

# LA RÉTINOPATHIE DU BORDER COLLIE, UNE MALADIE HÉRÉDITAIRE MAIS UN GÈNE DIFFICILE A ISOLER

## RETINOPATHY IN THE BORDER COLLIE, AN INHERITED DISEASE BUT A GENE THAT IS DIFFICULT TO MAP

Par Gilles CHAUDIEU<sup>1</sup> et Pascale QUIGNON<sup>2</sup>

(Communication présentée le 17 juin 2021, manuscrit accepté le 21 juin 2022)

### RÉSUMÉ

Certains Border Collies âgés en moyenne de 4 ans, surtout des mâles, présentent des lésions rétinienne atrophiques focales ou généralisées. Leur suivi montre une progression lésionnelle et l'examen histologique confirme leur nature. L'hypothèse d'une transmission héréditaire liée au chromosome X est renforcée par une analyse de liaison génétique mettant en évidence une région sur ce chromosome. Le séquençage du génome complet « *short-read* » de plusieurs chiens identifie un grand nombre de variants communs répondant aux critères de ségrégation. Le séquençage « *long read* » devrait permettre de détecter d'éventuelles altérations génomiques de grande taille. La variabilité du phénotype pouvant rendre difficile l'identification des variants, une sélection stricte des cas a été opérée. Par ailleurs, le choix des reproducteurs recommandé par le Club de race sur la base du mode de transmission présumé a diminué la fréquence des chiens atteints de 20 % en 2001 à 7,4% en 2019.

**Mots-clefs :** atrophie progressive de la rétine, Border Collie, chien, génétique, ophtalmologie.

### ABSTRACT

*Some Border Collies, essentially males on average 4-year-old, exhibit focal or generalized retinal atrophic lesions. A following survey revealed progressive lesions and histopathology examination confirmed retinal degeneration. The hypothesis of a X-linked inheritance is supported by a genetic linkage study highlighting the X chromosome. Whole genome sequencing (« short read ») of several dogs identifies variants segregating as expected. The « long read » would allow the identification of structural variants. Variability in the phenotype might induce difficulties to point out common variants in affected dogs. Thus, a strict selection of the cases has been performed. In addition, the selection of breeding dogs on the basis of the X-linked inheritance by the French Border Collie Kennel Club enabled to decrease the frequency of the affected dogs from 20% (2001) to 7,4% (2019).*

**Key-words:** Border Collie, dog, genetics, ophthalmology, progressive retinal atrophy

## INTRODUCTION

Une atrophie rétinienne multifocale (rétinopathie) a été identifiée dans la population française de Border Collies depuis le début des années 1990. Son phénotype, son évolution, son mode de transmission présumé ont été décrits dans plusieurs publications (Chaudieu, 2001 ; Vilboux *et al.* 2008 ; Chaudieu *et al.* 2014). À partir d'observations réalisées dans cet effectif, la

première description de la maladie avait été présentée au Congrès de la Société Française d'Ophtalmologie il y a presque trente ans (Chaudieu, 1998). La maladie est maintenant décrite dans d'autres populations de Border Collies, notamment dans les pays d'Europe du Nord et en Amérique du Nord, sous l'appellation de rétinopathie des chiens de travail ; son origine héréditaire présumée y est fortement discutée (Aguirre & Kazacos, 2021).

1. Gilles Chaudieu, DV, spécialiste en ophtalmologie, 18 allée de la Brune 63122 Ceyrat. Courrier : [gilles.chaudieu@gmail.com](mailto:gilles.chaudieu@gmail.com)

2. Pascale Quignon, PhD, UMR 6290-CNRS, Université de Rennes 1 35043 Rennes cedex



## DONNÉES CLINIQUES ET HISTOPATHOLOGIQUES

Le phénotype de rétinopathie (multi)focale se caractérise par une variabilité lésionnelle dans la symétrie (lésions uni- ou bilatérales) et la morphologie (lésions atrophiques focales

rondes ou ovales, de réflexion différente de celle du fond d'œil, le plus souvent bien délimitées mais pas toujours) (Figure 1A). Le phénotype précoce (lésions focales en nombre variable, souvent faible) peut s'exprimer soit sur un œil, soit sur les deux yeux (Figure 1B).

