femelle et en plus chez le mâle.
Le poids est compris entre 18 et 23 livres anglaises (entre 8,2 et 10,4 kg).

l) Défauts.

Tout écart par rapport à ce qui précède doit être considéré comme un défaut qui sera pénalisé en fonction de sa gravité.

N.B.: Les mâles doivent avoir deux testicules d'apparence normale complètement descendus dans le scrotum.

2) Le Bedlington Terrier de travail [49].

Depuis les années 1970 un retour vers des chiens de travail et non plus seulement de beauté est noté. La race renoue ainsi avec ses origines. Ces Bedlington Terriers de travail sont des chiens petits mais robustes, qui vont être utilisés pour leur aptitude à opérer sous la terre. Ils ont presque les mêmes caractéristiques que les Bedlington Terriers de beauté si ce n'est une taille plus petite, un poil plus dense et des mâchoires plus puissantes (figure 7). Le Bedlington Terrier obtenu est parfaitement adapté à la chasse au petit gibier.

Figure 7 : Deux jeunes Bedlington Terriers de travail, un de couleur bleu et un de couleur sable [66].

B) Historique de la race [49].

L'histoire commence dans le comté du Northumberland, autour de Rothbury. Les débuts sont un peu flous, car à l'époque les filiations écrites des chiens n'étaient pas répandues. Au départ la « race » est constituée par une sélection des chiens pour leurs capacités à la chasse : les chiens ne présentent pas tous les mêmes caractéristiques morphologiques mais sont tous des chiens puissants, courageux, endurants et ayant du flair. Puis certaines qualités de travail semblant être liées à des caractères morphologiques la création de la race à proprement parler commence. Lors de ses débuts, la race reste cantonnée autour de Rothbury. Puis en 1820 la race s'étend avec le don d'une chienne à un habitant de Bedlington. Ce village est un village minier et les chiens seront utilisés, en plus de la chasse, pour dératiser les mines. C'est de ce village que la race tire son nom: le Bedlington Terrier. A cette époque les chiens sont plus petits et plus légers que de nos jours. Puis la race tombant aux mains des braconniers, ces derniers introduisent des lignées de Bulldog pour augmenter la taille des animaux. Cette période reste assez confuse, les braconniers ne s'intéressant pas aux pédigrees. Du sang de Whippet est aussi introduit afin d'augmenter la vitesse des chiens Bedlington Terriers. A partir des années 1840 les renseignements sur les chiens, leurs propriétaires et leur descendance deviennent plus faciles à obtenir.

Le 11 avril 1870 se tient à Newcastle-on-Tyne la première exposition spéciale de Bedlington Terrier. C'est en fait la première exposition spéciale toutes races de chiens confondues ! En 1873 le Kennel club est formé et il contribue au recensement des chiens de la race ainsi qu'à la collecte de toutes les informations disponibles les concernant. En 1875 est formé le Bedlington Terrier Club (BTC), c'est le deuxième club de race après celui du Bulldog. Il a pour but de vérifier les pédigrees, d'établir un descriptif de la race afin d'informer et de former les juges des expositions. Ce club de race périclitera en 1876 avant d'être reformé en 1882 pour une durée de 5 ans. En 1887 le troisième BTC verra le jour et sera dissout entre 1893 et 1897. En 1898 apparaît le National Bedlington Terrier Club (NBTC), puis au début du XXème siècle les premiers clubs régionaux (écossais, anglais,...). A cette époque le Bedlington Terrier est réputé pour être le plus joueur des Terriers.

Après la première Guerre Mondiale, l'amélioration des routes et des voies de chemin de fer contribue à la diffusion de la race.

En 1924 est créé le Bedlington Terrier Association qui éclipsera petit à petit le NBTC.

Au terme des années 1960 il existe 3 lignées majeures dans cette race: les lignées Foggyfurge, Stanolly et Wetop. Depuis les années 1980 on remarque 3 phénomènes. Tout d'abord on assiste à une perte de qualité du poil. Deuxièmement, suite à l'utilisation abusive d'étalons peu corpulents, de nombreux individus présentent des « jarrets de vache » et ne sont pas stable de l'arrière train. Et troisièmement, un point positif : malgré une prédisposition l'hyperkératose des coussinets se fait rare.

C) Répartition géographique de la race [49].

Au départ race purement anglaise, le Bedlington Terrier a su conquérir des éleveurs à travers le monde. De nos jours il est donc présent dans de nombreux pays : la Grande Bretagne bien sûr, les Etats Unis, l'Argentine, l'Afrique du Sud, le Japon, Singapour, la Croatie, la Belgique, la Suisse, le Danemark, la Norvège, la Suède, la Finlande, la Russie, l'Allemagne, l'Italie, l'Espagne et la France.

D) Les principales maladies du Bedlington Terrier.

Le Bedlington Terrier est particulièrement sensible des yeux. Les affections principales ont une origine génétique et touchent principalement le jeune.

C'est le cas des entropions (spastiques, anatomiques voir parfois cicatriciels) qui touchent surtout les individus âgés de 6 à 12 mois [49].

Chez des chiens de moins de 6 mois on rencontre également occasionnellement des distichiasis qui peuvent être associés à des entropions, des dermoïdes cornéens (uni- ou bilatéraux souvent symétriques), des atrésies des voies lacrymales. Cette dernière affection touche les jeunes mais n'apparaît qu'après l'âge de 3-4 mois, et se situe au niveau des voies lacrymales inférieures chez le Bedlington Terrier. On peut également avoir une sténose ou une imperforation de ces voies [49].

Dans cette race les chiens peuvent présenter une persistance de la membrane pupillaire [49].

Une cataracte héréditaire, primitive, acquise et juvénile est rencontrée chez des individus de 3 mois à 2 ans. Elle est postérieure et/ou sous capsulaire et se transmettrait sur une mode autosomal récessif [57].

Chez le Bedlington Terrier une dysplasie rétinienne est parfois rencontrée. C'est une affection qui est présente dès la naissance de l'animal mais qui n'est décelée le plus souvent que vers l'âge de quelques semaines. Cette affection est due à une absence totale de la couche interne de la rétine dans sa portion centrale. Ajoutée à cela, la couche externe des cellules photoréceptrices est bien plus mince que la normale [57]. Le déterminisme génétique autosomal récessif s'appliquerait à cette atteinte [14].

Plus tardivement (vers 2 ans le plus souvent) une atrophie rétinienne progressive généralisée dégénérative peut se développer qui se transmet sur un mode autosomal récessif [57]. Pour ces deux dernières affections il n'existe pas de traitement [14].

Certains Bedlington Terriers présentent une prédisposition à l'hyperkératose des coussinets [54] (figure 8).

Figure 8 : Coussinet présentant une hyperkératose sévère [54].

Il semblerait que des problèmes rénaux se manifestent de plus en plus chez le Bedlington Terrier [54]. Il existe une forte suspicion de maladie rénale héréditaire dans cette race [49]. Cette affection entraîne une détérioration progressive de la fonction rénale avec l'apparition d'une insuffisance rénale chronique dans les premières années de vies du chien [30].

Des luxations de rotules peuvent parfois être rencontrées [63].

De rares chiens présentent de l'*osteogenesis imperfecta*. Cet amincissement de la corticale des os par déficience des ostéoclastes apparaît vers 3 à 6 mois d'âge et s'améliore à la puberté. Néanmoins la fragilité osseuse ne disparaît pas complètement [9].

L'atteinte hépatique majeure et la plus préoccupante est la non excrétion du cuivre par le foie qui entraîne une intoxication au cuivre chez les chiens atteints. Cette maladie sera développée ultérieurement [54].

II) Quelques notions de physiologie et physiopathologie du cuivre.

Le cuivre est un oligo-élément essentiel. Il participe au fonctionnement de nombreuses enzymes telles les oxydases (par exemple la cytochrome c oxydase), les superoxydes dismutases cytoplasmiques. IL joue un rôle dans l'absorption du fer. Il est transporté par l'albumine et la céruloplasmine. Une intoxication produit des symptômes non spécifiques tels que nausée, diarrhée, irritabilité et douleurs abdominales, ou constitue une maladie connue sous le nom de maladie de Wilson [29]. Les apports de cuivre de l'organisme proviennent de son alimentation. L'organisme stocke ensuite le cuivre dans le foie et élimine ce dont il n'a pas besoin (le cuivre étant un oligoélément, le corps n'a besoin d'en absorber que 0,2mg par jour afin de renouveler son stock de 100mg) [28].

A) Métabolisme du cuivre.

1) L'absorption du cuivre [56].

Le cuivre est apporté à l'organisme via son alimentation. Les apports journaliers, d'environ 4mg, couvrent les besoins de l'organisme, d'environ 2mg. Le cuivre est absorbé au niveau de l'estomac et de la partie supérieure de l'intestin grêle. L'acidification du bol alimentaire dans l’estomac est nécessaire à son absorption car elle permet la libération du cuivre des complexes organiques naturels et sa solubilisation. Le mécanisme d'entrée du cuivre dans les entérocytes n'est pas parfaitement connu mais plusieurs hypothèses sont étudiées. Cette entrée est favorisée par sa complexion avec des acides aminés (dont l'histidine). Par contre elle est diminuée par la présence d'acide ascorbique ou d'autres cations divalents (le zinc par exemple). Dans le cas du zinc, l'hypothèse avancée est que le zinc induirait la production de méthallothionéines, protéines se liant au cuivre et empêchant sa sortie des entérocytes. Le cuivre se retrouverait alors piégé dans les cellules de l'épithélium intestinal qui finissent par desquamer et serait alors éliminé dans les fécès.

Une ATPase de type P (transporteuse de cations), codée par le gène *ATP7A* permet ensuite par un mécanisme actif le passage du cuivre depuis l'entérocyte jusqu'au sérum.

2) Le transport du cuivre.

Le transport du cuivre depuis l'intestin se fait grâce à sa liaison à l'albumine ou à l'histidine (ou à d'autres acides aminés). Lors du passage du sang dans le foie, le cuivre sera transféré aux hépatocytes où il sera stocké [56].

Lorsque le foie le relarguera dans le sang il le fera notamment sous forme liée à la céruloplasmine ou à l'albumine (et histidine) [61].

La céruloplasmine est une α_2-globuline d'environ 160kDa produite par le foie, le transporte 90% du cuivre plasmatique. Elle est très fermement liée à 6 molécule de cuivre [28] et possède une activité de ferroxidase qui est très importante dans l'incorporation du fer dans l'hème de l'hémoglobine. Elle possède également une activité d'oxydase dépendante du cuivre qui permettrait d'oxyder l'ascorbate, l'épinéphrine, l'arylamine et la p-phényl-énédiamine [12]. Mais la signification physiologique de cette activité reste inconnue [28].

Les 10% restant sont liés plus faiblement à l'albumine et à l'histidine. Il en découle que le cuivre libéré dans l'organisme l'est surtout à partir du cuivre lié à l'albumine et à l'histidine, qui de ce fait semblent être plus importantes dans le transport du cuivre jusqu'aux cellules de l'organisme que la céruloplasmine [28].

D'autres molécules interviendraient comme par exemple la transcupréine, protéine de 270 kDa qui semble avoir une haute affinité pour le Cu^{2+} [61].

3) Le cuivre cellulaire.

Le corps d'un adulte comporte environ 100mg de cuivre répartis surtout au niveau des os, du foie, des reins et des muscles [33].

a) Transfert du cuivre du sang jusqu'aux protéines cibles.

Le mécanisme de libération du cuivre par les protéines les transportant, au contact de la cellule, n'a pas été entièrement élucidé. Trois gènes (*CTR1 à 3*) ont été identifiés chez la levure comme captant le cuivre. Des gènes homologues ont été retrouvés dans différentes espèces animales et chez l'Homme (*hCTR1 et hCTR2*). Ces gènes ne sont pas exprimés de la même façon dans tous les tissus. Par exemple le gène *hCTR1* se retrouve préférentiellement au niveau du foie, du cœur et du pancréas et, de façon faible, dans le cerveau et le muscle. Le gène *hCTR2* à une expression hépatique faible mais une expression placentaire intense. Cependant ces gènes ne prennent en charge que le cuivre sous forme de Cu(I), il est nécessaire que le cuivre soit au préalable réduit ; le mécanisme n'est pas encore entièrement connu [56].

Une fois que le cuivre a pénétré dans la cellule, il est acheminé jusqu'aux protéines auxquelles il sera incorporé via des protéines chaperonnes ou le gluthation (qui possède un site de fixation du cuivre représenté par une cystéine). Parmi les molécules chaperonnes du cuivre ont été identifiées la molécule codée par le gène *ATOX1* qui interagit avec la molécule codée par le gène *ATP7B,* la molécule codée par le gène *CCS* qui interagit avec les superoxyde dismutases, et la molécule codée par le gène *COX17* qui adresse le cuivre à la mitochondrie. Ces molécules chaperonnes ainsi que le gluthation empêchent la constitution d'un pool cytoplasmique de cuivre non lié à une protéine [56].

b) Les protéines de la cellule contenant du cuivre.

Les protéines contenant du cuivre sont nombreuses. Le cuivre est principalement un cofacteur d'enzymes : il accepte ou donne des électrons et, de ce fait, intervient dans des réactions de dismutation, d'hydroxylation et d'oxygénation [28]. Mais on le retrouve également dans la céruloplasmine, les métallothionéines et certains facteurs de coagulation.

i) Le cuivre coenzyme de la cytochrome oxydase.

La cytochrome oxydase est la dernière enzyme à intervenir dans la chaîne de transporteurs respiratoires trouvée dans la membrane mitochondriale. Ainsi elle transfère les électrons qui

ont été produits par cette chaîne à l'oxygène. Cette enzyme est constituée de deux sous-unités comportant chacune un hème (fer) associé à une molécule de cuivre [33].

ii) Le cuivre coenzyme de l'uricase.

Cette enzyme, absente chez les primates, catalyse l'oxydation de l'acide urique en allantoïne [15], lors de la dégradation des bases azotées puriques. Elle se trouve essentiellement au niveau du foie. C'est un réducteur important au niveau du plasma (au niveau des leucocytes et des hématies) [55].

Le cuivre intervient en liant le substrat à l'enzyme et en participant au transfert d'électrons [15].

iii) Le cuivre coenzyme de la Cu/Zn-superoxyde dismutase.

La Cu/Zn-superoxde dismutase est une enzyme cytoplasmique de 32,5kDa qui est capable de prendre en charge les radicaux libres produits par le fonctionnement cellulaire et de les transformer en molécules non dangereuses pour l'organisme. Elle est constituée de deux sous-unités semblables contenant chacune un équivalent de Cu^{2+} et de Zn^{2+} (figure 9). C'est l'enzyme qui possède la vitesse catalytique la plus rapide connue [28].

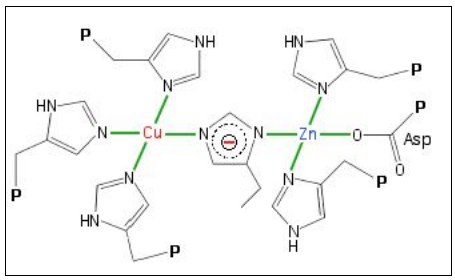


Figure 9 : Représentation de la Cu/Zn superoxyde dismutase [59].

iv) Le cuivre constituant de la céruloplasmine.

La céruloplasmine est obtenue par fixation de quatre molécules de cuivre sur l'apocéruloplasmine. C'est une protéine qui intervient notamment dans l'incorporation du fer dans l'hème de l'hémoglobine [56]. Le cuivre, par l'intermédiaire de la céruloplasmine, est donc important pour le métabolisme du fer. Ceci est illustré par les constatations suivantes : avec une alimentation ne comportant pas de cuivre on observe que le Fer s'accumule dans le foie et que le taux d'hémoglobine n'augmente pas. Si on administre alors de petites quantités de cuivre on remarque que la quantité de fer dans le foie diminue et que le taux d'hémoglobine augmente dans le sang [15].

La céruloplasmine possède aussi une activité de ferroxydase et réduit instantanément O_2 en H_2O [61].

v) Le cuivre coenzyme de nombreuses autres enzymes.

Parmi les enzymes ayant besoin de cuivre pour fonctionner, peuvent être citées :

- la β-mercaptopyruvate transulfurase qui contient une molécule de cuivre.
- la dopamineβhydroxylase (retrouvée dans les glandes adrénales) qui contient quatre à sept molécules de cuivre et permet de transformer la dopamine en épinéphrine.
- la monoamine oxydase (présente dans le sérum) qui contient quatre molécules de cuivre et oxyde les amines aliphatiques substituées en l'aldhéhyde leur correspondant [12].
- l'héphaestine qui est une oxydase intervenant dans la libération du fer depuis l'entérocyte.
- la tyrosinase qui transforme de la tyrosine en mélanine.
- la ferroxydase II a besoin de la présence d'oxygène pour exercer son activité ferroxydasique et qui possède deux sous unités, une grande et une petite, la molécule de cuivre se trouvant dans la plus petite.
- la galactosyl transférase intervenant dans la myélinisation.
- l'amine oxydase qui intervient dans la synthèse de collagène et de la matrice protéique de l'os [48].

Le cuivre intervient également dans le fonctionnement de la lysyloxydase et de l'ascorbate oxydase [59].

vi) *Les métallothionéines.*

Dans le cytoplasme des cellules, notamment au niveau du foie, des reins et de l'intestin, on trouve des protéines appelées métallothionéines. Ce sont des protéines de petite taille (6,5kDa) présentant un contenu élevé en cystéine et qui peuvent de ce fait fixer des métaux tels le cuivre, le zinc, le cadmium et le mercure. Les métaux fixés à ces métallothionéines le sont sous une forme non toxique. Ces protéines peuvent donc stocker le cuivre et ainsi en diminuer la quantité liée qui pourrait induire des radicaux libres [28].

vii) *les facteurs de coagulation V et VIII*

Des analyses par spectroscopie d'émission atomique et d'absorption de préparation de facteurs de coagulation V et VIII ont montré que ces molécules contiennent du cuivre [27].

4) L'excrétion du cuivre [56].

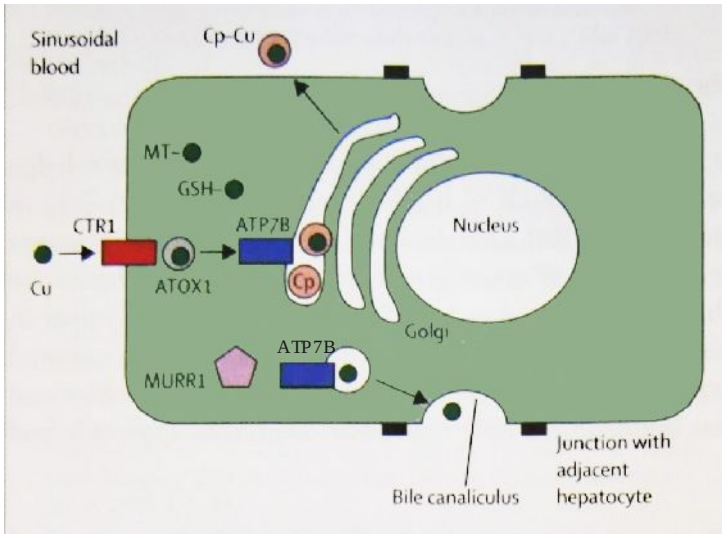
L'excrétion du cuivre est essentiellement biliaire, le corps en excréterait environ 1mg par jour. Le passage du cuivre depuis les hépatocytes jusque dans la bile est un mécanisme complexe qui fait intervenir une ATPase de type P codée par le gène *ATP7B*.

Cette ATPase est une molécule transmembranaire qui se trouve dans les hépatocytes, soit au niveau de la membrane des vésicules de sécrétion près des canaux biliaires, soit au niveau de la membrane du trans-Golgi. Si le cytoplasme contient peu de cuivre libre, alors la molécule codée par le gène *ATP7B* se trouve au niveau de la membrane du trans-Golgi et le cuivre va, par passage dans le trans-Golgi, être incorporé à l'apocéruloplasmine. Par contre si le cytoplasme contient du cuivre libre en excès alors l'ATPase se situera au niveau de la membrane des vésicules de sécrétion et le cuivre se retrouvera dans les vésicules et sera excrété dans la bile.

Des molécules, telle la molécule codée par le gène *COMMD1,* se lieraient à l'ATPase pour moduler son action.

L'excrétion urinaire est faible (environ 0,03 mg /j). On retrouve aussi du cuivre dans le lait des Mammifères à raison de 0,13mg/L [15].

La figure 10 présente un schéma récapitulatif des différentes molécules qui sont connues pour jouer un rôle dans le métabolisme du cuivre au niveau de l'hépatocyte.



Cp : céruloplasmine,
Mt : métallothionéine, MURR1 : protéine COMMD1,
GSH : glutathion

Figure 10 : Schéma récapitulatif du métabolisme du cuivre dans l'hépatocyte. [1]

B) Les maladies liées au cuivre.

1) Déficit en cuivre.

a) Par carence alimentaire.

L'individu ayant une carence alimentaire en cuivre présente une anémie. Le mécanisme est le suivant. L'apocéruloplasmine en fixant le cuivre devient la céruloplasmine qui, possédant, une activité de ferroxydase, intervient dans l'incorporation du fer dans l'hème de l'hémoglobine. En absence de cuivre, il n'y a pas de production de céruloplasmine et l'incorporation du fer ne se déroule pas correctement ; une quantité moindre d'hémoglobine fonctionnelle est produite [56][29].

Chez les volailles nourries avec un aliment pauvre en cuivre, on peut observer une fragilité osseuse, un épaississement des cartilages épiphysaux, de l'ataxie et de la paralysie spastique. Une augmentation du nombre de ruptures de l'aorte est aussi constatée, dues à un défaut de synthèse de la desmosine [24].

Des quantités élevées de sulfate, acide ascorbique ou molybdène dans l'alimentation diminuant l'absorption intestinale du cuivre, une intoxication au molybdène, aux sulfates ou à l'acide ascorbique s'accompagnera de signes de carence en cuivre [24].

b) Par mutation génétique : exemple de la maladie de Menkes chez l'Homme.

La maladie de Menkes chez l'Homme est due à une ou plusieurs mutations du gène *ATP7A* codant pour une ATPase de type P permettant la sortie du cuivre hors des entérocytes. Cette maladie récessive est liée au chromosome X et n'est exprimée que chez les garçons, dès la naissance [33]. Elle touche environ un nourrisson sur 300 000. Cette affection se manifeste par un retard de croissance intra-utérin, qui persiste après la naissance. Les différents symptômes visibles sont dus aux dysfonctionnements des enzymes ayant pour coenzyme le cuivre.

On observe chez les individus atteints une dégénérescence cérébrale avec des troubles neurologiques, dès les premiers mois de vie, tels qu'une hypotonie axiale, une spasticité, une hypothermie, des convulsions et des difficultés pour s'alimenter. L'individu présente un aspect remarquable avec des cheveux anormaux (rares, hypopigmentés, ternes, raides et cassants, présentant au microscope une torsion axiale caractéristique), une hypotonie de la face, une micrognathie, une peau sèche, épaisse, irrégulièrement pigmentée. Radiologiquement des anomalies osseuses sont visibles. Ces individus sont sujets aux anévrismes du fait de vaisseaux tortueux [59].

Les examens complémentaires mettent en évidence une diminution des taux sériques de cuivre, de la céruloplasmine. Si une diminution du taux hépatique de cuivre est notée [33], par contre le taux de cuivre dans les fibroblastes est augmenté [59].

La mort est rapide, dans les premières années de vie. Le seul traitement à l'heure actuelle est l'administration par voie parentérale de cuivre-histidine. Mais ce traitement ne fait que retarder l'échéance de la maladie.

Un diagnostique anténatal existe : il consiste à prélever des villosités choriales, à diagnostiquer le sexe du foetus, et, s'il s'agit d'un garçon, à étudier l'accumulation du cuivre dans les villosités choriales. Une étude par biologie moléculaire est également réalisable si une étude familiale est faite [59].

2) Intoxication au cuivre.

a) Intoxication accidentelle.

Une surcharge en cuivre est néfaste car le cuivre peut oxyder des lipides et des protéines et donc les dénaturer, se fixer aux acides nucléiques ou augmenter la production de radicaux

libres, délétères pour l'organisme.

i) *Intoxication aiguë.*

Les symptômes sont non spécifiques tels que nausée, diarrhée, irritabilité [29], douleurs abdominales, déshydratation et/ ou choc. Si l'individu survit à cette première phase, des signes d'hémolyse pourront être observés. Au niveau lésionnel,apparaissent des ulcères et érosions du tractus intestinal, une hypertrophie des reins et de la rate ainsi que de l'ictère.

Sans traitement l'individu meurt en 1 à 2 jours le plus souvent, parfois plus tard (conséquence d'une insuffisance rénale). Le traitement consiste en une administration de chélateurs du cuivre (par exemple de la pénicillamine) [24].

Il faut noter que le mouton est une espèce très sensible au cuivre, et sujette aux intoxications par cet oligoélément.

ii) *Intoxication suite à une affection hépatique.*

Toute maladie hépatique entraînant des perturbations du fonctionnement de cet organe peut être à l'origine d'une accumulation de cuivre résultant à terme en une intoxication. On peut notamment citer les maladies choléstatiques.

b) *Intoxication liée à une maladie génétique.*

i) *La maladie de Wilson chez l'Homme.*

La maladie de Wilson touche une personne sur 30 000, et apparaît entre 3 et 50 ans. Elle est due à une ou plusieurs des 300 mutations [1] qui peuvent affecter le gène *ATP7B* situé sur le chromosome 13 [34]. Ce gène code pour une ATPase transmembranaire permettant le transfert du cuivre jusqu'à l'apocéruloplasmine ou son élimination dans les vésicules de sécrétion biliaire [56].

Lors de la maladie de Wilson on note une accumulation du cuivre dans l'organisme. Dans le foie on peut observer une simple augmentation de la quantité de cuivre ou bien des signes beaucoup plus graves comme une stéatose, une hépatite chronique ou éventuellement une cirrhose. Au niveau de l'œil un dépôt de cuivre a lieu dans la membrane de Descemet de la cornée entraînant la visualisation d'anneaux de Kayser-Fleischer. Ces anneaux, de couleur verte ou dorée, sont quasi pathognomoniques : en dehors de la maladie de Wilson, ils ne sont visualisables que lors de maladies choléstatiques sévères. L'accumulation de cuivre au niveau du ganglion basal du système nerveux va entraîner des trémulations, des tremblements, des migraines, voire des signes psychologiques tels que dépression, changement de personnalité ou psychose. Parfois les patients souffrent d'anémie hémolytique [33][1].

La combinaison de plusieurs de ces signes va conduire à une suspicion diagnostique qui sera étayée par des examens complémentaires. Au niveau biochimique, les taux de céruloplasmine plasmatique sont inférieurs aux valeurs usuelles mais cela n'est pas spécifique. De plus lors d'inflammation ces taux peuvent être normaux. En général on note une augmentation persistante des AsAt, AlAt et taux de cuivre plasmatique [1]. Mais lors d'insuffisances hépatiques on peut obtenir une valeur des AlAT et Pal quasi nulle. Le taux de cuivre sérique sera diminué, ce dosage plasmatique ne servira pas au diagnostic mais permettra d'ajuster le traitement. On peut noter une augmentation du cuivre urinaire mais elle reste non spécifique. Il en va de même pour les signes observés sur une biopsie de foie : une stéatose, des infiltrations lymphocytaires portales ou périportales, une cirrhose pourront être observées par le pathologiste.

Les signes cliniques de cette affection ne sont pas spécifiques (sauf les anneaux de Kayser-Fleischer). Le marquage du cuivre sur la lame produit de nombreux faux négatifs et n'est donc pas fiable. De même le dosage du cuivre dans le foie peut donner de faux négatifs en cas de fibrose importante ou des faux positifs en cas de maladie choléstatique chronique. Le diagnostic définitif sera donc obtenu par recoupement des résultats et/ou répétition des examens complémentaires [17][1].

Au vu de l'étendue et de l'importance des symptômes on comprend que l'individu atteint ne vivra pas longtemps à moins d'instaurer un traitement médical à vie. Ce traitement passe par

une alimentation pauvre en cuivre ainsi que l'administration de chélateurs du cuivre (comme la pénicillamine par exemple) et de zinc (qui diminue l'absorption intestinale) [33][1]. Si le foie de l'individu est trop endommagé une greffe du foie peut être envisagée et permet une rémission quasi complète si seuls les signes hépatiques s'exprimaient [1].

La mutation étant transmise de façon récessive, associé au fait que la maladie peut ne s'exprimer que tardivement, la découverte d'un individu atteint entraîne une recherche de la maladie dans sa famille [17][1]. En effet le traitement est d'autant plus efficace qu'il est commencé avant l'apparition de lésions tissulaires irréversibles [34].

ii) L'intoxication au cuivre chez d'autres espèces.

La lignée des rats « Long Evans Cinnamom » (LEC) et celle des souris « toxic milk » présentent des désordres héréditaires du stockage du cuivre à déterminisme autosomal récessif [1] .

✗ *Les rats LEC [13].*

Chez les rats LEC une hépatite fulminante se déclare, vers l'âge de 4 mois, par accumulation de cuivre dans le foie. A cela s'ajoute une hémolyse intravasculaire qui entraîne l'accumulation de fer dans le foie. Les symptômes observés sont un ictère, des saignements, une oligurie, une léthargie et une perte de poids. Les dosages enzymatiques montrent une augmentation des taux d'AlAt, d'AsAt, de GGT. Les taux de bilirubine et de cuivre plasmatiques sont aussi plus hauts que la normale. Le taux de céruloplasmine sanguin est quant à lui diminué. Un bas taux de sélénium hépatique est par ailleurs noté. Les rats qui survivent à cet épisode aigu développent ensuite une cirrhose et des hépatocarcinomes.

La maladie chez cette lignée de rats est due à une mutation dans le gène Atp7b, gène homologue du gène ATP7B impliqué dans la maladie de Wilson. Elle possède un déterminisme autosomal récessif.

Cette similarité génétique, ajoutée au fait que certains symptômes sont semblables, font de cette lignée un modèle de la maladie humaine. Des différences existent néanmoins : les rats ne présentent pas de troubles neurologiques et l'humain ne développe pas d'hépatocarcinome.

✗ *Les souris « toxic milk » [13].*

Les femelles atteintes donnent naissance à des souriceaux dépourvus de cuivre. Or leur lait étant lui aussi dépourvu de cuivre, les souriceaux qu'elles allaitent meurent par déficience en cuivre. Par contre ces souriceaux pourront survivre s'ils sont allaités par une femelle saine. On assistera alors à l'accumulation de cuivre dans leur foie et à l'instauration d'une fibrose nodulaire, d'une hyperplasie des conduits biliaires et d'une infiltration portale par des lymphocytes. Ces animaux présentent, comme lors de la maladie de Wilson, une diminution des taux plasmatiques de cuivre et de céruloplasmine. L'origine génétique de cette maladie est similaire à celle de la maladie de Wilson. Cela fait de cette lignée de souris un modèle pour la maladie humaine même si des différences existent (pas de troubles neurologiques chez la souris, pas de lait pauvre en cuivre chez les femmes atteintes).

✗ *Les Doberman pinchers*

Chez cette race canine, les femelles ovariectomisées, d'âge moyen sont prédisposées à déclarer une hépatite chronique active, une choléstase et une cirrhose. La cause n'a pas été élucidée mais les données d'histopathologie favorisent l'hypothèse d'une maladie à médiation immune [13].

Les animaux atteints présentent de l'anorexie, des vomissements, de la diarrhée, une perte de poids, un ictère, une polyuro-polydipsie et de l'ascite. A un stade avancé de la maladie apparaissent des saignements et une encéphalose hépatique. Les examens d'imagerie médicale mettent en évidence une hypoplasie de foie ainsi qu'une splénomégalie. Les taux de bilirubine, des acides biliaires sanguins et des enzymes hépatiques sont élevés. Une hypoalbuminémie est également observée [24][36]. A l'histologie sont notées une accumulation de cuivre, plus importante en zone périportale que dans les zones centrolobulaires [36][22], des zones de nécrose et des zones fibrotiques [22]. L'accumulation

du cuivre pourrait être dû à un défaut d'excrétion de la bile (et alors n'être qu'une conséquence) et elle pourrait constituer un facteur favorisant l'apparition de la maladie. Il n'est pas exclu que le taux élevé de cuivre retrouvé ne soit pas normal, les animaux sains de cette race ayant en effet des taux de cuivre hépatique exceptionnellement élevés [24].

Le diagnostic de la maladie se base sur la mise en évidence de cette accumulation de cuivre [13].

Le traitement est un traitement symptomatique et de soutien, accompagné d'immunosuppresseurs. L'utilisation de chélateurs du cuivre est discutée du fait que le rôle de cet oligoélément dans cette affection n'est pas précisément connu.

