

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Recherche de la mutation *ABCB1-1Δ* chez des chiens exprimant
des signes de toxicité subchronique suite à l'administration
quotidienne de lactones macrocycliques**

par

Stéphane Bissonnette

Département de sciences cliniques
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès Sciences
en sciences vétérinaires
option sciences cliniques



Avril 2008

© Stéphane Bissonnette, 2008

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Recherche de la mutation *ABCB1-1Δ* chez des chiens exprimant des signes de toxicité subchronique suite à l'administration quotidienne de lactones macrocycliques

présenté par

Stéphane Bissonnette

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Marie-Ève Nadeau, présidente-rapporteuse

Manon Paradis, directrice de recherche

David William Silversides, codirecteur

Marilyn Dunn, membre du jury

Mémoire accepté le

RÉSUMÉ

La glycoprotéine-P, composante de la barrière hémato-méningée, limite l'accès de certaines substances au système nerveux central. Toute altération de son expression ou sa fonction, comme rencontrée chez des chiens de la lignée des colleys homozygotes pour la mutation nt228(del4) du gène *ABCB1* (*ABCB1-1Δ*), potentialise une neurotoxicose possiblement fatale, particulièrement suivant l'administration de lactones macrocycliques systémiques (LMS). Occasionnellement, des chiens étrangers à la lignée des colleys manifestent des signes de neurotoxicité subchronique lorsque traités avec une LMS pour une démodécie généralisée. L'hypothèse testée dans cette étude proposait que ces chiens soient hétérozygotes pour la mutation *ABCB1-1Δ*, entraînant une diminution d'activité de la glycoprotéine-P et une neurotoxicose subséquente. Des écouvillons de muqueuse jugale furent prélevés sur 28 chiens ayant exprimé des signes de neurotoxicité subchronique lorsque traités avec une LMS pour une démodécie généralisée. Après extraction de l'ADN, la portion pertinente du gène *ABCB1* fut amplifiée par PCR et séquencée. Vingt-sept chiens s'avérèrent homozygotes normaux et un chien était hétérozygote pour la mutation recherchée. Exception faite de ce chien, les signes de neurotoxicité observés ne peuvent être attribués à la mutation *ABCB1-1Δ*. Les explications possibles aux réactions adverses incluent des interactions pharmacologiques (administration conjointe d'une LMS et d'un autre substrat ou inhibiteur de la glycoprotéine-P), un dosage médicamenteux excessif, des polymorphismes d'expression de la glycoprotéine-P, des mutations génétiques non rapportées (*ABCB1* ou autre), ou un phénomène indépendant de l'interaction LMS-glycoprotéine-P. Enfin, la prévalence de la mutation fut évaluée chez des colleys et bergers australiens québécois pour fins de comparaison avec d'autres populations.

Mots clés : bergers australiens; canin; chien; colleys; démodécie; gène *ABCB1*; glycoprotéine-P; lactones macrocycliques; mutation; toxicité.

ABSTRACT

P-glycoprotein, encoded by the *ABCB1* gene, is an integral component of the blood brain barrier and is crucial in limiting drug uptake into the central nervous system. Altered expression or function of P-glycoprotein, as seen in dogs of the collie lineage homozygous for the nt228(del4) mutation of the *ABCB1* gene (*ABCB1-1Δ*), can result in potentially fatal neurotoxicosis, especially following administration of systemic macrocyclic lactones (SML). Occasionally, dogs not related to the collie breed experience signs of subchronic neurotoxicity when receiving SML as treatment for generalized demodicosis. The hypothesis tested in this study was that these dogs were heterozygous (carriers) for the *ABCB1-1Δ* mutation, resulting in decreased P-glycoprotein activity and central neurotoxicosis. Cheek swabs were collected from 28 dogs with generalized demodicosis that had shown signs of subchronic neurotoxicity following daily oral administration of ivermectin or other SML. After DNA extraction, the relevant portion of the *ABCB1* gene was amplified by PCR and sequenced. Twenty-seven dogs were homozygous normal while one dog was heterozygous for the *ABCB1-1Δ* mutation. Therefore, with the exception of one dog, the signs of neurotoxicity observed could not be attributed to the *ABCB1-1Δ* mutation. Possible explanations for the adverse reactions observed include pharmacological interactions (administration of SML with other P-glycoprotein substrates or inhibitors), excessive drug dosage, polymorphisms in P-glycoprotein expression, uncharacterized mutations in the *ABCB1* gene or in another gene, or phenomena unrelated to the SML-P-glycoprotein interaction. Prevalence of the mutation has also been evaluated in collies and Australian shepherd dogs in Quebec for the purpose of comparison with other geographic locations.

Key words: Australian shepherds; canine; collies; demodicosis; dog; *ABCB1* gene; mutation; P-glycoprotein; systemic macrocyclic lactones; toxicity.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	iii
<i>Abstract</i>	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux	vii
Liste des figures	viii
Liste des sigles et abréviations	ix
Dédicace	x
Remerciements	xi
Introduction	1
Recension de la littérature	4
- Notions pharmacologiques sur les lactones macrocycliques	5
- Revue générale de la démodécie canine	9
- Faits saillants sur la glycoprotéine-P	12
- La mutation <i>ABCB1-1Δ</i>	16
Méthodologie	18
- Recrutement	19
- Échantillonnage et extraction de l'ADN génomique	21
- Détermination de la séquence génomique canine	22
- Amplification de l'ADN génomique et diagnostic de la mutation	23
- Détermination de la prévalence des allèles <i>ABCB1-1Δ</i>	24
Premier article	25
« <i>The ABCB1-1Δ mutation is not responsible for subchronic neurotoxicity seen in dogs of non-collie breeds following macrocyclic lactone treatment for generalized demodicosis</i> »	26

- <i>Abstract</i>	27
- <i>Introduction</i>	28
- <i>Materials and methods</i>	31
- <i>Results</i>	34
- <i>Discussion</i>	38
- <i>Acknowledgements</i>	42
- <i>References</i>	43
- <i>Legends for illustrations</i>	48
Deuxième article	49
«Prévalence de l'allèle ABCB1-1 Δ chez des chiens colleys et bergers australiens au Québec»	50
- <i>Résumé</i>	51
- <i>Abstract</i>	52
- Introduction et revue de littérature	53
- Matériel et méthodes	56
- Résultats	58
- Discussion	59
- Remerciements	62
- Bibliographie	63
Discussion générale des résultats	68
Conclusions	74
Bibliographie	77

LISTE DES TABLEAUX

Recension de la littérature :

Tableau I : Toxicité à l'ivermectin chez des chiens beagles	7
Tableau II : Homologations des LMS chez l'espèce canine au Canada	8
Tableau III : Principaux substrats de la glycoprotéine-P	14
Tableau IV : Principaux inhibiteurs de la glycoprotéine-P	15
Tableau V : Races canines identifiées potentiellement porteuses de la mutation nt228(del4) du gène <i>ABCB1</i>	17

Premier article :

<i>Table I : Data on 28 dogs having expressed central neurological signs days to weeks after the initiation of daily oral systemic macrocyclic lactone administration for the treatment of CGD</i>	<i>36</i>
--	-----------

LISTE DES FIGURES

Premier article :

Figure 1 : Exon 4 and partial intron 4-5 sequences of canine ABCB1 gene, showing cloning, PCR amplifications and sequencing strategy 33

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ABC :	<i>ATP-binding cassette</i> , cassette de liants de l'ATP
ADN :	acide désoxyribonucléique
ATP :	adénosine triphosphate
DCG :	démodicie canine généralisée
DCL :	démodicie canine localisée
GABA :	<i>gamma amino-butyrac acid</i> , acide gamma amino-butyracique
gp-P :	glycoprotéine-P
LD ₅₀ :	<i>lethal dose 50</i> , dose létale pour 50% des individus
LMS :	lactone(s) macrocyclique(s) systémique(s)
MDR :	<i>multiple drug resistance</i> , résistance à de multiples médicaments
MRP :	<i>multiple drug resistance protein</i> , protéine de résistance à de multiples médicaments
PO :	<i>per os</i> , par voie orale
SID :	<i>semel in die</i> , une fois par jour
SNC :	système nerveux central
SNP :	<i>single nucleotid polymorphism</i> , polymorphisme de nucléotide simple

À mes parents, qui m'ont ouvert tous les horizons...

À ma sœur, pour son soutien inconditionnel...

À Mère Nature, pour sa merveilleuse complexité nous obligeant à nous dépasser
constamment...

REMERCIEMENTS

En tout premier lieu, je tiens à remercier chaleureusement Dre Manon Paradis, la véritable âme de ce projet. Avec une patience énergique, elle a su me guider tout au long du processus. Sa passion inépuisable de la médecine, sa curiosité insatiable et sa grande humilité face à ses accomplissements en dermatologie vétérinaire son inspirantes. Peut-être à son insu, elle m'a aussi enseigné la notion de mesure dans l'excès. En quelque sorte, Manon a été pour moi une mère spirituelle.

Je veux aussi souligner la précieuse collaboration de Dr David W. Silversides, notre navigateur sur les méandres de la génétique. C'est avec générosité et ferveur qu'il m'a communiqué son savoir et j'ai sincèrement apprécié nos échanges. Son esprit critique et ses facultés d'analyse ont éclairé nos lanternes à de multiples reprises...

Tout particulièrement, je tiens à exprimer ma reconnaissance à Isabelle Daneau pour sa participation plus qu'active à cette recherche. Son expertise et ses talents techniques ont été des pierres angulaires à la réalisation de chacune de ses étapes.

Enfin, merci à l'Académie canadienne de dermatologie vétérinaire de nous avoir soutenu financièrement par l'octroi d'un fond de recherche.

INTRODUCTION

La manifestation de réactions adverses est une éventualité à ne jamais prendre à la légère lors de la prescription d'un traitement médical, quel qu'il soit. Bien que divers effets secondaires connus et prévisibles soient décrits pour plusieurs substances, certains individus y réagiront occasionnellement de façon imprévisible et souvent indésirable : ces réactions seront alors qualifiées d'idiosyncrasiques. Il appert que certains médicaments sont surreprésentés dans les rapports de telles manifestations, alors que certaines populations semblent prédisposées à répondre de façon inadéquate ou inquiétante à l'administration d'une médication donnée.

Depuis le début des années 1980, de nombreux cas de réactions idiosyncrasiques à différentes substances ont été rapportés chez des chiens colleys et des individus de races apparentées, comme les bergers des Shetlands et les bergers australiens entre autres. L'ivermectin, une lactone macrocyclique, est l'exemple classique de médicament souvent incriminé dans ce type de réactions¹⁻⁵. Depuis sa mise en marché en 1981⁶, cette molécule a rapidement gagné en popularité auprès des médecins vétérinaires grâce à son vaste spectre d'activité endectoparasiticide combiné à une ample marge de sécurité chez les mammifères. D'autres lactones macrocycliques ont depuis été commercialisées et également tenues responsables de la manifestation de réactions adverses⁷⁻⁹.

Une mutation affectant le gène *ABCB1* (aussi connu sous la désignation *MDR1*) a été identifiée comme cause à cette apparente hypersensibilité aux lactones macrocycliques chez les colleys^{10, 11} et les chiens appartenant à des races de la même lignée¹²⁻¹⁵. Cette mutation (nt228(del4) ou *ABCB1-1Δ*) se traduit chez les individus homozygotes mutants par un défaut de synthèse de la glycoprotéine-P (gp-P), une composante majeure de la barrière hémato-méningée. La gp-P protège le système nerveux central (SNC) des effets potentiellement néfastes de différentes substances s'avérant substrats de cette protéine, telles des lactones macrocycliques systémiques (LMS)¹⁶⁻¹⁸ et plusieurs autres¹⁹⁻²¹. La mutation décrite a donc pour conséquence un déficit en gp-P, permettant l'exposition du SNC à différentes molécules et à leurs effets secondaires indésirables qui se traduisent par des signes de neurotoxicité centrale (i.e. mydriase, ataxie de proprioception,

dépression, coma et mort entre autres). Théoriquement, les individus hétérozygotes pour cette mutation, tout comme les homozygotes non mutants, ne devraient pas être à risque d'expérimenter des réactions adverses suite à l'administration de l'un ou l'autre des substrats de la gp-P^{10, 11}. Cependant, des phénotypes de sensibilité intermédiaire à certains substrats ont été observés chez des chiens hétérozygotes^{17, 22, 23}.

Certaines LMS représentent une alternative thérapeutique intéressante contre la démodécie canine généralisée (DCG), une dermatose parasitaire grave chez le chien; cette utilisation requiert cependant des doses de LMS élevées et beaucoup plus fréquentes que ce pour quoi elles sont généralement homologuées²⁴⁻³⁰. Exclusion faite des chiens de races identifiées potentiellement porteuses de la mutation *ABCB1-1Δ*, ces régimes de traitement sont bien tolérés par la plupart des patients. Cependant, quelques chiens manifestent des signes de neurotoxicité subchronique quelques jours à quelques semaines après leur initiation^{30, 31}.