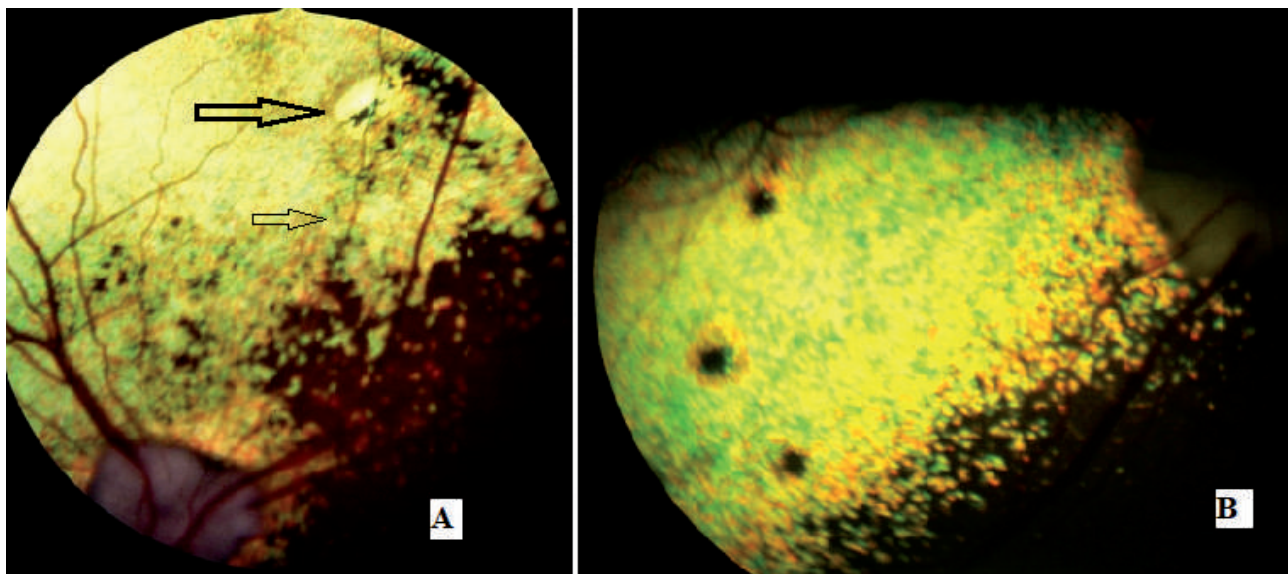


Figure 1A : Border Collie mâle âgé de 3 ans. Lésion délimitée (flèche grasse), lésion à contours moins nets (flèche fine)

Figure 1B : Border Collie mâle âgé de 2 ans, œil droit. Lésions focales unilatérales du tapis périphérique (bilatérales à l'examen renouvelé 2 ans plus tard), centrées sur une zone pigmentée.

L'évolution vers des lésions coalescentes ou une atteinte diffuse et un phénotype APR (Atrophie Progressive de la Rétine) est possible (Figure 2) mais n'est pas une règle absolue.

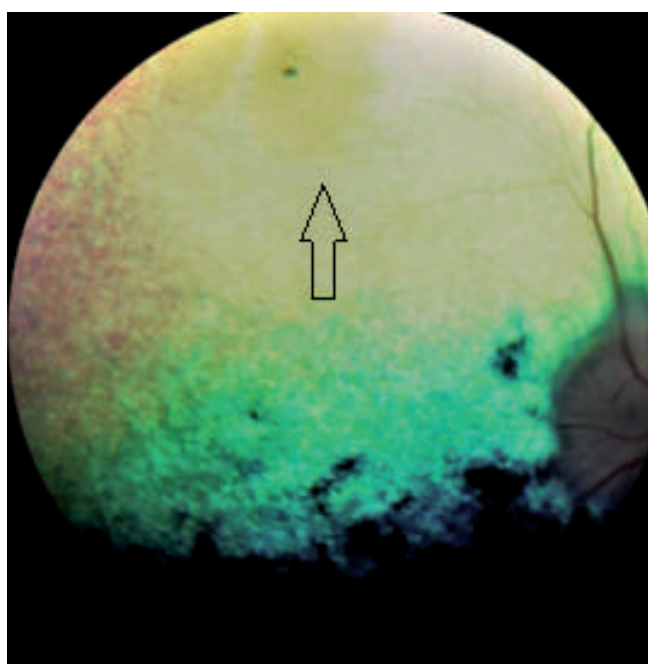
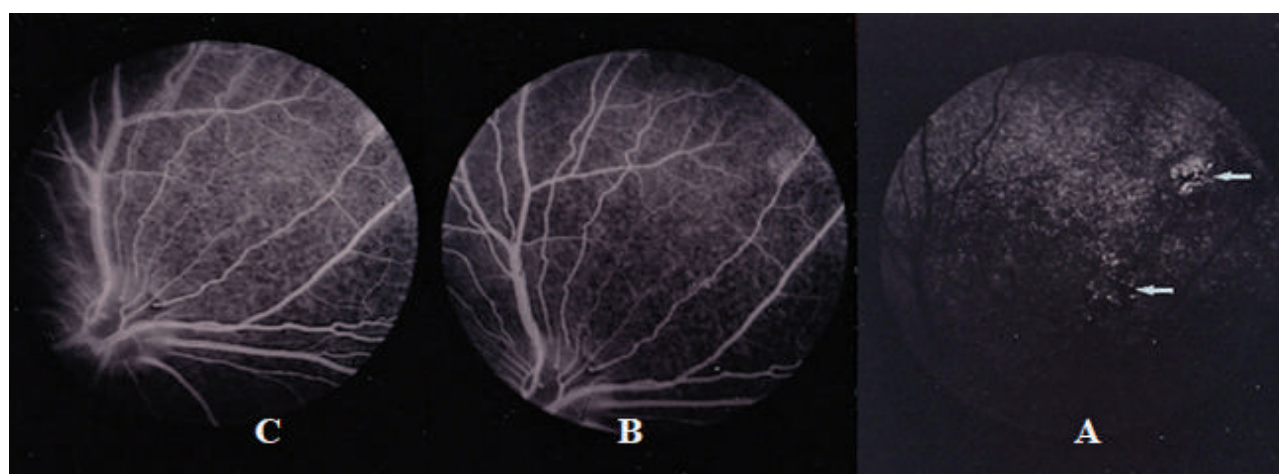