Le pronostic est en général mauvais (l'animal décédant dans les mois qui suivent le diagnostic même malgré un traitement [7][22]), sauf si la maladie est détectée avant l'apparition des signes cliniques (en effet il existe une phase subclinique de la maladie) et qu'un traitement est mis en place de façon précoce [24].

✗ *Les Skye Terriers.*

Dans cette race de chiens quelques individus présentent une choléstase intracanaliculaire, une dégénerescence des cellules hépatiques et une accumulation de cuivre dans les zones périacinaires. Certains auteurs pensent que cette localisation du cuivre pourrait indiquer que son accumulation n'est pas secondaire à la choléstase [13], mais pour d'autres l'accumulation du cuivre fait tout simplement suite à la non excrétion de la bile [16].

Les symptômes de cette affection sont de l'ascite, de l'ictère, de la déshydratation et du méléna. Une légère anémie, une neutrophilie, une bilirubinurie, une hypoalbuminémie une diminution du taux d'urée plasmatique et une augmentation des phosphatases alcalines sont observés [24].

L'étiologie de cette affection reste inconnue mais une hypothèse d'un défaut métabolique héréditaire qui impliquerait des transferts membranaires en région périacinaire a été avancée [13].

Le traitement et le pronostic sont les mêmes que chez le Doberman [24].

✗ *Les Dalmatiens [13].*

Les Dalmatiens peuvent présenter une insuffisance hépatique fulgurante associée à des taux plasmatiques élevés pour les enzymes AlAt et AsAt. Une nécrose importante des hépatocytes centrolobulaires est visible à l'histologie. Les hépatocytes restants et les macrophages réagissent positivement aux colorations ciblant le cuivre et le taux de cuivre hépatique est élevé. Les données histologiques suggèrent un désordre primaire du stockage du cuivre par le foie. Les ressemblances avec l'intoxication des rats LEC sont remarquables et les scientifiques espèrent que cette affection du Dalmatien sera un modèle pour la maladie de Wilson chez l'Homme.

✗ *Les West Hilghland White Terriers et les Bedlington Terriers.*

Ces deux races présentent des intoxications au cuivre qui se ressemblent. Celle du Bedlington Terrier sera détaillée dans les paragraphes suivants. De ce fait seules les différences de la maladie du West Highland White Terrier avec celle du Bedlington Terrier seront décrites.

L'étiologie de l'intoxication au cuivre chez le West Highland White Terrier n'a pas encore été déterminée avec précision [24]. C'est une maladie héréditaire qui n'entraine pas une aussi forte accumulation hépatique en cuivre que celle du Bedlington Terrier et la quantité de cuivre accumulé ne peut pas être reliée à l'âge [13][40]. Aucune crise hémolytique n'a été signalée chez les chiens atteints [24]. Ajouté à cela, le foie des West Highland White Terriers ne présente, à aucun stade, de nécrose parcellaire comme on peut en retrouver dans le foie de chiens Bedlington Terriers [13].

III) L'intoxication au cuivre chez le Bedlington Terrier.

L'intoxication au cuivre est une des principales maladies du Bedlington Terrier. Cette affection sera envisagée au travers des signes cliniques de son origine génétique et du traitement des chiens.

A) Les signes cliniques et leur intérêt pour le diagnostic.

1) Les signes de l'intoxication.

Il existe deux catégories de signes: ceux recueillis lors de l'examen clinique, immédiatement exploitables, et les examens complémentaires d'histopathologie.

a) Signes au chevet de l'animal.

Les signes cliniques sont des signes non spécifiques qui apparaissent entre 2 et 6 ans et peuvent évoluer de façon aiguë ou chronique.

On note une atteinte du foie : une hépatite chronique (puis une cirrhose lors d'évolutions chroniques) se traduisant notamment par un ictère, une hépatomégalie et de l'ascite. Lors d'une laparotomie ou d'un examen nécropsique sur un animal à un stade avancé de la maladie, le foie apparaît petit, déformé, nodulaire : c'est un foie typique d'une cirrhose postnécrotique. Les nœuds lymphatiques mésentériques présentent une légère hypertrophie [10][18].

Les chiens atteints peuvent aussi présenter une anémie hémolytique qui serait due à l'action toxique du cuivre, que l'animal n'a pas réussi à stocker, sur la membrane plasmatique érythrocytaire. Ces chiens présentent aussi parfois de la faiblesse, de la léthargie, des pyodermites récurrentes, de l'anorexie, des vomissements, une polyuro-polydipsie, une déshydratation ou des dérangements gastriques [18][41].

b) Examens complémentaires.

i) Analyse de l'excrétion biliaire et biochimie.

Lors d'analyses de l'excrétion biliaire, une nette diminution de la quantité de cuivre contenue dans la bile est visible.

Les analyses sanguines ou urinaire mettent en évidence une augmentation des taux d'AlAT [20], d'AsAT et des Pal [18], mais ces augmentations n'apparaissent que tardivement. De même une augmentation tardive du taux de bilirubine totale peut être constatée [18]. Très tardivement dans l'évolution de la maladie on observe une diminution des concentrations en prothrombine et en albumine plasmatique. De plus, généralement, une augmentation de la quantité de cuivre dans le sang est remarquée. Parfois il en est de même pour la quantité de céruloplasmine oxydase.

ii) Histopathologie et histochimie .

Des colorations simples (Hémalun-Eosine, Perls, PAS) permettent d'observer les lésions au niveau des hépatocytes. On note une hépatite progressive chronique avec des infiltrations par des neutrophiles ou des lymphocytes [35] (figure 11) ainsi que de la fibrose au niveau des zones portales et périportales des lobules [10][18]. Des zones de nécrose sont parfois remarquées. Les hépatocytes, d'abord les centrolubulaires puis, quand la maladie évolue, les périportaux, apparaissent comme gorgés et leur cytoplasme contient des granules (corps denses et de forme irrégulière) réfractants [35], qui apparaissent marron quand ils sont colorés à l'hémalun-éosine [10]. Il a été montré que ces granules sont des lysosomes [41]. L'utilisation des colorations de Schiff, de Fontana, de Shikita, de Perls, à l'acide périodique et soit à l'acide rubéanique soit à la rhodanine montre respectivement que ces lysosomes contiennent de la mélanine, des protéines fixant le cuivre, pas de fer, des glycoprotéines et du cuivre [18][41]. La couleur marron en coloration à l'Hémalun-Eosine est due à la présence de lipofuscine dans ces lysosomes [18].

Au microscope électronique à transmission, le foie présente de nombreux corps irréguliers, denses aux électrons (figure 12) ainsi que des vacuoles nucléaires dans les hépatocytes [20].

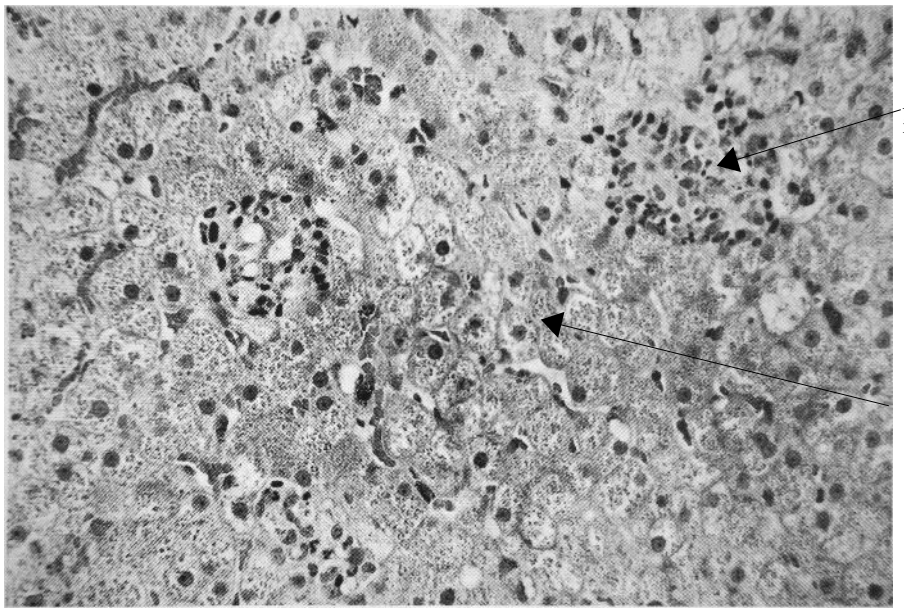


Figure 11 : Coloration à l'Hémalun-Eosine d'un échantillon, provenant d'une biopsie hépatique réalisée sur un Bedlington Terrier malade ([Cu]=5,438µg/g) (microscope X250) [41].

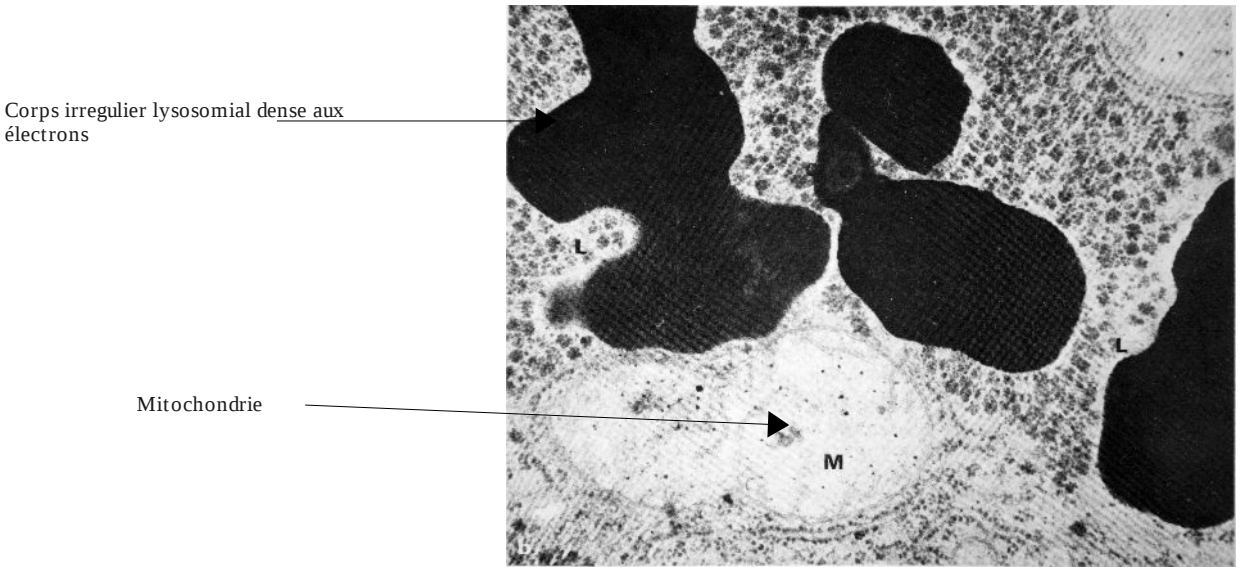
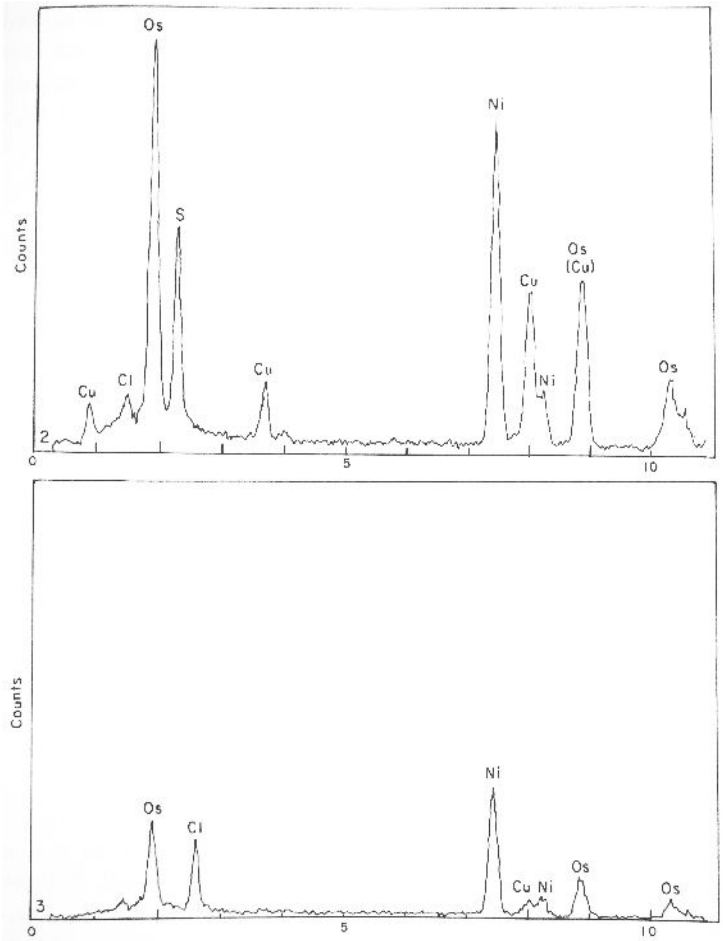


Figure 12 : Détail du cytoplasme d'un hépatocyte d'un chien atteint (microscope électronique. X80000) [10]

Une analyse spectrométrique du foie d'un animal malade (figure 13) montre des pics importants pour le Cuivre et le Soufre (l'existence de ce dernier pic pourrait s'expliquer par la présence d'acides aminés contenant cet élément dans les protéines fixant le cuivre) qui ne sont pas retrouvés chez des animaux sains [10].



Analyse spectrale d'un corps dense aux électrons provenant d'un chien malade. On peut y voir des pics importants pour le cuivre et le soufre.

Analyse d'une zone ne contenant pas de corps denses aux électrons mais provenant d'un échantillon du même chien que celui de l'analyse d'au-dessus.

Figure 13 : Analyse spectrale de zones du foie d'un Bedlington Terrier malade [10].

iii) Dosage tissulaire du cuivre.

Le dosage du cuivre tissulaire se fait sur un échantillon de foie. La plupart des laboratoires demandent au moins 1g de foie pour faire l'analyse. En général on considère qu'un chien est sain si sa concentration hépatique en cuivre est inférieure à 375 µg/g [31][42](440 µg/g dans certaines publications [6]) et qu'il est atteint si elle dépasse 1000 µg/g [3][6](850µg/g dans certaines publications [41]). Entre ces deux valeurs on ne peut pas conclure car certains chiens ont physiologiquement des taux dépassant 375 µg/g alors que, chez certains chiens atteints, la concentration hépatique en cuivre est inférieure à 1000 µg/g.

2) Intérêt de ces signes dans le diagnostic de la maladie.

a) Diagnostic à partir des signes cliniques et examens biochimiques.

Les signes cliniques sont non spécifiques, en effet, ils traduisent simplement une atteinte hépatique qui intervient entre 2 et 6 ans (d'où un diagnostic tardif) [20]. Ils peuvent évoluer de façon aiguë ou chronique. Les signes cliniques ne sont donc pas un moyen fiable de diagnostiquer la maladie [41].

Diagnostiquer la maladie à partir des résultats des prises de sang est tout aussi hasardeux : il n'y a pas toujours une élévation des concentrations plasmatiques en cuivre, des AsAT, AlAT, PAl et bilirubine totale ni une diminution des concentrations en prothrombine et albumine plasmatique [20][18]. De plus quand ces paramètres sont augmentés (ou diminués pour les deux derniers), cela n'intervient que tardivement dans l'évolution de la maladie et ne peut pas être considéré comme spécifique : on ne peut donc pas avoir un diagnostic précoce et de certitude [41].

En outre, se baser sur les signes énoncés ci-dessus ne permet de détecter que les animaux atteints et ne diagnostique pas les animaux porteurs pourtant très importants sur le plan de la transmission de l'anomalie génétique. L'éradication de la maladie par accouplements raisonnés n'est pas possible à partir des seuls signes cliniques et examens biochimiques. D'autres méthodes diagnostiques doivent être envisagées.

b) Diagnostic à partir d'une biopsie du foie.

La réalisation de la biopsie nécessite une anesthésie générale (ce qui n'est pas sans risques). Un échantillon du lobe carré est récupéré suite à une laparotomie abordée par la ligne médiane. Une autre méthode est l'utilisation d'un trocard soit en aveugle soit sous cœlioscopie mais avec un risque hémorragique, de péritonite, voire de mort, plus important [20].

L'étude des lésions du foie reste non spécifique. L'utilisation de coloration ciblant le cuivre est une aide. Les colorants utilisables sont par ordre de sensibilité décroissante le « Timm's silver sulfide », l'acide rubéanique et la rhodanine [18]. Avec l'acide rubéanique le cuivre apparaîtra sous la forme de précipités noirs, granuleux et fins [39]. La rhodanine donnera un précipité rouge en présence de cuivre. Elle ne réagit pas avec le zinc et le fer mais pourrait réagir avec l'argent, le mercure, l'or, le platine et le palladium qui sont tous des métaux que l'on ne trouve qu'exceptionnellement dans les tissus des Mammifères [23]. Ce marquage sera associé à l'attribution d'un grade entre 0 et 5 en fonction de la quantité de précipités dans le cytoplasme des hépatocytes et des monocytes-phacocytes [39]. La figure 14 présente différents grades obtenus par marquage à la rhodanine.

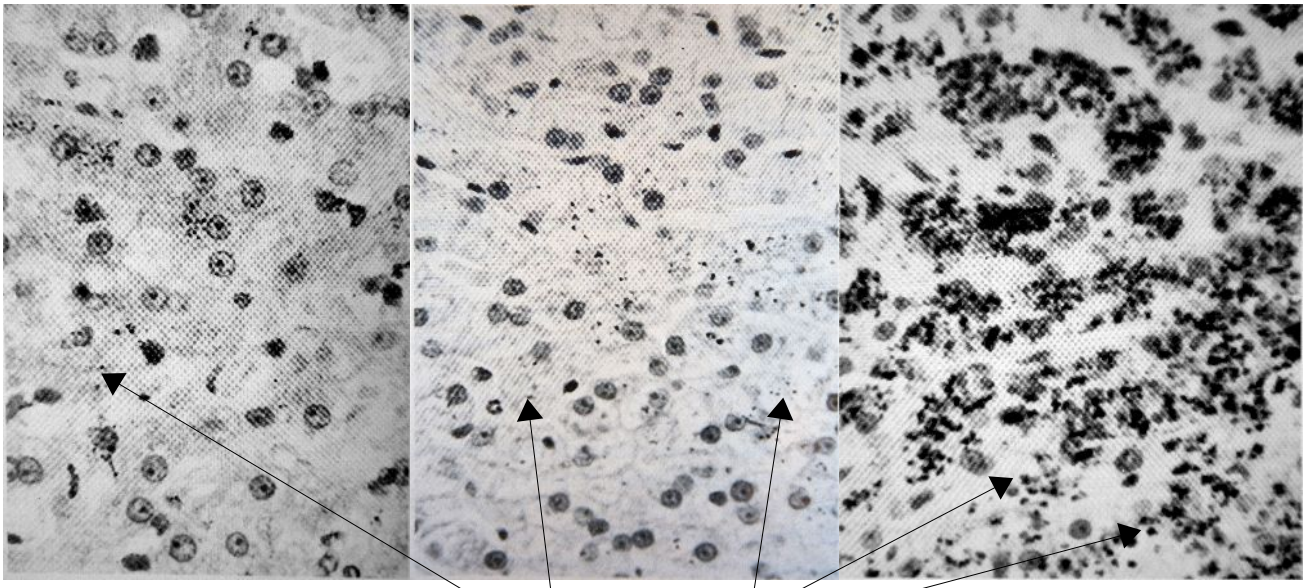


Figure 14 : Marquage a l'aide de rhodanine d'échantillons de foie de Bedlington Terriers atteints d'intoxication au cuivre. De gauche à droite : grade 3, 4 et 5 [23].

Le marquage du cuivre est intéressant chez les jeunes animaux. En effet ils n'ont pas toujours les granules apparaissant sombres à l'Hémalun-Eosine [18][31]. Par contre ce marquage ne permet pas de faire la différence entre un chien hétérozygote et un chien homozygote sain [23].
La mesure de la quantité de cuivre présente dans l'échantillon de foie est une méthode un peu plus spécifique mais elle est loin d'être satisfaisante. Tout d'abord le diagnostic ne sera que tardif. En effet les quantités de cuivre dans le foie ne s'élèvent que progressivement au cours de la vie de l'animal. De plus il semble qu'il y ait un pic de la concentration hépatique en cuivre chez les chiens de moins de 1an : il faut alors faire attention à ne pas confondre ce pic normal avec une élévation pathologique. Aussi le diagnostic chez les jeunes chiens n'est pas possible [31]. De plus, si le chien a une valeur en cuivre comprise entre les deux valeurs seuil (375 µg/g et 1000 µg/g), son statut ne peut être déterminé : certains animaux sains ont des taux de

cuivre élevés dans le foie et certains animaux atteints ont malgré tout des taux bas. De plus la détection des animaux porteurs n'est pas possible avec cette méthode.

c) *Diagnostic à partir d'une cytoponction du foie [10].*

Grâce à une aiguille fine le foie est ponctionné, l'acte pouvant être réalisé sous guidage échographique. Les risques d'hémorragies, de péritonite sont réduits et ceux liés à l'anesthésie générale sont absents. Après étalement de l'échantillon prélevé, des cytologies sont réalisées en utilisant les marqueurs spécifiques du cuivre cités au paragraphe précédent. L'aspect des hépatocytes pourra également être observé et les granules marron en coloration à l'Hémalun-Eosine seront recherchés dans leur cytoplasme (figure 15). Par contre les dosages en cuivre ne pourront pas être effectués du fait du peu de matière recueillie (inférieure à 1g).

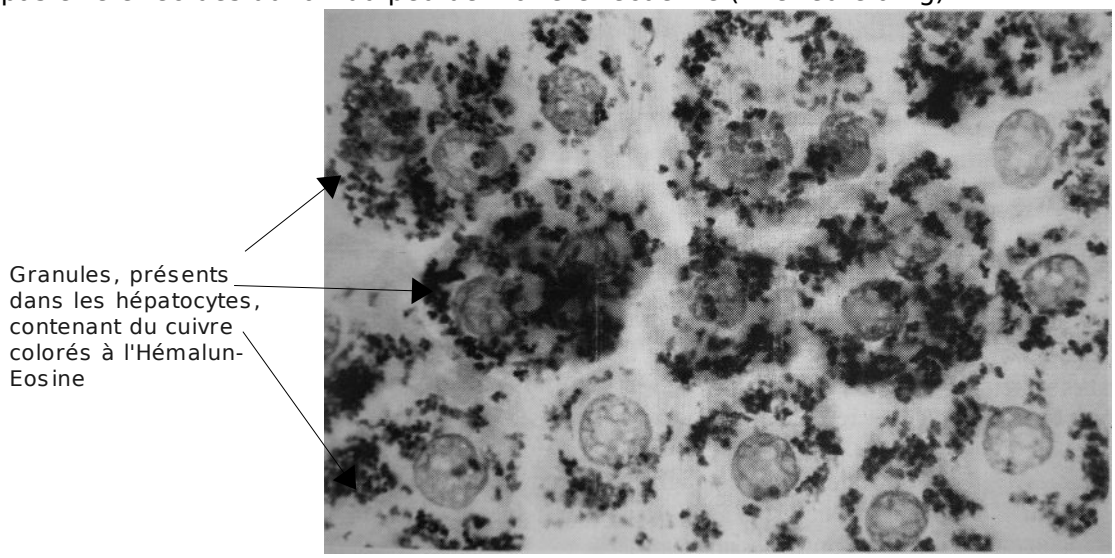


Figure 15 : Visualisation d'un frottis réalisé après une cytoponction hépatique chez un Bedlington Terrier présentant un stade avancé de la maladie [39].

Cette méthode est donc moins dangereuse pour l'animal, mais les risques de passer à côté des lésions recherchées, notamment en début d'évolution de la maladie, sont plus élevés. Or obtenir un faux négatif pour un mâle reproducteur champion serait des préjudiciables car il répandrait la mutation dans la population sans qu'on s'en aperçoive.

B) Une maladie d'origine génétique.

L'étude de la transmission de la maladie au sein de familles de Bedlington a permis de révéler qu'elle était de type autosomale récessive. Ceci, en plus des signes cliniques, la rapproche de la maladie de Wilson chez l'Homme. Une comparaison entre la maladie de Wilson et l'intoxication au cuivre chez le Bedlington Terrier sera envisagée ainsi que la mise en évidence du gène responsable de cette intoxication.

1) Comparaison avec la maladie de Wilson chez l'Homme.

L'intérêt porté à la maladie de Wilson chez l'Homme a permis une étude poussée de l'intoxication au cuivre chez le Bedlington Terrier.

En effet l'intoxication au cuivre chez le Bedlington Terrier ressemble beaucoup, sur certains points, à la maladie de Wilson. Les deux maladies sont à déterminisme autosomal récessif et provoquent une accumulation de cuivre par défaut d'excrétion. On note une augmentation du taux de cuivre dans le foie et dans une moindre mesure dans le rein dans les deux cas. A un stade avancé de l'atteinte, une cirrhose du foie s'installe, ainsi que de l'ascite et des crises hémolytiques. Pour les deux espèces, un traitement à la pénicillamine réduit le taux de cuivre du foie (le traitement de l'intoxication au cuivre du Bedlington Terrier sera envisagé dans un paragraphe ultérieur).

Il existerait pourtant des différences entre ces deux affections. Ainsi, dans le cas de

l'intoxication au cuivre chez les Bedlington Terriers aucune modification du taux de cuivre n'est notée ni dans l'œil ni dans le cerveau des chiens contrairement à ce qui se passe dans le cas des personnes atteintes de la maladie de Wilson. Il n'y a pas non plus d'atteinte neurologique alors que l'on peut en voir avec la maladie de Wilson. Ajouté à cela, chez les patients humains on note un faible taux de céruloplasmine dans le sérum alors qu'il est normal chez les chiens atteints [44]. Mais ces différences pourraient n'être dues qu'à des métabolismes différents entre le chien et l'Homme. Seule la recherche du gène causant l'intoxication au cuivre du Bedlington Terrier (celui causant la maladie de Wilson étant connu) va permettre de conclure à une même affection ou à deux affections seulement similaires.

2) La recherche du gène responsable de l'intoxication au cuivre chez le Bedlington Terrier.

Différentes méthodes ont été utilisées (méthode des gènes candidats, utilisation de microsatellites) avant de découvrir le gène *COMMD1*, responsable de la plupart des cas d'intoxication au cuivre dans cette race, mais pas seul en cause.

a) L'utilisation de la méthode des gènes candidats.

L'application de la méthode des gènes candidats a amené à chercher une relation entre la maladie et certains allèles de gènes connus, soit pour provoquer chez d'autres espèces des symptômes proches de ceux de l'intoxication au cuivre du Bedlington Terrier, soit pour intervenir dans le métabolisme du cuivre.
Ce fut le cas des gènes *CTR1* et *CTR2* (gènes codant pour le transport du cuivre)[44], *ATP7B* (gène responsable de la maladie de Wilson), *ATX1* (gène codant pour une molécule chaperonne du cuivre)[51], *ATP6H* (gène codant pour une sous-unité d'une ATPase impliquée dans le transport des métaux)[5], estérase D et retinoblastoma (gènes liés à la maladie de Wilson)[44].
La méthode utilisée majoritairement fut la cohybridation in situ du gène candidat avec le microsatellite C04107.
Les résultats obtenus ont montré que ces gènes étaient soit sur des chromosomes différents de celui du microsatellite soit trop éloignés de ce dernier.

b) La découverte du microsatellite C04107.

Pour mettre en évidence une maladie génétique il est fréquent de recourir à des tests utilisant des microsatellites ségrégeants avec la maladie. Dans le cas de l'intoxication au cuivre chez les Bedlington Terriers il fut possible de développer un tel test grâce à la mise au point de 500 microsatellites répartis sur l'ensemble du génome du chien. Un microsatellite est une portion du génome correspondant à la répétition d'une séquence simple de multiple fois. Le plus couramment il est du type (CA)n, avec n le nombre de répétitions. Les différents allèles d'un microsatellite correspondent à des nombres de répétitions différents. On considère qu'un microsatellite ségrège avec la maladie si le LOD score est supérieur à 3. Dans le cas de l'intoxication au cuivre des Bedlington Terriers, le microsatellite C04107 remplit cette condition. Ce fut le seul des 500 microsatellites testés dans ce cas. Ce microsatellite C04107 présente deux allèles nommés 1 et 2. Dans la population des Bedlington Terriers étudiée aux Etats Unis, l'allèle 2 ségrège avec la maladie : les chiens 2/2 sont atteints, les 2/1 sont porteurs et les 1/1 sont sains [50]. Des études ultérieures sur des familles de chiens en Grande Bretagne, au Danemark [32], en Allemagne, aux Pays Bas [43] et en Belgique ont mis en évidence une ségrégation de l'allèle 2 avec la maladie.

L'utilisation à des fins diagnostiques de ce microsatellite présente des limites. C'est un test qui ne peut être conduit sans une analyse familiale : on ne saurait l'utiliser pour évaluer un chien dont la filiation est inconnue. De plus pour savoir quel allèle ségrège avec la maladie il faut avoir au moins un chien malade dans la famille de l'animal testé (or par sélection on cherche à diminuer le nombre d'animaux malades). En effet, même s'il semblait que l'allèle 2 accompagne le plus souvent la maladie , la probabilité d'un crossing over, qui échangerait les données dans une certaine lignée, n'est pas nulle même si elle est faible. Récemment de tels chiens ont été découverts : des chiens 2/1 atteints et non pas seulement porteurs ou des chiens 2/2 non malades [45][47].

De ce fait, la mise au point d'un test ciblant l'anomalie responsable de la mutation paraît

inévitable.

c) La découverte d'un gène en cause : le gène COMMD1.

i) Localisation du gène COMMD1 [5][44][45][46][51].

Le gène *COMMD1* (anciennement nommé *MURR1*) a été localisé par la méthode de FISH (fluorescence *in situ* hybridization) appliquée au microsatellite C04107. Il est situé sur le chromosome 10 dans la région q26 (qui est homologue à la région 2p13-p21 du chromosome humain n°2).
Ce gène est composé de 173 321 nucléotides. Il comporte 3 exons et 2 introns (figure 16).

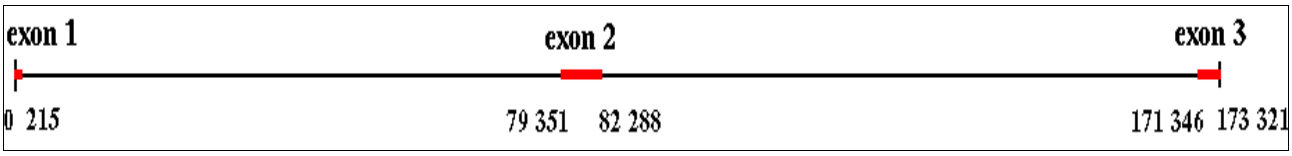


Figure 16 : Schéma du gène COMMD1, localisation des exons.

ii) Localisation de l'anomalie dans le gène [11].

Il a été montré par RT-PCR suivi d'un Southern Blotting que l'exon 2 n'existe pas dans l'allèle muté [21]. Un ARNm tronqué est produit mais ne permet pas l'obtention d'une protéine puisque cette dernière n'est pas retrouvée dans le foie.
L'utilisation de différents couples d'amorces (tableau I), à la fois chez un chien sain et chez un chien atteint, a permis de préciser la localisation de la délétion : si un produit d'amplification était obtenu chez les deux cela signifiait que les amorces n'étaient pas dans la zone délétée, si l'amplification n'avait lieu que chez le chien sain cela signifiait qu'au moins une des amorces était dans la zone délétée. Une fois une localisation plus précise trouvée, il a pu être possible de séquencer cette partie du génome et ainsi de qualifier la délétion.

Amorce sens (5'-3')	Amorce antisens (5'-3')
GCTGATGGTTGCTTAAGTTTGA	AAAAGGGACTCTGAGTACAAAGGA
CCTGCTTATGGTCTTTCCTTTG	AAGCAGCAAAAGAACCCAGT
CCAATTCCTAGGCAACCAGT	CTGGGTAAAGAGGGCTATTC
CACCCAGGGATCCCTTTGTTGTACT	CTGGGTAAAGAGGGCTATTC
CCTGCTTATGGTCTTTCCTTTG	GTACAACAAAGGGATCCCTG
ATGGGCATTCAACAAGAAGC	CAGACACAGGGCTCATCTCA
GAGCCCCACGAAACAGACTA	TGGTCCACATCTTCCAATCA
CCTGCTTATGGTCTTTCCTTTG	GTACAACAAAGGGATCCCTG
GAGCCCCACGAAACAGACTA	CCTTGAGGCACAAAGCTCTC
GCTGATGGTTGCTTAAGTTTGA	CTGGGTAAAGAGGGCTATTC
GCTGATGGTTGCTTAAGTTTGA	TGTGGAGCACAGGCAAGATA
GCTGATGGTTGCTTAAGTTTGA	CTCTTGCCGCCTTATATGCT
TAAGGCTCCATTGCGACAG	TTGCTAACATTGTAATGGGAAACA
CCTGCAGTTAAGAAGCTGGG	ACCATGAGGTTGGTTTCCAG
GAATCAGAATTTCTGTGTT	CTGGCTGCATCAGTGTGCTG

Tableau I : Différents couples d'amorces utilisés pour localiser la délétion de l'exon 2 du gène COMMD1 [11][21].