Ces observations nous ont amenés à émettre l'hypothèse proposant que ces chiens, exprimant des signes de neurotoxicité subchronique pendant l'administration de LMS pour le traitement d'une DCG, soient hétérozygotes pour la mutation *ABCB1-1Δ*, ceci entraînant une diminution d'activité de la gp-P se traduisant par une subséquente neurotoxicose. Tout en testant cette hypothèse, nous avons aussi déterminé la prévalence de ladite mutation au sein d'un échantillon des populations de colleys et de bergers australiens de la province de Québec, ceci à des fins de comparaison avec les données publiées pour différentes régions géographiques du globe.

RECENSION DE LA LITTÉRATURE

NOTIONS PHARMACOLOGIQUES SUR LES LACTONES MACROCYCLIQUES

Les LMS les plus fréquemment utilisées en médecine vétérinaire appartiennent à deux familles de composés de structure similaire, soit les avermectines et les milbémycines. Ces molécules sont des dérivés de produits de fermentation d'actinomycètes terricoles et appartenant au genre *Streptomyces* : les avermectines (abamectin, doramectin, éprinomectin, ivermectin et selamectin) sont issues de *S. avermitilis* et les milbémycines de *S. hygrosopicus aureolacrymosus* (oxime de milbémycine) et de *S. cyaneogriseus noncyanogenus* (moxidectin et némadectin). Les noms des deux familles sont le reflet des propriétés des LMS (avermectin = *a* préfixe privatif + *verm* vers + *ect* ectoparasites + *in* produit pharmaceutique; milbemycin = *milbe* mite + *myc* fungus + *in* produit pharmaceutique)³²⁻³⁴.

La sécurité d'utilisation des LMS chez les mammifères s'explique par leur mode d'action très spécifique. Chez les invertébrés, elles se lient avec haute affinité aux canaux à ions chlore dépendants de deux neurotransmetteurs, soit le glutamate (localisé au niveau des jonctions neuromusculaires chez les arthropodes) et l'acide gamma amino-butérique (GABA; retrouvé au niveau des jonctions entre les interneurons et les neurones moteurs du cordon ventral chez les nématodes, ainsi qu'au niveau des jonctions neuromusculaires chez les arthropodes). Cette liaison a pour effet d'augmenter la perméabilité des membranes cellulaires aux ions chlore, induisant ainsi une inhibition d'activité électrique qui résulte en une paralysie et, ultimement, la mort de l'arthropode ou du nématode³³⁻³⁹. Il est à noter que les LMS demeurent inefficaces contre les cestodes et les trématodes, ceux-ci n'utilisant pas le GABA comme neurotransmetteur^{35, 37}. Chez les mammifères, les canaux à ions chlore dépendants du glutamate sont absents, alors que ceux dépendant du GABA sont restreints exclusivement au SNC. C'est à la protection de ce dernier par la barrière hémato-méningée, relativement imperméable aux LMS, qu'est imputable cette sûreté chez les mammifères³⁵.

L'intoxication aux LMS s'exprime par des signes neurologiques centraux, tels qu'hypersalivation, tremblements, ataxie de proprioception, dépression, changements de comportement, cécité, faiblesse, décubitus, coma et mort; la mydriase est considérée comme le plus sensible de ces signes. Des études de toxicité aiguë et subchronique à l'ivermectin ont été conduites chez des chiens beagles et ont démontré sa grande marge de sécurité chez l'espèce canine (Tableau I, p.7). Dans une étude de toxicité aiguë, aucune manifestation de neurotoxicité n'a été observée suite à l'administration par voie orale (PO) d'une dose unique de $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, la mydriase a été remarquée à partir de $2,5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ et la LD_{50} (dose létale pour 50% des individus du groupe testé) a été fixée à $80 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Afin d'évaluer les risques d'intoxication subchronique, des doses orales quotidiennes d'ivermectin ont été administrées pour une période de 14 semaines : aucune réaction adverse n'a été notée pour $0,5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, alors que la mydriase a pu être observée à partir de $1,0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ d'ivermectin^{6, 40}. Néanmoins, des réactions idiosyncrasiques aiguës ont été rapportées chez des colleys à des dosages à peine plus élevés que $0,1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ d'ivermectin⁴¹⁻⁴³. Ainsi, la sécurité des produits à base de LMS devant être homologués chez l'espèce canine est habituellement évaluée chez des colleys identifiés sensibles à l'ivermectin à titre de référence⁴⁴⁻⁴⁷.

Les LMS se sont taillé une place de choix dans la pharmacie de plusieurs praticiens vétérinaires, particulièrement en dermatologie. Non seulement se sont-elles avérées être très efficaces dans le traitement de moult parasitoses cutanées⁴⁸⁻⁵⁶, mais elles se sont aussi révélées être plus pratiques et parfois même plus efficaces que d'autres options thérapeutiques dans certaines situations, comme la DCG²⁴⁻³⁰. Cependant, plusieurs de ces utilisations sont hors homologation puisqu'elles requièrent des doses plus élevées que celles auxquelles les produits sont autorisés. Ceci est particulièrement vrai pour le régime thérapeutique de la DCG avec l'ivermectin, dont la seule homologation en médecine canine au Canada est en prévention de la dirofilariose cardiovasculaire (Heartgard^{30®} et Heartgard^{30®} Plus; Merial) à des doses de $0,006$ à $0,012 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ PO mensuellement, alors que le traitement de la DCG nécessite entre $0,3$ et $0,6 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ PO quotidiennement⁵⁷. Le Tableau II présente les homologations des LMS chez l'espèce canine au Canada (p.8).

Tableau I Toxicité à l'ivermectin chez des chiens beagles^{6, 40}

<u>Toxicité aiguë</u>	
Dose orale unique	
Aucune réaction adverse	2 mg·kg ⁻¹
Mydriase	2,5 mg·kg ⁻¹
Mydriase et tremblements	5 mg·kg ⁻¹
Mydriase, tremblements et ataxie	10 mg·kg ⁻¹
LD ₅₀	80 mg·kg ⁻¹

<u>Toxicité subchronique</u>	
Dose orale quotidienne pour 14 semaines	
Aucune reaction adverse	0,5 mg·kg ⁻¹
Mydriase	1 mg·kg ⁻¹
Mydriase, tremblements et ataxie	2 mg·kg ⁻¹

Tableau II Homologations des LMS chez l'espèce canine au Canada

<u>LMS</u>	<u>Homologation</u>	<u>Posologie</u>
Ivermectin	Heartgard^{30®} Heartgard^{30®} Plus (combinaison avec pyrantel) Prévention de la dirofilariose cardiovasculaire. Traitement et contrôle des ascarides et ankylostomes intestinaux (pyrantel).	6 µg·kg ⁻¹ PO mensuel
Moxidectin	ProHeart[®] 6 Prévention de la dirofilariose cardiovasculaire. Traitement des ankylostomes intestinaux. advantage multi^{MC} (combinaison avec imidacloprid) Prévention de la dirofilariose cardiovasculaire. Traitement et contrôle de la pulicose, de l'otacariose et de la gale sarcoptique, ainsi que des ankylostomes et ascarides intestinaux. Aide au traitement et au contrôle de la démodécie généralisée et des infections intestinales à <i>Trichuris vulpis</i> .	0,17 mg·kg ⁻¹ SC aux 6 mois 2,5 mg·kg ⁻¹ topique mensuel
Oxime de milbémycine	Interceptor[®] Sentinel[®] (combinaison avec lufenuron) Prévention de la dirofilariose cardiovasculaire. Traitement et contrôle des nématodes intestinaux. Contrôle de la pulicose (lufenuron). Milbemite[®] 0,1% Traitement de l'otacariose.	0,5 mg·kg ⁻¹ PO mensuel 0,4 ml topique (conduit auditif externe)
Selamectin	Revolution[®] Prévention de la dirofilariose cardiovasculaire. Traitement et contrôle de la pulicose, de l'otacariose, de la gale sarcoptique et des infestations par la tique brune (<i>Rhipicephalus sanguineus</i>). Aide au traitement et au contrôle des infestations par la tique américaine du chien (<i>Dermacentor variabilis</i>) ainsi que des infections intestinales à <i>Toxocara canis</i> .	6 mg·kg ⁻¹ topique mensuel

REVUE GÉNÉRALE DE LA DÉMODÉCIE CANINE

La démodécie canine est une dermatose parasitaire et inflammatoire non contagieuse engendrée par la prolifération excessive d'acariens commensaux du genre *Demodex*, principalement au niveau des unités pilosébacées. C'est un désordre complexe impliquant des facteurs parasitologiques, génétiques, immunologiques, dermato-écologiques, bactériologiques et environnementaux^{58, 59}. Jusqu'à ce jour, trois espèces distinctes de *Demodex* ont été identifiées chez le chien : *D. canis*, espèce la plus commune et occupant les unités pilosébacées⁵⁹; *D. injai*, au corps plus long et aussi retrouvé au niveau des follicules pileux et des glandes sébacées⁶⁰⁻⁶³; une troisième espèce (nommée provisoirement *D. cornei* de façon non officielle), au corps plus court et colonisant la couche cornée de l'épiderme⁶⁴⁻⁶⁹. On reconnaît deux présentations distinctes de démodécie canine, soit la forme localisée (DCL) et la forme généralisée (DCG), chacune étant associée à une évolution et un pronostic fort différents de l'autre forme. Le diagnostic est posé suite à la mise en évidence des parasites par raclages cutanés ou analyse histopathologique, ainsi qu'en tenant compte des caractéristiques inhérentes à chaque présentation⁵⁹.

La DCL représente environ 90% des cas de démodécie canine. Elle se manifeste par l'apparition de moins de six lésions alopéciques plus ou moins circulaires, érythémateuses et squameuses, souvent au niveau de la face. Dans la majorité des cas, elle se déclare entre l'âge de 3 et 6 mois et régresse spontanément en moins de 2 mois. Le pronostic en est excellent et les récurrences sont rares. Le traitement n'est ni nécessaire, ni indiqué; en effet, il convient plutôt d'en suivre l'évolution pour éviter toute confusion avec les stades précoces d'une DCG⁵⁷⁻⁵⁹.

À l'opposé de la DCL, la DCG est une entité grave. Elle peut s'exprimer soit par le développement de 12 lésions ou plus (telles que décrites pour la DCL) distribuées un peu partout sur le corps, soit par l'implication d'une région corporelle entière ou de 2 pieds ou plus (pododémocécie). Deux formes de DCG sont décrites selon l'âge auquel les symptômes apparaissent. La forme juvénile, plus fréquente, se

manifeste chez les individus de moins d'un an en général. Quoique la pathogénie en reste imparfaitement identifiée, on suspecte une immunodéficience spécifique des lymphocytes T face au parasite, celle-ci vraisemblablement héréditaire (autosomale récessive). La forme adulte, quant à elle, est souvent secondaire à une immunosuppression induite par un autre désordre (maladie systémique, dysendocrinie, néoplasie, thérapie immunosuppressive). Une résolution spontanée a pu être observée chez 30 à 50% des chiens souffrant de DCG âgés de moins d'un an et demi; cependant, le pronostic n'en reste pas moins réservé et un traitement est habituellement indiqué⁵⁷⁻⁵⁹.

La thérapie de la DCG implique tout d'abord l'identification et le traitement de maladies concomitantes ou sous-jacentes s'il y a lieu, ou alors la cessation de toute médication immunosuppressive si possible. Une pléthore de substances sont réputées efficaces pour traiter la DCG, ceci de façon anecdotique ou clairement démontrée. À l'heure actuelle, le seul traitement homologué dans plusieurs pays reste l'amitraz, un acaricide/insecticide de la famille des formamidines. L'amitraz est appliqué sous forme de solution sur toute la surface corporelle du patient; différents protocoles (concentration de la solution, fréquence d'application) sont homologués selon divers pays. Les taux de guérison rapportés varient de 0 à 100%, mais sont généralement satisfaisants. Plusieurs inconvénients et effets secondaires potentiels sont cependant reliés à l'utilisation de cette molécule^{57-59, 70}.

D'autres modalités thérapeutiques sont aussi rapportées, mais font appel à l'utilisation de certains produits en dehors de leurs homologations. Les régimes de traitement les plus couramment appliqués impliquent l'administration fréquente (quotidienne à hebdomadaire) de hautes doses de LMS, surtout l'ivermectin (0,3 à 0,6 mg·kg⁻¹ PO aux 24 à 48 heures), l'oxime de milbémycine (0,5 à 2,2 mg·kg⁻¹ PO SID), le moxidectin (0,4 mg·kg⁻¹ PO SID) et le doramectin (0,6 mg·kg⁻¹ en injection sous-cutanée aux 7 jours)^{57, 58, 70}. Les taux de guérison avec les LMS sont habituellement aussi convenables que pour l'amitraz et leur emploi présente plusieurs avantages. Quoique les effets secondaires soient peu fréquents, une neurotoxique potentiellement fatale est induite à ces dosages chez les chiens de races de la lignée des colleys étant homozygotes pour la mutation *ABCB1-1Δ*¹⁰⁻¹⁵.