Figure 2 : Border Collie mâle âgé de 3 ans, atrophie rétinienne généralisée par progression et coalescence des lésions focales encore discernables en tapis dorsal (flèche) ; les artères rétiniennes ont disparu, la papille est ardoisée ; les lésions sont bilatérales, le chien est aveugle.

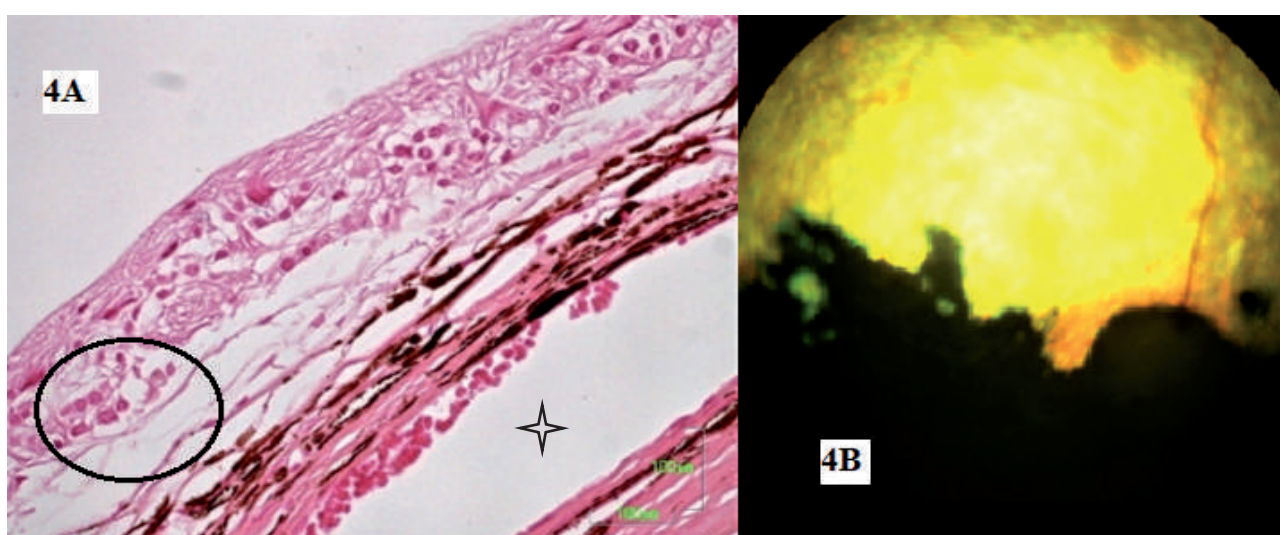
L'âge d'apparition des lésions est estimé entre 2 et 5 ans : nous préconisons pour des reproducteurs un examen clinique annuel entre 1 et 7 ans d'âge ; les examens renouvelés annuellement ont montré une possibilité de progression de lésions responsables de cécité complète au stade terminal (Chaudieu *et al.* 2014). Le phénotype APR d'emblée typique décrit plus anciennement (Rubin, 1989) n'a pas été identifié dans notre population de référence, sauf dans un seul cas où l'hyper-réflexion périphérique en bande initiale n'a pas pu être suivie pour apprécier une éventuelle évolution. Les résultats d'électrorétinographie sont en accord avec les phénotypes observés (Chaudieu, 2001 ; Vilboux *et al.* 2008 ; Chaudieu *et al.* 2014) et l'angiographie fluoresceïnique, si elle confirme l'atteinte rétinienne (Figure 3), exclut la dystrophie de l'épithélium pigmentaire rétinien (Chaudieu, 2001 ; Vilboux *et al.* 2008 ; Chaudieu *et al.* 2014).