Cette délétion concerne une séquence d'environ 40kb englobant la totalité de l'exon 2. Les points de délétion sont situés respectivement dans l'intron 1 et l'intron 2 au niveau des nucléotides 44 120 et 83 807. Les séquences des deux sites de délétion se ressemblent et cette homologie pourrait être la cause de l'apparition de l'allèle muté.

iii) Le rôle de la protéine codée par le gène COMMD1 [8].

Le premier rôle auquel on pense pour la protéine codé par le gène *COMMD1* (que nous appellerons protéine COMMD1) est un rôle dans l'excrétion du cuivre par le foie. Le mécanisme précis n'est pas encore connu mais il semblerait que la protéine COMMD1 se fixe à la protéine ATP7B et participe ainsi à l'excrétion du cuivre depuis le compartiment golgien jusque dans les canalicules biliaires en facilitant la dégranulation du contenu lysosomial dans la bile.

Mais ce rôle ne semble pas être le seul que possède la protéine COMMD1. Elle diminuerait la réabsorption du sodium dans la partie distale des tubules rénaux en inhibant l'activité de certaines des sous-unités des canaux Na, sensibles à l'amiloride, se situant dans l'épithélium de cette partie des tubules.

La protéine COMMD1 aurait également un effet protecteur sur les protéines IkB (inhibitrices des NF-kB), et elle régulerait la fixation des NF-kB à leur site promoteur. Les NF-kB (facteurs nucléaires kappa-B) ont un rôle important dans la régulation de la transcription d'un grand nombre de gènes. Ils jouent notamment un rôle important dans la réplication du HIV-1 en initiant la transcription du génome viral. Le fait que la protéine COMMD1 inhibe l'activité de ces facteurs pourrait permettre de trouver de nouvelles perspectives pour la protection contre le HIV-1.

La protéine COMMD1, grâce à la présence, en son sein, d'une séquence particulière, est capable de se dimériser ou de se lier à d'autre protéines contenant cette même séquence. Ces autres protéines sont nommées protéines COMMD du fait de leur ressemblance avec la protéine COMMD1 [4].

Ainsi le gène *COMMD1* code pour une protéine ayant de nombreuses fonctions dans l'organisme.

d) L'existence d'une autre anomalie [6][8][21].

Dès 2003, les chercheurs se sont aperçus que la prise en compte seulement de la délétion de l'exon 2 du gène *COMMD1* ne permettait pas d'expliquer tous les cas d'intoxication au cuivre héréditaire chez le Bedlington Terrier.

Des chiens ne présentant pas cette délétion mais atteint d'intoxication au cuivre ont été identifiés. En étudiant leur gène *COMMD1* (anciennement *MURR1*) il a été établi qu'ils étaient 1/1 ou 1/2 pour le microsatellite C04107 et qu'ils présentaient une altération d'un site d'épissage dans l'intron 1 : une cytosine est remplacée par une adénosine. Mais cette variation est peut être sans effet néfaste. En effet de études sur l'ADNc de ces chiens n'a pas révélé d'anomalie de longueur de l'ARNm codé par le gène *COMMD1*. Mais les auteurs n'ont pas quantifié cet ARNm. Peut être y a-t-il une moindre production d'ARNm donc une moindre production de la protéine codée chez ces chiens atteints? Peut être également y a-t-il une mutation sur un autre gène ,intervenant ou non dans la régulation de la protéine codée par *COMMD1*. Les autres gènes *COMMD* constituent de bons candidats.

3) La détection de la maladie à travers le monde.

a) Aux Etats-Unis, au Canada et en Australie

Le laboratoire VetGen aux Etats-Unis [60] propose de diagnostiquer l'intoxication au cuivre en réalisant deux tests PCR. Le premier recherche les allèles présents pour le microsatellite C04107 et correspond à l'ancienne méthode. Le deuxième cible la délétion de l'exon 2 du gène *COMMD1*. La nature de ces tests PCR n'est pas connue et n'est pas publiée.

Ce laboratoire possède une filiale en Australie : GenTest [69] qui propose les mêmes tests.

Le laboratoire IDEXX au Canada [70] organise l'envoie des échantillons de ses clients à VetGen afin que ce dernier s'occupe de la réalisation du test de recherche de la délétion.

b) *Aux Pays-Bas*

Une équipe de chercheurs aux Pays Bas a développé une PCR quantitative permettant de mesurer le rapport entre l'exon 2 et l'exon 3 à partir d'une prise de sang ou d'un écouvillon buccal [37]. Les amorces utilisées sont présentées dans le tableau II.

Séquence ciblée	Positionnement de l'amorce.	Séquence de l'amorce	Taille du fragment amplifié
Exon 2 du gène *COMMD1*	sens	5'-GACCAAGCTGCTGTCATTTCCAA-3'	122
	antisens	5'-TTGCCGTCAACTCTCCAACTCA-3'	
Exon 3 du gène *COMMD1*	sens	5'-GTTCATGATCCCTCCCCAGTG-3'	118
	antisens	5'-AAAGACAAAAGAAATCTCAGCAAGTG-3'	

Tableau II : Amorces utilisées dans le test PCR d'une équipe de chercheurs des Pays-Bas [37]

Ils ont obtenu les résultats suivants : un rapport proche de 0 pour leur unique chien homozygote atteint, un rapport de 0,5 pour leurs huit chiens hétérozygotes et un rapport de 1 pour le chien d'une race non concernée par l'intoxication au cuivre, leur servant d'homozygote sain [37]. Les auteurs ont préféré choisir une méthode de PCR quantitative à partir d'ADN plutôt qu'une RT-PCR car en utilisant l'ARN et non l'ADN à la base, on risque des erreurs : en effet des différences dans l'épissage peuvent exister d'un tissu à un autre. Une PCR quantitative à partir d'ADN et non une RT-PCR quantitative semble de ce fait préférable.

c) *Au Royaume-Uni*

Le laboratoire Laboklin [68] n'effectue que la recherche des allèles du microsatellite C04107.

Le laboratoire Animal Health Trust [67] propose le test mis au point et publié par Forman et al. [11]. Pour ce test utilisant une PCR point final sur gel d'agarose, les couples d'amorces présentés dans le tableau I servent a amplifier une séquence dans l'exon 2, une séquence n'existant que quand la délétion de l'exon 2 est présente et une séquence dans l'intron 2, dans une zone, non concernée par la délétion, leur servant de contrôle interne.

Amorce sens (5'-3')	Amorce antisens (5'-3')
CCTGCTTATGGTCTTTCCTTTG	GTACAACAAAGGGATCCCTG
ATGGGCATTCAACAAGAAGC	CAGACACAGGGCTCATCTCA
GAGCCCCACGAAACAGACTA	TGGTCCACATCTTCCAATCA

Tableau III : Amorces utilisée dans le test diagnostique du laboratoire Animal Health Trust [67][11]

d) *Dans les autres pays.*

D'autres équipes de chercheurs étudiant l'intoxication au cuivre chez le Bedlington Terrier, ont été amenées à développer des tests recherchant la délétion de l'exon 2 du gène *COMMD1*. Mais il n'est pas explicité dans leurs publications si leur test est mis à la disposition des éleveurs.

Aucun test de diagnostic n'existe en France.

4) Les différents tests rapides de diagnostic moléculaire utilisables pour détecter une mutation responsable d'une maladie génétique.

Pour diagnostiquer une mutation responsable d'une maladie génétique, différentes méthodes sont utilisées. Ces méthodes ont pour point commun d'utiliser la technique de PCR.

La PCR ou réaction de polymérisation en chaîne correspond à une amplification moléculaire *in vitro*. Elle permet une amplification sélective d'un séquence d'ADN double brin à partir d'un couple d'amorces s'hybridant de part et d'autre de cette séquence. On obtient alors un grand nombre de copies de cette séquence, même à partir d'une infime quantité d'ADN.

a) *Principe général.*

Dans un tube, sont mis en présence l'ADN cible (appelé matrice), une enzyme (la Taq polymérase) qui est thermostable et polymérise l'ADN dans le sens 5'-3', deux séquences oligonucléotidiques (appelées amorces) qui se lient chacune à un des deux brins de part et d'autre de la zone à amplifier, des dNTP, un tampon et du Mg^{2+} (souvent sous forme de $MgCl_2$). Le tout est placé dans un thermocycleur : c'est un automate qui va appliquer des températures différentes pendant des durées précises afin de créer des cycles. Ces cycles comportent chacun trois phases. La première est la dénaturation thermique qui permet de séparer les deux brins de l'ADN double brin. Puis vient la phase d'hybridation des amorces (par diminution de la température). La dernière phase correspond à l'élongation, c'est à dire à l'action de la Taq polymérase qui va permettre d'obtenir à partir d'un exemplaire d'ADN double brin et de deux amorces, deux exemplaires d'ADN double brin ciblé sur la séquence que l'on veut amplifier (comprise entre la séquence des amorces).

Cette méthode est spécifique à condition de posséder les amorces adéquates se fixant de façon unique. Elle est sensible : on peut obtenir 10 à 100ng d'ADN à partir d'une seule cellule (et donc d'une seule copie d'ADN génomique). Cette capacité à amplifier de très faibles quantités d'ADN rend les risques de contamination importants : il faut notamment se méfier des aérosols produits lors des pipetages, aérosols contenant les produits amplifiés, et l'on comprend toute l'importance de l'organisation infrastructurelle du laboratoire et l'utilisation d'un témoin négatif (ne contenant normalement aucun échantillon d'ADN). La taille de la séquence à amplifier est importante : au dessus de 1,5kb l'amplification par PCR devient délicate (un changement de polymérase peut aider).

Diverses versions de PCR existent dont notamment la PCR point final et la PCR quantitative.

b) *La PCR point final.*

Dans le cas d'une PCR point final, la réaction a lieu comme décrit ci-dessus. Après amplification, on effectue une migration par électrophorèse sur un gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium. Ce dernier deviendra fluorescent en présence de nucléotides sous lumière UV et permettra de visualiser les différents fragments ayant migré. On obtient une lecture qualitative : il y a ou non présence du fragment de la longueur attendue. Une lecture semi-quantitative peut être effectuée par comparaison des intensités des signaux visualisés.

Une PCR multiplex (duplex, triplex, ...) peut être réalisée: pour cela on met dans le milieu plusieurs (deux, trois, ...) couples d'amorces (en vérifiant que les couples ne se croisent pas et ainsi n'amplifient bien que les séquences spécifiques). L'intérêt réside dans la possibilité d'une étude semi-quantitative de plusieurs séquences. Pour une étude quantitative un recours à la PCR quantitative est nécessaire.

c) *La PCR quantitative.*

En PCR point final on observe les résultats seulement à la fin de la totalité des cycles. C'est là la différence avec la PCR quantitative : grâce à un appareillage approprié on peut faire des mesures à la fin de chaque cycle. A cette fin, on rajoute au mélange d'une PCR classique un colorant qui n'émet une fluorescence que s'il est incorporé à l'ADN, le SYBR™ Green. Le SYBR™ Green vient s'intercaler entre les deux brins d'ADN double brins et on mesure la fluorescence à la fin de chaque cycle en éclairant le fond du tube avec un laser. Si l'on trace la courbe représentant la fluorescence au cours du temps on obtient une courbe de croissance exponentielle. Cette fluorescence sera proportionnelle à la quantité d'ADN dans l'échantillon au moment de la mesure. En étalonnant au préalable le thermocycleur avec des concentrations en ADN connues, on pourra en déduire la quantité d'ADN présente par lecture de la courbe. De plus si on utilise deux couples d'amorces, un ciblant la séquence que l'on cherche à étudier et un ciblant une séquence de référence, alors on pourra comparer les deux quantités d'ADN. Cela permet de déterminer le niveau d'expression d'un gène ou de rechercher la présence d'une délétion ou addition de séquence.

Dans cette méthode, une fois le mélange réalisé, il n'est plus manipulé jusqu'à lecture du résultat donné par l'automate. Par rapport à la PCR point final il y a donc une étape en moins lors de laquelle il pourrait y avoir contamination : le mélange contenant les produits amplifiés n'est pas manipulé pour être mis dans un des puits d'un gel afin de subir une migration par

électrophorèse.

C) Comment gérer l'intoxication au cuivre chez les Bedlington Terriers?

La gestion de l'intoxication au cuivre chez le Bedlington Terrier se fait à deux niveaux : au niveau individuel avec la gestion du chien atteint, et au niveau de la race avec un raisonnement des accouplements, reposant sur les connaissances quant à l'origine génétique de cette maladie.

1) La gestion du chien atteint.

C'est une gestion à vie ayant pour objectifs d'aider l'animal par un traitement symptomatique, de réduire les apports en cuivre et de favoriser l'excrétion du cuivre.

a) Traitements symptomatiques.

L'utilisation d'anti-inflammatoires dans les cas d'hépatites chroniques permet de diminuer les signes cliniques.

La vitamine E étant une molécule antioxydante permet d'éviter l'aggravation des symptômes par action de radicaux libres dus au cuivre.

b) La réduction des apports en cuivre.

Elle est réalisée en nourrissant l'animal avec des rations ménagères et en apportant une supplémentation en Zinc par voie orale.

i) L'utilisation de rations ménagères [19].

Les aliments du commerce contiennent des taux en cuivre plus élevés que les besoins quotidiens d'un chien. Il sont donc à éviter, et on leur préférera des rations ménagères.

Les rations ménagères doivent être faites à partir d'aliments pauvres en cuivre (tableau IV).

Aliments à proscrire	Aliments utilisables
viscères (foie, reins) coquillages et crustacés fèves légumineuses (séchées ou non) fruits à noyau céréales champignons noix suppléments minéraux	viandes de porc, de bœuf et de poulet (sauf viscères) viandes transformées (salami, hot-dogs) œufs poisson produits laitiers riz blanc, farine blanche légumes suppléments en vitamines sans cuivre

Tableau IV : Choix des aliments pour le régime d'un chien atteint.

Il ne faut pas que le régime contienne plus de 1,2mg de cuivre /100g d'aliment.

Il ne faut pas donner à l'animal de friandise pour chien.

La plupart des canalisations transportant l'eau potable étant en cuivre (du fait de l'interdiction de l'utilisation de plomb) il faut éviter de donner de l'eau provenant du robinet et préférer une eau minérale en bouteille pauvre en cuivre.

ii) La supplémentation orale en Zinc [19].

La supplémentation orale en Zinc permet d'éviter l'absorption intestinale de cuivre.

Elle peut se faire grâce à de l'acétate, du gluconate ou de la méthionine de zinc. Ces molécules vont permettre une augmentation de l'expression des métallothionéines dans les cellules de l'épithélium intestinal. Ces métallothionéines vont complexer le cuivre qui se

retrouvera alors emprisonné dans la cellule et éliminé par desquamation de la cellule. Ce mécanisme permet d'empêcher l'absorption du cuivre provenant de l'alimentation ainsi que du cuivre endogène présent dans la salive, dans les sucs gastriques, pancréatique et intestinal [3].

La supplémentation en zinc se fait par voie orale. Il faut donner les gélules contenant le zinc au moins une heure après une prise alimentaire sauf si le chien a tendance à vomir après l'administration. Il convient alors de donner les gélules accompagnées d'un morceau de viande. Il est conseillé de commencer par donner 200mg de zinc par jour en deux prises puis au bout de 3 mois de diminuer les doses jusqu'à atteindre 50 à 100mg par jour toujours en deux prises. Ceci permet d'obtenir un taux plasmatique de zinc compris entre 0,2 et 0,3 mg/L. En effet lors de la mise en place du traitement il existe un certain délai avant de pouvoir observer les effets escomptés.

Dans l'étude de Brewer et al [3], six chiens (trois Bedlington Terriers et trois West Highland White Terriers) atteints d'intoxication au cuivre furent traités au Zinc pendant 2 ans pour deux chiens de chaque race et pendant 1 an pour les deux chiens restants. Au bout de 2 ans, les chercheurs notèrent, chez les quatre chiens, une réduction de la concentration hépatique en cuivre et des signes hépatiques.

Il existe des effets secondaires si le taux plasmatique en zinc atteint 2 mg/L : anémie hémolytique, signes gastro-intestinaux (anorexie, vomissements, diarrhée, douleurs abdominales)[20]. Ainsi, un contrôle tous les 2-3 mois de la concentration plasmatique en zinc est à effectuer.

Remarque : l'utilisation d'acide ascorbique (500 à 1000 mg/kg) pourrait aussi réduire l'absorption intestinale mais aucune étude n'a été faite sur ce point [20].

c) Favoriser l'excrétion du cuivre.

Il existe différents chélateurs du cuivre possibles. Les deux principaux sont la D-pénicillamine et la 2,3,2-tetramine même si d'autres chélateurs existent.

i) La D-pénicillamine.

La D-pénicillamine chélate les métaux lourds et surtout ceux cationiques divalents (comme le cuivre, le fer) et favorise leur excrétion urinaire [20][41]. De plus elle possède une activité anti-inflammatoire et immunosuppressive, et elle inhibe la synthèse de collagène réduisant ainsi la fibrose lors de cirrhose. Il est recommandé d'administrer par voie orale aux chiens atteints 10 à 15mg/kg deux fois par jour, 20 à 30 minutes avant un repas [20].

L'amélioration clinique est lente à apparaître (de l'ordre de l'année) et on ne guérit jamais le chien. De plus cette molécule n'est pas intéressante chez les chiens gravement malades (atteint de nécrose hépatique aiguë) et ceux faisant une crise d'anémie hémolytique [19][42]. Une association avec de la vitamine B6 peut réduire les effets secondaires du traitement (vomissement, anorexie, nausée).

La réponse au traitement est évaluée par des visites tous les 4 à 6 mois, incluant des mesures du taux de cuivre plasmatique. Ceci permet de suivre la progression de la maladie, même si pour ce faire le suivi de la teneur hépatique en cuivre serait préférable (mais ce suivi nécessiterait alors une anesthésie et une technique invasive).

Les chiens peu à moyennement atteints répondent bien à ce traitement de soutien. Par contre le pronostic est mauvais pour les chiens gravement atteints ou pour ceux atteints de façon chronique.

ii) La 2,3,2-tetramine.[42]

Cette molécule agit aussi en chélatant le cuivre et en favorisant son excrétion urinaire notamment.

Dans une étude faite sur 5 chiens atteints [42], le 2,3,2-tetramine de tetrahydrochloride a permis de réduire la concentration hépatique en cuivre ainsi que les signes d'atteinte hépatique. Les concentrations hépatiques en fer et en zinc n'étaient pas modifiées par cette molécule et aucune toxicité ni intolérance n'ont été remarquées (mais l'effectif est un peu

restreint pour conclure quant à l'absence de toxicité). Par contre il a été noté une diminution de la concentration plasmatique en zinc. L'excrétion urinaire du cuivre semble augmenter quand on donne des doses de 2,3,2-tetramine plus importantes.

Il semble que cette molécule possède des avantages par rapport à la D-pénicillamine. Tout d'abord elle semble agir plus rapidement et pourrait ainsi être utilisée chez les chiens présentant une atteinte aiguë du foie. Ajoutés à cela, les effets secondaires de la D-pénicillamine n'ont pas été retrouvés et du fait de leur plus grande affinité pour le cuivre, ils ont moins d'effets indésirables dus à une action sur le zinc et le fer.

L'évaluation de la réponse au traitement doit se faire comme dans le cas de l'utilisation de la D-pénicillamine.

iii) Autres chélateurs du cuivre [19].

Le trientine dihydrochloride, le tétramine tétrahydrochloride et les « tetramine cupretic agents » sont à préférer aux deux chélateurs que nous avons détaillés ci dessus. Mais la plupart du temps ils sont moins disponibles que la D-pénicillamine et la 2,3,2-tétramine, et on utilise donc plus volontiers ces deux derniers.

Un chien atteint peut donc être traité mais il est préférable d'essayer de diminuer le nombre de chiens atteints en pratiquant une gestion au niveau de la race toute entière.

2) La gestion au niveau de la race.

Pour comprendre comment gérer une maladie à déterminisme autosomal récessif, il faut avoir à l'esprit les différentes possibilités de statut des chiots en fonction du statut des parents. (tableau V).

Statut des parents	mère	Homozygote sain (N/N)	Hétérozygote (N/m)	Homozygote malade (m/m)
père	Gamètes produits par les parents	N	N ou m	m
Homozygote sain (N/N)	N	**N/N**	**N/m ou N/N**	**N/m**
Hétérozygote (N/m)	N ou m	**N/m ou N/N**	**m/m** **N/m** **m/N** **N/N**	**m/m ou N/m**
Homozygote malade (m/m)	m	**N/m**	**m/m ou N/m**	**m/m**

Tableau V: Statut des chiots en fonction du statut des parents.

L'objectif de cette gestion est de réduire la prévalence de la mutation en raisonner les accouplements. La conduite est différente en fonction du caractère atteint ou porteur du chien.

a) Cas d'un chien atteint.

Si un éleveur possède un chien atteint, il vaudrait mieux qu'il l'écarte de la reproduction.

Il peut malgré tout vouloir le faire reproduire : ce peut être un chien avec des qualités exceptionnelles ou bien tout simplement un chien qui permettrait d'améliorer un caractère dans l'élevage. Il ne doit alors l'accoupler qu'avec un chien sain. Les chiots obtenus seront alors tous porteurs mais aucun ne sera atteint. Il faudra, bien entendu, ensuite gérer la mise à la reproduction de ces chiens porteurs.

b) *Cas d'un chien porteur.*

Prôner le retrait de la reproduction de tous les chiens porteurs serait une erreur. En effet si on le faisait on risquerait d'avoir des problèmes liés à une consanguinité trop importante dans la race.

Si l'éleveur possède des chiens porteurs, le mieux est de les faire reproduire avec des chiens sains. Car si on accouple un chien porteur avec un chien sain on obtiendra des chiots sains et des chiots porteurs (chaque chiot ayant alors 50% de chances d'être sain et 50% de chances d'être porteur) (tableau IV). Dans l'idéal il faudrait alors tester les chiots dès la naissance afin de déterminer leur statut.

L'accouplement de 2 chiens porteurs est à éviter puisque l'on risque d'obtenir des chiots atteints. Si vraiment c'est inévitable, alors il faudrait tester tous les chiots à la naissance pour éliminer ceux ayant le statut d'atteint.

IV) Synthèse

L'intoxication, fatale, au cuivre chez le Bedlington Terrier est une maladie génétique à déterminisme autosomal récessif qui ressemble par de nombreux aspects à la maladie de Wilson chez l'Homme. Elle provient d'une non excrétion du cuivre qui est alors stocké par l'organisme, en grande partie dans le foie. Cette accumulation du cuivre est responsable de dégâts tissulaires importants du fait de la toxicité du cuivre (notamment par son action dans la production de radicaux libres) : on observe ainsi des signes d'hépatite chronique et parfois d'anémie hémolytique ainsi que tout un cortège de symptômes non spécifiques. Ces signes cliniques apparaissent à l'âge adulte (vers 2 à 6 ans) alors que les chiens ont déjà été mis à la reproduction. La maladie est ainsi transmise de façon involontaire par les éleveurs et cela d'autant plus que le caractère récessif de l'intoxication est responsable de la présence de nombreux animaux porteurs, asymptomatiques.

Le traitement de l'intoxication est un traitement à vie qui passe par une alimentation spécifique et l'administration d'agents chélatant le cuivre. Il ne guérit pas et ne retarde efficacement les effets de l'accumulation du cuivre que s'il est commencé avant l'apparition de dégâts tissulaires important. L'éradication de cette maladie, au sein de la race, passe par un raisonnement des accouplements. Ceci n'est possible que si le statut des chiens (sain, porteur ou atteint) est déterminé avant leur mise à la reproduction.

L'utilisation de dosage du cuivre hépatique et des résultats d'histologie réalisée sur un morceau de foie prélevé par biopsie ont longtemps été les seuls moyens de diagnostiquer avec certitude les chiens atteints. Mais le portage ne peut pas être objectivé par ces méthodes.

Les études sur cette maladie ont montré l'existence d'un microsatellite dont l'allèle 2 ségrège avec la maladie dans la plupart des familles : ce microsatellite est donc utilisé comme marqueur de la maladie. Mais son utilisation nécessite une analyse familiale au préalable et n'exclut pas la possibilité d'un crossing over spontané faussant les résultats.

Des découvertes récentes ont montré que l'intoxication était due à la délétion de l'exon 2 dans le gène COMMD1, gène dont la protéine intervient dans le mécanisme d'excrétion du cuivre. Des test diagnostiques ciblant cette délétion voient progressivement le jour dans différents pays, mais n'existent pas encore en France.

Une modération a toutefois été apporté à l'engouement qui a suivi la découverte de cette délétion : certains chiens atteints ne présentent pas cette délétion (mais ils ne constituent qu'une petite minorité des individus atteints). Les recherches sur ce sujet continuent donc.

2ème partie : Etude expérimentale : mise au point d'un test diagnostique moléculaire.

Objectifs de l'étude expérimentale.

L'intoxication au cuivre du Bedlington Terrier, maladie très étudiée à cause de sa ressemblance avec la maladie de Wilson, possède un déterminisme génétique, autosomal récessif. Une étiologie majeure de cette affection est la délétion de l'exon 2 au sein du gène COMMD1.

Les éleveurs portent un vif intérêt dans l'élaboration d'un test PCR permettant de diagnostiquer l'intoxication au cuivre chez le Bedlington Terrier. En effet, c'est une maladie très répandue dans cette race du fait de l'apparition tardive des symptômes chez les animaux atteints, de l'asymptomatologie des animaux porteurs et du manque de test pour déterminer avec certitude le statut d'un chien vis à vis de cette maladie.

Cette deuxième partie détaille la mise au point d'un test, recherchant la délétion de l'exon 2 dans le gène COMMD1, au sein du Laboratoire Vétérinaire Départemental du Rhône (LVD 69). Nous avons pour cela utilisé successivement trois stratégies PCR différentes.

Pour les deux premières stratégies, les deux séquences ciblées sont localisées respectivement dans les exons 2 et 3. L'objectif est de comparer les quantités d'ADN de ces deux séquences, la séquence de l'exon 3 servant de référence :

- Chez un chien homozygote malade l'exon 2 est absent. Seule la séquence dans l'exon 3 pourra être amplifiée.
- Un chien homozygote sain présentera deux copies de l'exon 2 et deux copies de l'exon 3. Les quantités d'ADN amplifiées seront les mêmes pour les deux séquences ciblées.
- Chez un chien hétérozygote, une seule copie de l'exon 2 est présente. La comparaison des quantités d'ADN révélera donc une double dose d'exon 3 contre une simple dose d'exon 2.

Dans la première stratégie, cet objectif est atteint en utilisant une PCR point final (sur gel) et une évaluation semi-quantitative (à l'œil nu) des intensités des signaux lumineux des exons 2 et 3. Lors de la deuxième stratégie, l'amplification et la lecture des quantités d'ADN se déroulent dans un automate, une PCR quantitative étant réalisée.

L'objectif de la troisième stratégie diffère et les séquences ciblées sont différentes. La séquence dans l'exon 2 est toujours recherchée mais pas celle dans l'exon 3. On recherche à la place une séquence qui n'est présente que lorsque la délétion a eu lieu : cette dernière rapproche les deux séquences complémentaires des amorces choisies et permet l'amplification d'un segment court (quand l'exon 2 existe, le segment entre ces deux séquences est trop long pour être amplifié). Cet objectif ne nécessitant pas de comparaison d'intensité de signaux, elle est réalisée en PCR point final.

Mon travail a consisté à prendre contact avec des éleveurs de Bedlington Terriers pour obtenir des prélèvements contenant de l'ADN provenant de leurs chiens et collecter des informations sur le statut de ces animaux, afin de constituer une banque d'échantillons utilisables pour la mise au point du test. J'ai également défini des amorces utilisables pour ce test et participé à la réalisation d'un certain nombre de PCR et à la réflexion ayant accompagné la conception de ce test (à partir des résultats que nous obtenions).

I) Matériel et méthodes.

A) Matériel

1) Matériel biologique

Les échantillons proviennent de 15 chiens, dont deux ont déclaré la maladie (Tableau V). Les 13 Bedlington Terriers appartiennent à 3 familles ayant en leur sein des animaux atteints. Leurs liens de parenté sont présentés dans la figure 17. Un Epagneul Breton sert de témoin positif sain : cette race n'est pas atteinte par l'intoxication au cuivre. Un Labrador (sain lui aussi car dans cette race la mutation n'est pas rapportée) est utilisé pour les essais à partir de cytobrosse. Les caractéristiques des différents chiens sont présentées dans le Tableau VI.

Animal	race	Sexe (M= male; F= femelle)	Statut déterminé (*ou déduit de la généalogie*) pour le microsatellite C04107	maladie déclarée ou *(statut déduit de la généalogie)*	Type de prélèvement effectué
CN 1	Bedlington Terrier	F		*Porteur ou atteint*	sang
CN 2	Bedlington Terrier	F			sang
CN 3	Bedlington Terrier	M		atteint	sang
CN4	Bedlington Terrier	F	1/2		sang
CN 5	Bedlington Terrier	M		*(Porteur ou atteint)*	sang
CN 6	Bedlington Terrier	M		*(Porteur ou atteint)*	sang
CN 7	Bedlington Terrier	F	1/1		sang
CN 8	Bedlington Terrier	F	*(1/2)*		sang
CN 9	Bedlington Terrier	F	1/2	*(Porteur ou atteint)*	sang
CN 10	Bedlington Terrier	M	1/2		sang
CN 11	Bedlington Terrier	M	2/2	atteint	sang
CN 12	Bedlington Terrier	M	1/2		sang
CN 13	Bedlington Terrier	M	1/1		sang
CN 14	Epagneul Breton	M			sang
CN 15	Labrador	F			Cellules buccales

Tableau VI : Caractéristiques des chiens utilisés dans l'expérimentation: race, sexe, statut génétique et prélèvements effectués.

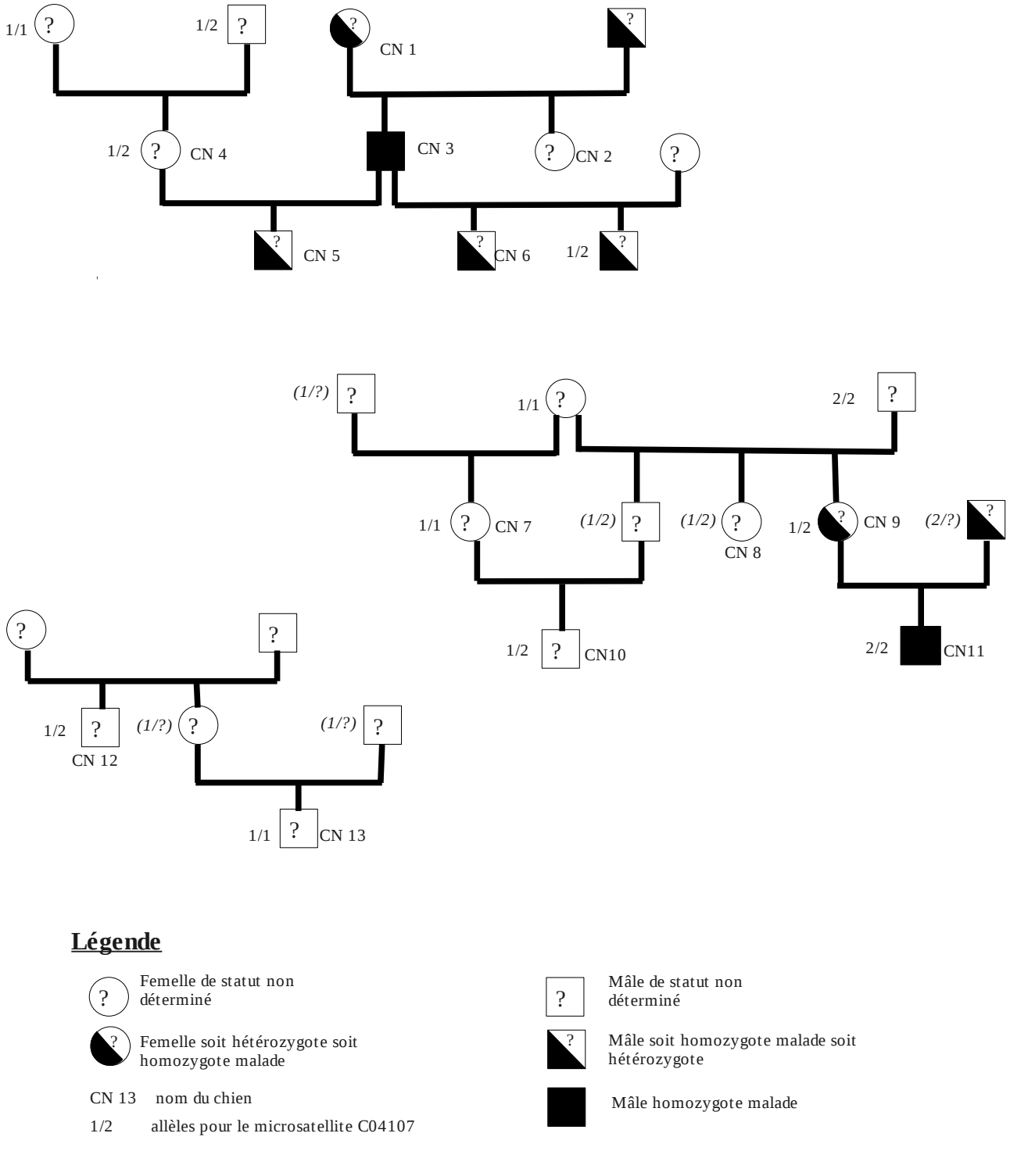


Figure 17 : Généalogie des 3 familles auxquelles appartiennent les chiens présents dans l'expérimentation.