Le succès du traitement d'une DCG est évalué en regard de la période de rémission, qui doit être maintenue pendant les 12 mois suivant la cessation de la thérapie^{59, 70}.

FAITS SAILLANTS SUR LA GLYCOPROTÉINE-P

La gp-P est une imposante protéine transmembranaire de 170 kDa qui compte parmi les pompes de transport cellulaire les mieux décrites, autant en médecine vétérinaire qu'en médecine humaine^{17, 22}. Encodée par le gène *ABCB1* (aussi connu sous l'appellation *MDR1*), appartenant à la superfamille ABC (*ATP-binding cassette*) de gènes codant pour des protéines de transport membranaire⁷¹, elle est exprimée au niveau de nombreux tissus (endothélium des capillaires cérébraux, canalicules biliaires, épithélium intestinal, tubules rénaux proximaux, cortex surrénalien, placenta, testicules, leucocytes) et joue un rôle actif dans l'absorption, la distribution et l'élimination de multiples molécules^{18, 72, 73} ainsi que dans certaines activités physiologiques, comme la régulation de l'axe hypothalamus-hypophyse-surrénales⁷⁴. Le métabolisme de nombreux médicaments peut donc être modulé (volontairement ou accidentellement) en influençant l'activité de la gp-P elle-même ou en agissant au niveau de ses activités conjointes avec le cytochrome P-450 3A, ceci en administrant une combinaison de leurs substrats et/ou inhibiteurs respectifs ou communs^{17, 72, 75, 76}. Composante majeure de plusieurs barrières hémato-cellulaires, la gp-P prévient l'exposition de certains organes à la toxicité potentielle d'une grande variété de xénobiotiques. L'intérêt généré par la gp-P a pris son essor en médecine humaine suite à la mise en évidence de son expression par des cellules néoplasiques résistantes à plusieurs médicaments⁷⁷ et en médecine vétérinaire avec la découverte de la mutation *ABCB1-1Δ* chez les chiens de races de la lignée des colleys¹⁰⁻¹⁵, mutation qui s'est avérée être la raison de l'apparente hypersensibilité des individus de ces races à l'ivermectin et autres substrats de la gp-P^{19, 20, 22, 23}. Chez le chien, la gp-P est aussi impliquée dans le phénomène de résistance chimiothérapeutique. L'expression de la gp-P par certaines lignées de cellules néoplasiques (lymphome et ostéosarcome canins) leur confère la capacité de se débarrasser de quelques agents antinéoplasiques^{78, 79} et est, de ce fait, utilisée en médecine vétérinaire comme facteur de pronostic négatif face à ce type de cellules. La mise au point de stratégies visant à moduler l'activité de la gp-P est un des objectifs poursuivis en oncologie^{72, 80, 81}.

Les critères de spécificité de la gp-P envers ses substrats apparaissent nébuleux, aussi est-il difficile de prédire le potentiel d'une molécule d'être ou non substrat en considérant uniquement ses caractéristiques moléculaires. Il semblerait par contre possible de se baser sur certaines propriétés physicochimiques prédéterminées pour tenter de classer différents médicaments en regard de leur affinité pour la gp-P^{73, 82}. Le Tableau III présente les principaux substrats d'intérêt clinique pour la gp-P (p.13), alors que le Tableau IV expose ses principaux inhibiteurs (p.14). Il appert que certaines molécules puissent être classées dans les deux catégories; cependant, si certains substrats de la gp-P en sont aussi reconnus comme inhibiteurs, tous les inhibiteurs de cette protéine de transport n'en ont pas nécessairement été identifiés comme substrats. La littérature ne procure à l'heure actuelle aucune explication claire sur cette observation.

Des altérations génétiques ou pharmacologiques de la fonction de la gp-P peuvent donc induire des problèmes de santé. Des polymorphismes intrinsèques du gène *ABCB1* ont d'ailleurs été incriminés dans l'augmentation de susceptibilité à diverses maladies et identifiés chez des humains souffrant de colite ulcéreuse, de la maladie de Parkinson et d'épilepsie réfractaire à plusieurs médicaments²².

Outre la gp-P et le gène *ABCB1*, d'autres membres de la superfamille de transporteurs ABC contribuent aussi au phénomène de résistance médicamenteuse, comme les gènes de la sous-famille *ABCC* encodant pour les protéines de résistance à de multiples médicaments (MRP)⁷¹. Tout comme la gp-P, les MRP (spécialement la MRP1) ont démontré une affinité pour l'ivermectin et doivent donc être considérées comme des voies potentielles de sa distribution dans l'organisme⁸³. En médecine humaine, des maladies ont été attribuées à des mutations ou des déficiences de certains de ces gènes, comme la fibrose kystique, la rétinite pigmentaire et quelques problèmes de métabolisme hépatique et de transport des lipides^{71, 84}.

Tableau III Principaux substrats de la glycoprotéine-P^{17, 22, 72, 73}

Agents antimicrobiens	Médicaments cardiovasculaires
Azoles antifongiques (itraconazole*, kétoconazole*)	Bêta-bloqueurs (celiprolol, talinolol)
Érythromycine*	Bloqueurs des canaux calciques (diltiazem*, verapamil*)
Fluoroquinolones (levofloxacin, sparfloxacin)	Digoxine
Inhibiteurs de protéase virale (amprenavir, indinavir, nelfinavir, ritonavir*, saquinavir)	Losartan
Rifampin	Quinidine*
Tétracyclines (doxycycline, tétracycline)	
	Opioïdes
Antinéoplasiques	Butorphanol
Agents alkylants (chlorambucil, cisplatine)	Fentanyl
Antimétabolites (cytarabine, fluorouracil, hydroxyurée, méthotrexate)	Lopéramide
Inhibiteurs des microtubules (vinblastine*, vincristine, docetaxel, paclitaxel)	Méthadone*
Inhibiteurs de la topo-isomérase (anthracyclines et dérivés (actinomycine D, daunorubicine, doxorubicine, mithoxantrone), etoposide, topotecan)	Morphine
Tamoxifène*	
	Autres
Hormones stéroïdiennes	Acépromazine
Aldostérone	Antidépresseurs tricycliques (amitriptyline, nortriptyline)
Cortisol*	Antiémétiques (dompéridone, ondansetron)
Dexaméthasone	Anti-H1 (fexofenadine, terfenadine*)
Méthylprednisolone	Anti-H2 (cimétidine, ranitidine)
	Avermectins (ivermectin*, moxidectin, selamectin*)
	Colchicine
	Immunosuppresseurs (ciclosporine*, tacrolimus*)

* Aussi inhibiteur de la gp-P

Tableau IV Principaux inhibiteurs de la glycoprotéine-P^{17, 22, 72, 73}

Agents antimicrobiens	Autres
Azoles antifongiques (itraconazole, kétoconazole)	Anti-H1 (astemizole, terfenadine)
Macrolides (clarithromycine, érythromycine)	Avermectins (ivermectin, selamectin)
Ritonavir	Chlorpromazine
	Cortisol
	Immunosuppresseurs (ciclosporine, tacrolimus)
Antinéoplasiques	Inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (fluoxetine, paroxetine)
Sensibilisateurs chimiothérapeutiques (bircodar, valsopodar)	Jus de pamplemousse
Tamoxifène	Méthadone
Vinblastine	Midazolam
	Progestérone
Médicaments cardiovasculaires	Quinine
Amiodarone	
Bloqueurs des canaux calciques (bepridil, diltiazem, felodipine, nicarpidine, nitrendipine, verapamil)	
Carvedilol	
Quinidine	

LA MUTATION *ABCB1-1Δ*

Au milieu des années 1990, une étude visant à étudier le rôle physiologique des produits des gènes *MDR* (*multiple drug resistance*) illustra que des souris dont le gène *Mdr1a* avait été expérimentalement inactivé étaient, comparativement avec les souris de génotype sauvage, 50 à 100 fois plus susceptibles à la neurotoxicité provoquée par l'ivermectin. Il fut en effet démontré qu'elles accumulaient au niveau cérébral des concentrations d'ivermectin 80 à 90 fois plus élevées que leurs consœurs intactes et subséquemment que leur barrière hémato-méningée était déficiente en gp-P¹⁸. L'ivermectin étant un substrat pour la gp-P, l'absence de cette dernière chez les souris génétiquement modifiées expliquait les manifestations de toxicité provoquées par l'accumulation de la LMS dans le cerveau. C'est donc la suspicion d'une altération de l'activité de la gp-P comme explication aux rapports de neurotoxicité aux LMS chez les colleys qui a finalement mené à l'incrimination d'une mutation du gène *ABCB1*, l'orthologue canin du gène *Mdr1a* murin^{10, 11}.

Cette mutation, identifiée *ABCB1-1Δ*, se traduit par la délétion d'une séquence de quatre paires de bases sise dans le quatrième exon du gène *ABCB1* (nt228(del4)); le décalage du cadre de lecture qui en découle génère un codon «stop» prématuré. Les individus homozygotes pour cette mutation subissent ainsi un défaut de synthèse de la gp-P, déficit qui les expose donc aux effets secondaires indésirables des LMS (et d'une variété de composés¹⁹⁻²¹) qui ont alors la possibilité de s'accumuler dans l'organisme et de pénétrer le CNS. Tel qu'exposé plus tôt, les individus hétérozygotes ou homozygotes normaux n'étaient initialement pas considérés particulièrement sensibles aux risques de toxicité aux substrats de la gp-P^{10, 11}, mais des phénotypes de sensibilité intermédiaire à quelques substrats ont été rapportés chez des chiens hétérozygotes. Ainsi, des patients hétérozygotes pour la mutation *ABCB1-1Δ* auraient exprimé des signes de neurotoxicité à l'ivermectin à des dosages de plus de 0,1 mg·kg⁻¹, ceci particulièrement lorsqu'administré quotidiennement comme pour les protocoles de traitement de la DCG^{17, 22, 23}.

Jusqu'à présent, onze races de chiens ont été identifiées comme potentiellement porteuses d'allèles *ABCB1-1Δ*, les colleys arrivant en tête de liste des plus affectés (Tableau V)¹⁰⁻¹⁵.

Tableau V Races canines identifiées potentiellement porteuses de la mutation *ABCB1-1Δ*¹⁰⁻¹⁵

berger australien (standard et miniature)
Border collie
colley (à poil long et court)
berger anglais (English shepherd)
whippet à poil long
McNab
bobtail (Old English sheepdog)
berger des Shetlands
silken windhound
Wäller
berger Suisse blanc

MÉTHODOLOGIE

RECRUTEMENT

Recherche d'allèles *ABCB1-1Δ* chez des chiens ayant exprimé des signes de neurotoxicité subchronique suite à l'administration quotidienne de LMS pour le traitement d'une DCG

Entre janvier 2004 et janvier 2007, des praticiens vétérinaires ont été sollicités à la grandeur du globe par l'intermédiaire du Vetderm Listserv (site de discussion de dermatologie vétérinaire) pour recruter des patients canins ayant démontré des signes de neurotoxicité subchronique (tels que décrits précédemment) suivant l'administration orale quotidienne d'une LMS pour le traitement d'une DCG. Les chiens de races déjà identifiées comme potentiellement porteuses de l'allèle *ABCB1-1Δ* étaient d'office exclus de l'étude. Les renseignements pertinents à la présentation de chaque candidat ont été recueillis, incluant le signalement du chien (race, âge), son historique médical (forme de DCG, LMS et dosage administrés, présence de maladie concomitante et autre médicament reçu), la description des signes neurologiques manifestés et le moment d'apparition de ces manifestations après l'initiation de la thérapie (*Table 1*, p.34). La définition de «toxicité subchronique» reste imprécise relativement au délai entre l'initiation du traitement avec une LMS et le début des manifestations de signes de neurotoxicité. Pour les besoins de l'étude, une période de 4 jours a été arbitrairement fixée comme limite après le commencement de l'administration quotidienne de LMS et les premières observations de signes de toxicité. Selon ce critère, les réactions adverses s'étant produites moins de 4 jours après l'initiation du traitement ont été considérées comme aiguës ou subaiguës, alors que celles s'étant manifestées 4 jours et plus après l'initiation du traitement ont été considérées comme subchroniques.