**Figure 3** : angiographie fluorescéinique (chien de la Figure 1).  
 A. Temps choroidien, effet fenêtre rétinien (hyperfluorescence choroidienne, flèches).  
 B. Temps veineux, diffusion de la fluorescéine dans l'épithélium pigmentaire rétinien (flèches).  
 C. Temps veineux tardif, diffusion fluorescéinique augmentée (flèches).

Une étude rétrospective (Chaudieu *et al.* 2014) portant sur 1358 chiens dénombrait 113 chiens (98 mâles et 15 femelles) présentant des lésions du fond d'œil, principalement en zone du tapis, cinquante-quatre chiens présentaient d'emblée une atteinte bilatérale (52 mâles et 2 femelles) et cinquante-neuf une atteinte unilatérale (46 mâles et 13 femelles). Dans les années suivant le diagnostic initial, six des seize chiens mâles atteints unilatéraux réexaminés annuellement présentaient une atteinte de l'autre œil et dix restaient atteints unilatéraux avec

une évolution des lésions sur l'œil affecté. Sans tenir compte du sexe ou du type d'atteinte, la prévalence de la rétinopathie chez le Border Collie était en 2014 de 8,3% ; 2% chez les femelles et 16,4% chez les mâles. L'âge moyen du diagnostic initial était de 4 ans. Les résultats d'examens histologiques sur les globes de deux chiens mâles âgés de 8 et 9,5 ans, aveugles après coalescence des foyers lésionnels, montraient une diminution d'épaisseur de la rétine, associée à une réduction cellulaire sévère avec disparition de la couche des articles externes des photorécepteurs, des couches nucléaires et plexiformes interne et externe ; seules quelques cellules ganglionnaires restaient visibles, des cellules épithéliales rétinienne et du pigment pouvant être retrouvés inclus dans la neurorétine ; la choroïde était le siège d'un léger œdème et d'une infiltration lymphoplasmocytaire diffuse (Figures 4A et 4B).

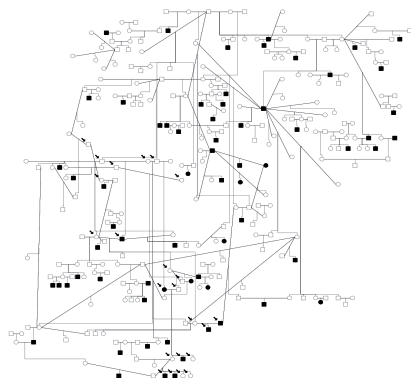


**Figure 4** : Border Collie aveugle âgé de 9,5 ans.  
 A. Atrophie rétinienne (coloration hématoxyline-éosine). Photorécepteurs non reconnaissables, noyaux résiduels de cellules ganglionnaires (cercle), vaisseau choroïdien dilaté (L'étoile a disparu sur le vaisseau choroïdien) (Cliché Laboniris).  
 B. Aspect atrophique du fond d'œil.