2) Amorces

a) *Pour la PCR point final ciblant les exons 2 et 3*

Les amorces ciblant l'exon 2 sont les amorces sens CT1s1 et CT2s1 et les amorces antisens CT1as2 et CT2as2. Elles sont présentées sur la figure 18. Elles permettent de former quatre couples différents dont la longueur des produits amplifiés est présentée dans le tableau VII.

Pour cibler l'exon 3 le couple d'amorce EX3s1-EX3as2 est utilisé (figure 18 et tableau VI). La séquence de chacune de ces amorces est confidentielle.

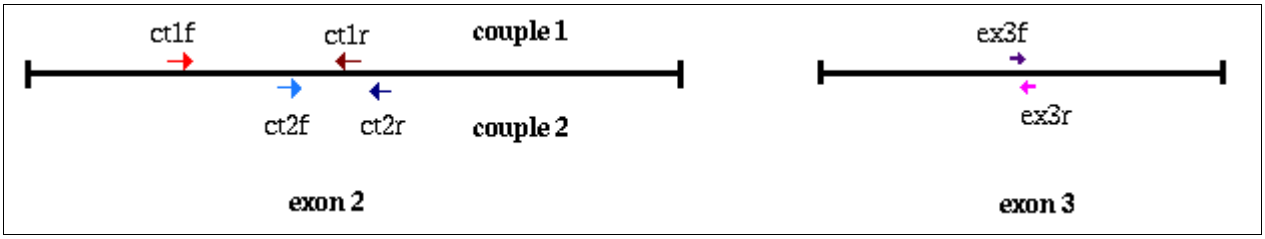


Figure 18 : Localisation sur le gène COMMD1 des amorces utilisées dans la PCR point final ciblant l'exon 2 et l'exon 3.

Amorce sens	Amorce antisens	Longueur du fragment amplifié en paire de bases.
CT1s1	CT1as2	956
CT2s1	CT2as2	553
CT1s1	CT2as2	1106
CT2s1	CT1as2	403
EX3s1	EX3as2	107
INTs1	INTas2	804

Tableau VII : Les différents couples d'amorces utilisés et la taille respective des séquences amplifiées.

b) *Pour la PCR point final ciblant la présence ou l'absence de l'exon 2*

Le couple d'amorces CT2s1-CT1as2 est utilisé pour mettre en évidence la présence de l'exon 2. Le couple INTs1-INTs2 permet de montrer l'absence de l'exon 2 car ces amorces se fixent chacune en bordure de la zone délétée (figure 19). La séquence de chaque amorce est confidentielle

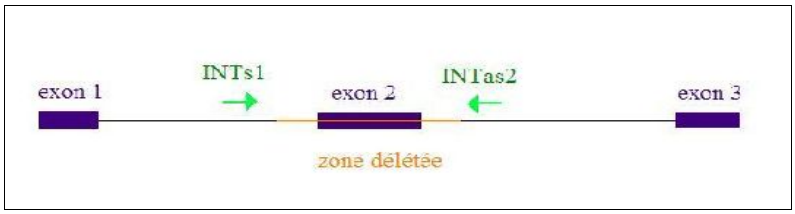


Figure 19 : Localisation du couple d'amorces INTs1-INTas2 sur le gène COMMD1

c) *Pour la PCR temps réel*

Les couples d'amorces CT2s1-CT1as2 et EX3s1-EX3as2 permettent respectivement d'amplifier les exons 2 et 3.

3) Réactifs

Les réactifs utilisés pour les extractions, les amplifications et les révélations sont présentés en annexe 1.

4) Thermocycleurs

a) *Pour les PCR point final ciblant les exons 2 et 3*

Les thermocycleurs utilisés sont les suivant :

- Primus Thermocycleur (modèle Primus 25) du fabricant Avison
- Thermocycleur Primus 96/25 de la société MWG SA BIOTECH
- Thermocycleur Gene Amp PCR System 970 du fabricant Applied biosystems

b) *Pour les PCR point final ciblant la présence ou l'absence de l'exon 2*

Les thermocycleurs utilisés sont les suivant :

- Thermmocycleur Primus 96 du fabricant Avison
- Thermocycleur Primus 96/25 de la société MWG SA BIOTECH

c) *Pour les PCR temps réel*

Les réactions ont toutes eu lieu dans l'appareil Light Cycler 2.0 de chez Roche.

B) Méthodes

1) Prélèvements

a) *Prélèvements sanguins*

Les prélèvements sanguins sont réalisés sur tubes EDTA soit directement au LVD 69, soit chez le vétérinaire traitant de l'animal. Dans ce cas, les tubes contenant le sang sont acheminés au LVD 69 par courrier, à température ambiante.

b) *Prélèvement de cellules buccales*

Le prélèvement est effectué grâce à une cytobrosse : c'est un brosse stérile au bout d'un manche (figure 20). La cytobrosse est insérée entre la gencive et la babine supérieures. La brosse y est maintenue 20 secondes pendant lesquelles le préleveur frotte la gencive supérieure et la babine. Une fois retirée la brosse est mise dans un tube sec et le tube est refermé. L'ensemble est alors envoyé par courrier au LVD 69.

Figure 20 : Photographie d'une cytobrosse utilisée pour réaliser un prélèvement de cellules buccales [58].

2) Définition des amorces

La séquence du gène *COMMD1* se trouve sur le site internet du National Center for Biotechnology Information (NCBI) [53]. Le logiciel Amplify® a été utilisé pour faire des simulations de PCR. Les amorces trouvées dans la bibliographie ont été testées avec ce logiciel; les simulations ont révélé la présence de nombreuses bandes non spécifiques. C'est pourquoi

nous avons défini nos propres amorces. La réalisation de ce travail sur ce logiciel m'a demandée beaucoup de temps du fait de la grande longueur du gène (173 321 nucléotides) et de la longueur maximale que prend en compte le logiciel (20 000 nucléotides). J'ai donc divisé le gène en 9 portions et fait des simulations de PCR avec chaque couple d'amorces sur chacune de ces portions. L'étape d'après fut de vérifier l'absence d'amplification non spécifique aux jonctions entre les 9 portions du gène.

Ainsi, pour la stratégie 1 (comparaison des produits d'amplification d'une PCR point final ciblant les exons 2 et 3), un couple d'amorce fut défini pour cibler l'exon 3 et servir de contrôle interne : EX3s1-EX3as2. Quatre amorces (deux sens et deux anti-sens) furent définies pour cibler l'exon 2 : CT1s1, CT2s1, CT1as2, CT2as2.

Pour la stratégie 2 (Q-PCR), le couple ciblant l'exon 3 et le couple CT2s1-CT1as2 ciblant l'exon 2 furent utilisés.

Pour la dernière stratégie, le couple CT2s1-CT1as2 ciblant l'exon 2 fut employé. Un autre couple d'amorces fut défini : INTs1-INTas2. Ces amorces se situent de part et d'autre de la délétion et ne permettent d'amplifier une séquence que lorsque la délétion est présente (si l'exon 2 existe, alors la séquence que les amorces ciblent est trop grande pour être amplifiée).

3) Extractions

a) A partir d'échantillons de sang

Le protocole du kit d'extraction d'ADN Nucleospin® Blood Quick Pur de chez Macherey-Nagel est donné en annexe 2. Il comprend une première étape de lyse des cellules, suivie d'une adsorption de l'ADN sur une colonne. Un lavage de la colonne et une élution permettent de recueillir cet ADN.

Les extraits sont ensuite conservés à -20°C le temps voulu.

b) A partir d'écouvillons buccaux

Le protocole du kit d'extraction d'ADN NucleoSpin Tissue XS de chez Macherey-Nagel est donné en annexe 2. Il comprend une première étape de prélyse des cellules, suivie d'une étape de lyse. Ensuite on réalise une adsorption de l'ADN sur une colonne. Un lavage de la colonne et une élution permettent de recueillir cet ADN.

Les extraits sont ensuite conservés à -20°C le temps voulu.

c) A partir de gels d'agarose

Pour mettre au point la PCR quantitative (Q-PCR), la réalisation de gammes de dilution correspondant aux séquences ADN des exons 2 et 3 a été nécessaire. Ces séquences ont donc été amplifiées pour en obtenir une quantité suffisante. Après amplification, une électrophorèse fut réalisée pour séparer les deux séquences. Le kit d'extraction NucleoSpin Extract II de chez Macherey-Nagel fut ensuite utilisé pour extraire les ADN correspondants à partir du gel d'électrophorèse.

Le protocole du kit est présenté en annexe 2. Il comporte une première étape de préparation de l'échantillon par prélèvement depuis le gel et lyse. Puis l'ADN est adsorbé à une colonne qui est ensuite lavée. Pour finir une élution permet de recueillir l'ADN purifié.

4) Préparation du mélange de réactifs pour l'amplification.

a) Pour les PCR point final

Pour préparer le mélange pour un volume de 29µL nous avons utilisé :

- 3µL de tampon 10X (concentration finale de 1X)
- 0,6µL de dNTP à 10mM (concentration finale de 200µM)
- 0,9µL de Taq à 1u/µL (concentration finale de 0,03u/µL)
- qsp 29µL d'H_2O
- une solution de $MgCl_2$ à 25mM à raison de :

- ✗ 1,2µL pour obtenir une concentration finale de 1mM
- ✗ 1,8µL pour obtenir une concentration finale de 1,5mM
- ✗ 2,4µL pour obtenir une concentration finale de 2mM

Les concentrations en $MgCl_2$ selon la PCR sont présentées dans le tableau en annexe 3.

- des amorces à partir d'une solution initiale de concentration 10µM pour arriver aux concentrations finales ci-dessous (présentées en fonction de la PCR dans le tableau en annexe 3).
  - ✗ 1,2µL pour obtenir une concentration finale de O,4µM
  - ✗ 0,9µL pour obtenir une concentration finale de O,3µM
  - ✗ 0,6µL pour obtenir une concentration finale de O,2µM
  - ✗ 0,3µL pour obtenir une concentration finale de O,1µM

A ce mélange on ajoute 1µL d'extrait d'ADN (ou d'H_2O pour le témoin négatif), la provenance de l'échantillon étant indiquée dans le tableau en annexe 3.

a) *Pour les PCR temps réel*

Pour préparer le mélange pour un volume de 15µL nous avons utilisé :

- 4µL du mélange de réactifs pour une concentration finale de 1X
- 9µL d'H_2O
- des amorces à raison de 1µL de chaque amorce à 10µM mise dans le capillaire (soit une concentration finale de 0,5µM pour chacune). L'annexe 4 présente quelles amorces furent utilisées lors de chaque Q-PCR.

A ce mélange on ajoute 5µL d'extrait d'ADN (ou d'H_2O pour le témoin négatif), la provenance de l'échantillon étant indiquée dans le tableau en annexe 4.

1) Amplification

a) *Programmes pour les PCR point final*

Pour chaque PCR le programme était le suivant

- 3 min à 94°C
- *1 min à 94°C*
- *1 min à la température d'hybridation voulue*
- *1 min 72°C*
- 10 min à 72°C
- conservation des tubes à 8°C

40 cycles

Le tableau en annexe 3 présente de façon détaillée les différentes températures pour les différentes PCR point final. Ces températures ont varié entre 52 et 61°C.

b) *Cas des PCR temps réel*

Pour chaque PCR le programme était le suivant

- 10 min à 95°C
- *10 s à 95°C*
- *10 s à 56°C*
- *11 s à 72°C*
- 15 s à 65°C
- 30 s à 40°C

45 cycles

1) Analyse des produits amplifiés.

a) *Cas des PCR point final*

Des électrophorèses sur gel d'agarose sont réalisées (une pour chaque PCR) en appliquant 100V pendant environ 40 minutes à un gel d'agarose à 1,5 %. Ce gel contient du bromure d'éthidium à la concentration de 0,5µg/L et un tampon de migration (Tris-borate-EDTA à 0,5µg/L

et bromure d'éthidium à 0,5µg/L). La fixation du bromure d'éthidium aux nucléotides est visible sous lumière ultra-violette. Une photographie du gel éclairé par cette lumière ultra-violette est prise.

b) Cas des PCR temps réel

Pour analyser les résultats des PCR temps réel nous avons utilisé le LightCycleur software version 4.05 de chez Roche qui donne notamment les résultats sous forme de courbes et de tableaux.

II) Résultats

A) Stratégie 1

Dans la stratégie 1, deux séquences dans les exons 2 et 3 sont amplifiées afin de comparer leur intensité lumineuse. La comparaison se fait à l'œil nu, après une PCR point final et une électrophorèse sur gel d'agarose.

1) PCR sur échantillons sanguins.

a) PCR simplex ciblant l'exon 2.

Ces PCR sont réalisées à partir de sang du chien CN 14 : ce n'est pas un Bedlington Terrier, il est donc sain vis à vis de la mutation et présente 2 copies de l'exon 2.

i) PCR utilisant le couple CT2s1-CT2as2.

La figure 21 présente les résultats de la PCR 1, pour laquelle la température varie de 52 à 55°C et la concentration en $MgCl_2$ vaut 1, 1,5 ou 2 mM. Le produit d'amplification attendu de 553pb est bien visible avec un signal intense, à toutes les températures et à toutes les concentrations en $MgCl_2$. Plusieurs bandes non spécifiques sont présentes pour [$MgCl_2$]=1,5 et 2 mM. On observe une seule bande non spécifique pour [$MgCl_2$]=1mM. L'intensité de ces bandes non spécifiques diminue avec l'augmentation de la température.

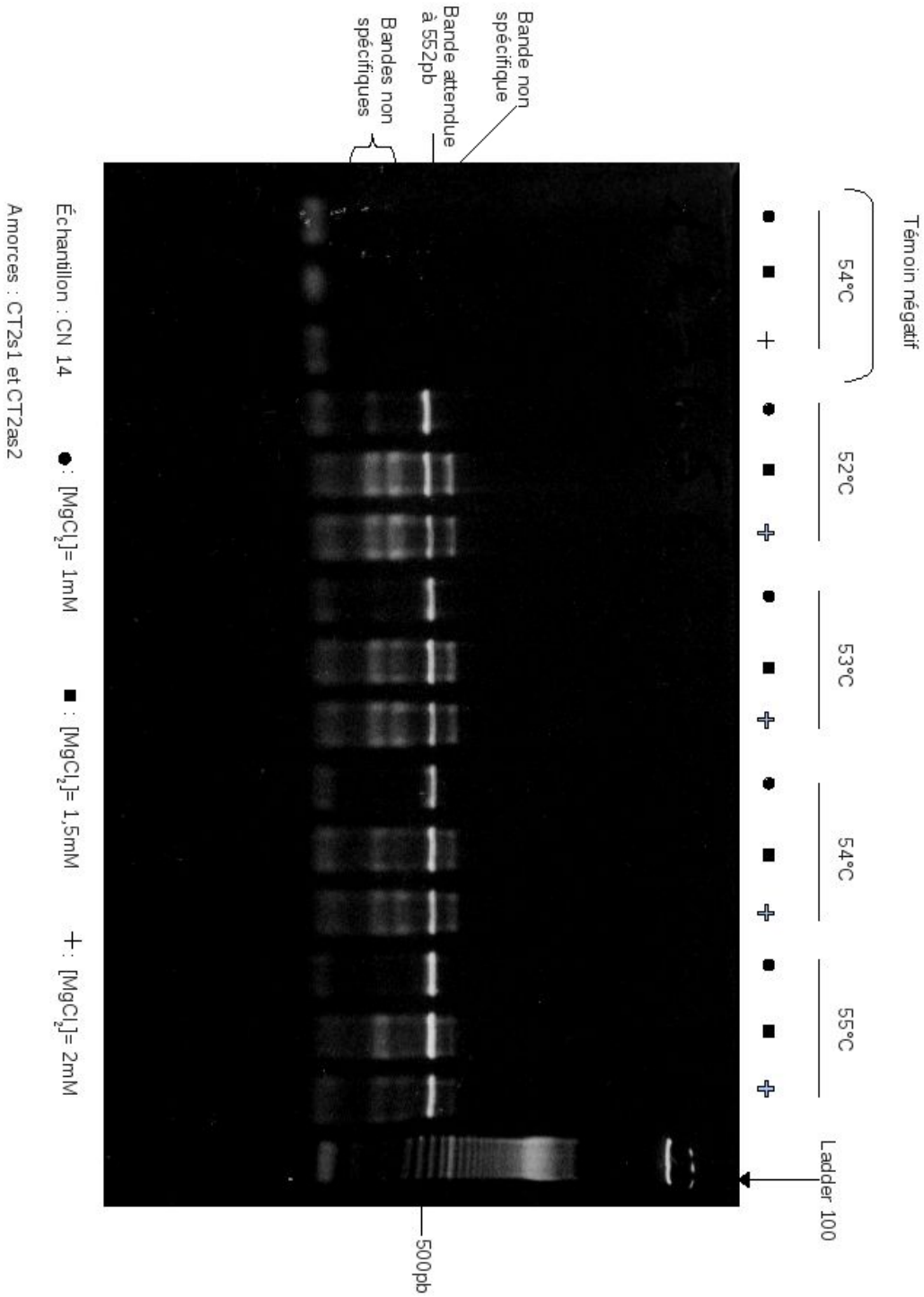


Figure 21 : Résultats de la PCR 1.

Les températures plus élevées (56 et 57°C) de la PCR 2 (non illustrées ici) ont légèrement diminué l'intensité des bandes non spécifiques sans les éteindre complètement.

ii) PCR utilisant le couple CT1s1-CT1as2

Les résultats de la PCR 3, non montrés ici, présentent un grand nombre de bandes non spécifiques quelle que soit la température employée. Les signaux sont, dans l'ensemble, plus faibles pour $[MgCl_2]$=1mM que pour $[MgCl_2]$=1,5mM.

iii) PCR utilisant le couple CT1s1-CT2as2

Les résultats de la PCR 4, pour laquelle la température varie de 55 à 58°C et [$MgCl_2$]=1 ou 1,5mM, ne sont pas illustrés ici. Le produit d'amplification attendu de 1106pb n'est pas visible à chaque fois et de nombreuses bandes non spécifiques sont observables.

iv) PCR utilisant le couple CT2s1-CT1as2

La figure 22 présente les résultats de la PCR 5 pour laquelle la température varie entre 55 et 59°C et la concentration en $MgCl_2$ vaut soit 1 soit 1,5 Mm. Le produit d'amplification attendu de 403pb est bien visible (très intense) dans toutes les conditions. Une bande non spécifique, d'environ 330pb, est observée à 55°C pour [$MgCl_2$]=1 et 1,5mM et à 56°C pour [$MgCl_2$]=1,5mM. Son intensité est faible. Elle disparaît complètement aux températures plus élevées.

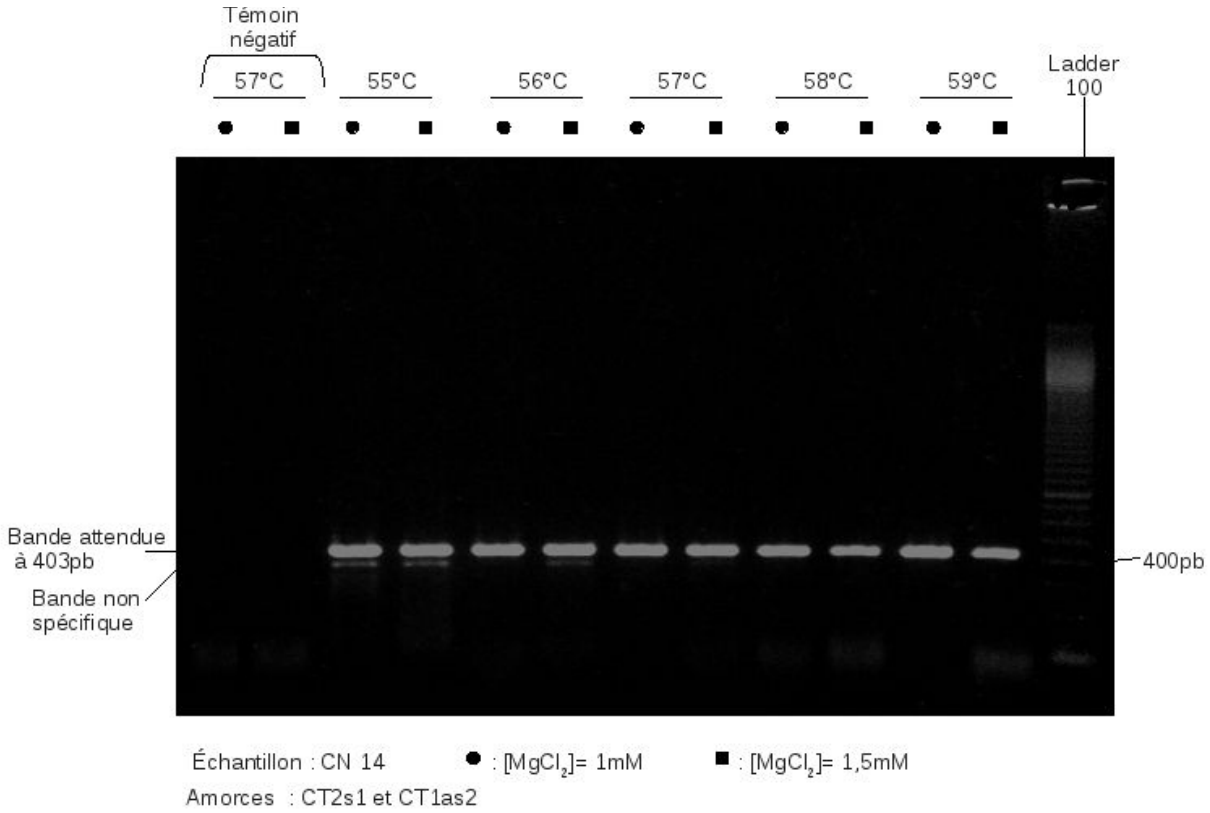


Figure 22: Résultats de la PCR 5.

Le couple CT2s1-CT1as2 est le couple d'amorces retenu pour l'amplification de l'exon 2.

b) PCR simplex ciblant l'exon 3.

La PCR 6 est réalisée à partir de sang du chien CN 14. Les températures s'échelonnent entre 53 et 57 °C et la concentration en $MgCl_2$ vaut 1, 1,5 ou 2 mM. La figure 23 en présente les résultats pour les températures de 53 à 56°C. Le produit d'amplification attendu de 107pb est visible à chaque fois. Le signal est intense pour [$MgCl_2$]=1mM et très intense pour [$MgCl_2$]=1,5 et 2mM. Des bandes non spécifiques de très faible intensité sont observées à 53 et 54°C pour [$MgCl_2$]=1,5mM ainsi qu'à 53, 54, 55 et 56°C pour [$MgCl_2$]=2mM. Ces bandes non spécifiques diminuent d'intensité et s'éteignent avec l'augmentation de la température.

Le profil obtenu à 57°C (résultats non illustrés) est identique à celui visible à 56°C.

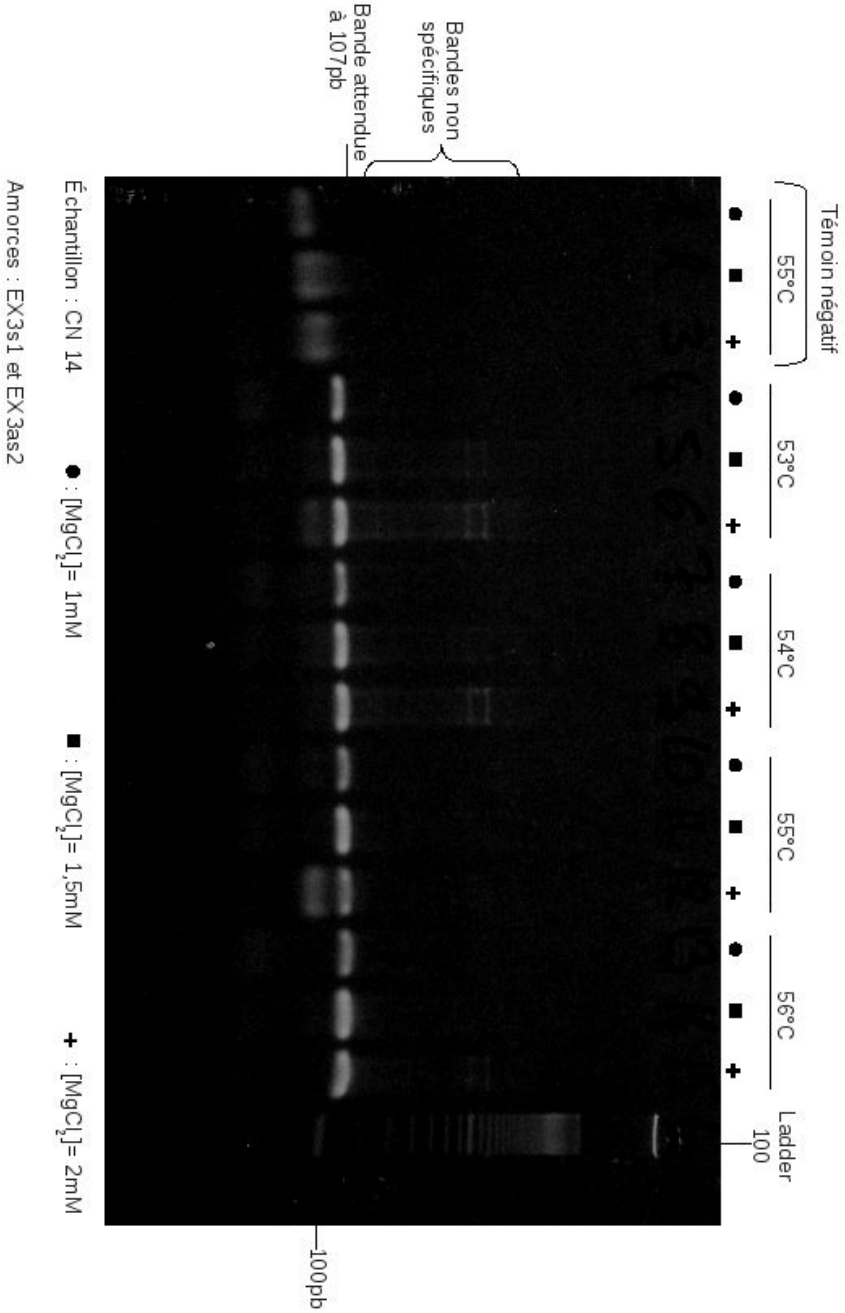


Figure 23 : Résultat de la PCR 6.

c) PCR duplex.

Les couples d'amorces CT2s1-CT1as2 et EX3s1-EX3as2 sont employés. Différentes PCR sont réalisées en faisant varier les concentrations en amorces, les concentrations en $MgCl_2$ et la température.

i) Concentrations d'amorces identiques pour les deux couples.

✗ *0,4µM*

Lors de la PCR 7, chaque amorce était présente à la concentration de 0,4mM. Les résultats, non illustrés ici, montrent de nombreuses bandes non spécifiques en plus des signaux attendus.

✗ *0,3µM*

Pour la PCR 8, les échantillons des chiens CN 14 et CN 4 sont utilisés, CN 14 étant homozygote sain (avec donc 2 copies de l'exon 2) et CN 4 étant hétérozygote (avec donc une seule copie de l'exon 2). La figure 24 présente les résultats de cette PCR, pour laquelle chaque amorce est présente à la concentration de 0,3µM, les températures sont échelonnées entre 56 et 58°C, et $[MgCl_2]$=1 ou 1,5mM.

On peut y voir un signal intense à 107pb pour l'exon 3 et un signal de moyenne intensité à 403pb pour l'exon 2. Le signal pour l'exon 2 chez l'hétérozygote est un plus faible que celui pour l'homozygote sain. Des bandes non spécifiques sont présentes quelle que soit la température pour $[MgCl_2]$=1,5mM.

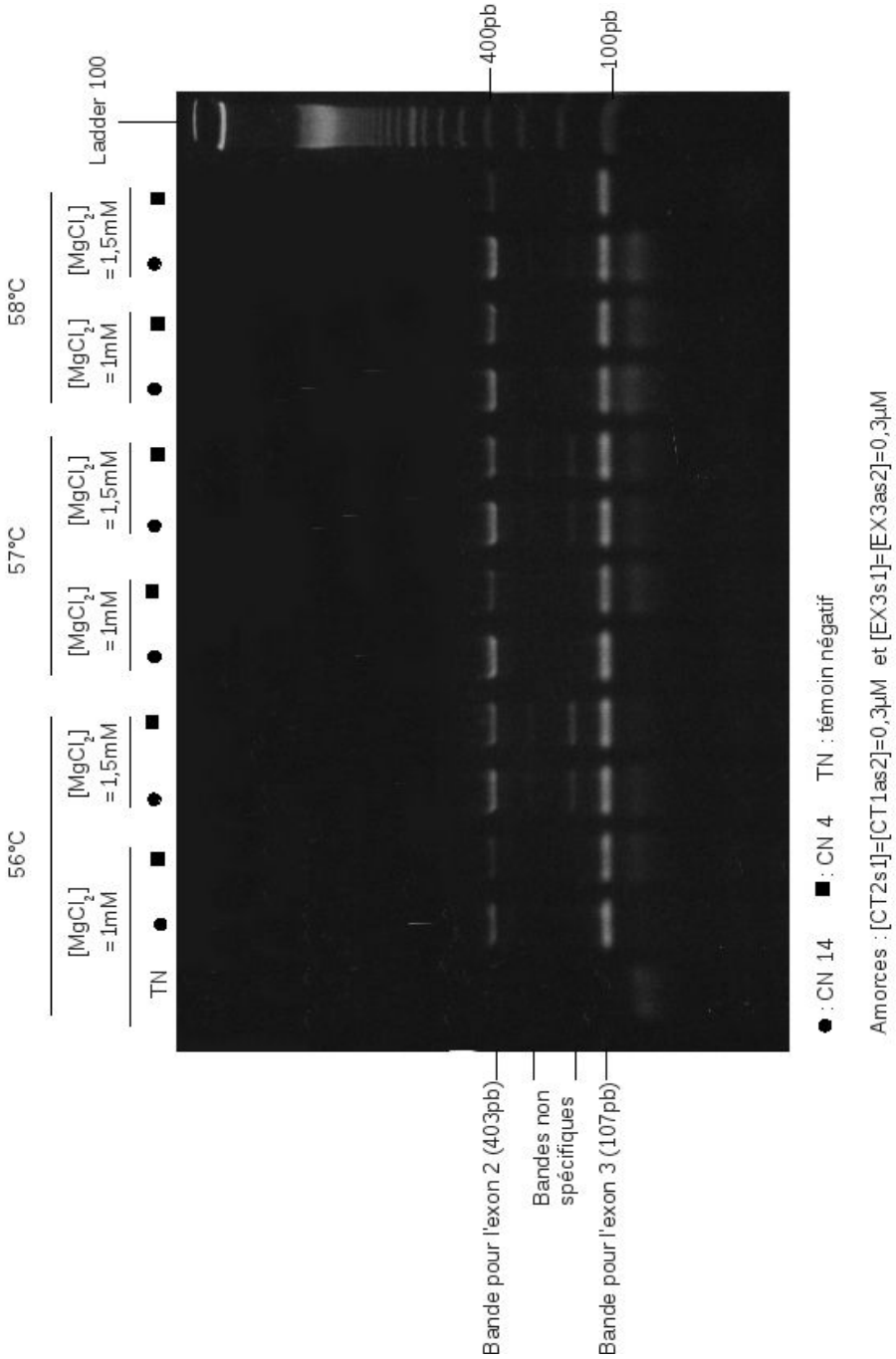


Figure 24 : Résultats de la PCR 8.