Prévalence de l'allèle *ABCB1-1Δ* chez des chiens colleys et bergers australiens au Québec

Les chiens ont été sélectionnés aléatoirement parmi le bassin de propriétaires de colleys et de bergers australiens en provenance de différentes régions du Québec. Ils ont ensuite été répartis en deux groupes, soit le groupe 1, composé de 30 colleys, et le groupe 2, composé de 30 bergers australiens. Trente chiens beagles, appartenant à des particuliers ou à la colonie de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal, ont aussi été testés à titre de groupe témoin (type sauvage ou homozygote normal).

ÉCHANTILLONNAGE ET EXTRACTION DE L'ADN GÉNOMIQUE

Afin d'obtenir de l'ADN génomique, des cellules de la muqueuse buccale ont été récoltées par écouvillonnage pour chaque animal. Postérieurement à un jeûne d'eau et de nourriture de 2 heures, la muqueuse orale de chaque joue était frottée avec un écouvillon de coton stérile (deux écouvillons par candidat). Les écouvillons étaient ensuite disposés de façon à pouvoir sécher à l'air libre à la température de la pièce pendant 2 heures, puis insérés individuellement dans un contenant de transport (tube de plastique ou tube sec pour la récolte de sang). À leur arrivée au laboratoire, les échantillons étaient entreposés au congélateur jusqu'à leur traitement. L'ADN génomique a été extrait en utilisant une méthode commerciale de colonne d'affinité (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen; Mississauga, ON, Canada).

DÉTERMINATION DE LA SÉQUENCE GÉNOMIQUE CANINE

Afin de développer un robuste test de dépistage pour l'allèle *ABCB1-1Δ* canin, et puisque les séquences d'ADN génomique de l'espèce canine n'étaient pas disponibles au moment de démarrer l'étude, des séquences introniques partielles (intron 4-5) ont été générées à partir d'ADN génomique dérivé d'un chien beagle. En utilisant des séquences d'ADNc du gène *ABCB1* canin (Genbank AF045016) comme référence, deux amorces sens ont été élaborées à partir de l'extrémité 5' de l'exon 4 en amont de la mutation, soit cMDR.A (5' - TTT CGC TAT TCA AAT TGG CT - 3') et cMDR.B (5' - TTG ATA GGT TGT ATA TGT TGG TGG GG - 3'). Ces amorces ont été utilisées dans une stratégie de clonage de l'ADN génomique par PCR ancré (Universal Genome Walker, BD Biosciences; Oakville, ON, Canada), d'après les directives du fabricant. Ainsi, des séquences de 267 nt de l'extrémité 5' de l'intron 4-5 ont été dérivées, à partir desquelles les amorces antisens cMDR.2 (5' - TTT CTG AAT TCA CAG AAC TCT GCC - 3') et cMDR.seq (5' - CCC AGA AAT AAA CAC ACT A - 3') ont été conçues.

AMPLIFICATION DE L'ADN GÉNOMIQUE ET DIAGNOSTIC DE LA MUTATION

Tous les échantillons reçus ont été traités et analysés au Laboratoire de génomique/ADN, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec. Pour chaque échantillon, 500 ng d'ADN génomique étaient utilisés pour l'amplification de fragments par PCR avec l'enzyme AmpliTaq (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA). Le produit du PCR était généré en employant l'amorce sens cMDR.B et l'amorce antisens cMDR.2; l'amplification était constituée de 40 cycles réalisés sous les conditions suivantes : 45 secondes à 95°C pour la dénaturation, 45 secondes à 63°C pour l'annelage et 60 secondes à 72°C pour l'extension. Les réactions de PCR produisaient des amplicons de 391 paires de bases; 10 µl de ces produits étaient séparés par électrophorèse sur un gel de TAE-agarose 1% (40 mM tris-acétate, pH 8, et 1 mM d'EDTA) contenant du bromure d'éthidium (0,5 µg/ml). Les produits de PCR étaient ensuite visualisés sous forme de bandes d'ADN par fluorescence ultra-violette (UV) et les images étaient numérisées.

Les fragments de PCR étaient séquencés par la méthode de séquençage didéoxy (Big Dye Terminator 3.1 ABI Prism, PE Applied Biosystems; Branchburg, NJ, USA) avec l'amorce antisens cMDR.seq, puis analysés avec le séquenceur ABI 310 (Applied Biosystems).

Les séquences de nucléotides des fragments de PCR amplifiés du gène *ABCB1* en provenance d'un chien homozygote normal, de même que la stratégie d'amplifications d'ADN et de séquençage pour le test de diagnostic, sont illustrées à la Figure 1 (p. 31).

DÉTERMINATION DE LA PRÉVALENCE DES ALLÈLES *ABCB1-1Δ*

La prévalence des allèles *ABCB1-1Δ* est définie ici comme le nombre d'allèles porteurs de cette mutation recensés respectivement pour les groupes de colleys et de bergers australiens de la province de Québec au moment de la présente étude. Elle a été calculée comme le nombre moyen d'allèles mutants à l'intérieur d'un groupe et exprimé sous forme de pourcentage en utilisant la formule suivante :

d'allèles mutants = 2 (# chiens homozygotes mutants) + (# chiens hétérozygotes)

total d'allèles = 2 (# chiens)

Prévalence d'allèles mutants = $\frac{\text{\# d'allèles mutants}}{\text{\# total d'allèles}} \times 100$

PREMIER ARTICLE

The *ABCB1-1Δ* mutation is not responsible for subchronic neurotoxicity seen in dogs of non-collie breeds following macrocyclic lactone treatment for generalized demodicosis

Stéphane Bissonnette, DMV^a; Manon Paradis, DMV, MScV, dipl. ACVD^a;
Isabelle Daneau, BSc, MSc^b; David W. Silversides, BSc, DVM, PhD^b

^aDepartment of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine,
University of Montreal, St-Hyacinthe, Quebec, Canada

^bDepartment of Veterinary Biosciences, Faculty of Veterinary Medicine,
University of Montreal, St-Hyacinthe, Quebec, Canada

Presented at the 22nd Annual Meeting of the North American Veterinary
Dermatology Forum, Kauai, Hawaii, USA, April 2007.

Funded by the Canadian Academy of Veterinary Dermatology.

Correspondence to Manon Paradis, Department of Clinical Sciences,
Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal,
C.P. 5000, St-Hyacinthe, Quebec, Canada, J2S 5L2.

E-mail: [information retirée / information withdrawn]

Short title: *ABCB1* mutation and subchronic toxicity.

The authors state the lack of any conflict of interest.

Accepté pour publication en juillet 2008 à la revue **Veterinary Dermatology**.

ABSTRACT

P-glycoprotein (P-gp), encoded by the multiple drug resistance gene *ABCB1* (also known as *MDR1*), is an integral component of the blood brain barrier and is crucial in limiting drug uptake into the central nervous system. Altered expression or function of P-gp, as seen in dogs of the collie lineage homozygous for the nt228(del4) mutation of the *ABCB1* gene (*ABCB1-1Δ*), can result in potentially fatal neurotoxicosis, especially following administration of systemic macrocyclic lactones (SML). Occasionally, dogs not related to the collie breed experience subchronic neurotoxicity signs when receiving SML as treatment for generalized demodicosis. The hypothesis tested in this study was that these dogs were carriers (heterozygous) for the *ABCB1-1Δ* mutation, resulting in decreased P-gp activity and central neurotoxicosis. Cheek swabs were collected from 28 dogs with generalized demodicosis that had shown subchronic neurotoxicity signs following daily oral administration of ivermectin or other SML. Ten of these animals received other P-gp substrates (confirmed or putative) systemically and concurrently. After DNA extraction, the relevant portion of the *ABCB1* gene was amplified by PCR and sequenced. Twenty-seven dogs were homozygous normal while one dog was heterozygous for the *ABCB1-1Δ* mutation. Therefore, with the exception of one dog, the neurotoxicity signs observed could not be attributed to the *ABCB1-1Δ* mutation. Possible explanations for the adverse reactions observed include pharmacological interactions (administration of SML with other P-gp substrates or inhibitors), excessive drug dosage, polymorphisms in P-gp expression, uncharacterized mutations in the *ABCB1* gene or in another gene, or phenomena unrelated to the SML-P-gp interaction.

INTRODUCTION

Since the early 1980s many cases of idiosyncratic reactions to various pharmacological substances have been reported for the collie dog breed as well as for related breeds including Australian shepherds and Shetland sheepdogs. Ivermectin is a classical example of a drug incriminated in these reactions.¹⁻⁵ Available on the international marketplace since 1981, ivermectin rapidly gained popularity in veterinary medicine due to its broad spectrum of activity against endo- and ectoparasites combined with a generally wide safety margin in mammals.⁶ Other systemic macrocyclic lactones (SML) have since been commercialized and, although less frequently, have also been incriminated in adverse reactions.⁷⁻⁹

The toxicity of SML in invertebrates, and their generally wide safety margin in mammals can be attributed to their very specific modes of action. In invertebrates, SML bind with high affinity to glutamate-gated chloride ion channels in neuromuscular junctions of arthropods, and γ -aminobutyric acid (GABA) -gated chloride ion channels in neuromuscular junctions of arthropods and in interneurons and motor neurons of the ventral nerve cord of nematodes. Binding of SML to these chloride ion channels increases the permeability of cell membranes to chloride ions, resulting in inhibition of nerve activity, flaccid paralysis and death.¹⁰⁻¹² Glutamate-gated chloride channels are not found in vertebrates. In mammals, GABA-gated chloride channels are located exclusively in the central nervous system (CNS) where they are protected from the general circulation by the blood-brain barrier, which SML do not readily cross. These species differences explain the wide safety margin usually associated with the use of ivermectin and its relatives in mammalian species.¹⁰

In dogs, toxicity to SML is expressed by central neurological signs such as drooling, tremors, proprioceptive ataxia, disorientation, lethargy, depression, behavioural changes, blindness, weakness, recumbency and coma, with the most sensitive sign being mydriasis. Acute and subchronic toxicity studies on ivermectin conducted in beagle dogs have demonstrated a large safety margin. It was shown

that following administration of a single oral dose, no drug-related adverse reaction was noted at $2,0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, mydriasis was observed starting at $2,5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, and the LD_{50} was fixed at $80 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.^{6,13} When ivermectin was administered daily for 14 weeks, no adverse reaction was seen at $0,50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ and mydriasis was noted starting at $1,0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.^{6,13} However, idiosyncratic acute reactions have been reported in collies at dosages barely higher than $0,10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.¹⁴⁻¹⁶ For this reason, SML-containing products approved for the canine species are usually evaluated for safety using already identified ivermectin-sensitive collies as reference.¹⁷⁻²⁰

In Canada, the only approved use of ivermectin in dogs is for the prevention of cardiovascular dirofilariasis (Heartgard^{30®} and Heartgard^{30®} Plus; Merial) at a dosage of $0,006$ to $0,012 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ monthly. However, ivermectin and other SML are commonly used in veterinary dermatology,²¹⁻²⁹ where extra-label doses or protocols are routinely applied in the treatment of canine generalized demodicosis (CGD).³⁰⁻³⁶ For example, ivermectin is typically administered orally at dosages between $0,30$ and $0,60 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ daily in CGD.³⁷

In the mid 1990s, mice in which the *Mdr1a* (multiple drug resistance) gene was experimentally knocked-out were found to be 50 to 100 times more sensitive to ivermectin than wild-type mice.³⁸ The product of this gene, P-glycoprotein (P-gp), is a large transmembrane protein expressed in many tissues that acts as a transport pump for various endogenous and exogenous substrates, thereby decreasing tissue and cell exposure to potentially toxic xenobiotics. P-gp is a major component of the blood-brain barrier and thus acts to protect the CNS from the harmful effects of many substrate drugs including ivermectin and other SML.³⁸⁻⁴⁰

DNA sequence analysis of the canine *ABCB1* gene (ortholog of murine *Mdr1a*) in cases of neurotoxicosis to SML in collies led to the identification of a four base pair deletion within the fourth exon (nt228(del4); *ABCB1-1Δ*), which results in a frame shift generating a premature stop codon.^{41,42} This mutation, when homozygous, would be causative for a defect in the synthesis of P-gp, exposing affected dogs to

undesirable adverse reactions to SML as well as to a variety of other compounds.⁴³⁻⁴⁵ Currently, collies and 10 other breeds have been identified as potential carriers of the *ABCB1-1Δ* allele.⁴⁶⁻⁴⁹ Heterozygous dogs as well as homozygous normal (wild type) dogs do not display the severe neurotoxicosis to SML associated with homozygous mutant dogs.^{41,42} However, intermediate phenotypes of sensitivity to some P-gp substrates have been observed in heterozygous dogs, in which ivermectin neurotoxicity was noticed at dosages higher than 0,10 mg·kg⁻¹, especially if given daily as in CGD treatment protocols.^{40,50,51}

Excluding dogs from breeds known to carry the described *ABCB1* mutation, subchronic toxicity signs are occasionally seen in dogs treated for a CGD with a daily SML protocol. The central neurological signs are typically observed between 2 and 6 weeks after initiation of daily oral SML, particularly with ivermectin at 0,40 to 0,60 mg·kg⁻¹. The objective of this study was to investigate the hypothesis that dogs experiencing subchronic toxicity signs when receiving daily SML as treatment for CGD are heterozygous carriers for the *ABCB1-1Δ* mutation, resulting in decreased P-gp activity and subsequent neurotoxicosis.