## ÉTUDE GÉNÉTIQUE

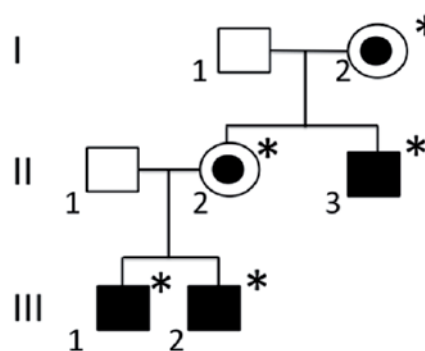
### État des connaissances

Les mutations *prcd-PRA* (*progressive rod cone degeneration - Progressive Retinal Atrophy*), *X-LPRA 1* et *X-LPRA 2* (*X Linked Progressive Retinal Atrophy 1 & 2*) ont été exclues par test génétique (Vilboux *et al.* 2008). Des mutations du gène *BEST 1* (*Bestrophin 1*, également appelé *VMD 2*, *Vitelliform Macular Dystrophy 2*) ont été identifiées comme causales de la *cmr* (*canine multifocal retinopathy*) dans différentes races canines (Guziewicz *et al.* 2007 ; Zangerl *et al.* 2010 ; Hoffmann *et al.* 2012 ; Gornik *et al.* 2014) mais aussi comme modulatrices de certaines autres APRs : l'expression de l'APR chez le Border Collie aurait pu être ainsi modulée. Le séquençage de l'ensemble du gène *BEST 1* pour quatre Border Collies atteints (2 mâles et 2 femelles) et quatre sains (2 mâles et 2 femelles) ne montrait aucune variation de séquence, donc aucun polymorphisme pouvant expliquer la variabilité d'expression d'une APR dans cette race ; l'analyse sur puce SNP de la région chromosomique contenant ce gène chez 133 chiens montrait par ailleurs que les Border Collies étaient très homozygotes. *BEST 1* n'aurait donc pas de rôle modulateur dans la race (Chaudieu *et al.* 2014). Les travaux menés l'équipe « Génétique du Chien » du CNRS de Rennes ont permis, à partir des données cliniques, de valider le mode de transmission récessif lié au chromosome X (Vilboux *et al.* 2008 ; Chaudieu *et al.* 2014 ; Bunel *et al.* 2019), expliquant l'atteinte très préférentielle des mâles. Plus de 1000 prélèvements sanguins ont été effectués sur des chiens atteints et des chiens indemnes d'APR. Ils ont été collectés, traités (extraits en ADN) et sont stockés dans le centre de ressources biologiques (CRB) national Cani-DNA, qui tient à disposition les ADN pour des travaux de recherche (<http://dog-genetics.genouest.org>). Les données associées sont entrées dans la base de données. L'analyse des données généalogiques de 312 chiens, incluant 89 sujets atteints (78 mâles et 11 femelles) a confirmé statistiquement l'hypothèse de transmission liée au chromosome X que les premières publications avaient proposée (Chaudieu 2001 ; Vilboux *et al.* 2008 ; Chaudieu *et al.* 2014 ; Bunel *et al.* 2019) (Figure 5).



**Figure 5 :** Pedigree de Border Collies. Tous les chiens ont été examinés (carrés et cercles blancs : mâles et femelles sains ; les flèches indiquent les prélèvements sanguins collectés et stockés ; la présence des atteints (essentiellement des mâles - carrés noirs - et de rares femelles - cercles noirs) est en faveur du mode de transmission autosomique récessif lié au chromosome X et permet d'identifier les femelles porteuses.

Grâce à ces données, une analyse de liaison génétique a mis en évidence une région liée à la maladie sur le chromosome X, renforçant ainsi cette hypothèse (Vilboux *et al.* 2008 ; Bunel *et al.* 2019). Même si la taille de la région identifiée est importante, les régions codantes d'une dizaine de gènes candidats ont été séquencées, sans pour autant aboutir à l'identification d'une mutation causale. La technologie de séquençage de génome entier devenant faisable dans des Centres spécialisés et de moins en moins coûteuse, nous avons alors entrepris le séquençage de génome complet (WGS, *Whole Genome Sequencing*) de cinq chiens apparentés (trois mâles atteints et deux femelles) (Figure 6).



**Figure 6 :** Les femelles I2 et II2 sont porteuses, les mâles II 1 et III 1 sont sains, les mâles II3, III1 et III2 sont atteints.

Le chromosome X de ces chiens a alors été analysé afin d'identifier des variants (ou mutations appelés SNV - *Single Nucleotide Variants*) répondant à trois critères : 1) ils doivent être retrouvés systématiquement chez les chiens atteints (car les mâles n'ont qu'un exemplaire du chromosome X), 2) ils doivent être hétérozygotes chez les femelles porteuses saines et 3) ils doivent être absents dans un groupe de chiens de races non touchées par une dégénérescence rétinienne héréditaire. Une centaine de variants répondant à ces critères ont ainsi été identifiés. Cependant aucun de ces variants n'est localisé dans une région codante du génome, tous étant dans des régions intergéniques, plus ou moins proches en amont ou en aval de gènes, ainsi que dans des régions introniques (Bunel, 2017). Ceci ne permet pas de définir que l'un de ces variants est causal, car on ne peut pas facilement évaluer les conséquences biologiques.