Des résultats identiques, non illustrés ici, sont obtenus pour la PCR 9 (mêmes conditions de

réalisation).

Lors de la PCR 10 ([$MgCl_2$]=1mM, 57°C), les échantillons de certains chiens de la famille 1 sont utilisés, dont notamment celui du chien CN 3, malade. Les résultats ne sont pas présentés ici. Le signal pour l'exon 3 est très intense. Celui pour l'exon 2 est absent chez CN 3, faible à très faible chez les autres chiens.

ii) Concentration en amorces plus élevée pour le couple ciblant l'exon 2 que pour celui ciblant l'exon 3.

✗ *0,3µM / 0,2µM.*

La figure 25 présente les résultats de la PCR 11 qui est réalisée sur les échantillons des chiens CN 14 (homozygote sain), CN 3 (homozygote malade) et CN 4 (hétérozygote), avec des températures de 56, 57 et 58°C et pour [$MgCl_2$]=1mM. Quelle que soit la température, le signal de l'exon 3 est intense. Celui de l'exon 2 est faible pour CN 4 et moyen pour CN 14. Il est absent pour CN 3. On remarque une bande non spécifique, d'environ 330pb d'intensité très très faible quand le signal de l'exon 2 est visible.

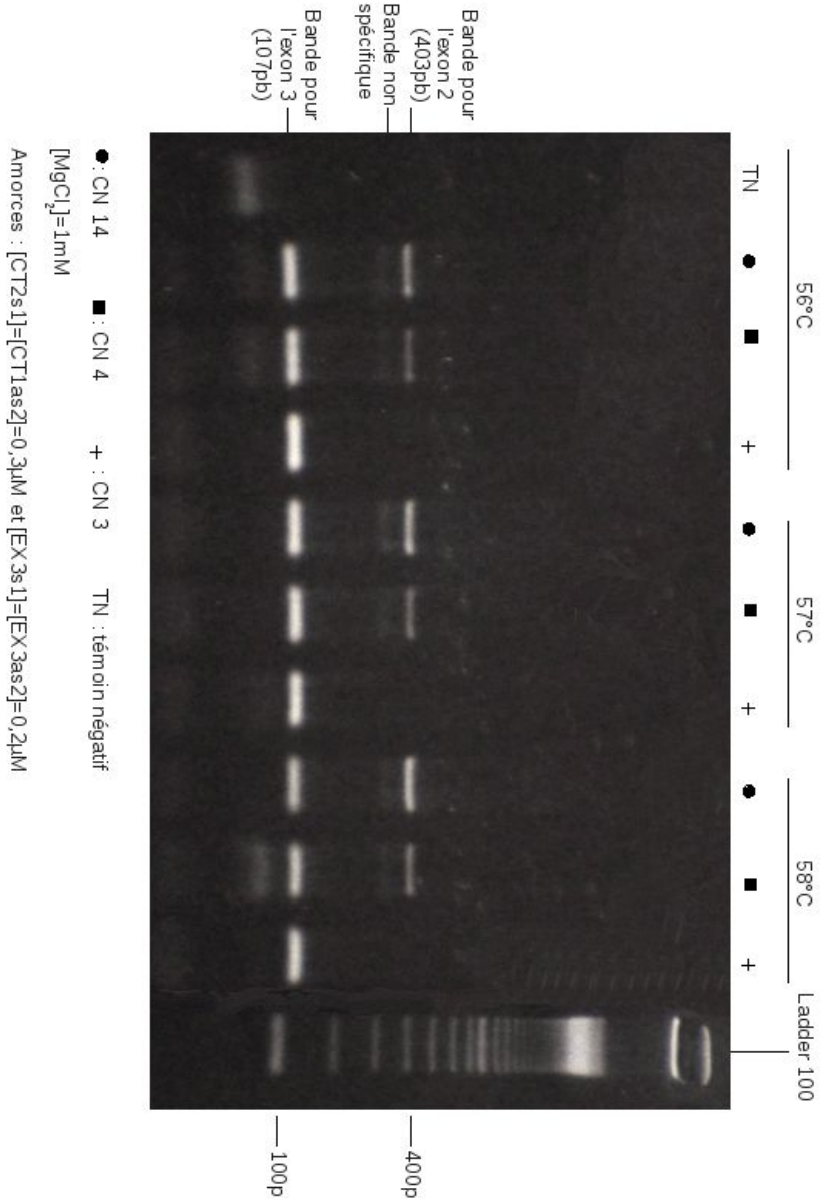


Figure 25 : Résultats de la PCR 11.

✗ *0,4µM / 0,2µM*

La figure 26 présente la première partie des résultats de la PCR 12. Celle-ci est réalisée sur les mêmes échantillons que la PCR 11, avec des températures de 56, 57 et 58 °C et pour [$MgCl_2$]=1mM. Le signal de l'exon 3 est intense. Celui de l'exon 2 est faible à très faible. Le signal pour l'exon 2 est à chaque fois plus faible chez l'hétérozygote par rapport à l'homozygote sain. Il est absent chez l'homozygote malade. On remarque une bande non spécifique, d'environ 330pb d'intensité très très faible quand le signal de l'exon 2 est visible.

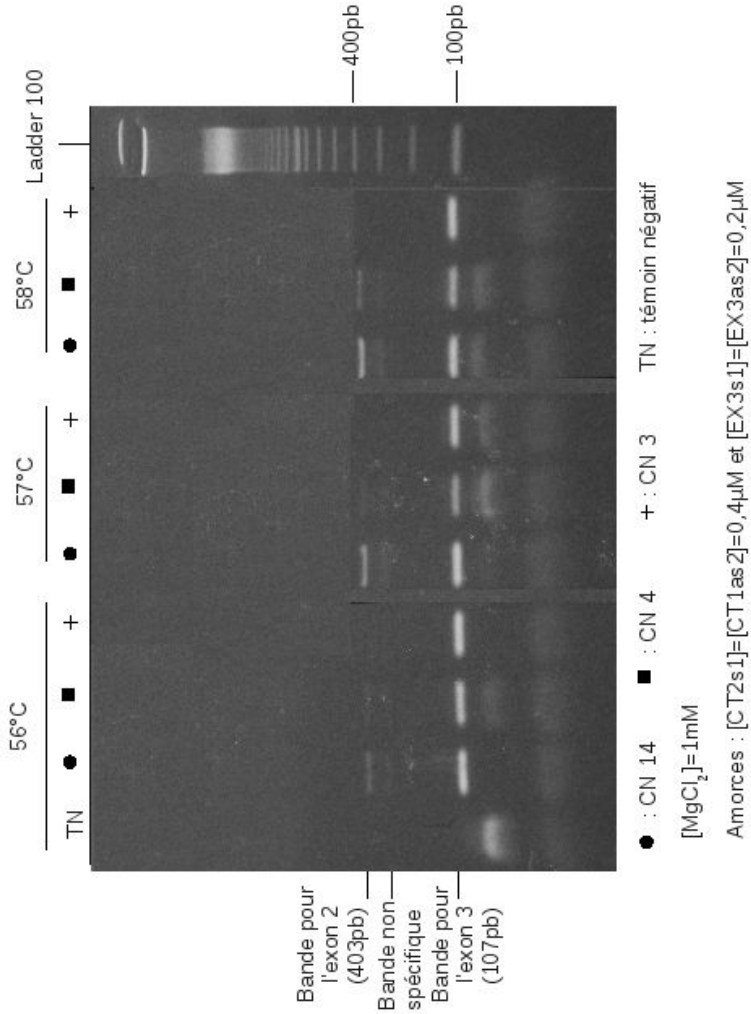


Figure 26 : Première partie des résultats de la PCR 12.

✗ *0,3µM / 0,1µM.*

La figure 27 présente la deuxième partie des résultats de la PCR 12. On peut voir que le signal de l'exon 3 est intense et que le signal de l'exon 2 est moyen à faible. Ce dernier est plus faible à 56 et 57°C chez l'hétérozygote par rapport à l'homozygote sain. Cette différence d'intensité du signal est moins marquée à 58°C. L'homozygote malade ne présente pas de signal pour l'exon 2 quelle que soit la température. La bande non spécifique d'environ 330pb est observable, d'intensité très très faible.

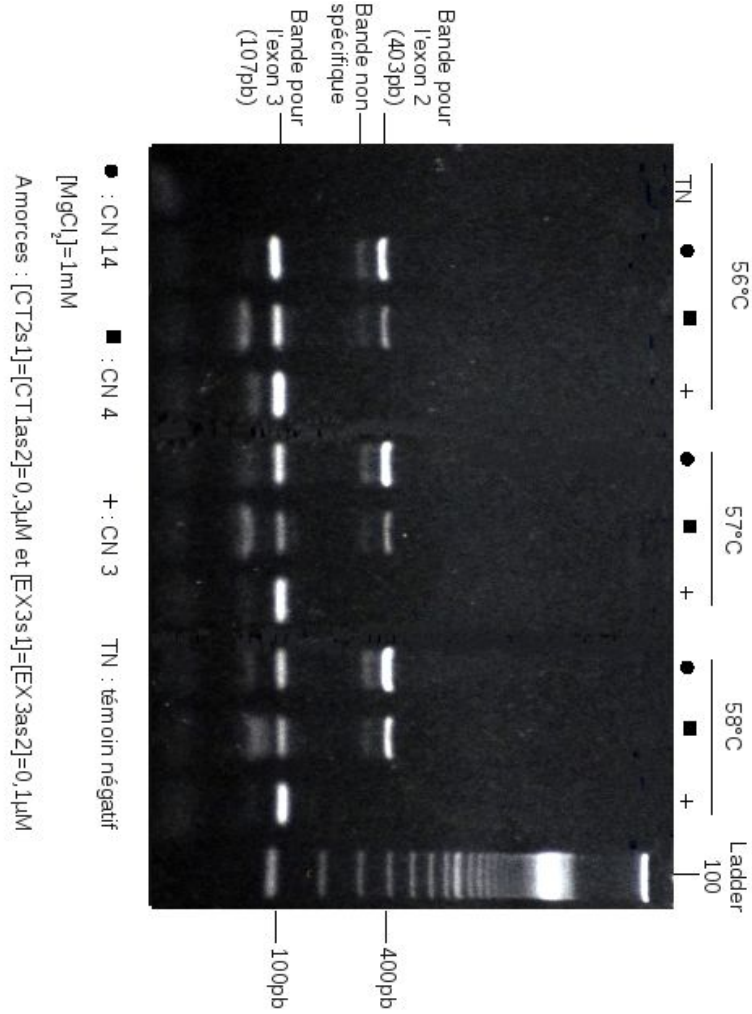


Figure 27 : Deuxième partie des résultats de la PCR 12.

iii) La PCR duplex réalisée sur l'ensemble des Bedlington Terriers.

Les conditions retenues pour la PCR duplex de la stratégie 1 sont 56°C, [$MgCl_2$]=1, [CT2s1]=[CT1as2]=0,3mM et [EX3s1]=[EXas2]=0,1mM. Lors de la PCR 13 tous les échantillons provenant de Bedlington Terriers sont soumis à ces conditions. Les résultats sont présentés sur la figure 28. On peut y remarquer une bande non spécifique d'intensité très très faible d'environ 330pb, présente quand le signal de l'exon 2 est présent. Le signal de l'exon 3 est intense. Le signal de l'exon 2 est intense pour CN 14, moyen pour CN 1, CN 2, CN 4, CN 5, CN 6, CN 7, CN 12, et faible pour CN 8, CN 9, CN 10, CN 13. Il est absent pour CN 3 et CN 8.

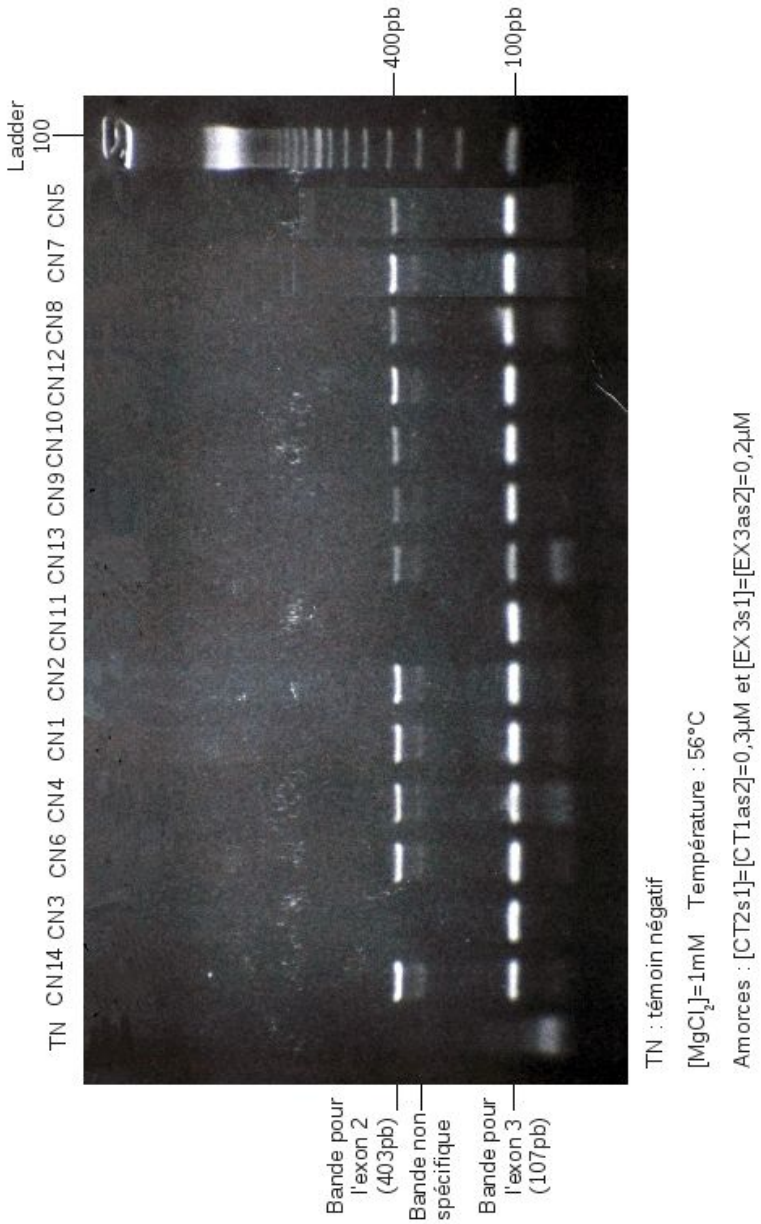


Figure 28: Résultats de la PCR 13.

2) PCR à partir d'écouvillons buccaux

Dans la PCR 14, les résultats obtenus à partir d'un échantillon d'ADN extrait de cellules buccales sont comparés à ceux obtenus à partir d'un échantillon sanguin, pour $[MgCl_2]$=1mM et une température de 56°C. Les deux échantillons proviennent de chiens n'appartenant pas à la race de Bedlington Terriers. La figure 29 présente les résultats. On voit, pour les deux échantillons, un signal intense pour les exons 2 et 3.

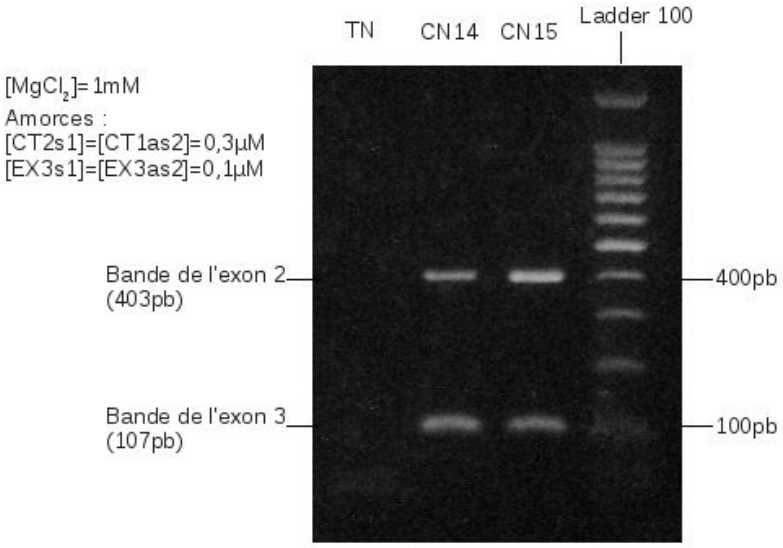


Figure 29 : Résultat de la PCR 14.

B) Stratégie 2.

Dans la stratégie 2, l'objectif est le même que dans la stratégie 1, mais la comparaison est faite par un automate lors d'une PCR quantitative.

1) Amplification des exons 2 et 3.

Les PCR 15 et 16 servent à amplifier respectivement les exons 3 et 2. Après migration par électrophorèse, les signaux obtenus sont intenses. Les gammes nécessaires à la réalisation des PCR quantitatives (ou Q-PCR) sont ensuite réalisées à partir de l'ADN extrait des gels.

2) Gammes de dilutions.

Chaque dilution est présente en trois fois lors de la réalisation des gammes de dilutions.

a) Q-PCR 1 : gamme pour l'exon 3.

Les dilutions de la séquence de l'exon 3 (recueillie à partir du gel de la PCR 15) utilisées sont 10^{-5}; 10^{-6}; 10^{-7}; 10^{-8}; 10^{-9}; 10^{-10}; 10^{-11}. Les figures 30 et 31 montrent les résultats obtenus. Sur la figure 31 on voit que pour chaque dilution les trois courbes sont similaires, sauf pour la dilution à 10^{-11}. Cela se traduit par une incurvation à l'extrémité de la droite de la figure 30

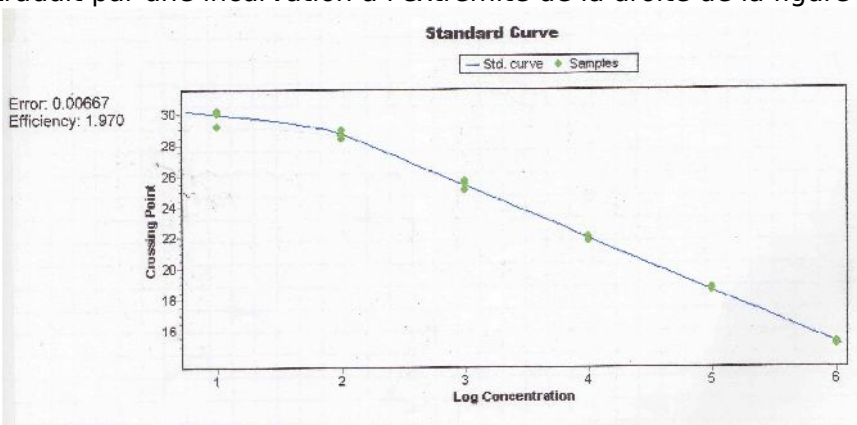


Figure 30 : Résultat de la courbe d'étalonnage pour la gamme de dilution de l'exon 3. .

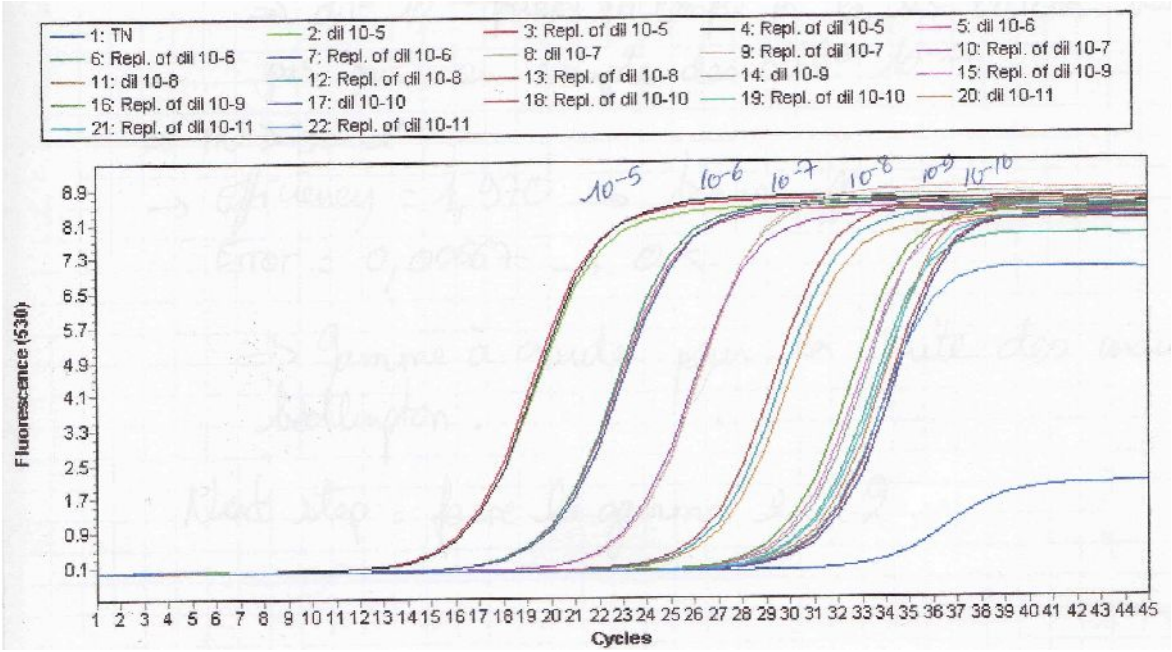


Figure 31 : Courbes d'amplification obtenues lors de la Q-PCR1.

b) Q-PCR 2 : gamme pour l'exon 2.

Les dilutions de la séquence de l'exon 2 (recueillie à partir du gel de la PCR 16) utilisées sont 10^{-5}; 10^{-6}; 10^{-7}; 10^{-8}; 10^{-9}; 10^{-10}; 10^{-11}. Les résultats sont similaires à ceux obtenus pour la gamme de l'exon 3, mis à part qu'il n'y a pas de différence entre les 3 courbes pour la dilution à 10^{-11}, et donc pas d'incurvation de la droite.

3) Q-PCR 3.

Les résultats de cette PCR sont donnés dans les figures 32 et 33 et dans le tableau VIII.
On observe les ratio entre les concentrations en exon 2 et 3 suivants :

- aux environs de 0 pour un animal homozygote malade
- aux environs de 3 pour un animal homozygote sain
- entre 1 et 2 pour un animal hétérozygote.

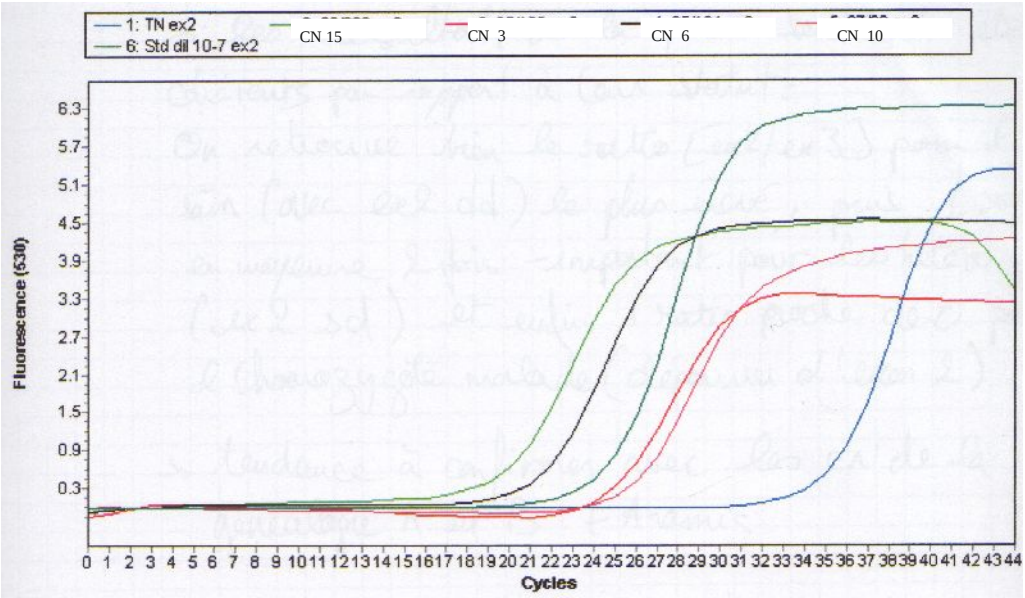


Figure 32 : Courbes d'amplification pour l'exon 2 lors de la Q-PCR3.

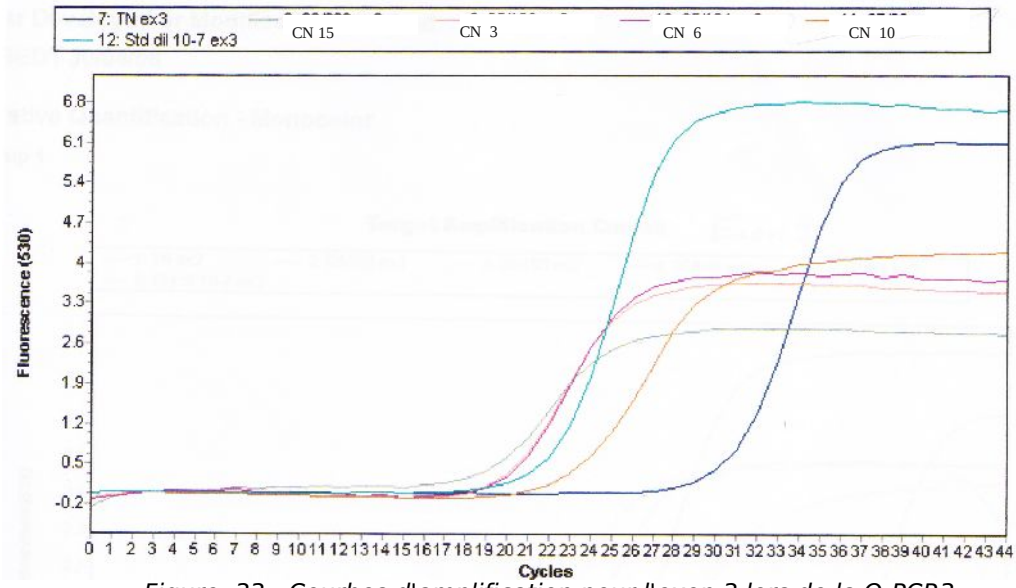


Figure 33 : Courbes d'amplification pour l'exon 3 lors de la Q-PCR3.

Echantillon	Séquence amplifiée	CP Médian	Ratio des concentrations
CN 14	Exon 2	19,74	3,18
	Exon 3	18,79	
CN 3	Exon 2	24,41	0,20
	Exon 3	19,52	
CN 6	Exon 2	21,27	2,03
	Exon 3	19,70	
CN 10	Exon 2	25,54	1,02
	Exon 3	23,08	

Tableau VIII : Résultats de la Q-PCR 3.

4) Q-PCR 4.

Lors de cette PCR, les échantillons non encore testés en Q-PCR sont utilisés. Les résultats de cette PCR sont donnés dans les figures 34 et 35 et dans le tableau IX.

On observe un ratio des concentrations en exons 2 et 3 aux environs de 0 pour le chien homozygote malade et des ratios variant entre 1,67 et 10,76 pour les autres chiens. Une erreur est intervenue dans le cadre de l'amplification de l'exon 2 pour CN 9.

Echantillon	Séquence amplifiée	CP Médian	Ratio des concentrations
CN 1	Exon 2	20,43	1,67
	Exon 3	18,55	
CN 2	Exon 2	19,57	3,80
	Exon 3	18,87	
CN 4	Exon 2	22,20	2,58
	Exon 3	21,00	
CN 5	Exon 2	19,93	4,66
	Exon 3	19,54	
CN 7	Exon 2	19,50	8,50
	Exon 3	19,99	
CN 8	Exon 2	20,04	4,19
	Exon 3	19,50	
CN 9	Exon 2		0
	Exon 3	23,26	
CN 11	Exon 2	24,89	0,11
	Exon 3	19,16	
CN 12	Exon 2	19,94	5,28
	Exon 3	19,74	
CN 13	Exon 2	19,42	10,76
	Exon 3	20,26	

Tableau IX : Résultats de la Q-PCR 4.

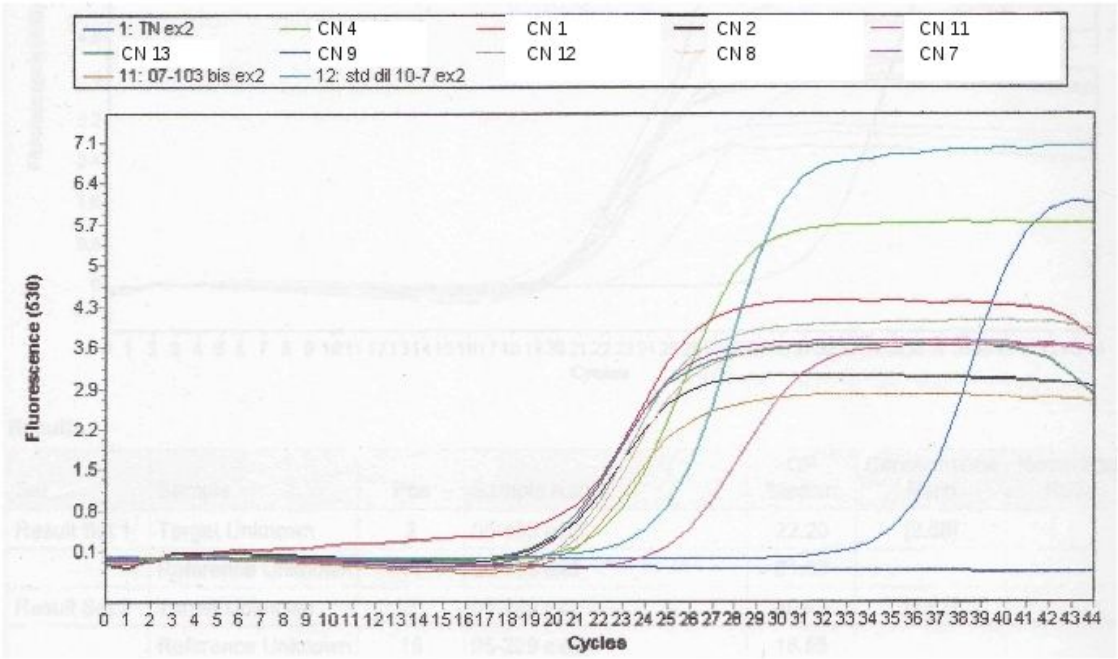


Figure 34 : Courbes d'amplification pour l'exon 2 lors de la Q-PCR4.

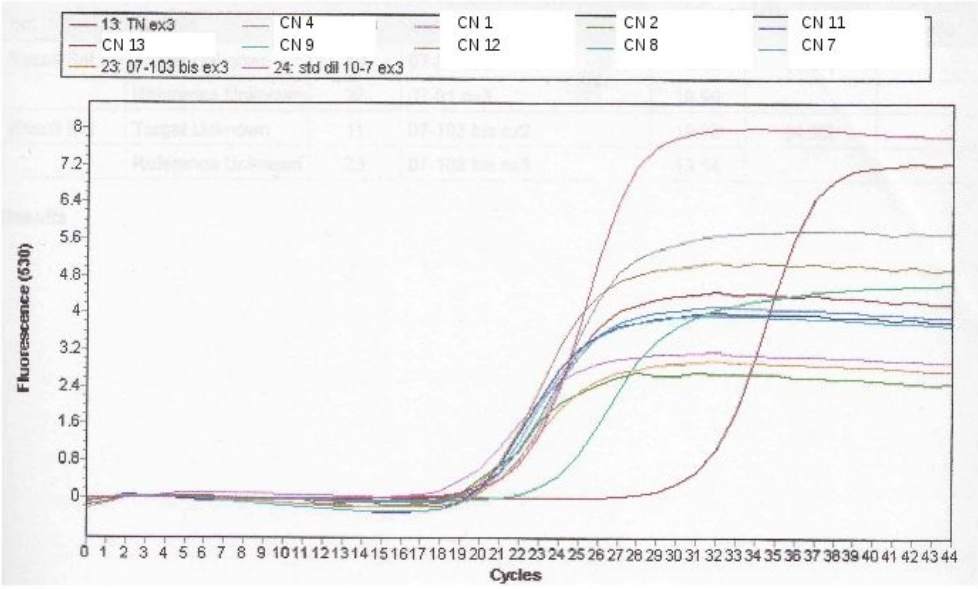


Figure 35 : Courbes d'amplification pour l'exon 3 lors de la Q-PCR4.

C) Stratégie 3.