MATERIALS AND METHODS

Recruitment

From January, 2004 to January, 2007, veterinary practitioners worldwide were solicited via the Vetderm Listserv (veterinary dermatology discussion website) for the recruitment of canine patients having shown subchronic neurotoxicity signs (as previously described) following daily oral administration of a SML as treatment for a CGD. Dogs from breeds identified as potentially affected by the *ABCB1-1Δ* mutation were excluded of the study. Data were collected regarding each dog's description (breed, age), medical history including form of CGD, SML and dosage administered, concurrent diseases and medications, manifestation of adverse reactions, and time of onset of these reactions after the initiation of the SML therapy. The definition of «subchronic» toxicity is somewhat vague with respect to time of initiation of administration of SML. For our purposes, we arbitrarily fixed 4 days after the beginning of daily administration of SML as a limit for the onset of toxicity signs. Using this definition, adverse reactions occurring less than 4 days after initiation of treatment were considered acute or subacute, while adverse reactions occurring 4 days or more after initiation of treatment were considered subchronic.

Sampling and extraction of genomic DNA

In order to obtain genomic DNA, mucosal cells have been sampled via cheek swabs for each animal. After a 2-hour minimum food and water fasting, a sterile cotton swab was rubbed six times onto the oral mucosa of each cheek (one swab per cheek, providing two samples for each animal), then allowed to dry out at room temperature for about 2 hours before being inserted in a container (plastic or dry blood tube) for transport. Samples were stored frozen until processing. Genomic DNA was extracted using a commercial affinity column method (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen; Mississauga, ON, Canada).

Determination of the canine genomic sequence

To develop a robust screening test for the canine *ABCB1-1Δ* allele, and as genomic DNA sequences were not available for the dog at the time, partial intronic sequences (intron 4-5) were generated using genomic DNA derived from a beagle dog. Based on cDNA sequences for the canine *ABCB1* gene (Genbank AF045016), two forward primers, cMDR.A (5'-TTTCGCTATTCAAATTGGCT-3') and cMDR.B (5'-TTGATAGGTTGTATATGTTGGTGGGG-3') were designed at the 5' end of exon 4, upstream of the mutation. These primers were used in a genomic DNA anchored PCR cloning strategy (Universal Genome Walker, BD Biosciences; Oakville, ON, Canada), according to the manufacturer's instructions. In such a fashion, 267 nt of the 5' region of intron 4-5 were generated, from which reverse primers cMDR.2 (5'-TTTCTGAATTCACAGAACTCTGCC-3') and cMDR.seq (5'-CCCAGAAATAACACACTA-3') were designed.

Genomic DNA amplification and diagnosis of mutation

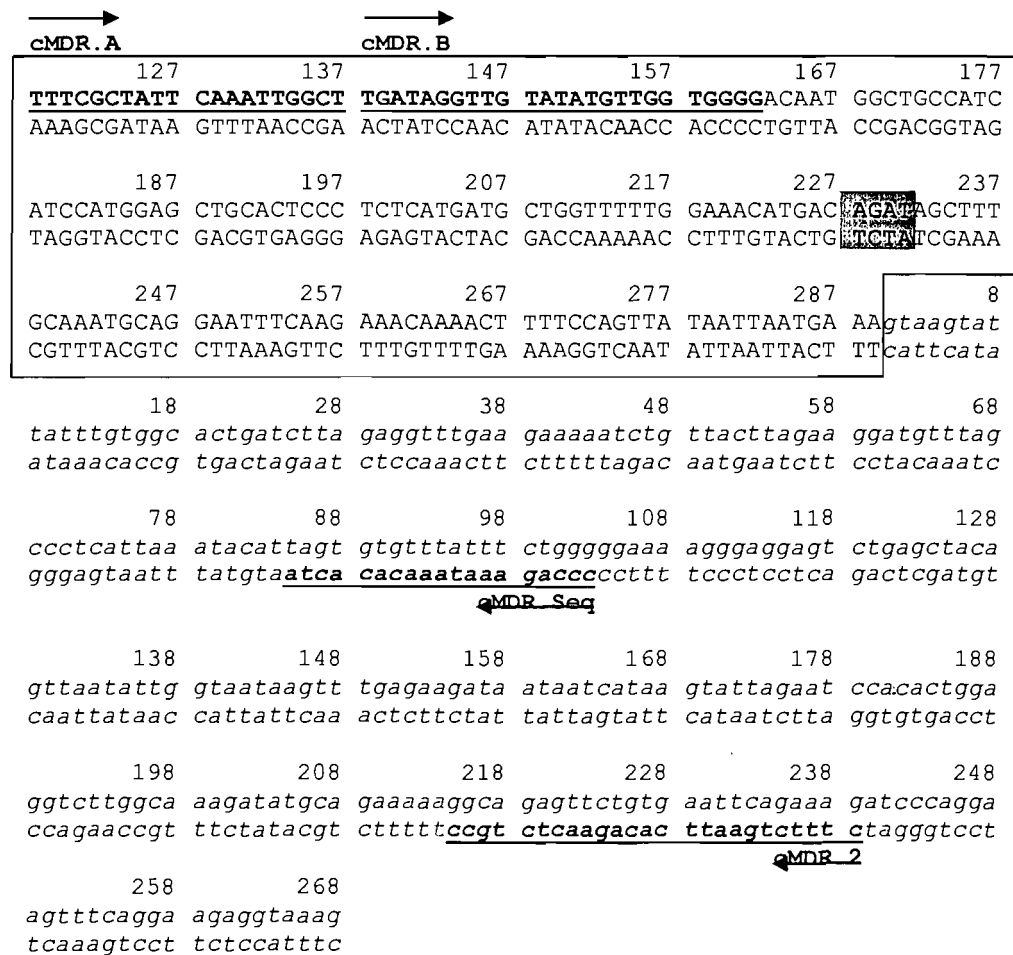
All of the samples received were processed and analyzed at the DNA/Genomics Laboratory, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, St-Hyacinthe Quebec. For each sample, 500 ng of genomic DNA was used for fragment amplification by PCR with the enzyme AmpliTaq (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA). The PCR product was generated using the forward primer cMDR.B and the reverse primer cMDR.2. PCR amplifications consisted of 40 cycles under the following conditions: 95°C (45 seconds) for denaturing, 63°C (45 seconds) for annealing and 72°C (60 seconds) for extension. PCR resulted in amplicons of 391 base pairs. PCR products (10 μl) were resolved by electrophoresis on a 1% TAE-agarose gel (40 mM tris-acetate, pH 8, and 1 mM EDTA) containing ethidium bromide (0,5 μg/ml). PCR products were visualized by ultra-violet (UV) fluorescence of DNA bands and the images were digitized.

The PCR products were sequenced via the dideoxy sequencing method (Big Dye Terminator 3.1 ABI Prism, PE Applied Biosystems; Branchburg, NJ, USA) and

analysed on ABI 310 sequencer (Applied Biosystems). The reverse primer cMDR.seq was used for the sequencing.

Nucleotide sequences of amplified PCR fragment of *ABCB1* gene from a homozygous normal dog, and strategy of DNA amplifications and sequencing for the diagnostic test, are shown in Figure 1.

Figure 1 Exon 4 and partial intron 4-5 sequences of canine *ABCB1* gene, showing cloning, PCR amplifications and sequencing strategy



RESULTS

Although samples were received from a total of 30 dogs, 2 animals were excluded of the study. One animal was eliminated because orthopaedic disease was considered the most likely explanation for weakness and paresia of the hind limbs. For the other animal, no DNA result could be generated from both samples received.

Twenty-eight dogs, affected by CGD and having shown subchronic neurotoxicity signs following daily oral administration of ivermectin or other SML, were enrolled in the study (Table 1). This group included 25 dogs from 20 different purebred breeds and 3 dogs from mixed breeds, ranging in age from 8 months to 18 years. Twelve dogs had juvenile onset CGD and 16 had adult onset CGD. Four of the 16 dogs with adult onset CGD had a concurrent disease: two dogs had hyperadrenocorticism, one dog had epitheliotropic lymphoma and one dog had chronic renal failure as well as hemangiopericytoma. For all the dogs, toxicity signs resolved after decreasing the dose of SML administered or drug withdrawal.

Twenty-five dogs were receiving ivermectin (daily dose range from 0,18 to 0,67 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) as SML, whereas two dogs received moxidectin (daily dose of 0,39 and 0,45 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and two dogs received milbemycin oxime (daily dose of 2,0 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). One of the dogs receiving milbemycin oxime had previously shown neurotoxicity signs with ivermectin at 0,30 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Ten of the 28 dogs were also receiving simultaneously other P-gp substrates or inhibitors (confirmed or putative), including: ketoconazole (n = 4); a quinolone antibiotic (ciprofloxacin, enrofloxacin or marbofloxacin; n = 4); prednisolone (n = 2); ciclosporin (n = 1); butorphanol (n = 1); or another SML (moxidectin with ivermectin; n = 1). Of note, one of the dogs was receiving ketoconazole, ciprofloxacin and butorphanol concurrently, while another dog was receiving ketoconazole and ciclosporin. Onset of toxicity signs was first noted between 4 days and 10 weeks after initiation of therapy (Table 1).

Upon sequencing of the amplified genomic DNA, 27 of the 28 dogs were found to be homozygous wild type (normal), and one dog heterozygous (carrier) for the *ABCB1-1Δ* allele. The heterozygous animal, a one year old Labrador retriever cross, was receiving oral ivermectin at $0,67 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ daily as only medication, the highest dosage of SML seen in this study. After 7 weeks of this treatment, the animal started to express central neurotoxicity signs including proprioceptive ataxia, tremors, depression and hypermetry.

Table 1

Data on 28 dogs having expressed central neurological signs days to weeks after the initiation of daily oral systemic macrocyclic lactone administration for the treatment of CGD

Breed	Age (years)	CGD onset	Concurrent diseases	Systemic macrocyclic lactones	Dose (mg·kg ⁻¹)	Concurrent P-gp substrates or inhibitors	Clinical signs expressed	Onset of toxicity signs after initiation of treatment	ABCB1 status vs ABCB1-1Δ mutation
1	Doberman	1	juvenile	ivermectin	0,50		mydriasis, hyperactivity	≥ 4 days	normal homozygous
2	Shih Tzu	8	adult	ivermectin	0,38	ketoconazole	ataxia	1 week	normal homozygous
3	Saluki	5	juvenile	ivermectin	0,50		mydriasis, ataxia, weakness, decreased reaction to menace and pupillary reflexes	≥ 2 weeks	normal homozygous
4	WHWT	3	juvenile	ivermectin	0,60	moxidectin	tremors	4 weeks	normal homozygous
5	bull terrier	2,5	juvenile	ivermectin	0,30		lethargy, blindness	2 weeks	normal homozygous
6	Rottweiler	9	adult	ivermectin	0,60		mydriasis, drooling, weakness, tremors, depression, behaviour changes, blindness, panting	3 weeks	normal homozygous
7	mixed breed	16	adult	chronic renal failure, hemangiopericytoma	milbemycin oxime	2,0	ataxia, lethargy	≥ 4 days	normal homozygous
8	mixed breed	6	adult	ivermectin	0,25		ataxia, lethargy	9 days	normal homozygous
9	English bulldog	0,9	juvenile	ivermectin	0,60		lethargy, anorexia	3 weeks	normal homozygous
10	WHWT	13	adult	hyperadrenocorticism	ivermectin	0,30	ataxia, tremors, disorientation	2 weeks	normal homozygous
11	basset hound	12	adult	ivermectin	0,40	ketoconazole + ciprofloxacin + butorphanol	ataxia, stupor	5 weeks	normal homozygous
12	Boxer	3,5	juvenile	ivermectin	0,25	enrofloxacin	disorientation	5 days	normal homozygous
13	Doberman	1,5	juvenile	ivermectin milbemycin oxime	0,30 2,0		ataxia, tremors, hypermetry	5 weeks ≥ 4 days	normal homozygous
14	WHWT	14,5	adult	hyperadrenocorticism	ivermectin	0,20	ataxia, drooling	4 days	normal homozygous
15	golden retriever	13	adult	epitheliotropic lymphoma	ivermectin	0,50	mydriasis, ataxia, tremors	2 weeks	normal homozygous
16	Weimaraner	12	adult	ivermectin	0,39	marbofloxacin	ataxia, tremors	1 month	normal homozygous
17	Lhasa apso	18	adult	ivermectin	0,45		tremors	1 month	normal homozygous
18	Labrador retriever	11,5	adult	ivermectin	0,40	prednisolone	ataxia, weakness, lethargy, alteration in mental state	≥ 4 days	normal homozygous