Les génomes de quatre nouveaux chiens (trois mâles et une femelle atteints), sélectionnés sans lien de parenté connu, qui présentaient une évolution clinique et des phénotypes extrêmement similaires, ont été séquencés. De par leurs signes cliniques similaires, nous pouvions formuler l'hypothèse qu'ils partageaient la même mutation responsable de la maladie. Par ailleurs, parmi ces chiens se trouvait une femelle atteinte, très intéressante dans la recherche de variants, puisque selon notre hypothèse de maladie récessive liée au chromosome X, les femelles doivent être homozygotes pour la mutation afin de développer la maladie.

L'identification de SNVs d'intérêt pour la rétinopathie a consisté comme précédemment à rechercher les variants présents chez les mâles atteints, homozygotes chez les femelles atteintes et

hétérozygotes chez les femelles porteuses. Ces variants ont ensuite été filtrés selon leur impact et seuls les variants non-synonymes (c'est à dire présents dans les régions codantes et

changeant l'acide aminé de la protéine synthétisée) ont été sélectionnés selon l'effet modéré (MODERATE) ou fort (HIGH), prédit sur la structure/fonction de la protéine (Tableau 1).

	Nombre de variants communs	Nombre de variants avec un effet prédit « HIGH » ou « MODERATE »
SNVs situés sur le chromosome X	215	0
SNVs situés dans la région identifiée par l'étude de liaison sur le chromosome X	52	0
INDELs situés sur le chromosome X	151	1
INDELs situés dans la région identifiée par l'étude de liaison sur le chromosome X	28	0

**Tableau 1** : résultats de l'analyse des données de séquençage des génomes de 9 chiens (6 mâles atteints, deux femelles porteuses et 1 femelle atteinte). Des variants SNV (Single Nucleotide Variants) et INDEL (petites insertions/délétions) communs sont présents chez les mâles atteints, hétérozygotes chez les femelles porteuses, et homozygotes chez la femelle atteinte.

Le seul variant (INDEL) commun répondant à tous les critères de filtre ne se situait pas à proximité d'un gène qui pourrait être impliqué dans la maladie selon les recherches bibliographiques et le séquençage de ce variant chez plusieurs Border Collies atteints et sains ne montrait pas une ségrégation parfaite entre lui et la maladie.

Cependant, nous avons identifié un grand nombre de variants exoniques communs (Tableau 1) répondant aux critères de ségrégation (présents chez les mâles atteints, hétérozygotes chez les femelles porteuses et homozygotes chez la femelle atteinte), même si l'impact sur la structure ou la fonction de la protéine en cause est moindre. Ces variants restent donc de bons candidats à explorer.

### Étapes à venir

Les variants exoniques de gènes d'intérêt doivent être génotypés chez plus de chiens mâles atteints et sains, en tenant compte des données cliniques des atteints (voir « Points limitants »).

Par ailleurs, les données de séquençage tout génome ont été obtenues avec la technologie de séquençage dite « short-read » (fragments courts), ce qui permet de mettre en évidence les variants de type SNV (1 nucléotide) et de courtes INDELs (inférieures à 20 nucléotides). Des variants de plus grandes tailles sont difficilement détectés avec cette technique. Afin de ne pas « passer à côté » d'une altération génomique de grande taille, nous nous orientons actuellement vers une technologie récente et innovante dites séquençage « long-read » (longs fragments) pour laquelle nous avons acquis le matériel au laboratoire (Minion, Oxford-Nanopore®). Notre équipe est responsable de cette nouvelle technologie de séquençage au sein de l'institut Génétique et Développement de Rennes (IGDR). Nous avons déjà entrepris l'extraction d'ADN spécifique à ce séquençage « longs fragments » pour deux Border Collies : un chien atteint, déjà séquéncé en technique « short-read », et un chien indemne dont l'examen oculaire a été réalisé à 9 ans. La qualité et la quantité de ces ADN doivent maintenant être

évaluées avant la réalisation de la banque, étape préalable au séquençage sur le séquenceur Minion.

Le séquençage « long-read » nous permettra de mettre en évidence, si elles existent, de larges altérations génomiques telles que des insertions, des délétions, des inversions, des duplications, de grande taille (d'une centaine à plusieurs milliers de nucléotides) qui devront ensuite être validées sur un plus grand nombre de Border Collies.