Dans cette stratégie, on ne recherche plus l'exon 3. On amplifie toujours l'exon 2, quand il est présent, avec le couple CT2s1-CT1as2. Un nouveau couple d'amorces, INTs1-INTas2, sert à mettre en évidence une séquence formée par la délétion de l'exon 2.

1) Mise au point.

a) Essai du couple INTs1-INTas2.

i) Sur un Bedlington Terrier homozygote malade.

La figure 36 présente les résultats de la PCR 17 dans laquelle la température s'échelonne entre 53 et 57°C et la concentration en $MgCl_2$ vaut soit 1 soit 1,5mM.. La séquence attendue de 804pb est visible. Son signal est de très forte intensité, sauf à 53°C, pour [$MgCl_2$]=1,5mM, où l'intensité est moyenne. Pour le reste on observe pas de variation en fonction de la température et de la concentration en $MgCl_2$.

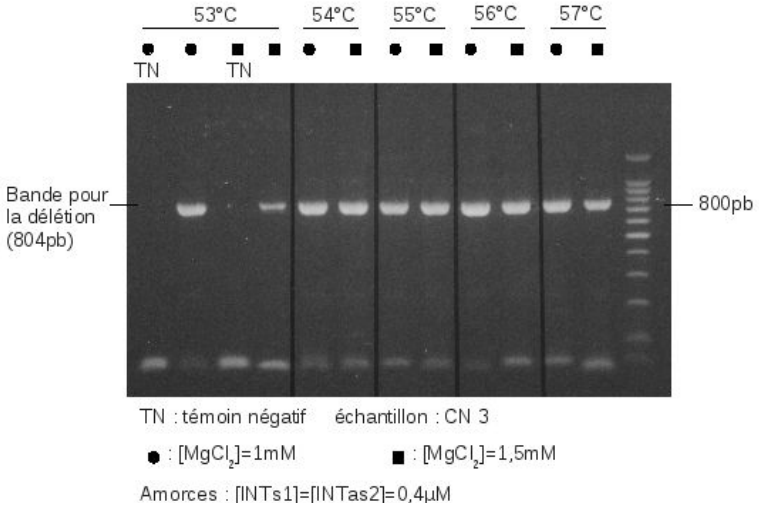


Figure 36 : Résultats de la PCR 17.

On retient les mêmes conditions que celles retenues dans la stratégie 1 pour la suite de l'expérimentation.

ii) Sur l'ensemble des statuts génétiques possibles.

La figure 37 présente les résultats de la PCR 18. Cette PCR est réalisée sur 5 chiens : 2 homozygotes malades (CN 3 et 11), 2 hétérozygotes (CN 4 et 8) et 1 homozygote sain (CN15). On voit que le produit d'amplification attendu est absent chez le chien homozygote sain, présent avec un signal intense chez l'hétérozygote et présent avec un signal très intense chez le chien homozygote malade. Deux bandes non spécifiques sont visibles quand la délétion est présente : une de faible intensité d'environ 700pb et une de très faible intensité d'environ 200pb.

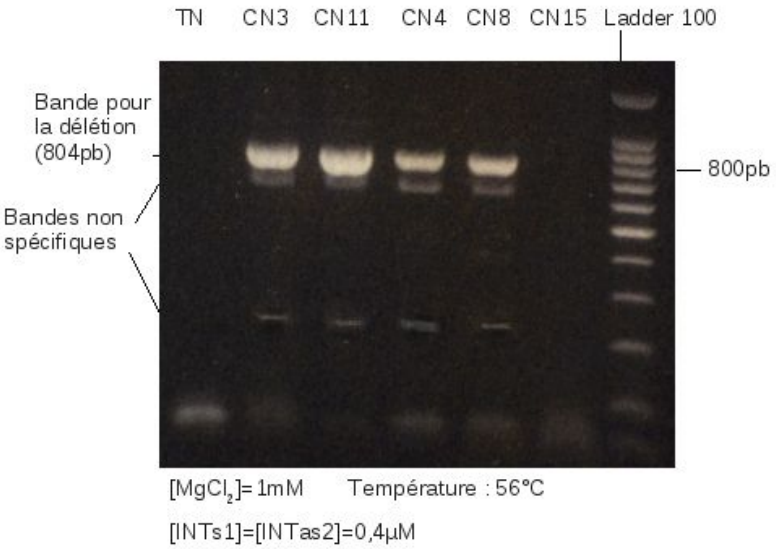


Figure 37 : Résultats de la PCR 18.

b) Essai de la PCR duplex INTs1-INTas2 / CT2s1-CT1as2.

i) Variation des concentrations d'amorces à 56°C et pour [$MgCl_2$]=1mM

La figure 38 présente les résultats de la PCR 19 dans laquelle chaque couple d'amorces a, alternativement, une concentration plus élevée que l'autre couple. Cette PCR est réalisée avec l'échantillon d'un chien hétérozygote. On observe, sur la figure, un signal très intense à intense pour l'exon 2 et un signal faible à moyen pour la délétion. Dans les conditions [CT2s1]=[CT1as2]=0,2µM et [INTs1]=[INTas2]=0,4µM, la différence entre les deux signaux est la plus faible. Deux bandes non spécifiques sont visibles : une d'intensité très faible d'environ 700pb et une d'intensité très très faible d'environ 200pb. Aucun produit d'amplification n'est visible au niveau du puits 3 (erreur lors de la PCR).

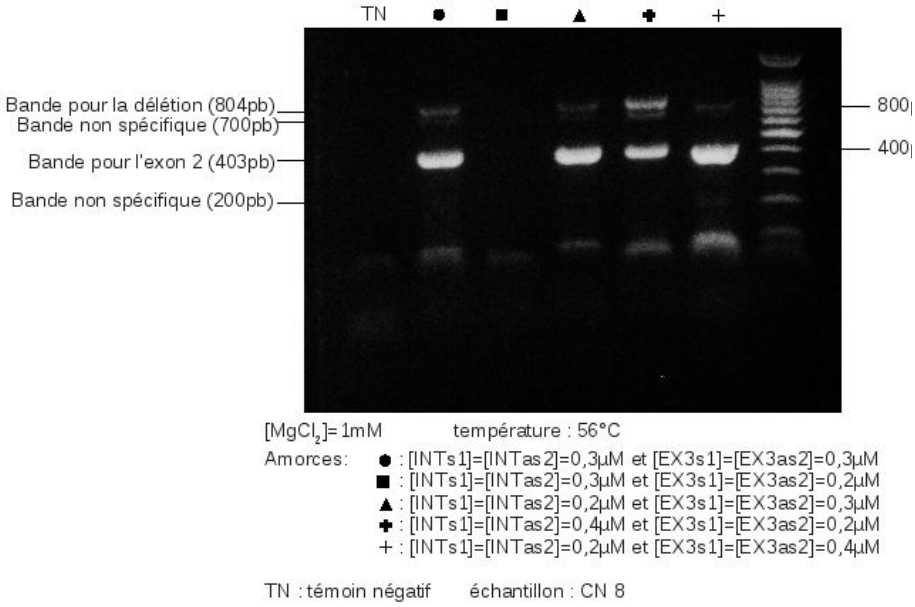


Figure 38 : Résultats de la PCR 19.

La figure 39 présente les résultats de la PCR 20 pour laquelle [INTs1]=[INTas2]=0,4µM et [CT2s1]=[CT1as2]=0,2 ou 0,1µM. Elle est réalisée sur 3 chiens de statut différent vis à vis de la maladie.

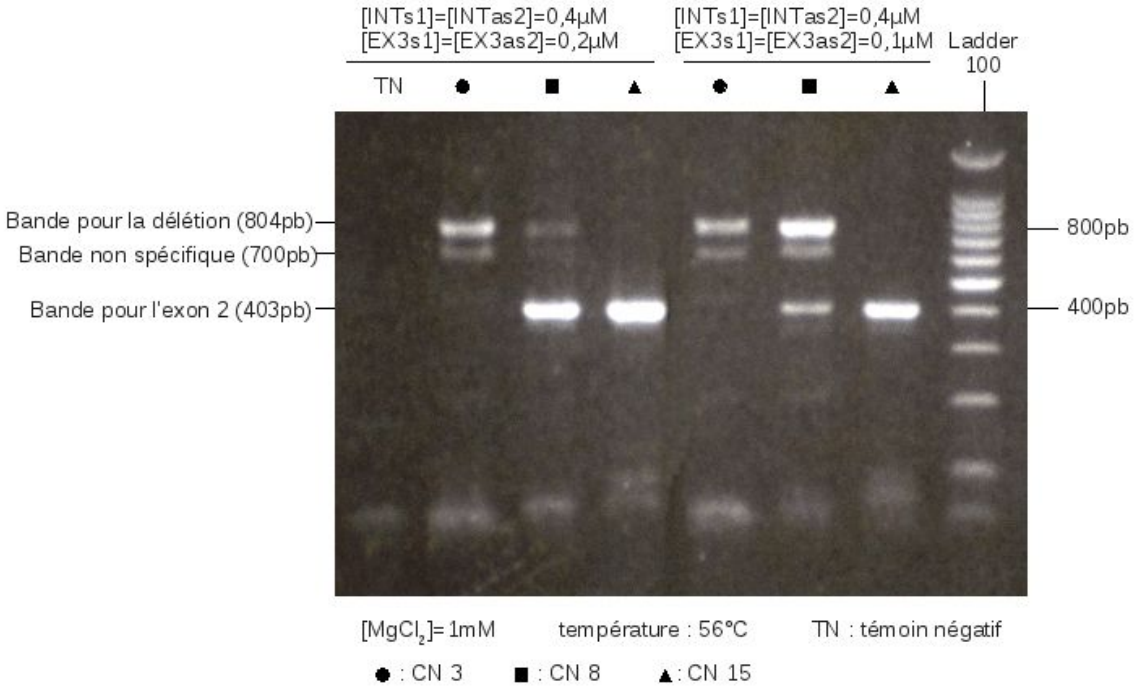


Figure 39 : Résultats de la PCR 20.

Dans les conditions [INTs1]=[INTas2]=0,4µM et [CT2s1]=[CT1as2]=0,2µM, le signal pour l'exon 2 est intense et celui de la délétion est moyen (pour l'homozygote malade) à faible (pour l'hétérozygote). Une faible bande non spécifique d'environ 700pb est présente lorsque le produit d'amplification de 804pb est visible.

Dans les conditions [INTs1]=[INTas2]=0,4µM et [CT2s1]=[CT1as2]=0,1µM, la différence d'intensité entre les deux signaux a disparu : les deux signaux sont intenses à moyens. La bande non spécifique, visible qu'en présence du signal pour la délétion, est observée avec une intensité un peu plus marquée.

ii) *Variation de la température avec concentrations en amorces et $MgCl_2$ fixes.*

Les conditions des PCR 21 et 22 sont [INTs1]=[INTas2]=0,4µM, [CT2s1]=[CT1as2]=0,1µM et [$MgCl_2$]=1mM. Elles sont toutes les deux réalisées sur un échantillon d'un chien hétérozygote.

Pour la PCR 21 la température varie de 54 à 58°C. Les résultats sont visibles sur la figure 40. Le signal de l'exon 2 est intense à 53 et 58°C et moyen pour les trois autres températures. Le signal de la délétion est très faible à 53°C et moyen aux quatre autres températures. La bande non spécifique est présente, d'intensité faible, légèrement plus faible à 58°C.

Figure 40: Résultats de la PCR 21.

Pour la PCR 22 la température varie de 58 à 61°C. La figure 41 en présente les résultats. Le signal de la délétion est très intense. Celui de l'exon 2 est intense, un peu plus faible à 60°C. On ne voit pas de bande non spécifique.

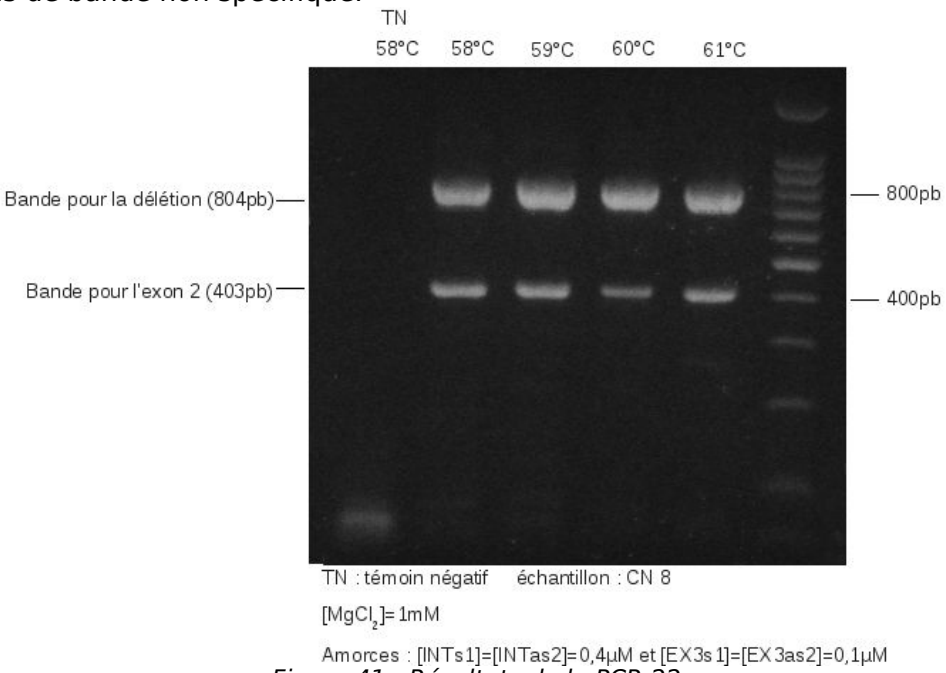


Figure 41 : Résultats de la PCR 22.

Les conditions retenues sont 59°C, [INTs1]=[INTas2]=0,4µM, [CT2s1]=[CT1as2]=0,1µM et [$MgCl_2$]=1mM.

2) Application des conditions retenues à tous les chiens.

Les résultats de la PCR 23 sont visibles sur la figure 42. Le signal pour l'exon 2 présente une forte intensité pour les chiens CN 1, 2, 7, 8, 12, 14 et une intensité moyenne pour les chiens CN 4, 5, 6, 9, 10, 13. La bande n'est pas visible pour les chiens CN 3 et 11. On observe, pour le signal de la délétion, une très forte intensité pour les chiens CN 2, 3, 4, 9, 11, une forte intensité pour les chiens CN 5, 8, 12, une intensité moyenne pour les chiens CN 6 et 10 et une très faible intensité pour le chien CN 1. Cette bande n'est pas observable pour les chiens CN 7, 13, 14. La bande non spécifique d'environ 700pb est présente, d'intensité faible à très faible, quand le signal pour la délétion est présent.

La PCR 24, réalisée dans les mêmes conditions que la PCR 23, sur les chiens CN 1, 8, 9 et 13, donne les mêmes résultats (non illustrés ici).

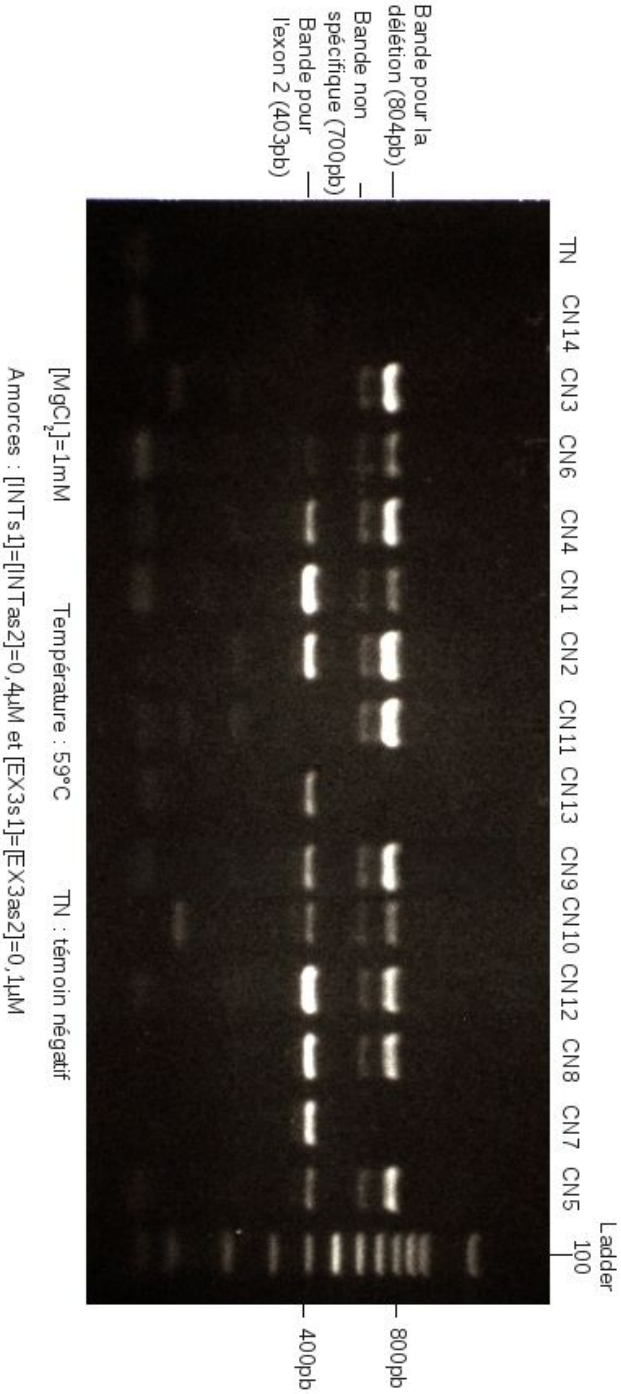


Figure 42 : Résultats de la PCR 23

III) Discussion.

A) Technique.

1) La cible.

Le test diagnostique mis en place dans ce travail se base sur la recherche d'une délétion de l'exon 2 dans le gène COMMD1. En effet, les avancées des recherches sur l'intoxication au cuivre chez le Bedlington Terrier ont montré que cette délétion est responsable de la majeure partie des cas d'intoxication au cuivre chez le Bedlington Terrier []. Tout animal présentant cette délétion en deux exemplaires est systématiquement malade et tout animal n'en présentant qu'un exemplaire est porteur. Les dernières découvertes indiquent néanmoins que ce n'est pas le seul gène impliqué : certains animaux malades ne présentant pas la délétion ont été diagnostiqués. L'utilisation de ce seul test ne permet donc pas d'affirmer qu'un animal est sain, mais il permet de détecter un grand nombre d'animaux porteurs ou atteints de l'intoxication au cuivre.

2) Les animaux.

Pour cette thèse un nombre conséquent d'échantillons ont pu être obtenus grâce à la collaboration des propriétaires français de Bedlington Terriers. L'appartenance des animaux à trois généalogies différentes permet d'éviter des biais qui seraient dus à un phénomène présent dans une seule lignée.

Certains des animaux avaient auparavant été testés pour le microsatellite C04107. Leur statut pour la maladie est donc suspecté et permet, par une étude généalogique, de déduire celui d'autres Bedlingtons Terriers. Deux chiens ont déclaré la maladie ce qui rend leur statut certain. La connaissance de ces informations fut très utile à la mise en place du test : nous avions à notre disposition des chiens connus pour être atteints, d'autres fortement suspectés d'être hétérozygotes. L'utilisation de chiens non Bedlington Terrier, appartenant à des races pour lesquelles aucune intoxication au cuivre n'est connue (épagneul breton et labrador), nous a fourni des chiens homozygotes sains.

Il est toutefois regrettable que la mise au point du test PCR n'est pas été accompagnée de dosage du cuivre hépatique et/ ou de biopsies hépatiques systématiques afin de s'assurer des statuts qui n'avaient pas été déterminés auparavant.

3) Prélèvement.

La majorité des échantillons d'ADN utilisés provient de prélèvements sanguins. En effet, pour mettre en place le test, une quantité importante d'ADN est nécessaire. De plus nous devons pouvoir réutiliser un même échantillon plusieurs fois et donc le conserver un certains temps, contrairement à la réalisation d'un dépistage où il suffit de tester l'échantillon une fois (voir deux si un problème est survenu lors de la manipulation). Une simple prise de sang autorise l'obtention d'une grande quantité d'ADN, et les extraits congelés peuvent être conservés plusieurs mois.

Cependant, pour l'utilisation future du test le prélèvement de sang n'est pas forcément le meilleur choix. En effet, c'est une méthode de prélèvement invasive (même si elle est couramment pratiquée par des vétérinaires), nécessitant parfois une tonte qui n'est pas forcément bienvenue sur des chiens de concours. Nous avons donc tenté de mettre au point l'utilisation de prélèvements non invasifs, réalisables par l'éleveur (même si un passage par l'intermédiaire d'un vétérinaire reste plus approprié pour certifier l'identification des animaux prélevés).

Nous nous sommes tout d'abord tournés vers l'utilisation de bulbes pileux. Lors des essais successifs, les poils prélevés par l'éleveur n'ont jamais présenté le moindre bulbe pileux : ils étaient probablement obtenus au cours du toilettage et non par arrachage. Il nous est donc apparu qu'une méthode consistant à arracher des poils à des chiens de concours ne recevrait pas l'approbation des propriétaires. De plus le poil de Bedlington Terrier étant très fin, il n'est pas aisé pour l'éleveur de vérifier la présence de bulbes pileux dans l'échantillon qu'il envoie.

Nous avons donc envisagé une autre méthode de récolte d'ADN : l'utilisation de cytobrosse pour récupérer des cellules buccales. Cette méthode non invasive et non douloureuse est facilement mise en oeuvre (à condition de s'équiper du matériel nécessaire : une cytobrosse et un tube sec pour l'envoi) et la quantité d'ADN recueillie est suffisante à la réalisation d'un test PCR. La PCR point final PCR 14 a comparé les résultats obtenus entre un échantillon de sang et un prélèvement par écouvillonnage buccal. Les résultats pour les deux types de prélèvements sont similaires et nous permettent donc d'envisager ce test sur l'un ou l'autre des échantillons.

4) La PCR.

a) *Répétabilité.*

La répétabilité correspond à l'obtention de résultats identiques lors d'essais indépendants réalisés par la même méthode, sur des individus identiques, dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps.

La répétabilité de notre test peut être illustrée par deux exemples.

On peut voir sur les figures 43 et 44 que les PCR 8 et 9 donnent les mêmes résultats.

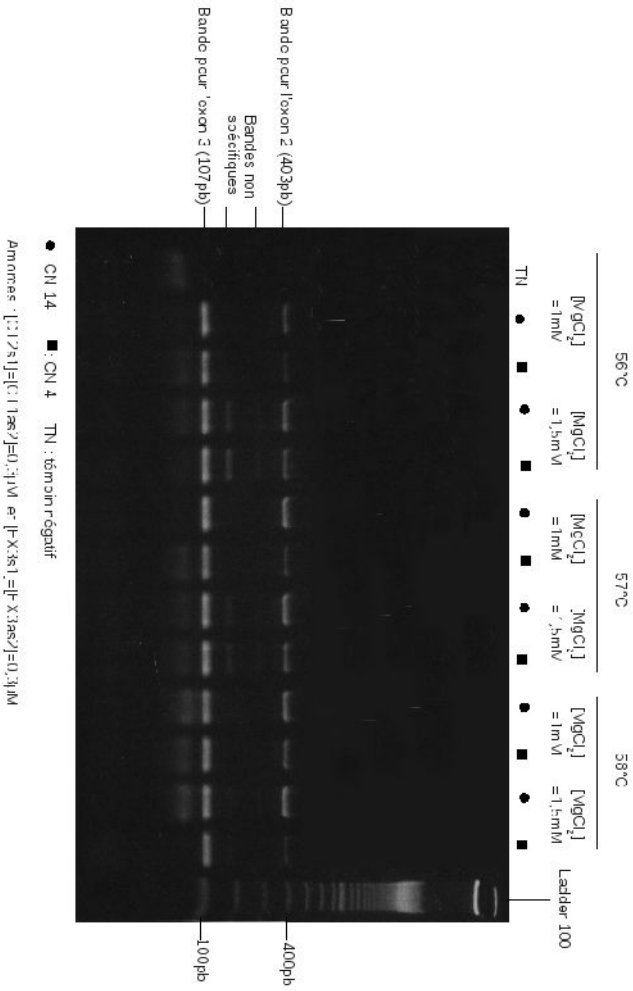


Figure 43 : Résultats de la PCR 8

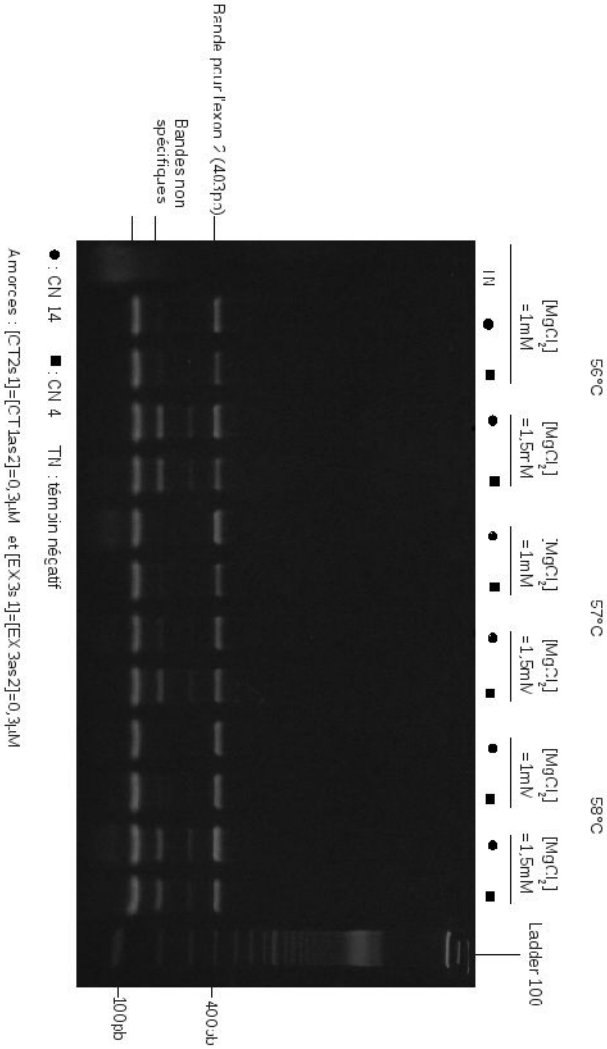


Figure 44 : Résultats de la PCR 9

Il en a été de même entre la PCR 24 et les puits correspondants de la PCR 23 (tous les échantillons de la PCR 23 n'ont pas été réutilisés dans la PCR 24 par souci d'économie des échantillons en notre possession).

b) *Stringence.*

La stringence est la capacité d'un ensemble de conditions d'une réaction (température, concentration en sel et pH) à affecter le processus d'appariement d'ARN ou d'ADN simple brin pour former une molécule à double brin. La stringence augmente quand la concentration en $MgCl_2$ diminue et quand la température augmente. Une faible stringence permet l'appariement des brins avec un certain degré de mésappariement. A haute stringence, au contraire, les duplex se forment uniquement entre des brins parfaitement complémentaires. Il faut néanmoins garder à l'esprit qu'une stringence trop élevée (trop haute température ou $[MgCl_2]<1mM$) rendra tout appariement impossible (même celui entre de séquences parfaitement complémentaires).

Au cours de nos expériences, nous avons fait varier la température (de 53 à 61°C) et la concentration en $MgCl_2$ (de 1 à 2mM) pour trouver les conditions dans lesquelles la lecture des résultats est la meilleure. On peut ainsi voir sur la figure 43 que l'intensité des signaux pour les exons 2 et 3 augmente avec l'augmentation de température alors que celle des deux bandes non spécifiques d'environ 200 et 300pb diminue. On remarque également que ces bandes non spécifiques s'éteignent quand on passe d'une concentration en $MgCl_2$ de 1,5mM à celle de 1mM.

c) *Sensibilité.*

La sensibilité d'un test PCR est théoriquement excellente : une seule molécule d'ADN permet l'amplification d'une séquence. Mais en pratique elle peut être moins bonne car il faut pouvoir mettre en évidence cette amplification. La sensibilité d'un test PCR dépend donc de la quantité d'ADN présent dans l'échantillon au départ et du type de PCR.

Si nous avions poursuivi dans le développement du test à partir de prélèvements de poils, nous aurions pu alors rencontrer des problèmes de sensibilité. Mais à partir de prélèvements sanguins ou de prélèvements de cellules buccales, effectués avec une cytobrosse, le problème ne se pose pas car la quantité d'ADN contenue dans ces types d'échantillons est élevée. Or notre test se base sur de tels échantillons.

La PCR quantitative, qui utilise une lecture automatisée est plus sensible que la PCR point final pour laquelle la lecture du résultat se fait à l'œil nu. Par souci d'obtenir rapidement un test pratique, nous avons opté pour un test en PCR point final. Mais des essais de mise au point d'une Q-PCR se poursuivent afin d'obtenir un test encore plus sensible. Pour augmenter la sensibilité de notre test en PCR point final, chaque chien est testé en duplicata. Ainsi la répétition du test pour le chien CN 1 lors de la PCR 24 a permis de s'assurer du statut hétérozygote de cet animal, statut qui pouvait être douteux à partir des résultats de la PCR 23.

d) *Spécificité.*

La spécificité d'un test PCR dépend en grande partie de la spécificité des amorces utilisées. Cette dernière dépend de la complémentarité de la séquence des amorces avec la séquence ciblée. Mais il faut aussi prendre en compte les autres loci où les amorces pourraient se fixer, sans que leur séquence ne soit parfaitement complémentaire de ces régions. L'augmentation de la stringence permet de lutter contre ce phénomène. Mais si parfois des amplifications non voulues persistent (et donc des bandes non attendues sont observées sur le gel d'agarose), cela n'affecte pas toujours la spécificité du test. En effet, lors de la migration sur le gel d'agarose, un des puits du gel est occupé par un mélange contenant des fragments d'ADN de longueurs différentes et connues ce qui permet de construire une échelle de longueur. Ainsi si la bande non attendue n'est pas de la même longueur que celle recherchée aucune confusion ne sera possible entre les deux et la spécificité du test ne sera pas diminuée.

Pour nos expériences, nous avons défini les amorces à partir de la séquence du gène COMMD1. De ce fait nos amorces sont normalement parfaitement complémentaires des séquences ciblées. L'utilisation du logiciel Amplify® a permis de sélectionner des amorces qui *a priori* ne devaient pas amplifier de séquences non voulues. Nous avons néanmoins pu constater des bandes non attendues après électrophorèse. Mais ces bandes ne sont pas de la même longueur que celles visées par notre test, on ne peut donc pas les confondre et la spécificité globale du test reste bonne. De plus en faisant varier la stringence du milieu ces

bandes non attendues s'éteignent. Seul le couple INTs1-INTas2 entraîne la présence systématique d'une bande non spécifique, d'environ 700pb, lorsque la délétion existe. Mais cette bande n'étant visible que lorsque celle de la séquence voulue l'est aussi, le couple d'amorces permet malgré tout une bonne spécificité du test.

Nous avons ainsi mis au point un test PCR ayant une bonne spécificité.

B) Résultats.

1) Stratégie par stratégie.

Nous avons successivement utilisé trois stratégies différentes dans la mise au point du test PCR.

L'objectif de la première et de la deuxième stratégie était de comparer les quantités d'ADN présent pour les exons 2 et 3. En effet une délétion de la totalité de l'exon 2 est une des causes de l'intoxication au cuivre chez le Bedlington Terrier. Ainsi un chien homozygote sain présentera des quantités équivalentes pour les deux exons, un chien homozygote malade n'aura pas de copie de l'exon 2 et un chien hétérozygote aura deux fois plus d'exon 3 que d'exon 2. Dans la stratégie 1, cette comparaison est réalisée par une personne, après une PCR point final suivie d'une électrophorèse sur gel d'agarose. La deuxième stratégie permet une comparaison plus fine car celle-ci est faite par un automate.

La troisième stratégie cherche à amplifier une séquence dans l'exon 2 (témoin de la présence de l'exon) et une séquence formée après délétion de cet exon (et donc témoin de la délétion). Un individu homozygote malade ne présentera pas le fragment correspondant à l'exon 2 et un individu homozygote sain n'aura pas le fragment témoin de la délétion. Chez un individu hétérozygote les deux seront visibles.

a) Stratégie 1.

i) Considérations générales.

La figure 45 présente les résultats théoriquement attendus en utilisant la PCR point final ciblant les exons 2 et 3.