19	Shih Tzu	12	adult	ivermectin	0,60		ataxia, lethargy, anorexia	4 days	normal homozygous
20	mixed breed	1	juvenile	ivermectin	0,67		ataxia, tremors, depression, hypermetry	7 weeks	heterozygous
21	Pug	Unknown	juvenile	ivermectin	0,45	marbofloxacin	ataxia, tremors, behaviour changes	5 weeks	normal homozygous
22	bull terrier	0,7	juvenile	ivermectin	0,60		mydriasis, ataxia, blindness, lethargy	5 weeks	normal homozygous
23	Welsh terrier	5	adult	ivermectin	0,18	ketoconazole + ciclosporin	mydriasis, ataxia, tremors	4 weeks	normal homozygous
24	cocker spaniel	13	adult	ivermectin	0,60		disorientation	8 days	normal homozygous
25	schipperke	13,5	adult	ivermectin	0,53	prednisolone	depression, blindness, disorientation	7 days	normal homozygous
26	Bernese mountain dog	0,9	juvenile	ivermectin	0,60		mydriasis, drooling, anorexia, weight loss	2 weeks	normal homozygous
27	Dogue de Bordeaux	1,5	juvenile	ivermectin	0,40	ketoconazole	mydriasis, ataxia, lethargy, GI signs	3 weeks	normal homozygous
28	Border terrier	10	adult	ivermectin	0,60		drooling, weakness, disorientation	10 weeks	normal homozygous

DISCUSSION

Pharmacogenetics is a branch of pharmacology that studies the behaviour of different substances and variations in response to their administration with respect to an individual's genetic background; it strives to provide a rational basis for understanding idiosyncratic or adverse reactions to drug treatments as well as individual variations in treatment success. Pharmacogenetics evaluates the risk potential of a given molecule for a particular patient, and allows the setting of efficient and safe individualized pharmacotherapies.⁴⁰ A case in point is the pharmacogenetics of P-glycoprotein (P-gp). P-gp is one of the best described cellular transport pumps in both human and veterinary medicine. Coded for by the *ABCB1* gene (also known as the *MDR1* gene), P-gp belongs to the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily of membrane proteins.⁵² P-gp is expressed in various cells and tissues including biliary canalicules, intestinal epithelium, renal proximal tubules, adrenal cortex, placenta, testes, leukocytes, and the endothelium of cerebral capillaries. P-gp plays a role in the absorption, distribution and elimination of multiple molecules,^{38,53} as well as in physiologic activities including the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis;⁵⁴ it prevents exposure of various tissues and organs to the potential toxicity of a variety of substances and constitutes an important component of many blood-to-cell barriers including the blood-brain barrier. The metabolism of many drugs can be influenced by modulating P-gp activity, either purposely or accidentally, via the administration of substrates or inhibitors of P-gp.^{40,53,55,56} Alternatively, P-gp activity can be influenced indirectly, for example by modulating the activity of cytochrome P450 3A.^{40,53,55,56}

Interest in P-gp arose in human medicine following recognition of its expression in multiple drug resistant cancer cells.⁵⁷ Pharmacologic alterations in P-gp function can induce health problems, while genetic *ABCB1* polymorphisms have been implicated in increased susceptibility to various diseases. Different polymorphisms have been identified in human patients with ulcerative colitis, Parkinson disease, and refractory or multidrug resistant epilepsy.⁵¹ In veterinary medicine, the

discovery of the nt228(del4) canine *ABCB1* gene mutation (*ABCB1-1Δ*) in dogs of the collie lineage provided an explanation for why individuals of these breeds can be sensitive to the toxic effects of ivermectin and other P-gp substrates.^{41-44,46-51}

The goal of the present study was to evaluate the possible role of heterozygosity for the *ABCB1-1Δ* allele as a contributing factor in the neurotoxicity seen in dogs of non collie lineages when receiving a SML daily as treatment for a CGD. Based on the fact that 27 out of 28 test animals studied were shown to be homozygous normal for the *ABCB1* gene at the nt228(del4) locus, we conclude that (outside of the 11 dog breeds already identified as potential carriers of that mutation) there is little current evidence to implicate the *ABCB1-1Δ* allele in cases of neurotoxicity to SML. Thus there must be alternative explanation(s) for the observed neurotoxicity.

Almost half of the recruited dogs (13/28) were receiving 0,50 mg·kg⁻¹ or more of ivermectin daily, which falls within the upper range of the reported therapeutic dosage for CGD. Such high doses can be considered at risk for inducing eventual toxicity via saturation of elimination mechanisms, as suggested by the case of the heterozygous Labrador cross receiving 0,67 mg·kg⁻¹ daily. As well, unreported pharmacological interactions may be involved, for example, the inhibition of cytochrome P450 3A by as yet unidentified P-gp substrates.

Adverse drug interactions can be suspected in 10 of the 28 dogs (35,7%) who were receiving different known or putative P-gp substrates concurrently with a SML. This observation highlights the importance of being careful when establishing a multiple drug therapy for a patient, paying attention to the potential of each medication to be a substrate and/or inhibitor for P-gp and cytochrome P450 3A. Thus drug interactions may be a more important risk factor in the development of clinical neurotoxicity than is currently appreciated.

In this study, we evaluated one known mutation within the *ABCB1* gene as a possible explanation for the clinical neurotoxicity observed. It is possible that the neurotoxicity was the result of an as yet unidentified mutation (missense,

nonsense, insertion/deletion) affecting the exons of P-gp, or affecting some other protein transporting the SML, either from the same subfamily (ABCB encoding for MDRs) or from another subfamily (i.e. ABCC encoding for MRPs). In addition, mutations in genetic control regions that affect the level of expression of the *ABCB1* gene or other genes from the ABC transporter superfamily could also predispose some dogs to adverse reactions to different molecules. New genetic resources, including SNP analysis, may be useful for future clinical studies related to SML neurotoxicity.

In the four dogs affected by concurrent diseases (hyperadrenocorticism, epitheliotropic lymphoma, chronic renal failure and hemangiopericytoma), metabolic disturbances may have modified the P-gp function or another step in the metabolism of SML. In such a case, other transport mechanisms may be favoured under different non physiological circumstances.

The one dog found to be heterozygous for the *ABCB1-1Δ* allele was a Labrador retriever cross who was receiving ivermectin at an unusually high daily oral dose of $0,67 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ for 7 weeks prior to displaying central neurological signs. Possible factors contributing to the clinical neurotoxicity observed include the high dosage used, and also the animal's heterozygous *ABCB1* gene status. Increased sensitivity of heterozygous *ABCB1-1Δ* dogs to SML neurotoxicity previously observed remains to be formally proven through further clinical studies. As the pedigree of this dog is unavailable, we are not able to determine if its ancestors include herding dogs, but believe that this is the most probable explanation for the presence of the *ABCB1-1Δ* allele.

In conclusion, based on the results of our study, the *ABCB1-1Δ* mutation is generally not the cause of the neurotoxicity signs seen in dogs of non collie breeds receiving daily SML for a CGD. However, the results suggest that drug interactions may be involved in approximately one-third of such cases, stressing the importance of caution when setting up an individual's therapy comprising several drugs known to interact with P-gp and/or cytochrome P450 3A. Ongoing and future

research in pharmacogenetics, particularly on the ABC transporter superfamily, should provide further understanding of so-called idiosyncratic drug reactions.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the Canadian Academy of Veterinary Dermatology for their financial support of this study. In addition, we thank all of our colleagues who participated to the project, for their patient referrals and their helpful comments.

REFERENCES

1. Hadrick MK. Ivermectin toxicosis in two Australian shepherds. *Journal of American Veterinary Medical Association* 1995; 206: 1147-50.
2. Hopper K, Aldrich J, Haskins SC. Ivermectin toxicity in 17 collies. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2002; 16: 89-94.
3. Preston JM. Adverse reactions to unapproved applications. *Veterinary Record* 1983; 112: 286.
4. Seward RL. Reactions in dogs given ivermectin. *Journal of American Veterinary Medical Association* 1983; 183: 493.
5. Tranquilli WJ. Ivermectin toxicosis in two Australian shepherds. *Journal of American Veterinary Medical Association* 1995; 206: 1150.
6. Campbell WC, Benz GW. Ivermectin: a review of efficacy and safety. *Journal of Pharmacology and Therapeutics* 1984; 7: 1-16.
7. Beal MW, Poppenga RH, Birdsall WJ, Hughes D. Respiratory failure attributable to moxidectin intoxication in a dog. *Journal of American Veterinary Medical Association* 1999; 215: 1813-17.
8. Tranquilli WJ, Paul AJ, Todd KS. Assessment of toxicosis induced by high-dose administration of milbemycin oxime in collies. *American Journal of Veterinary Research* 1991; 52: 1170-72.
9. Yas-Natan E, Shamir M, Kleinbart S, Aroch I. Doramectin toxicity in a collie. *Veterinary Record* 2003; 153: 718-20.
10. Bennett DG. Clinical pharmacology of ivermectin. *Journal of American Veterinary Medical Association* 1986; 189: 100-4.
11. Turner MJ, Schaeffer JM. Mode of action of ivermectin. In: Campbell WC. ed. *Ivermectin and abamectin*. New-York: Springer-Verlag inc, 1989: 73-88.
12. Wolstenholme AJ, Rogers AT. Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics. *Parasitology* 2005; 131: S85-95.
13. Lankas GR, Gordon LR. Toxicology. In: Campbell WC. ed. *Ivermectin and abamectin*. New-York: Springer-Verlag inc, 1989: 89-112.

14. Pulliam JD, Preston JM. Safety of ivermectin in target animals. In: Campbell WC. ed. Ivermectin and abamectin. New-York: Springer-Verlag inc, 1989: 149-61.
15. Paul AJ, Tranquilli WJ, Seward RL, Todd KS, DiPietro JA. Clinical observations in collies given ivermectin orally. *American Journal of Veterinary Research* 1987; 48: 684-5.
16. Pulliam JD, Seward RL, Henry RT, Steinberg SA. Investigating ivermectin toxicity in collies. *Veterinary Medicine* 1985; 7: 33-40.
17. Fassler PE, Tranquilli WJ, Paul AJ, Soll MD, DiPietro JA, Todd KS. Evaluation of the safety of ivermectin administered in a beef-based formulation to ivermectin-sensitive collies. *Journal of American Veterinary Medical Association* 1991; 199: 457-60.
18. Paul AJ, Hutchens DE, Firkins LD, Borgstrom M. Dermal safety study with imidacloprid/moxidectin topical solution in the ivermectin-sensitive collie. *Veterinary Parasitology* 2004; 121: 285-91.
19. Paul AJ, Hutchens DE, Firkins LD, Keehan CM. Effects of dermal application of 10,0% imidacloprid-0,08% ivermectin in ivermectin-sensitive collies. *American Journal of Veterinary Research* 2004; 65: 277-8.
20. Paul AJ, Tranquilli WJ, Hutchens DE. Safety of moxidectin in avermectin-sensitive collies. *American Journal of Veterinary Research* 2000; 61: 482-3.
21. Campbell WC. Use of ivermectin in dogs and cats. In: Campbell WC. ed. Ivermectin and abamectin. New-York: Springer-Verlag inc, 1989: 245-59.
22. Chailleux N, Paradis M. Efficacy of selamectin in the treatment of naturally acquired cheyletiellosis in cats. *Canadian Veterinary Journal* 2002; 43: 767-70.
23. Delucchi L, Castro E. Use of doramectin for treatment of notoedric mange in five cats. *Journal of American Veterinary Medical Association* 2000; 216: 215-6.
24. McTier TL, Hair A, Walstrom DJ, Thompson L. Efficacy and safety of topical administration of selamectin for treatment of ear mite infestation in rabbits. *Journal of American Veterinary Medical Association* 2003; 223: 322-4.
25. Pagé N, de Jaham C, Paradis M. Observations on topical ivermectin in the treatment of otoacariosis, cheyletiellosis, and toxocariosis in cats. *Canadian Veterinary Journal* 2000; 41: 773-6.