### Points limitants

La variabilité d'apparition des signes cliniques dans le temps (estimée entre 1 et 5 ans d'âge), dans leur localisation (certains cas sont au départ unilatéraux ; le nombre, la taille et l'aspect des foyers sont variables), dans leur évolution (certains cas évoluent rapidement vers la cécité, d'autres vers une perte de vision partielle, d'autres - avec de petites lésions focales, peu nombreuses, plutôt périphériques - ne semblent pas présenter de déficit visuel) pose le problème de la difficulté de définition d'un phénotype typique de la maladie. On peut se demander si cette situation n'entraîne pas de difficultés pour identifier des variants communs à tous les chiens atteints. C'est pourquoi nous sélectionnons maintenant des chiens atteints dont les signes cliniques et l'évolution de la maladie sont semblables, mais il est éventuellement possible que deux altérations génétiques viennent perturber notre hypothèse de départ. Cependant, la variabilité d'expression clinique peut aussi être le reflet d'une altération génétique au niveau d'un mécanisme de régulation de l'expression d'un ou de plusieurs gènes.

Par ailleurs, plusieurs annotations du génome canin sont maintenant disponibles, avec une meilleure couverture des chromosomes (c'est à dire moins de « trous » (*gaps*) dans la séquence), dont le chromosome X. L'annotation du génome que nous avons utilisée (CanFam 3.1) contient plus de 1 000 régions non séquencées sur le chromosome X, alors que la version la mieux annotée (CanFam 4) n'en contient plus que 59 (Jagannathan *et al.* 2021). Nous allons donc utiliser cette dernière annotation afin d'identifier de nouveaux variants et de mieux les annoter.

## CONCLUSION

Malgré un nombre important d'examens réalisés (plus de 2500 actuellement), les données que nous pouvons produire restent incomplètes. La prise en compte de l'hypothèse d'une transmission récessive liée au chromosome X dans la politique de sélection

des reproducteurs par l'AFBC (Association Française du Border Collie) a toutefois permis de faire passer la proportion de chiens atteints de 20% en 2001 (Chaudieu, 2001) à 8% en 2012 (Chaudieu *et al.* 2014) et 7,3% en 2018 (Figure 7) dans une population géographiquement stable. Nous espérons que de futurs résultats viendront conforter le bien-fondé de cette démarche.