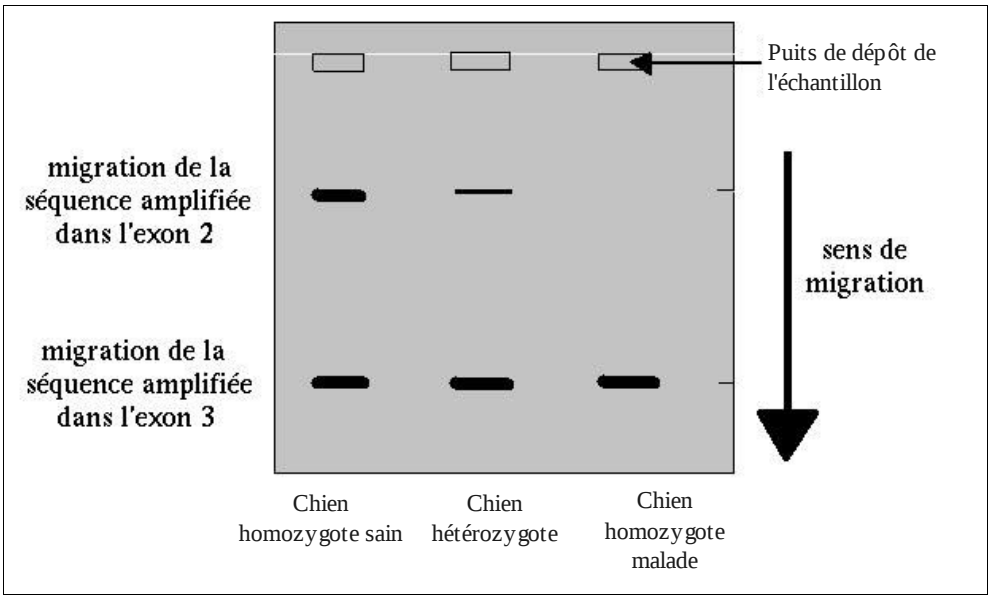


Figure 45 : Résultats théoriquement attendus avec la stratégie 1.

Dans cette stratégie les amorces ont d'abord été essayées en simplex afin de choisir le meilleur couple pour amplifier la séquence de l'exon 2. Le chien CN 14, non Bedlington Terrier donc homozygote sain, a été utilisé lors de ces simplex dans un souci d'économie des

échantillons de Bedlington Terriers.

Puis les duplex ont d'abord été réalisées sur l'échantillon provenant de ce chien. Ce n'est qu'une fois les conditions affinées qu'un Bedlington Terrier hétérozygote a été utilisé. L'ADN d'un des deux homozygotes malades n'a été employé que pour les ajustements finaux.

ii) PCR simplex pour l'exon 2.

Deux amorces sens (CT1s1 et CT2s1) et deux amorces antisens (CT1as2 et CT2as2) ont été définies afin de tester les différents couples de combinaisons et de retenir celui donnant les meilleurs résultats. Ainsi, les couples CT1s1-CT1as2, CT2s1-CT2as2, CT1s1-CT2as2 et CT2s1-CT1as2 ont été testés. Les résultats obtenus pour les trois premiers couples présentent de nombreuses bandes non spécifiques et/ou un signal trop faible alors que ceux pour le couple CT2s1-CT1as2 présentent un signal intense et seulement une bande non spécifique. C'est donc ce dernier qui a été retenu pour la suite de l'expérimentation. L'augmentation de la température et la diminution de la concentration en $MgCl_2$ ayant permis d'éteindre la bande non spécifique, des conditions de température comprises entre 56 et 58°C ainsi qu'une concentration en $MgCl_2$ de 1mM ont été retenues.

iii) PCR simplex pour l'exon 3.

Les résultats de la PCR 6 ont conduit à retenir une température autour de 57°C à une concentration en $MgCl_2$ de 1mM comme conditions optimales pour l'action du couple d'amorces EX3s1-EX3as2.

iv) PCR en duplex.

L'utilisation de concentrations identiques en amorces pour les deux couples donne, quelle que soit cette concentration, un signal plus faible pour l'exon 2 que pour l'exon 3. Des PCR sont réalisées en essayant d'augmenter la concentration du couple CT2s1-CT1as2 par rapport au couple EX3s1-EX3as2 afin d'obtenir, chez l'homozygote sain, une même intensité de signal pour les exons 2 et 3.

Les conditions [CT2s1]=[CT1as2]=0,3µM, [EX3s1]=[EX3as2]=0,1µM et [$MgCl_2$]=1mM, à une température de 56°C, permettent d'y arriver. Mais la différenciation des simple et double doses d'exon 2 n'est pas aisée et un risque d'erreurs lors de la lecture existe (en fonction du lecteur, de sa vision, de l'éclairage, ...). Il fut donc décidé de passer à une méthode de PCR quantitative (Q-PCR) dans laquelle cette différenciation, étant faite par un automate, est beaucoup plus fine.

b) Stratégie 2.

i) Les courbes d'étalonnage.

Les PCR point final 15 et 16 ont constitué une première étape à l'obtention en grande quantité des séquences ADN des exons 2 et 3, afin de réaliser les gammes de dilutions pour chacune de ces séquences. Ces gammes de dilutions sont importantes pour l'automate car elles lui permettent d'établir ses courbes d'étalonnage. Cela permet aussi à l'opérateur de vérifier la linéarité de ces courbes et donc de connaître les dilutions entre lesquelles les résultats seront exploitables. Une autre de leur utilité est de vérifier la répétabilité des mesures.

Lors de la réalisation de Q-PCR 1, gamme de dilution pour l'exon 3, on constate que la répétabilité est bonne et que les valeurs de l'efficacité et de l'erreur sont correctes. On remarque également que la courbe d'étalonnage est linéaire entre les dilutions à 10^{-10} et à 10^{-5}. Par contre la courbe présente un plateau au-delà de la dilution à 10^{-10}. Mais dans les échantillons d'ADN extraits à partir de sang ou de prélèvement de cellules buccales on trouve des quantité d'ADN supérieures à cela. La non-linéarité de la courbe d'étalonnage au-delà de la dilution à 10^{-10} n'est donc pas néfaste à la réalisation du test.

Lors de la réalisation de Q-PCR 2, gamme de dilution pour l'exon 2, la courbe d'étalonnage est linéaire, la répétabilité et les valeurs de l'efficacité et de l'erreur sont correctes.

ii) Essai du test.

Un premier essai du test sur un chien homozygote sain, un chien homozygote malade et deux chiens hétérozygotes a donné des résultats plutôt concluants. Pour le chien homozygote malade le ratio est nul, ce qui correspond au fait qu'il ne possède pas de copies de l'exon 2. Le ratio du chien homozygote sain, dont le génome contient deux copies de l'exon 2, est environ le double de ceux des chiens hétérozygotes (3 vs 1 et 2), qui eux n'ont qu'une copie de cet exon.

Mais un deuxième essai, utilisant les différents chiens, montre des ratios beaucoup plus dispersés alors que les crossing points sont du même ordre de grandeur que ceux obtenus lors des Q-PCR 1, 2 et 3. La majorité des ratios se situe entre 0 et 5,5 et deux chiens sortent du lot en présentant des ratios plus élevés (8,50 et 10,76).

Des mises au point de ce test en PCR quantitative sont donc en cours au LVD 69 afin d'obtenir soit des ratios de 1 pour les animaux sains, de 0,5 pour les hétérozygotes et de 0 pour les animaux malades soit des ratios normalisés (grâce à l'utilisation d'un calibreur).

Mais afin d'obtenir rapidement un test diagnostique et pour que les éleveurs puissent commencer à raisonner les accouplements de leurs chiens, nous sommes revenus à une PCR point final dont l'objectif a été modifié par rapport à celle de la stratégie 1.

c) Stratégie 3.

i) Considérations générales.

Le nouveau couple d'amorces INTs1-INTas2 se situe de part et d'autre de la zone de délétion. Cette zone de délétion étant d'une grande longueur, ce couple d'amorce ne permettra d'amplifier une séquence que si la délétion existe. L'association des couples INTs1-INTas2 et CT2s1-CT1as2 permet d'amplifier une séquence nucléotidique que le chien soit hétérozygote, homozygote sain ou malade. Il n'est donc pas utile d'ajouter un contrôle interne. De plus, les produits de l'amplification n'étant pas de la même longueur, différencier les trois statuts est possible comme on peut le voir sur la figure 46.

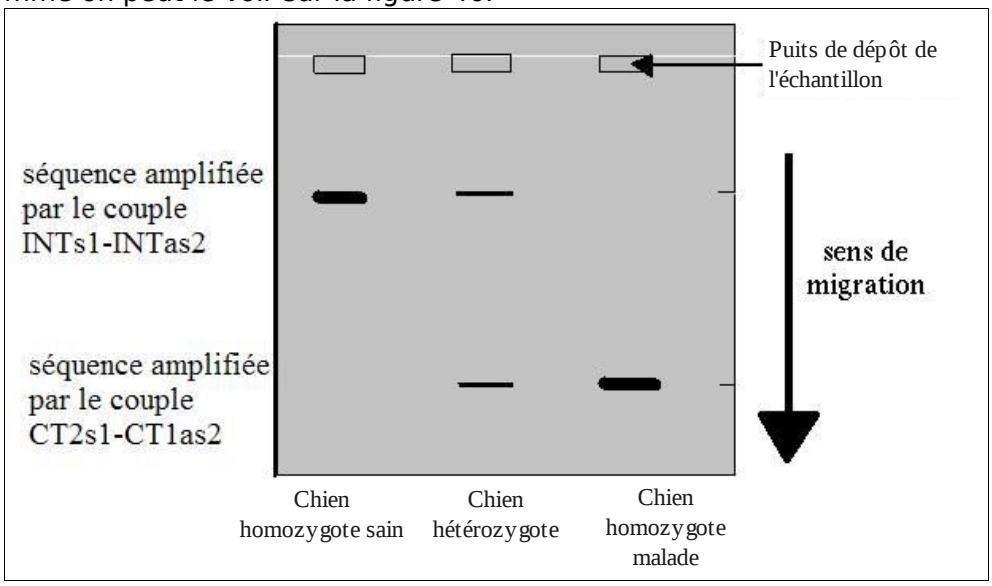


Figure 46 : Résultat théorique pour la stratégie 3.

ii) PCR simplex pour la délétion.

Pour tester le couple d'amorces INTs1-INTas2 tout en économisant les échantillons d'ADN, les conditions de PCR pour ce couple ont été déterminées à partir d'un seul chien homozygote malade. C'est ainsi qu'une température de 56°C et une concentration en $MgCl_2$ de 1mM ont été retenues. Ce n'est qu'après cette étape que ce nouveau couple fut essayé, dans ces conditions

optimisées, sur des chiens de statuts différents. Les résultats furent concluants : aucun signal n'apparaît chez le chien homozygote sain et le signal des homozygotes malades est plus fort que celui des hétérozygotes.

iii) PCR duplex.

La première étape de la mise au point de cette PCR duplex a été de déterminer quelles devaient être les concentrations en amorces pour chacun des deux couples. Les essais ont montré que les meilleures résultats sont obtenus pour [INTs1]=[INTas2]=0,4µM et [CT2s1]=[CT1as2]=0,1µM.

Du fait de la présence d'une bande non spécifique, lorsque la délétion existe, à 56°C et [$MgCl_2$]=1mM, des essais avec une température différente ont été réalisés (la concentration en $MgCl_2$ n'a pas été modifiée). Pour une température de 59°C elle semblait avoir disparue. Mais lors de la PCR effectuée sur tous les échantillons de Bedlington Terriers elle est encore visible. Cette bande étant d'une longueur d'environ 700pb, elle ne se situe pas au même endroit que celle de l'exon 2 et de la délétion (respectivement 403 et 804pb). De plus elle n'est présente que lorsque la délétion est présente. De ce fait elle ne fait que modifier légèrement le profil théorique (le nouveau profil est présenté dans la figure 47)

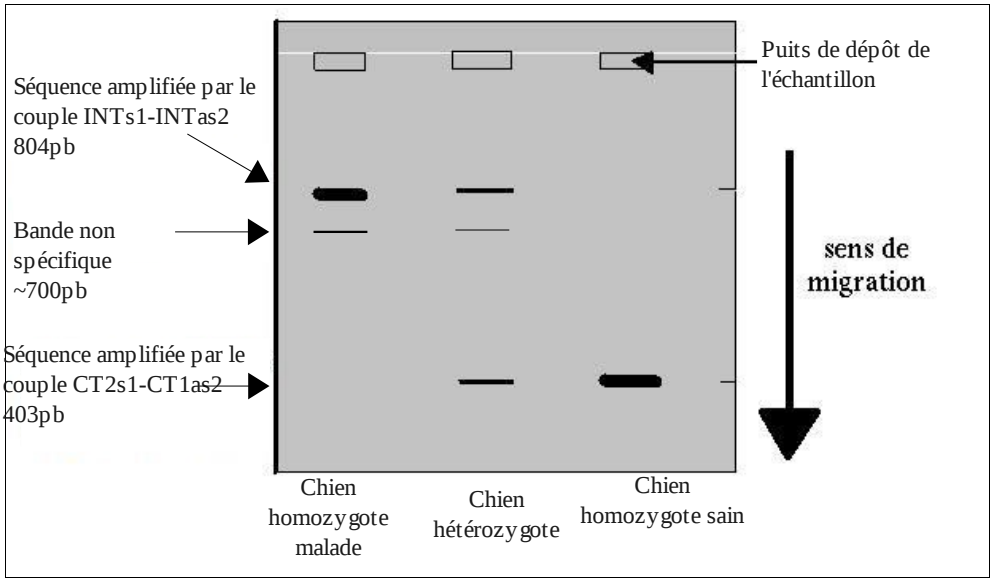


Figure 47 : Profil obtenu en fonction du statut du chien avec la PCR retenue pour la stratégie 3.

Le protocole retenu pour ce test de diagnostic moléculaire de l'intoxication au cuivre chez le Bedlington Terrier est présenté en annexe 5.

2) Application des tests aux échantillons de chiens.

Le tableau X présente les statuts des chiens obtenus par application du test PCR pour chaque stratégie ainsi que le statut éventuellement connu par une maladie déclarée ou par l'étude des résultats pour le microsatellite C04107.

Nom de l'animal	maladie avérée ou *(déductions de l'arbre généalogique)* ou chien non Bedlington Terrier	Statut connu (*ou déduit de la généalogie*) pour le microsatellite C04107	Statut déterminé dans la stratégie 1	Statut déterminé dans la stratégie 2	Statut déterminé dans la stratégie 3
CN 1	*(Porteur ou atteint)*		**N/m**	*N/m?*	**N/m**
CN 2			**N/m**	*N/m?*	**N/m**
CN 3	**Maladie avérée**		**m/m**	**m/m**	**m/m**
CN 4		**1/2**	**N/m**	*N/m?*	**N/m**
CN 5	*(Porteur ou atteint)*		**N/m**	*N/m?*	**N/m**
CN 6	*(Porteur ou atteint)*		**N/m**	**N/m**	**N/m**
CN 7		**1/1**	**N/m**	*N/N?*	**N/N**
CN 8		*(1/2)*	**/m**	*N/m?*	**N/m**
CN 9	*(Porteur ou atteint)*	**1/2**	**N/m**	*erreur*	**N/m**
CN 10		1/2	**N/m**	**N/m**	**N/m**
CN 11	**Maladie avérée**		**m/m**	**m/m**	**m/m**
CN 12		**1/2**	**N/m**	*N/m?*	**N/m**
CN 13		**1/1**	**N/m**	*N/N?*	**N/N**
CN 14	**Non Bedlington Terrier**		**N/N**	**N/N**	**N/N**
CN 15	**Non Bedlington Terrier**		**N/N**	**Non testé**	**Non testé**

Tableau X : Les différentes évaluations du statut des chiens utilisés dans l'expérimentation.

Dans le cadre de la stratégie 2, les résultats ne sont pas certains, seul un ratio de 0 permet de conclure (c'est alors un chien homozygote sain). Il peut être supposé que le groupe des animaux dont le ratio est compris entre 1,5 et 5,5 soient hétérozygotes alors que les deux animaux avec un ratio élevé seraient homozygotes sains.

Les données issues des arbres généalogiques (figure 17) corroborent cette hypothèse. Prenons l'exemple de CN 5 : son père est un chien ayant déclaré une maladie, CN 5 est donc soit hétérozygote soit homozygote malade. Il n'est en aucun cas homozygote sain. Lors de la Q-PCR, son ratio non nul nous indique qu'il est soit homozygote sain soit hétérozygote. Ne pouvant pas être homozygote sain il est donc forcément hétérozygote. Or il appartient à cet ensemble de chiens dont les ratios, groupés, ne sont pas tous inférieurs à 3 (le sien étant supérieur à cette valeur). On peut donc penser que cet ensemble est constitué de chiens hétérozygotes. Cela d'autant plus que les deux chiens CN 7 et CN 13, qui au vu de leurs résultats pour le microsatellite C04107 sont possiblement homozygotes sains, se distinguent de cet ensemble par des ratios plus élevés.

Lors de la PCR de la stratégie 1 on remarque que le statut des chiens CN 7 et 13 ne correspond pas au statut évalué grâce au microsatellite : ils apparaissent hétérozygotes plutôt qu'homozygotes sains. Pour expliquer cette divergence, deux hypothèses s'offrent à nous :

- Ces deux chiens sont porteurs d'un allèle 1 du microsatellite qui, par crossing over, ségrège avec la délétion.
- Une erreur est intervenue lors de la lecture du test PCR.

Le poids de la première hypothèse est diminué par le fait que ces deux chiens appartiennent à deux familles différentes. Or la fréquence d'un crossing over est faible et il semble peu probable de retrouver ce phénomène dans deux familles sur trois.

En faveur de la deuxième hypothèse vient le fait que le test PCR de la stratégie 1 fut abandonné pour des raisons de difficultés de comparaison des intensités lumineuses et donc de lecture. De plus les résultats de la PCR de la 3ème stratégie vont dans le sens des déductions issues des résultats pour le microsatellite.

C'est pour ces raisons que la deuxième hypothèse est retenue pour expliquer les divergences de statut, en fonction de la méthode employée.

Le tableau XI, présente la réponse qui fut transmise aux propriétaires des Bedlingtons Terriers utilisés pour la mise au point de ce test de diagnostic moléculaire.

Nom de l'animal	Réponse transmise au propriétaire
CN 1	Porteur de la délétion de l'exon 2 du gène COMMD1
CN 2	Porteur de la délétion de l'exon 2 du gène COMMD1
CN 3	Atteint d'Intoxication au cuivre
CN 4	Porteur de la délétion de l'exon 2 du gène COMMD1
CN 5	Porteur de la délétion de l'exon 2 du gène COMMD1
CN 6	Porteur de la délétion de l'exon 2 du gène COMMD1
CN 7	Ne présente pas la délétion de l'exon 2 du gène COMMD1
CN 8	Porteur de la délétion de l'exon 2 du gène COMMD1
CN 9	Porteur de la délétion de l'exon 2 du gène COMMD1
CN 10	Porteur de la délétion de l'exon 2 du gène COMMD1
CN 11	Atteint d'Intoxication au cuivre
CN 12	Porteur de la délétion de l'exon 2 du gène COMMD1
CN 13	Ne présente pas la délétion de l'exon 2 du gène COMMD1

Tableau XI: Réponses données aux propriétaires des Bedlington Terriers utilisés dans l'expérimentation.

C) Le test mis en place au LVD 69 et la race Bedlington Terrier en France.

1) Une réponse à la demande des éleveurs français de Bedlington Terriers.

Face au problème que pose l'intoxication au cuivre dans la race Bedlington Terriers, les éleveurs de ces chiens ont décidé d'essayer de l'éradiquer. En France, ils furent confrontés au fait qu'aucun test diagnostique fiable et sans danger pour l'animal n'existait encore dans l'Hexagone. Certains éleveurs français ont donc approché l'Ecole Vétérinaire de Lyon afin d'envisager la mise au point d'un tel test dans notre pays

Suite à leur démarche, et pour répondre à leurs attentes, le LVD 69, dans le cadre de cette thèse, a développé un test diagnostique reposant sur la technique PCR, réalisable à partir de prélèvements sanguins ou de cellules buccales. L'étude de la bibliographie a conduit à choisir le gène *COMMD1* comme gène cible de ce test. Plus précisément ce test recherche la présence de son exon 2 ou sa délétion, cette délétion étant responsable de presque tous les cas d'animaux atteints.

Etant donnée la nature des prélèvements, ce test ne présente pas de risque pour la santé des animaux testés. Basé sur la technique de PCR, il permet d'obtenir des résultats fiables (bonne spécificité et bonne sensibilité) rapidement.

Malgré le fait qu'une infime proportion d'animaux atteints ou porteurs ne seront pas détectés par cette méthode (car présentant une autre étiologie pour leur statut), ce test est utilisable par les éleveurs pour commencer l'éradication de l'intoxication au cuivre chez le Bedlington Terrier.

2) Comparaison du test conçu dans cette thèse avec les tests existants.

Une comparaison des différentes techniques utilisables, à l'heure actuelle, pour le diagnostic de l'intoxication au cuivre chez le Bedlington Terrier est présentée dans le tableau XII. On peut y voir que la méthode PCR recherchant la délétion de l'exon 2 du gène *COMMD1* est la meilleure.

Méthode diagnostique	Signes cliniques	Histologie, cytologie, histochimie	Dosage du cuivre hépatique	Recherche des allèles du microsatellite C04107 par PCR	Recherche de la délétion de l'exon 2 du gène COMMD1 par PCR
Type de prélèvement	Examen clinique	Biopsie hépatique		prise de sang, cellules buccales	
Risque pour l'animal testé	aucun	Risque inérant à la biopsie hépatique : risque anesthésique, risque de perforation d'un vaisseau sanguin important		Faible si prise de sang (septicémie dans de mauvaise conditions de prélèvements) aucun si cellules buccales	
Spécificité du diagnostique	Non spécifique	Spécificité moyenne	Spécificité moyenne	Spécifique si associé à une analyse familiale. Risque d'erreur par crossing over	Très spécifique si les bonnes amorces sont utilisées
Détection des hétérozygotes	impossible	impossible	Parfois une suspicion	possible	possible
Délai avant diagnostique	Long : la maladie ne se déclare que ver 2 à 6 ans	Long : les lésions tissulaires doivent être installées	Long : il faut que le cuivre se soit accumulé dans le foie à des doses supérieures de celles trouvés chez des animaux sains	Court, faisable dès la naissance	

Tableau XII : Comparaison des différentes techniques utilisables pour diagnostiquer l'intoxication au cuivre chez le Bedlington Terrier.

Notre test se base sur le même principe que le test proposé par le laboratoire Animal Health Trust [67] : une PCR point final sur gel recherchant deux séquences, l'une présente quand l'exon 2 l'est, l'autre présente quand cet exon est absent. Mais dans le notre nous n'avons pas jugé utile d'amplifier une troisième séquence qui servirait de témoin d'amplification pour les raisons exposées au paragraphe B)1)c)i).

Le laboratoire américain VetGen [60] propose lui aussi, sur internet, un test diagnostique par PCR pour cette maladie. Son test cible à la fois la délétion de l'exon 2 du gène COMMD1 et le marqueur C04107 (afin de déterminer ses allèles présents). Il ne nous a pas paru nécessaire d'inclure dans notre test une recherche du microsatellite. En effet, ce dernier n'est pas responsable de la maladie et nécessite une analyse familiale pour être utilisé. Sur un chien dont la généalogie n'est pas connu il n'est pas exploitable.

Le test de l'équipe de chercheurs au Pays-Bas [37], est, quant à lui, basé sur une PCR quantitative qui compare les expressions des exons 2 et 3 du gène COMMD1.

3) Conseil quant à l'application du test et au devenir des chiens.

a) Quand réaliser ce test?

Deux cas de figure se présentent quant au moment opportun pour réaliser le test proposé dans cette thèse.

- Le test doit être réalisé sur tout chien rapidement après sa naissance et avant son sevrage. Cela permet de donner une alimentation adaptée, dès le sevrage, des chiens diagnostiqués comme atteints. Leur espérance de vie s'en trouvera allongée.
- A l'heure actuelle, la maladie se répand dans la race du fait de la méconnaissance du statut des reproducteurs. Or la mise en place du test à la naissance ne concernera pas ces animaux déjà adultes. Il faut donc appliquer le test aux reproducteurs actuels de la race.

b) Devenir des chiens.

i) Chien atteint.

Pour un chien atteint, une alimentation pauvre en cuivre et l'administration de chélateurs du cuivre doivent être instaurées le plus rapidement possible afin de réduire la quantité de cuivre que l'organisme a à sa disposition pour stocker.

Une castration ou une ovariectomie permettrait de s'assurer que l'animal ne sera pas employé comme un reproducteur.

Pour les reproducteurs actuels détectés atteints, une dérogation pour une dernière portée peut être envisagée si l'animal possède des qualités exceptionnelles nécessaires à la race. Dans ce cas là, l'accouplement doit avoir lieu avec un individu non porteur de la délétion. Les chiots seront tous porteurs de la délétion et doivent être traités en conséquence. L'animal atteint est ensuite castré ou ovariectomisé

ii) Chien porteur de la délétion.

Prôner le retrait de la reproduction de tous les chiens porteurs de la délétion serait une erreur. En effet si on le faisait, vue la grande prévalence de la délétion dans la race, on risquerait d'avoir des problèmes liés à une consanguinité trop importante dans la race. Il faut arriver à éliminer ces chiens porteurs de la délétion petit à petit.

Un chien porteur de l'anomalie ne présentant pas de bons caractères est à écarter de la reproduction.

Un chien porteur de l'anomalie mais présentant des caractères intéressants à garder au niveau de la race peut être utilisé comme reproducteur. Dans tous les cas ces chiens ne doivent être accouplés qu'à des chiens non porteurs de la délétion. Il est alors judicieux de ne garder dans la portée, pour en faire des reproducteurs, que les chiens ne présentant pas la délétion.

A priori, aucune alimentation spécifique n'est nécessaire pour les chiens de cette catégorie. Il faut néanmoins se souvenir que la délétion de l'exon 2 n'est pas la seule étiologie à l'intoxication au cuivre chez le Bedlington Terrier. Une très faible proportion de chiens détectés comme porteurs de la délétion peuvent développer une intoxication. Il est important de les retirer alors de la reproduction, d'identifier ces chiens et de suivre l'état de santé de leur descendance. Ceci permet d'aider la recherche des autres étiologies de la maladie.

iii) Chien non porteur de la délétion.

Pour les chiens non porteurs de la délétion aucune attention spécifique n'est requise. Ils n'ont pas besoin d'une alimentation particulière. Lors de la mise à la reproduction, il est préférable de les accoupler avec des chiens de même statut, mais un accouplement avec un chien porteur de la délétion est envisageable.

Il faut néanmoins se souvenir qu'une très faible proportion de chiens détectés comme exempts de la délétion peuvent posséder dans leur génome une autre étiologie de l'intoxication au cuivre. S'ils développent cette maladie, il est important de les retirer alors de la reproduction, d'identifier ces chiens et de suivre l'état de santé de leur descendance. La recherche des autres étiologies de la maladie en sera grandement facilitée.

IV) Synthèse

L'utilisation d'échantillons provenant de quinze chiens (treize Bedlington Terriers dont deux atteints d'intoxication au cuivre et deux chiens de races non concernées par cette maladie) a permis la mise au point d'un test de diagnostic moléculaire recherchant la délétion de l'exon 2 du gène *COMMD1*. A cette fin trois stratégies furent successivement envisagées.

L'objectif des deux premières stratégies est de comparer l'expression de l'exon 2 du gène avec l'expression d'une séquence référence (choisie dans l'exon 3). Un chien homozygote sain aura des quantités équivalentes des deux séquences, un chien hétérozygote aura deux fois moins d'exon 2 que d'exon 3 et un chien homozygote malade n'aura pas d'amplification de l'exon 2.

Dans la première stratégie, la comparaison est faite à l'oeil nu, après amplification par une PCR point final et une électrophorèse. Les difficultés rencontrées pour avoir des signaux double et simple doses d'exon 2 bien différents ont conduit à envisager une deuxième stratégie.

Dans la deuxième stratégie, un automate effectue une PCR temps réel et la comparaison de l'expression des exons 2 et 3. Cette stratégie est actuellement en perfectionnement, et une troisième stratégie a été utilisée afin de pouvoir mettre au point un test diagnostique rapidement.

L'objectif de la troisième stratégie est d'amplifier deux séquences : une, témoin de la délétion de l'exon 2, et une, témoin de la présence de cet exon. Ces deux séquences étant de longueurs différentes, il est possible de différencier les trois statuts génétiques de l'intoxication au cuivre due à la délétion de l'exon 2 du gène *COMMD1*. Ces statuts sont communiqués aux éleveurs sous la forme de « atteint d'intoxication au cuivre », « porteur de la délétion de l'exon 2 du gène *COMMD1* » ou « non porteur de la délétion de l'exon 2 du gène *COMMD1* ».

Le test retenu et proposé aux éleveurs français (voire européens) est réalisable sur sang et sur écouvillons buccaux. L'utilisation de ce dernier mode de prélèvement, non invasif et non douloureux, est très intéressante pour des chiens de concours, sur lesquels une tonte, pour la réalisation d'une prise de sang, n'est pas toujours bien acceptée par les éleveurs. De plus, il est ainsi réalisable dès la naissance. De ce fait un régime adapté peut être instauré, au moment du sevrage, pour les chiens détectés atteints.

La lutte contre l'intoxication au cuivre chez le Bedlington Terrier ne doit pas être menée seulement de façon individuelle, avec un traitement à vie pour les chiens atteints, mais elle doit être aussi collective avec le raisonnement des accouplements. La connaissance du statut génétique des chiens vis à vis de la délétion de l'exon 2 du gène *COMMD1* permet cela. Les chiens atteints sont à considérer comme des chiens purement de compagnie et ne sont pas à utiliser comme reproducteurs. Les chiens porteurs de la délétion pourront, dans un premier temps, afin d'éviter des problèmes liés à une trop forte consanguinité, être utilisés comme des reproducteurs. Mais il faut prévoir une éradication à long terme de ces chiens.

Certes la délétion de l'exon 2 du gène COMMD1 n'est pas la seule origine de l'intoxication au cuivre chez le Bedlington Terrier. Mais c'est la seule connue et elle est responsable d'un grand nombre des cas. Sa détection permet donc une éradication raisonnée de la maladie dans cette race, en attendant que les autres causes de l'intoxication au cuivre dans cette race ne soient découvertes.

Conclusion

Les intoxications héréditaires au cuivre existent chez diverses espèces dont la souris, le rat et le chien qui servent de modèles pour la maladie de Wilson chez l'Homme. Elles ont en commun certains symptômes, d'être fatales et de posséder un déterminisme génétique récessif. Il y a trois catégories d'individus vis à vis de ces affections : les animaux sains, les animaux porteurs et les animaux malades. Dans l'espèce canine, dans les races où l'intoxication est très répandue (Bedlington, West Highland White et Skye Terriers, Doberman), il est important de connaître très tôt le statut des chiens. Cela permet la mise en œuvre d'un traitement prophylactique (régime spécifique) sur les chiens déterminés atteints ainsi qu'un programme de gestion raisonnée des accouplements. Mais pour atteindre cet objectif il faut disposer de tests de diagnostic, fiables et pouvant être utilisés précocement. Or les mécanismes sous-jacents ne sont pas toujours bien identifiés, et le diagnostic basé sur les signes cliniques et lésionnels est bien trop tardif et ne permet pas de détecter les porteurs.

Chez certaines espèces, l'origine est néanmoins connue : ainsi chez l'Homme, une mutation du gène *ATP7B* intervient. Chez la race canine Bedlington Terrier, un gène responsable de la quasi totalité des cas d'intoxication au cuivre a été découvert récemment : c'est le gène *COMMD1* dont une délétion de l'exon 2 est présente chez la grande majorité des chiens atteints. Cela permet d'envisager la mise au point d'un test de diagnostic moléculaire.

L'objectif de cette thèse est la conception d'un tel test en France afin de répondre à l'attente des éleveurs français de Bedlington Terriers. Trois stratégies sont successivement envisagées afin de mettre au point une PCR réalisable sur prélèvements sanguins ou de cellules buccales. Dans les deux premières stratégies, une approche comparative de la quantité d'exon 2 et d'exon 3 du gène *COMMD1* est conduite afin de détecter les animaux atteints (ne présentant pas d'exon 2), les chiens porteurs (pour lesquels il y a deux fois plus d'exon 3 que d'exon 2) et les animaux sains (chez qui aucune différence entre les deux exons n'existe). Afin de pouvoir rapidement fournir un test à l'usage des éleveurs, une troisième stratégie a été proposée. Dans celle-ci une PCR point final cible deux séquences : l'une n'existe que si l'exon 2 est présent, l'autre n'est amplifiée que si la délétion de l'exon 2 a eu lieu. Cette méthode permet de détecter, précocement et de manière fiable, les animaux atteints et les animaux porteurs. Ainsi, un régime alimentaire adapté peut être instauré dès le sevrage chez les chiens atteints ce qui augmente leur espérance de vie.