26. Paradis M. Ivermectin in small animal dermatology. Part II: Extralabel applications. *Compendium of Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 1998; 20: 459-69.
27. Paradis M, Scott DW, Villeneuve A. Efficacy of ivermectin against *Cheyletiella blakei* infestation in cats. *Journal of the American Animal Hospital Association* 1990; 26: 125-8.
28. Paradis M, Villeneuve A. Efficacy of ivermectin against *Cheyletiella yasguri* infestation in dogs. *Canadian Veterinary Journal* 1988; 29: 633-5.
29. Wagner R, Wendlberger U. Field efficacy of moxidectin in dogs and rabbits naturally infested with *Sarcoptes* spp., *Demodex* spp. and *Psoroptes* spp. mites. *Veterinary Parasitology* 2000; 93: 149-58.
30. Bensignor E, Carlotti DN. Essai de traitement de la démodécie généralisée du chien par la moxidectine : résultats préliminaires (18 cas). *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France* 1998; 71: 345-9.
31. Garfield RA, Reedy LM. The use of oral milbemycin oxime (Interceptor®) in the treatment of chronic generalized canine demodicosis. *Veterinary Dermatology* 1992; 3: 231-5.
32. Johnstone IP. Doramectin as a treatment for canine and feline demodicosis. *Australian Veterinary Practitioner* 2002; 32: 98-103.
33. Mueller RS, Bettenay SV. Milbemycin oxime in the treatment of canine demodicosis. *Australian Veterinary Practitioner* 1995; 25: 122-5.
34. Mueller RS, Hastie K, Bettenay SV. Daily oral ivermectin for treatment of generalized demodicosis in 23 dogs. *Australian Veterinary Practitioner* 1999; 29: 132-7.
35. Paradis M, Laperrière É. Efficacy of daily ivermectin treatment in a dog with amitraz-resistant, generalized demodicosis. *Veterinary Dermatology* 1992; 3: 85-8.
36. Ristic Z, Medleau L, Paradis M, White-Weithers NE. Ivermectin for treatment of generalized demodicosis in dogs. *Journal of American Veterinary Medical Association* 1995; 207: 1308-10.
37. Paradis M. New approaches to the treatment of canine demodicosis. *Veterinary Clinics of North America – Small Animal Practice* 1999; 29: 1425-36.

38. Schinkel AH, Smit JJM, van Tellingen O et al. Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* 1994; 77: 491-502.
39. Griffin J, Fletcher N, Clemence R, Blanchfower S, Brayden DJ. Selamectin is a potent substrate and inhibitor of human and canine P-glycoprotein. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 2005; 28: 257-65.
40. Mealey KL. Adverse drug reactions in herding-breed dogs: the role of P-glycoprotein. *Compendium of Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 2006; 28: 23-33.
41. Mealey KL, Bentjen SA, Gay JM, Cantor GH. Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the MDR1 gene. *Pharmacogenetics* 2001; 11: 727-33.
42. Roulet A, Puel O, Gesta S et al. MDR1-deficient genotype in collie dogs hypersensitive to the P-glycoprotein substrate ivermectin. *European Journal of Pharmacology* 2003; 460: 85-91.
43. Henik RA, Kellum HB, Bentjen SA, Mealey KL. Digoxin and mexiletine sensitivity in a collie with the MDR1 mutation. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2006; 20: 415-417.
44. Sartor LL, Bentjen SA, Trepanier L, Mealey KL. Loperamide toxicity in a collie with the MDR1 mutation associated with ivermectin sensitivity. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2004; 18: 117-118.
45. Schinkel AH, Wagenaar E, Mol CAAM, van Deemter L. P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *Journal of Clinical Investigation* 1996; 97 (11): 2517-2524.
46. Nelson OL, Carsten E, Bentjen SA, Mealey KL. Ivermectin toxicity in an Australian shepherd dog with the MDR1 mutation associated with ivermectin sensitivity in collies. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2003; 17: 354-6.
47. Neff MW, Robertson KR, Wong AK et al. Breed distribution and history of canine *mdr1-1Δ*, a pharmacogenetic mutation that marks the emergence of breeds from the collie lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; 101: 11725-30.

48. Geyer J, Döring B, Godoy JR, Leidolf R, Moritz A, Petzinger E. Frequency of the nt230(del4) MDR1 mutation in collies and related dog breeds in Germany. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 2005; 28: 545-51.
49. Geyer J, Klintzsch S, Meerkamp K et al. Detection of the nt230(del4) MDR1 mutation in white Swiss shepherd dogs: case reports of doramectin toxicosis, breed predisposition, and microsatellite analysis. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 2007; 30 (5): 482-485.
50. Mealey KL, Northrup NC, Bentjen SA. Increased toxicity of P-glycoprotein-substrate chemotherapeutic agents in a dog with the MDR1 deletion mutation associated with ivermectin sensitivity. *Journal of American Veterinary Medical Association* 2003; 223 (10): 1453-1455.
51. Mealey KL. Therapeutic implications of the MDR-1 gene. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 2004; 27: 257-264.
52. Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. Human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Research* 2001; 11: 1156-1166.
53. Matheny CJ, Lamb MW, Brouwer KLR, Pollack GM. Pharmacokinetic and pharmacodynamic implications of P-glycoprotein modulation. *Pharmacotherapy* 2001; 21 (7): 778-96.
54. Mealey KL, Gay JM, Martin LG, Waiting DK. Comparison of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in MDR1-1 Δ and MDR1 wildtype dogs. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 2007; 17 (1): 61-6.
55. Fromm MF. P-glycoprotein: defence mechanisms limiting oral bioavailability and CNS accumulation of drugs. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2000; 38: 69-74.
56. Wachter VJ, Salphati L, Benet LZ. Active secretion and enterocytic drug metabolism barriers to drug absorption. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2001; 46: 89-102.
57. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1976; 455 (1): 152-162.

LEGENDS FOR ILLUSTRATIONS

1. Figure 1: Exon 4 and partial intron 4-5 sequences of canine *ABCB1* gene, showing cloning, PCR amplifications and sequencing strategy. Exon 4 sequences are in upper case; numbering corresponds to the start of translation. The forward primers cMDR.A and cMDR.B are underlined and marked in bold; these primers were used for anchored genomic PCR amplification of intron 4-5 sequences. The 4 base pairs involved in the deletion associated with ivermectin sensitivity are indicated by the shaded box. Partial intron 4-5 sequences are in lower case and in italic; numbering corresponds to the first nucleotide of the intron being 1. Reverse primers cMDR.2 and cMDR.seq are underlined and marked in bold. The strategy for screening clinical samples was to perform an initial amplification of genomic DNA using primers cMDR.B and cMDR.2, followed by a sequencing reaction using primer cMDR.seq (see text for further details).
2. Table 1: Data on 28 non collie breed dogs having expressed central neurological signs days to weeks after the initiation of daily oral systemic macrocyclic lactone administration for the treatment of CGD.

DEUXIÈME ARTICLE

Prévalence de l'allèle *ABCB1-1Δ* chez des chiens colleys et bergers australiens au Québec

Stéphane Bissonnette^a, Manon Paradis^a, Isabelle Daneau^b, David W. Silversides^b

^aDépartement de sciences cliniques, Faculté médecine vétérinaire,
Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada

^bDépartement de biomédecine vétérinaire, Faculté de médecine vétérinaire,
Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada

Correspondance : Stéphane Bissonnette, Département de sciences cliniques,
Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000, St-Hyacinthe,
Québec, Canada, J2S 5L2.

Courriel : [information retirée / information withdrawn]

Soumis pour publication en juillet 2008 à la revue
Le Médecin Vétérinaire du Québec.

RÉSUMÉ

Le terme «idiosyncrasiques» ne peut plus être employé pour qualifier les réactions adverses rapportées chez les chiens de races de la lignée des colleys suite à l'administration d'ivermectin et de certains autres médicaments, ceci depuis l'identification de la mutation nt228(del4) du gène *ABCB1* (*ABCB1-1Δ*). Ce gène (aussi connu sous l'appellation *MDR1*) encode la synthèse de la glycoprotéine-P (gp-P), une composante de la barrière hémato-méningée limitant le passage de certaines molécules vers le système nerveux central. Toute altération de l'expression ou de la fonction de la gp-P peut permettre une neurotoxique potentiellement fatale, spécialement suite à l'administration systémique de lactones macrocycliques. Pour des fins de comparaison avec d'autres régions géographiques, la prévalence de la mutation *ABCB1-1Δ* a été évaluée chez des chiens colleys et bergers australiens au Québec. Des écouvillons de muqueuse jugale ont été récoltés chez 30 individus de chacune de ces deux races. Après extraction de l'ADN, la portion pertinente du gène *ABCB1* a été amplifiée par PCR et séquencée. Relativement à ce qui est rapporté ailleurs, la prévalence d'allèles mutant est plus élevée chez les colleys (81,7%) et plus faible chez les bergers australiens (10,0%) au Québec.

ABSTRACT

Prevalence of the *ABCB1-1Δ* allele in collie and Australian shepherd dogs in Quebec

Adverse reactions to ivermectin and many other drugs in dogs from breeds of the collie lineage are no longer idiosyncratic since the identification of the nt228(del4) mutation of the *ABCB1* gene (*ABCB1-1Δ*). *ABCB1* (also known as *MDR1*) codes for the synthesis of P-glycoprotein (P-gp), a component of the blood brain barrier which limits the uptake of some drugs into the central nervous system. Alteration in P-gp expression or function can result in potentially fatal neurotoxicosis, especially following administration of systemic macrocyclic lactones. To allow comparisons with other geographic locations, prevalence of the *ABCB1-1Δ* mutation was evaluated in collie and Australian shepherd dogs in Quebec. Cheek swabs were collected from 30 individuals for both breeds. After DNA extraction, the appropriate portion of the *ABCB1* gene was amplified by PCR and sequenced. The prevalence of mutant alleles in collies (81,7%) and in Australian shepherd dogs (10,0%) is respectively higher and lower in Quebec than what is reported elsewhere.

INTRODUCTION ET REVUE DE LITTÉRATURE

L'ivermectin est une lactone macrocyclique systémique (LMS) possédant un vaste spectre d'activité endectoparasiticide combiné à une ample marge de sécurité chez les mammifères.⁴ Des études de toxicité menées chez des chiens beagles ont démontré que suite à l'administration orale d'une dose unique, aucune réaction adverse n'était observée pour $2,0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, la mydriase était notée à partir de $2,5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ et la LD_{50} a été fixée à $80 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.^{4,21} Lorsque l'ivermectin était administré quotidiennement pendant 14 semaines, aucune réaction adverse n'était observée pour $0,50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, alors qu'une mydriase était notée à partir de $1,0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.^{4,21} Au Canada, l'ivermectin est actuellement approuvé en médecine canine uniquement en prévention de la dirofilariose cardiovasculaire (Heartgard^{30®} et Heartgard^{30®} Plus; Merial) à des doses mensuelles de $0,006$ à $0,012 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

En dermatologie vétérinaire, les LMS (incluant l'ivermectin) sont très efficaces pour traiter de nombreuses maladies cutanées parasitaires^{3,5,7,23,35,36,39,40,58}, incluant la démodécie canine généralisée (DCG).^{2,10,18,31,32,38,48} En traitement de la DCG, l'ivermectin est typiquement administré oralement à raison de $0,30$ à $0,60 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ quotidiennement, c'est-à-dire à des doses beaucoup plus élevées que celles pour lesquelles ce produit est homologué.³⁷

Depuis le début des années 1980, de nombreux cas de réactions idiosyncrasiques à différentes substances ont été décrits chez des chiens colleys et des individus de races apparentées. L'ivermectin est l'exemple classique de médicament souvent incriminé dans ce type de réactions^{14,16,45,54,55}; en effet, des réactions adverses ont été rapportées chez des colleys pour des doses à peine plus élevées que $0,10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.^{44,46,47} L'intoxication aux LMS s'exprime par des signes neurologiques centraux, incluant la mydriase (considérée comme le plus sensible de ces signes), l'hypersalivation, des tremblements, l'ataxie de proprioception, la désorientation, la léthargie, la dépression, des changements de comportement, la cécité, la faiblesse, le décubitus, le coma et la mort. D'autres LMS ont aussi été incriminées dans des réactions de neurotoxicité.^{1,56,59} Ainsi, la sécurité des produits à base de

LMS devant être homologués chez l'espèce canine est habituellement évaluée chez des colleys déjà identifiés sensibles à l'ivermectin à titre de référence.^{8,41-43}