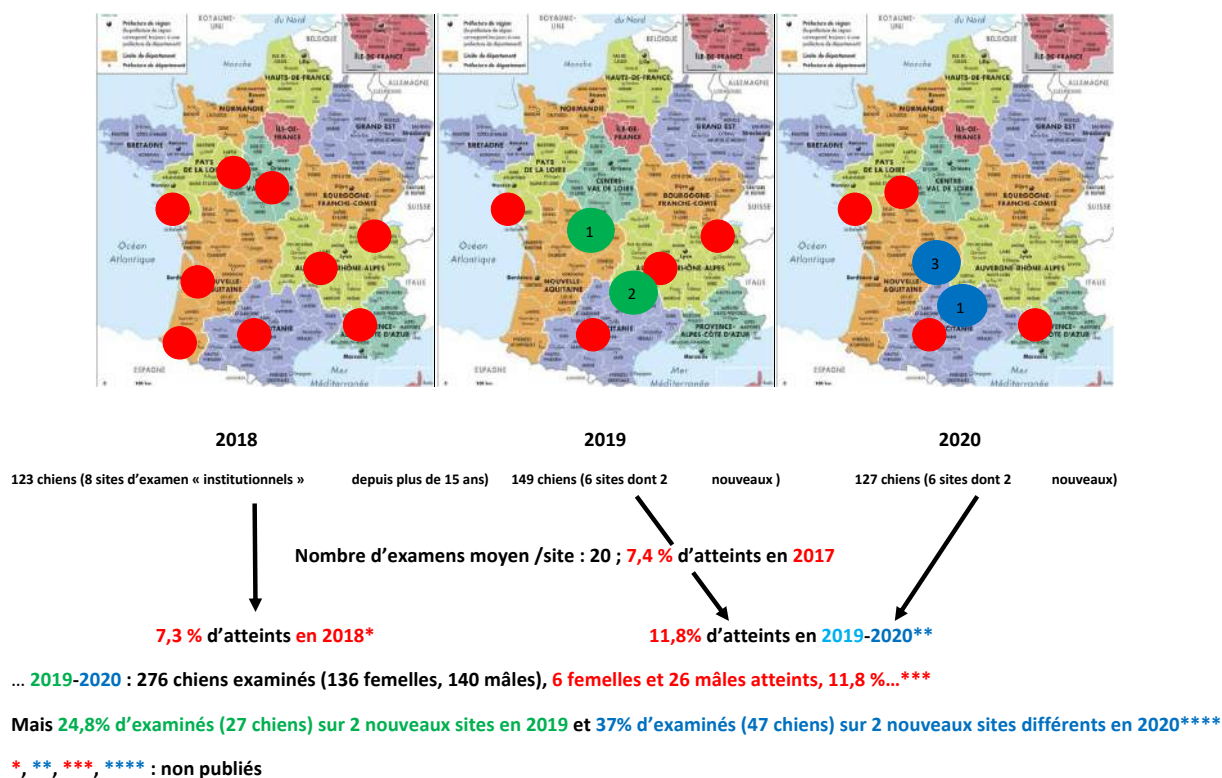


Figure 7 : Examens oculaires et résultats obtenus de 2018 à 2020.

## REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient l'Association de chiens de troupeaux de Haute-Loire, l'Association Française du Border Collie et la Société Centrale Canine pour le soutien apporté à cette étude, ainsi que tous les propriétaires et les vétérinaires grâce à qui le recrutement, l'examen des sujets d'intérêt et l'inclusion de leurs prélèvements dans la biobanque CaniDNA ont pu être réalisés.

## CONFLITS D'INTÉRÊTS

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts.

## BIBLIOGRAPHIE

- Aguirre GD, Kazacos KR. Is it canine DUSN? Vet Ophthalmol. 2021 ; doi: <https://doi.org/10.1111/vop.12951>.
- Bunel M. Recherche de gènes impliqués dans des rétinopathies canines comme modèles de rétinites pigmentaires humaines. Thèse de doctorat d'Université. Rennes : Université de Rennes 1 ; 2017, 279 p.
- Bunel M, Chaudieu G, Hamel C, Lagoutte L, Manes G, Botherel *et al.* Natural models for retinitis pigmentosa: progressive retinal atrophy in dog breeds. Hum Genet. 2019 ; 138 :441-53.
- Chaudieu G. Héredo-dégénérescence rétinienne chez le chien de race Border Collie. Communications orales du 114<sup>ème</sup> Congrès de la Société Française d'Ophtalmologie (SFO), Congrès annuel ; 1998 mai 2-4 ; Paris, France : Masson ; 1998.
- Chaudieu G. Étude de l'atrophie progressive de la rétine chez le Border Collie : Renseignements fournis par 213 examens pratiqués chez 161 chiens. Prat Méd Chir Anim Comp. 2001 ; 36 :55-73

- Chaudieu G, Olivier A, Thomas A, Bunel M, Albaric O, Lafont E *et al.* Atrophie progressive de la rétine du Border Collie : étude rétrospective (1996–2012). *Rev Vét Clin.* 2014; 49:93:101
- Hoffmann I, Guziewicz KE, Zangerl B, Aguirre GD, Mardin CY. Canine multifocal retinopathy in the Australian Shepherd: a case report. *Vet Ophthalmol.* 2012;15 (Suppl 2):134 -8.
- Gornik KR, Pirie CG, Duker JS, Boudrieau RJ. Canine multifocal retinopathy caused by a BEST1 mutation in a Boerboel. *Vet Ophthalmol.* 2014; 17:368-72
- Guziewicz KE, Zangerl B, Lindauer SJ, Mullins RF, Sandmeyer LS, Grahn BH, *et al.* Bestrophin gene mutations cause canine multifocal retinopathy: a novel animal model for best disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007; 48:1959-67
- Jagannathan V, Hitte C, Kidd JM, Master-son P, Murphy TD, Emery S *et al.* Dog10K\_Boxer\_Tasha\_1.0: A Long-Read Assembly of the Dog Reference Genome. *Genes (Basel).* 2021; 12 (6): 847
- Rubin LF. Inherited eye disease in purebred dogs. Baltimore: Williams & Wilkins; 1989.
- Vilboux T, Chaudieu G, Jeannin P, Delattre D, Hedan B, Bourgain C *et al.* Progressive retinal atrophy in the Border Collie: a new XLPRA. *BMC Vet Res.* 2008; 4:10
- Zangerl B, Wickstrom K, Slavik J, Lindauer SJ, Ahonen S, Schelling C, *et al.* Assessment of canine BEST1 variations identifies new mutations and establishes an independent bestrophinopathy model (cmr3). *Mol Vis.* 2010 ;16 :2791-804