Le test mis au point au LVD 69 dans le cadre de cette thèse est un outil au service des éleveurs français pour lutter contre l'intoxication au cuivre chez le Bedlington Terrier. En effet, il est utilisable dès la naissance, ce qui permet de différencier très rapidement les chiens qui seront purement de compagnie et les chiens futurs reproducteurs.

De récentes découvertes ont néanmoins montré l'existence d'autres gènes impliqués dans l'apparition de cette maladie. Il faut donc garder à l'esprit que des animaux ne présentant pas la délétion peuvent quand même être concernés par cette affection. Il en découle que ce test ne résoudra pas entièrement le problème mais il y contribuera fortement en permettant une éradication raisonnée.

Le professeur responsable
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon
F. GRAIN

Vu : le Directeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon

Pour le Directeur et par délégation,
LA DIRECTRICE DE L'ENSEIGNEMENT

Professeur Françoise GRAIN

Le Président de la thèse
Pr. A CALENDER

Vu et permis d'imprimer

Lyon le - 9 NOV. 2009

Pour le Président de l'Université,
Le Président du Comité de Coordination des
Etudes Médicales,
Professeur F.N GILLY

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON I

Bibliographie

[1] Ala, A. Walker, A.P. Ashkan, K. Dooley, J.S. Schilsky, M.L. (2007) Wilson's disease. *The Lancets*, 369, 397-408

[2] Balkema, S. Hamaker, M.E. Visser, H.P.J. Heine, G.D.N. Beuers, U. (2008) Haemolytic anaemia as a first sign of Wilson's disease. *The Netherlands Journal of Medicine,* 66, 8, 344-347

[3] Brewer, G.J. Dick, R.D. Schall, W. Yuzbasiyan-Gurkan, V. Mullaney, T.P. Pace, C. Lindgren, J. Thomas, M. Padgett, G. (1992) Use of zinc acetate to treat copper toxicosis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 201, 564-568

[4] Burstein, E, Hoberg, J.E. Wilkinsont, A.S. Rumbleţ, J.M. Csomos, R.A. Komarck, C.M. Maine, G.N. Wilkinsonţ, J.C. (2005) COMMD Proteins, a Novel Family of Structural and Functional Homologs of MURR1. *The journal of biological chemistry*, 280, 23, 22222-22232

[5] Coronado, V.A. Cox, D.W. Nanji, M. (2001) ATP6H, a subunit of vacuolar ATPase involved in metal transport : evaluation in canine copper toxicosis. *Mammalian Genome,* 12, 617-621

[6] Coronado, V.A. Damaraju, D. Kohijoki, R. Cox, D.W. (2003) New haplotypes in the Bedlington Terrier indicate complexity in copper toxicosis. *Mammalian Genome,* 14, 483-491

[7] Crawford, M.A. Schall, W.D. Jensen, R.K. Tasker, J.B. (1985) *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 187, 12, 1343-1350

[8] de Bie, P. van de Sluis, B.J.A. Klomp, L. Wijmenga, C. (2005) The Many Faces of the Copper Metabolism Protein MURR1/COMMD1. *Journal of Heredity,* 96, 803-811

[9] Denis, B. Colas, G. (1997) Génétique et sélection chez le Chien. PMCAC-CNVSPA, Paris, 225p

[10] Eriksson, J. Peura, R. (1989) Verifying Copper Toxicosis in Bedlington Terriers by Analytical Electron Microscopy of Needle Biopsies of Liver. *Journal* of Comparative Pathology, 100, 443-448

[11] Foreman, P. Boursnell, M.E.G. Dunmore, B.J. Stendall, N. van de Sluis, B.J.A. Fretwell, N. Jones, P. Wijmenga, C. Rothuizen, J. van Oost, B.A. Holmes, N.G. Binns, M.M. (2005) Characterization of the COMMD1 (MURR1) mutation causing copper toxicosis in Bedlington Terriers. *Animal Genetics,* 36, 497-501

[12] Frieden, E. Osaki, S. Kobayashi, H. (1965) Copper Proteins and Oxygen. Correlations between structure and function of the copper oxidases. *The journal of general physiology*. 49, 213-252

[13] Fuentealba, C. Aburto, E.M. (2003) Animal models of copper-associated liver diseases. *Comparative hepatology*. 2, 1, 5-17

[14] Guyonneau, O. (1995) La pathologie d'origine génétique chez les chiens des 3ème et 4ème groupes. Thèse de doctorat vétérinaire, Maisons-Alfort, 143p

[15] Harvey, D.G. (1962) Biochemistry for veterinary students. Blackwell scientific publications, Oxford, 356p

[16] Haywood, S. Rutgers, H.C. Christian, M.K. (1988) Hepatitis and Copper Accumulation in Skye Terriers. *Veterinary Pathology*, 25, 408-414

[17] Hennen, G. (1996) Biochimie humaine : introduction biochimique à la médecine interne. De Boeck université, Bruxelles, 792p

[18] Hutgren, B.D. Stevens, J.B. Hardy, R.M. (1986) Inherited, chronic, progressive hepatic degeneration in Bedlington Terriers with increased liver copper concentrations : Clinical and pathologic observations and comparison with other copper-associated liver diseases. *American Journal of Veterinary Research*, 47, 365-378

[19] Hyun, C. Filippich, L.J. (2002) Inherited Copper Toxicosis in a Bedlington Terrier. *Australian Veterinary Practice,* 32, 152-159

[20] Hyun, C. Folippich, L.J. (2004) Inherited canine copper toxicosis in Australian Bedlington Terriers. *Journal of Veterinay Science,* 5, 19-28

[21] Hyun, C. Lavulo, L.T. Filippich, L.J. (2004) Evaluation of haplotypes associated with copper toxicosis in Bedlington Terriers in Australia. *American Journal of Veterinary Research,* 65, 1573-1579

[22] Johnson, G.F. Zawie, D.A. Gilbertson, S.R. Sternlieb, I. (1982) Chronic active hepatitis in Doberman Pinschers. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 180, 12, 1438-1442

[23] Johnson, G.F. Gilbertson, S.R. Goldfischer, S. Grushoff, P.S. Sternlieb, I. (1984) Cytochemical Detection of Inherited Copper Toxicosis of Bedlington Terriers. *Veterinary Pathology,* 21, 57-60

[24] Kahn, C.M. (2005) The Merck veterinary manual - 9th Edition, Merck & Co, Whitehouse station, 2712p

[25] Klomp, A.E.M. van de Sluis, B.J.A. Klomp, L.W.J. Wijmenga, C. (2003) The ubiquitously expressed MURR1 protein is absent in canine copper toxicosis. *Journal of Hepatology,* 39, 703-709

[26] Shin-aeh, L. Hyun, C. Filippich, L.J. (2007) Prevalence of the exon 2 deletion of the COMMD1 gene in Australian Bedlington terriers . *Journal of Genetics*, 86, 3, 289-291

[27] MANN, K. G. LAWLER, C. M. VEHAR, G. A. CHURCH, W. R. (1984) Coagulation factor V contains copper ion. *The Journal of biological chemistry,* 259, 21, 12949-12951

[28] Mayes, P.A. (2002) Oxydation biologique. In : Murray, R.K. Granner, D.K. Mayes, P.A. Rodwell, V.W. (eds) Biochimie Harper, Les presses de l'Université Laval, Bruxelles, 130-136

[29] Mayes, P.A. (2002) Nutrition. In : Murray, R.K. Granner, D.K. Mayes, P.A. Rodwell, V.W. (eds) Biochimie Harper, Les presses de l'Université Laval, Bruxelles, 653-661

[30] Oksanen, A. (1972) Familial Nephropathy with secondary hyperparathyroïdism in 3 young dogs. *Nordisk Veterinaermedicin*, 24, 278-280

[31] Owen, C.A. McCall, J.T (1982) Identification of carrier of Bedlington Terrier copper disease. *American Journal of Veterinary Research*, 44, 694-697

[32] Proschowsky, H.F. Jepsen, B. Jensen, A.L. Fredholm, M. (2000) Microsatellitte Marker C04107 as a Diagnostic Marker for Copper Toxicosis in the Danish Population of Bedlington Terriers. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 41, 345-350

[33] Rand, M.L. Murray, R.K. (2002) Protéines plasmatiques, immunoglobulines et coagulation sanguine. In : Murray, R.K. Granner, D.K. Mayes, P.A. Rodwell, V.W. (eds) Biochimie Harper, Les presses de l'Université Laval, Bruxelles, 737-762

[34] Roberts, E.A. Cox, D.W. (1998) Wilson Disease. *Baillière's Clinical Gastroenterology,* 12, 2, 237-256

[35] Robertson, H.M. Studdert, V.P. Reuter, R.E. (1983) Inherited copper toxicosis in Bedlington Terriers. *Australian Veterinary Journal*, 60, 235-238

[36] Rondeau, S.C.J. (2004), Etude bibliographique de l'hépatite chronique du Doberman. Thèse de doctorat vétérinaire, Université Paul Sabatier, Toulouse, 91p

[37] Rothuizen, J. Brinkhof, B. Penning, L.C. Spee, B. Favier, R.P. (2005) Quantitative PCR method to detect a 13-kb deletion in the MURR1 gene associated with copper toxicosis and HIV-1 replication. *Mammalian Genome,* 16, 460-463

[38] Su, L-C. Ravanshad, S. Owen, C.A. McCall, J.T. Zollman, P.E. Hardy, R.M. (1982) A comparaison of copper-loading disease in Bedlington Terriers and Wilson's disease in humans. *The American Journal of Physiology*, 243, G226-G230

[39] Teske, E. Brinkhuis, B.G.A.M. Bode, P. van den Ingh, Th. S.G.A.M. Rothuizen, J. (1992) Cytological detection of copper for the diagnosis of inherited copper toxicosis in Bedlington Terriers. *The Veterinary Record*, 131, 30-32

[40] Thornburg, L.P. Shaw, D. Dolan, M. Raisbeck, M. Crawford, S. Dennis, G.L. Olwin, D.B. (1986) Hereditary Copper Toxicosis in West Highland White Terriers. *Veterinary Pathology*, 23, 148-154

[41] Twedt, D.C. Sternlieb, I. Gilberston, S.R. (1979) Clinical, Morphologic, and Chemical Studies on Copper Toxicosis of Bedlington Terriers. *Journal of the American Veterinary Medical Association,* 175, 269-276

[42] Twedt, D.C. Hunsaker, H.A. Allen, K.G.D. (1988) Use of 2,3,2-tetramine as a hepatic copper chelating agent dor treatment of copper hepatotxicosis in Bedlington Terriers. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 192, 52-56

[43] Ubbink, G.J. Rothuizen, J. van Zon, P. van den Ingh, T.S.G.A.M. Yuzbasiyan-Gurkan, V. (1998) Molecular diagnosis of copper toxicosis in Bedlington Terriers. *The Veterinary Quarterly*, 20, suppl 1, 91-92

[44] van de Sluis, B.J.A. Breen, M. Nanji, M. van Wolferen, M. de Jong, P. Binns, M.M. Pearson, P.L. Kuipers, J. Rothuizen, J. Cox, D.W. Wilmenga, C. van Oost, B.A. (1999)

Genetic mapping of the copper toxicosis locus in Bedlington Terriers to dog chromosome 10, in a region syntenic to human chromosome region 2p13-p16. *Human molecular Genetics,* 8, 501-507

[45] van de Sluis, B.J.A. Kole, S. van Wolferen, M. Holmes, N.G. Pearson, P.L. Rothuizen, J. van Oost,, B.A. Wijmenga, C. (2000) Refined genetic and comparative physical mapping of the canine copper toxicosis locus. *Mammalian Genome,* 11, 455-460

[46] van de Sluis, B.J.A. Rothuizen, J. Pearson, P.L. van Oost, B.A. Wilmenga, C. (2001) Identification of a new copper metabolism gene by positional cloning in a purebred dog population. *Human molecular Genetics,* 11, 165-173

[47] van de Sluis, B.J.A. Peter, A.T. Wijmenga, C. (2003) Indirect Molecular Diagnosis of Copper Toxicosis in Bedlington Terriers Is Complicated by Haplotype Diversity. *Journal of Heredity,* 94, 256-259

[48] van Lierde, H. (1989) Vademecum biologique du vétérinaire. Prodim, Bruxelles, 612p

[49] Villot, L. (2005) Contribution à l'étude de la race Bedlington Terrier. Thèse de doctorat vétérinaire, Université Paul Sabatier, Toulouse, 212p

[50] Yuzbasiyan-Gurkan, V. Halloran Blanton, S. Cao, Y. Ferguson, P. Li, J. Venta, P.J. Brewer, G.J. (1997) Linkage of a microsatellite marker to the canine copper toxicosis locus in Bedlington Terriers. *American Journal of Veterinary Research*, 58, 23-27

[51] Yusbazian-Gurkan, V. et al. (1999) The canine copper toxicosis locus is not syntenic with ATP7B or ATX1 and maps to a region showing homology to human 2p21. *Mammalian Genome*, 10, 753-756

[52] Le Club Français de l'Airedale terrier et de Divers Terriers,(page consulté le 24 octobre 2008),CFAT-DT, [en ligne]. Adresse URL : http://www.cfatdt.fr/stframebedlington.htm

[53]NCBI, (page consultée le 11 avril 2005), COMMD1 copper metabolism (Murr1) containing 1, [en ligne]. Adresse URL : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=retrieve&dopt=full_report&list_uids=403590&log$=databasead&logdbfrom=nuccore

[54] The Bedlington Terrier club of America, inc, (page consultée le 25 octobre 2008), Health and wellness topics, [en ligne]. Adresse URL : http://bedlingtonamerica.com/health/topics.htm

[55] Dolisi Georges, (page consultée le 13 octobre 2009), BIO-TOP, [en ligne], Adresse URL : http://georges.dolisi.free.fr/Terminologie/U/urico.htm

[56] Medix cours de médecine, (page consultée le 13 octobre 2009), Medix cours de médecine, [en ligne], Adresse URL : http://www.medix.free.fr/sim/metabolisme-hepatique-metaux.php

[57] Canine Eye Registration Foundation, (page consultée le 17 octobre 2009), diagnostic spotlight, [en ligne], Adresse URL : http://www.vmdb.org/dxspot.html

[58] Clinilab, laboratoires d'analyses de biologie médicale (page consultée le 15 octobre 2009), laboratoire de cytopathologie, [en ligne], Adresse URL : http://www.clinilab.fr/cytopathologie.html

[59] Cordier-Alex M-P pour l'Encyclopédie Orphanet (page consultée le 13 octobre 2009), La maladie de Menkes, [en ligne], Adresse URL : http://www.orpha.net/data/patho/FR/fr-menkes.html

[60] Crance Maryline, (page consultée le 14 octobre 2009), Soft like a lamb, [en ligne], Adresse URL : http://softlikealamb.chiens-de-france.com/site_eleveur/in *The Lancets* dex.php?ID_ELEVEUR=13549&ID_SITE=15067

[61] Deby, C. Dedy-Dupont, G. (CORD), (page consultée le 17 octobre 2009), L'oxygène et la vie : tome 1 – Initiation au métabolisme de l'oxygène. Chapitre IX : Principaux complexes métalliques inervenant en biochimie de l'oxygène. [en ligne], Adresse URL : http://www2.ulg.ac.be/cord/initiation%20au%20met%20oxygene/complmet.html

[62] Oinussa Bedlingtons, (page consultée le 14 octobre 2009), [en ligne], Oinussa Bedlingtons, Adresse URL : http://www.oinnusa.com/marcos.htm

[63] Orthopedic Foundation for Animals, (page consultée le 17 octobre 2009), Patellar luxation statistics, [en ligne], Adresse URL : http://www.offa.org/patluxstatbreed.html

[64] Raffaella Gamella, (page consultée le 14 octobre 2009), Colacoda Bedlingtons, [en ligne], Adresse URL : http://www.colacoda.it

[65] VetGen Veterinar Genetic Services, (page consultée le 17 octobre 2009), CT-deletion, [en ligne], Adresse URL : http://www.vetgen.com/canine-ct-deletion.html

[66] Wikipedia, (page consultée le 14 octobre 2009), Fichier:Bedlington Terriers.jpeg, [en ligne], Adresse URL : http://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Bedlington_Terriers.jpg

[67] Animal Health Trust, (page consultée le 31 octobre 2009), DNA Test for Copper Toxicosis in Bedlington Terriers , [en ligne], Adresse URL : http://www.aht.org.uk/genetics_toxicosis.html

[68] LABOKLIN Laboratory for clinical diagnostics, (page consultée le 31 octobre 2009), Copper Toxicosis, [en ligne], Adresse URL : http://www.laboklin.co.uk/laboklin/showGeneticTest.jsp?testID=8000

[69] GenTest veterinary genetic services, (page consultée le 31 octobre 2009), GenTest proudly providing VetGen's New Genetic Test for Copper Toxicosis-CT-Deletion in Bedlington Terriers, [en ligne], Adresse URL : http://members.optusnet.com.au/~gentest/ct2.html

[70] IDEXX Laboratories, (page consultée le 31 octobre 2009), Veterinary DNA, DNA-based Diagnostic Tests, [en ligne], Adresse URL : http://www.idexx.ca/dnabasedtests.cfm

Annexes

Annexe 1 : Liste des réactifs utilisés.

		Dénomination	Fournisseur
Kits d'extractions		Nucleospin® Blood Quick Pure	Macherey Nagel
		Nucleospin® Tissue XS	Macherey Nagel
		Nucleospin® extract II	Macherey Nagel
PCR point final	Amplification	Amorces	Eurogentec
		Ultrapure dNTP set® 2'Deoynucleoside5'triphosphate	Amersham Pharmacia Biotech
		• Red taq DNA • Tampon • $MgCl_2$	Sigma
	Electrophorèse	Agarose	Sigma
		Bromure d'éthidium	Sigma
		Ladder 100pb	promega
		Tampon : TBE10X	euromedex
Q-PCR		kit LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche

Annexe 2 : Mode d'emploi des kits d'extraction

	Mode opératoire	MO.BM 01/1
	Extraction manuelle ADN /sang /kit Nucleospin blood quick pure (Macherey Nagel)	Page 1/1

pour le sang pas de prétraitement de l'échantillon

allumer le thermo block à 70°C
préchauffer le tampon d'élution à 70°C

1-Lyse

pipeter 200µl de sang total
ajouter 200µl de BQ1 et 25µl de protéinase K
vortexer centrifuger
incuber 10mn à 70°C centrifuger

2-Adsorption sur colonne

ajouter 200µl éthanol absolu vortexer centrifuger
déposer la totalité sur la colonne
centrifuger 1mn à 13200rpm
jeter l'éluat

placer la colonne sur un tube collecteur neuf

3-Lavage

ajouter 350µl de BQ2
centrifuger 3mn à 13200rpm
jeter l'éluat

placer la colonne sur un tube eppendorf de 1,5ml

4-Elution

ajouter 50µl de tampon d'élution BE (préchauffé à 70°C)
laisser 1mn a température ambiante
centrifuger 1mn à 13200rpm

jeter la colonne et conserver l'extrait à -20°C

Allumer le thermo block (portoir pour tubes eppendorf 1.5ml) à 70°C et le thermo block (portoir pour tubes eppendorf 0.5ml) à 56°C
(Si thermo block avec portoir pour tubes 0.5ml non disponible, l'étape de prélyse peut se faire sur le Perkin Elmer (File 46))

1-Prélyse

Couper l'écouvillon ou la cytobrosse avec une paire de ciseaux ou une pince coupante dans un eppendorf de 0.5ml
Ajouter 200µl de Tampon T1 + 25µl de protéinase K
Vortexer 1 mn
Incuber 30 mn à 56°C en laissant l'écouvillon dans le tube

Presser l'écouvillon contre les parois avec une pince
Retirer l'écouvillon

Transférer le lysat dans un eppendorf de 1.5ml

2-Lyse

Ajouter au lysat 200µl de B3
Vortexer 2*10 sec
Incuber 10mn à 70°C

3-Ajustement des conditions d'adsorption

Ajouter 200µl d'éthanol absolu
Vortexer 2*5 sec

4-Adsorption sur colonne

Déposer la totalité sur la colonne
Centrifuger 1 mn à 13200rpm
Jeter l'éluat

placer la colonne sur un tube collecteur neuf

5-Lavages

Ajouter 50µl de tampon B5
Centrifuger 1 mn à 13200rpm

Ajouter 50µl de tampon B5
Centrifuger 2 mn à 13200rpm
Jeter l'éluat

placer la colonne sur un tube eppendorf 1,5ml

6-Elution

Ajouter 20µl de tampon d'élution BE
Centrifuger 1mn à 13200rpm

jeter la colonne

7-Evaporation des résidus d'éthanol

Laisser le tube eppendorf 2 mn à 70°C, bouchon ouvert

Conserver l'extrait à -20°C

PURIFICATION D'ADN A PARTIR DE GELS D'AGAROSE OU DE PRODUITS PCR (kit MN Nucleospin Extract II)

I. Préparation de l'échantillon ADN

A partir de gels d'agarose :

1) Prélèvement du fragment d'ADN

- Prélever le fragment d'ADN du gel d'agarose (« pipettes » X-tracta, Starlab) en prenant le moins de gel possible

2) Lyse du gel

- Ajouter 200µl de tampon NT pour 100mg de gel d'agarose
- Incuber 5 à 10mn à 50°C jusqu'à dissolution du gel
- Vortexer 2-3mn jusqu'à complète dissolution

A partir de produits PCR :

1) Ajustement des conditions d'adsorption

- Ajouter 2 volumes de tampon NT pour 1 volume d'échantillon

II. Adsorption

- Appliquer l'échantillon sur une colonne Nucleospin Extract II
- Centrifuger 1mn à 13200rpm
- Jeter l'éluat et placer la colonne sur le même tube collecteur

III. Lavages

- Ajouter 600µl de tampon NT3
- Centrifuger 1mn à 13200rpm
- Jeter l'éluat et placer la colonne sur le même tube collecteur

IV. Séchage de la membrane

- Centrifuger 2 mn à 13200rpm

V. Elution

- Placer la colonne sur un tube de 1.5ml
- Ajouter 15 à 50µl de tampon d'élution NE (optionnel : préchauffer le tampon NE à 70°C pour les fragments >5kb)
- Incuber à température ambiante 1mn
- Centrifuger 1mn à 13200rpm

Annexe 3 : Tableaux indiquant le numéro de la PCR, le(s) chien(s) utilisé(s), les conditions de PCR (nature et concentration des amorces, concentration en $MgCl_2$, température d'hybridation) et la taille attendue des fragments amplifiés.

Stratégie 1 : Point final

Nom de la PCR	animaux	[$MgCl_2$] en mM	température(s) en °C	Amorces ciblant l'exon 2 (concentration en µM)	Amorces ciblant l'exon 3 (concentration en µM)	Tailles attendues des produits d'amplifica-tion (pb)
PCR 1	CN 14	1 / 1,5 / 2	52; 53; 54; 55	CT2s1-CT2as2 (0,4)		553
PCR 2	CN 14	1	55; 56; 57	CT2s1-CT2as2 (0,4)		553
PCR 3	CN 14	1 / 1,5	53; 54; 55; 56; 57	CT1s1-CT1as2 (0,4)		956
PCR 4	CN 14	1 / 1,5	55; 56; 57; 58	CT1s1-CT2as2 (0,4)		1106
PCR 5	CN 14	1 / 1,5	55; 56; 57; 58; 59	CT2s1-CT1as2 (0,4)		403
PCR 6	CN 14	1 / 1,5 / 2	53; 54; 55; 56; 57		EX3s1-EX3as2 (0,4)	107
PCR 7	CN 14	1 / 1,5	56; 57; 58	CT2s1-CT1as2 (0,4)	EX3s1-EX3as2 (0,4)	403 107
PCR 8	CN 14 CN 4	1 / 1,5	56; 57; 58	CT2s1-CT1as2 (0,3)	EX3s1-EX3as2 (0,3)	403 107
PCR 9	CN 14 CN 4	1 / 1,5	56; 57; 58	CT2s1-CT1as2 (0,3)	EX3s1-EX3as2 (0,3)	403 107
PCR 10	CN 14 CN 1 CN 2 CN 3 CN 4 CN 6	1	57	CT2s1-CT1as2 (0,3)	EX3s1-EX3as2 (0,3)	403 107
PCR 11	CN 14 CN 3 CN 4	1	56; 57; 58	CT2s1-CT1as2 (0,3)	EX3s1-EX3as2 (0,2)	403 107
PCR 12	CN 14 CN 3 CN 4	1	56; 57; 58	CT2s1-CT1as2 (0,4)	EX3s1-EX3as2 (0,2)	403 107
				CT2s1-CT1as2 (0,3)	EX3s1-EX3as2 (0,1)	
PCR 13	Tous sauf CN 15	1	56	CT2s1-CT1as2 (0,3)	EX3s1-EX3as2 (0,1)	403 107
PCR 14	CN 14 CN 15	1	56	CT2s1-CT1as2 (0,3)	EX3s1-EX3as2 (0,1)	403 107

Stratégie 2 : PCR point final dont les produits sont utiliser pour la Q-PCR.

Nom de la PCR	animaux	[$MgCl_2$] en mM	température en °C	Amorces utilisées (concentration en mM)	Tailles attendues des produits d'amplification (pb)
PCR 15	CN 14	1	56	EX3s1-EX3as2 (0,3)	107
PCR 16	CN 14	1	56	CT2s1-CT1as2 (0,3)	403

Stratégie 3 : Point final

Nom de la PCR	animaux	[$MgCl_2$] en mM	température(s) en °C	Concentration en mM des amorces CT2s1-CT1as2	Concentration en mM des amorces INTs1-INTas2	Tailles attendues des produits d'amplification (pb)
PCR 17	CN 3	1 / 1,5	53; 54; 55; 56; 57		0,4	804
PCR 18	CN 15 CN 3 CN 4 CN 8 CN 11	1	56		0,4	804
PCR 19	CN 8	1	56	0,3	0,3	403 804
				0,3	0,2	
				0,2	0,3	
				0,4	0,2	
				0,2	0,4	
PCR 20	CN 15 CN 3 CN 8	1	56	0,4	0,2	403 804
				0,4	0,1	
PCR 21	CN 8	1	54; 55; 56; 57; 58	0,4	0,1	403 804
PCR 22	CN 8	1	58; 59; 60; 61	0,4	0,1	403 804
PCR 23	Tous sauf CN 15	1	59	0,4	0,1	403 804
PCR 24	CN 1 CN 8 CN 9 CN 13	1	59	0,4	0,1	403 804

Annexe 4 : Tableau indiquant le numéro de la PCR, les échantillons analysés et les amorces utilisées pour chaque Q-PCR.

Nom de la PCR	Échantillons	Amorces
Q-PCR 1	Triple exemple de chacune des dilutions suivantes de la séquence de l'exon 3 issu de la PCR 14 : 10^{-5}; 10^{-6}; 10^{-7}; 10^{-8}; 10^{-9}; 10^{-10}; 10^{-11}	EX3s1-EX3as2
Q-PCR 2	Triple exemple de chacune des dilutions suivantes de la séquence de l'exon 3 issu de la PCR 14 : 10^{-5}; 10^{-6}; 10^{-7}; 10^{-8}; 10^{-9}; 10^{-10}; 10^{-11}	CT2s1-CT1as2
Q-PCR 3	Dilution à 10^{-7} des exons 2 et 3 CN 14, CN 3, CN 6, CN 10	EX3s1-EX3as2 CT2s1-CT1as2
Q-PCR 4	Dilution à 10^{-7} des exons 2 et 3 CN 1, CN 2, CN 4, CN 5, CN 7, CN 8, CN 9, CN 11, CN 12, CN 13	EX3s1-EX3as2 CT2s1-CT1as2

Annexe 5 : Protocole du test PCR pour la recherche de l'intoxication au cuivre du Bedlington Terrier.

1) Obtention de l'échantillon d'ADN.

Prélever du sang de l'animal à tester sur un tube à EDTA ou bien faire deux écouvillons buccaux pour cet animal. Envoyer le ou les prélèvements au laboratoire réalisant le test.

2) Extraction de l'ADN

a) A partir d'un échantillon de sang.

Extraire l'ADN grâce au kit Nucléospin II.

b) A partir des écouvillons buccaux.

Extraire l'ADN grâce au kit Nucléospin II tissu mou.

3) Conservation de l'ADN.

Conserver l'ADN extrait à -18°C le temps voulu.

4) Réalisation de la PCR temps final.

a) La préparation du mélange.

Mélanger dans un tube:

- 3µL de tampon à 1X
- 1,2µL de $MgCl_2$ à 1mM
- 0,6µL de dNTP à 200µM
- 0,9µL de Taq à 0,03u/µL
- 1,2µL de INT1s à 0,4µM
- 1,2µL de INT2as à 0,4µM
- 0,3µL de CT2s1 à 0,1µM
- 0,3µL de CT2as1 à 0,4µM
- 1µL d'extrait d'ADN à tester
- de l'eau pour atteindre 30µL

a) Programme du thermocycleur

Rentrer dans le thermocycleur le programme suivant:

- 3min à 94°C
- 1min à 94°C
- 1min à 59°C
- 1min à 72°C
- 10min à 72°C
- 8°C jusqu'à récupération du tube pour dépôt sur gel à électrophorèse.

1) Révélation.

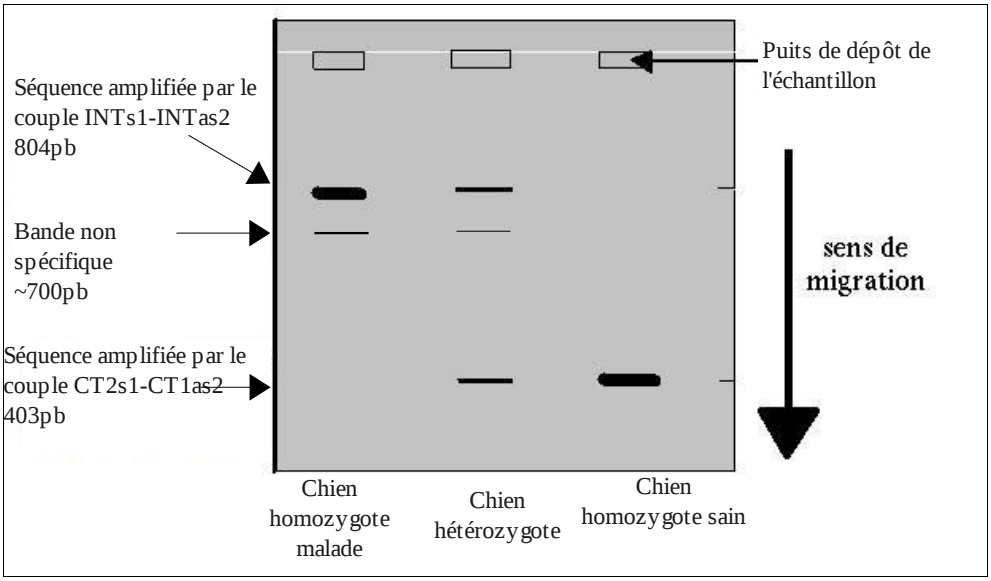
La révélation se fait par une électrophorèse sur gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium.

Déposer le contenu des tubes dans les puits du gel puis faire migrer.

2) Lecture du résultat.

Elle se fait sous lampe à ultra-violet.

La figure ci dessous donne le statut du chien en fonction de l'aspect sur le gel après migration.



Nom, Prénom :

Rampaud Audrey Emilie Nicole

Titre :

L'intoxication héréditaire au cuivre dans la race Bedlington Terrier :
mise au point d'un test diagnostic moléculaire.

Thèse vétérinaire : Lyon, le 4 Décembre 2009

Résumé :

L'intoxication au cuivre chez le Bedlington Terrier est une maladie héréditaire fatale, à déterminisme génétique autosomal récessif, très répandue dans cette race canine. La délétion d'une partie d'un gène est responsable de la majorité des cas rencontrés. Aucun test diagnostique fiable et réalisable précocement n'existe en France.
L'objectif de ce travail a consisté en la réalisation d'un test PCR permettant de détecter cette délétion à partir d'une prise de sang ou d'un écouvillon buccal. Ce test permet de distinguer les chiens non porteurs de la délétion, porteurs de la délétion ou malades.

Mots clés :

- Canin
- Bedlington
- Cuivre
- Intoxication
- Héréditaire
- Biologie moléculaire
- Diagnostic
- PCR

Jury :

Président : Monsieur le Professeur Alain CALENDER

1er assesseur : Madame la Professeur Françoise GRAIN
2ème assesseur : Monsieur le Professeur Philippe BERNY

Date de la soutenance :

le 4 décembre 2009

Adresse de l'auteur :

142 avenue Pierre Dumont
69 009 Craponne