La glycoprotéine-P (gp-P) est une imposante protéine transmembranaire appartenant à la superfamille de transporteurs ABC (*ATP-binding cassette*) et tient une fonction de pompe de transport cellulaire.⁶ Encodée par le gène *ABCB1* (aussi connu sous l'appellation *MDR1*, ou *Multiple Drug Resistance gene*), la gp-P est exprimée au niveau de nombreux tissus, incluant l'endothélium des capillaires cérébraux, les canalicules biliaires, l'épithélium intestinal, les tubules rénaux proximaux, le cortex surrénalien, le placenta, les testicules et les leucocytes. La gp-P participe activement à l'absorption, la distribution et l'élimination de multiples molécules (incluant l'ivermectin et d'autres LMS)^{13,22,24,51}, ainsi qu'à certaines activités physiologiques, comme la régulation de l'axe hypothalamus-hypophyse-surrénales.²⁸ Composante majeure de plusieurs barrières hémato-cellulaires (incluant la barrière hémato-méningée), la gp-P prévient l'exposition de certains organes à la toxicité potentielle d'une grande variété de xénobiotiques. Des altérations génétiques ou pharmacologiques de la fonction de la gp-P ont donc le potentiel d'induire des problèmes de santé. Des polymorphismes intrinsèques du gène *ABCB1* ont d'ailleurs été incriminés dans l'augmentation de susceptibilité à diverses maladies et identifiés chez des humains souffrant de colite ulcéreuse, de la maladie de Parkinson et d'épilepsie réfractaire à plusieurs médicaments.²⁵ Le métabolisme de nombreux médicaments peut donc être modulé (volontairement ou accidentellement) en influençant l'activité de la gp-P.^{6,9,13,22,24,25,57} L'intérêt généré par la gp-P a pris son essor suite à la mise en évidence de son expression par des cellules néoplasiques résistantes à plusieurs agents chimiothérapeutiques.¹⁹

Des souris dont le gène *Mdr1a* (orthologue du gène *ABCB1* canin) avait été expérimentalement inactivé ont été trouvées 50 à 100 fois plus susceptibles à la neurotoxicité provoquée par l'ivermectin que les souris de génotype sauvage.⁵¹ La déficience en gp-P chez les souris génétiquement modifiées engendrait une déficience fonctionnelle de la barrière hémato-méningée et permettait ainsi l'accumulation de l'ivermectin dans le tissu cérébral, expliquant les manifestations de neurotoxicité. Des études sur le gène *ABCB1* canin ont mené à la description

d'un allèle mutant chez un certain pourcentage de chiens de race colley.^{26,49} Cette mutation, une délétion de quatre paires de bases sise dans le quatrième exon du gène *ABCB1* (nt228(del4) *ABCB1*, ou *ABCB1-1Δ*), génère un décalage du cadre de lecture qui engendre un codon «stop» prématuré. Les individus homozygotes pour l'allèle *ABCB1-1Δ* subissent ainsi un défaut de synthèse de la gp-P, déficit qui les expose donc aux effets secondaires indésirables des LMS (et d'une variété de substances) qui ont alors la possibilité de s'accumuler dans l'organisme et de pénétrer le système nerveux central.^{15,25,30,50,52} Si l'allèle *ABCB1-1Δ* s'avérait récessif, les chiens hétérozygotes, tout comme les chiens homozygotes normaux, ne devraient théoriquement pas être sensibles à la neurotoxicité aux LMS.^{26,49} Cependant, des phénotypes de sensibilité intermédiaire à quelques substrats de la gp-P ont été rapportés chez des chiens hétérozygotes pour lesquels des signes de neurotoxicité à l'ivermectin se seraient manifestés à des doses d'à peine plus de 0,1 mg·kg⁻¹, ceci particulièrement lorsque cette LMS était administrée quotidiennement comme pour les protocoles de traitement de la DCG.^{24,25,30} Jusqu'à ce jour, des allèles *ABCB1-1Δ* ont été identifiés chez 10 races de chiens outre le colley^{26,49} : le berger australien (variétés standard et miniature)^{33,34}, le Border collie¹¹, le berger anglais³³, le whippet à poil long³³, le McNab³³, le bobtail³³, le berger des Shetlands³³, le silken windhound³³, le Wäller¹¹ et le berger suisse blanc.¹²

L'objectif de cette étude était d'évaluer la prévalence de l'allèle *ABCB1-1Δ* dans les populations de chiens colleys et bergers australiens au Québec pour des fins de comparaison avec les prévalences rapportées pour d'autres régions géographiques.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les chiens ont été sélectionnés aléatoirement parmi le bassin de propriétaires de colleys et de bergers australiens en provenance de différentes régions du Québec. Ils ont ensuite été répartis en deux groupes, soit le groupe 1, composé de 30 colleys, et le groupe 2, composé de 30 bergers australiens. De plus, 30 chiens de race beagle, en provenance de la colonie de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal ou appartenant à des particuliers, ont été testés à titre de groupe contrôle (génotype sauvage ou homozygote normal).

Afin d'obtenir de l'ADN génomique, des cellules de muqueuse buccale ont été récoltées par écouvillonnage pour chaque animal. Postérieurement à un jeûne d'eau et de nourriture de 2 heures, la muqueuse orale de chaque joue était frottée six fois avec un écouvillon de coton stérile (deux écouvillons par candidat). Les écouvillons étaient ensuite disposés de façon à pouvoir sécher à l'air libre à la température de la pièce pendant 2 heures, puis insérés individuellement dans un contenant de transport (tube de plastique ou tube sec pour la récolte de sang). À leur arrivée au laboratoire, les échantillons étaient entreposés au congélateur jusqu'à leur traitement.

L'extraction de l'ADN génomique, l'amplification par PCR et le séquençage du locus *ABCB1* ont été réalisés selon une méthode décrite précédemment (Bissonnette et coll., observations inédites).

La prévalence de l'allèle *ABCB1-1Δ* est définie ici comme le nombre d'allèles porteurs de cette mutation recensés respectivement pour les groupes de colleys et de bergers australiens de la province de Québec au moment de la présente étude. Elle a été calculée comme le nombre moyen d'allèles mutants à l'intérieur d'un groupe et exprimé sous forme de pourcentage en utilisant la formule suivante :

d'allèles mutants = 2 (# chiens homozygotes mutants) + (# chiens hétérozygotes)

total d'allèles = 2 (# chiens)

Prévalence d'allèles mutants = $\frac{\text{\# d'allèles mutants}}{\text{\# total d'allèles}} \times 100$

RÉSULTATS

Dans le groupe 1 (colleys), l'allèle *ABCB1-1Δ* a été identifié chez 90,0% (27/30) des chiens testés; 73,3% (22/30) des individus étaient homozygotes pour l'allèle mutant et 16,7% (5/30) étaient hétérozygotes. Seulement 10,0% (3/30) des chiens ont été trouvés homozygotes pour l'allèle normal. La prévalence globale de l'allèle *ABCB1-1Δ* était de 81,7%.

Dans le groupe 2 (bergers australiens), 20,0% (6/30) des chiens testés ont été diagnostiqués hétérozygotes pour l'allèle *ABCB1-1Δ* et aucun individu n'a été identifié homozygote mutant. Ainsi, 80,0% (24/30) des animaux testés se sont avérés homozygotes normaux pour le gène *ABCB1*. La prévalence globale de l'allèle *ABCB1-1Δ* était de 10,0%.

Dans le groupe contrôle (beagles), l'allèle *ABCB1-1Δ* n'a été identifié chez aucun des 30 chiens. Ce résultat est cohérent avec la conclusion que les chiens de cette race sont homozygotes normaux (génotype sauvage) au locus *ABCB1*.

DISCUSSION

L'objectif de la présente étude était d'évaluer la prévalence d'allèles affectés par la mutation *ABCB1-1Δ* dans la population de colleys et de bergers australiens de la province de Québec, ceci afin de dresser une comparaison avec la prévalence rapportée dans différents pays. Par extrapolation des données obtenues pour notre échantillonnage, la population de colleys du Québec semble ségréguer des allèles mutants dans une proportion beaucoup plus forte (90,0%) que n'importe où ailleurs à ce jour. En effet, la prévalence d'allèles *ABCB1-1Δ* chez les colleys en provenance d'autres régions géographiques varie entre 50,9 et 81,7%, avec un pourcentage d'homozygotes mutants de 24,2 à 48,0%.^{11,17,20,27,29,33} Au Québec, la reproduction répétée d'individus apparentés (de près ou de loin) est vraisemblablement la principale cause à cette haute prévalence de la mutation : considérant que cette race apparaît moins populaire au Québec qu'elle ne l'a déjà été, la diversité génétique ne peut être maintenue aussi aisément avec les quelques éleveurs encore actifs.

Les résultats obtenus pour les bergers australiens semblent indiquer la tendance inverse. En effet, la prévalence de la mutation *ABCB1-1Δ* au sein de l'échantillon de bergers australiens du Québec, à 10,0%, est plus faible que ce qui a été rapporté précédemment aux États-Unis (18,8%, variétés standard et miniature confondues)³³, en Allemagne (19,5%)¹¹, au Japon (33,3%)²⁰ et en Australie (42,9%)²⁹. Le pourcentage de bergers australiens homozygotes mutants en provenance de ces pays s'étend entre 2,2 et 21,4%^{33,11,20,29} (alors qu'aucun homozygote mutant n'a été identifié dans notre étude); cependant, le nombre de chiens testés dans certains pays était relativement faible (n = 9 pour l'étude japonaise²⁰ et n = 14 pour l'étude australienne²⁹). Des explications possibles à cette faible prévalence de la mutation *ABCB1-1Δ* chez les bergers australiens au Québec incluent la proximité géographique des États-Unis (où une faible prévalence est rapportée) et l'arrivée relativement récente de cette race au

Québec, donc la jeunesse d'un bassin génétique où la mutation n'est que peu dispersée et influencé par un nombre d'éleveurs encore restreint pour le moment.

Les 30 chiens beagles utilisés à titre de population de référence dans la présente étude ont tous été trouvés homozygotes normaux (génotype sauvage) pour l'allèle *ABCB1-1Δ*. Ce résultat était attendu puisque les beagles sont couramment utilisés pour des études de toxicité sans exprimer de sensibilité particulière à différentes LMS^{4,21}.

Dans le but d'évaluer la prévalence de la mutation *ABCB1-1Δ* et sa distribution à l'échelle nationale, il serait intéressant de réaliser un dépistage auprès de chiens appartenant aux races apparentées aux colleys en provenance des autres provinces et territoires canadiens.

L'identification du statut d'un chien en regard de la mutation *ABCB1-1Δ* présente des intérêts et des applications multiples. Chez les races pour lesquelles la prévalence d'allèles mutants est faible, comme les bergers australiens^{33,34}, les bobtails³³ et les Border collies¹¹, l'élimination des allèles mutants du bassin génétique pourrait être réalisable le temps d'une génération, ceci en ne reproduisant que des individus identifiés homozygotes normaux. Pour les races présentant une forte prévalence de la mutation et pour lesquelles les individus homozygotes normaux sont rares, comme les colleys^{11,17,20,27,29,33}, l'éradication rapide de la mutation par reproduction sélective semble irréaliste pour l'instant et serait même non avisée puisqu'elle mènerait à une situation d'entonnoir génétique. Dans de telles circonstances, l'élimination des allèles *ABCB1-1Δ* pourrait être étalée sur plusieurs générations, initialement en ne reproduisant pas les individus homozygotes mutants, puis éventuellement en n'ayant plus recours aux individus hétérozygotes pour la reproduction. Par la même occasion, la connaissance du statut d'un chien quant à la mutation *ABCB1-1Δ* permet l'élaboration d'une pharmacothérapie individualisée efficace et sécuritaire. De nombreux médicaments sont des substrats et/ou inhibiteurs connus de la gp-P, incluant plusieurs antimicrobiens (azoles antifongiques, tétracyclines, quinolones), des

agents antinéoplasiques (doxorubicin, vinblastine, vincristine), quelques médicaments cardiovasculaires (digoxin, diltiazem), des opioïdes (butorphanol, lopéramide), des hormones stéroïdiennes (dexaméthasone, méthylprednisolone) et bien d'autres (acépromazine, amitriptyline, lactones macrocycliques, cimétidine, ranitidine, ciclosporine, tacrolimus).^{22,24,25,52,53} Lors de l'élaboration d'une pharmacothérapie pour un patient canin affecté par la mutation *ABCB1-1Δ*, une attention particulière doit donc être portée quant à la sélection d'une ou plusieurs de ces molécules, de même que lors de la prescription de leur dose respective, ceci en fonction du potentiel d'interactions et d'effets secondaires.

En conclusion, la prévalence de l'allèle *ABCB1-1Δ* apparaît être beaucoup plus élevée chez les colleys et plus basse chez les bergers australiens au Québec comparativement avec ce qui a été rapporté pour toute autre région géographique où elle a été évaluée au moment de cette publication. Le dépistage de cette mutation auprès de chiens représentant les races déjà identifiées comme affectées pourrait grandement contribuer à non seulement tenter de graduellement l'éliminer de leur bassin génétique, mais aussi à concevoir des thérapies médicales individualisées sécuritaires pour chacun d'entre eux.

Un test de dépistage pour l'allèle *ABCB1-1Δ* canin (mutation du gène *MDR1*) est actuellement disponible à la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal. Pour plus d'informations, veuillez communiquer avec Isabelle Daneau aux coordonnées suivantes :

-par la poste: Laboratoire de diagnostic génomique (ADN), Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000, St-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 5L2;

-par courrier électronique : [information retirée / information withdrawn]

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient l'Académie Canadienne de Dermatologie Vétérinaire pour son support financier à cette étude. Ils tiennent également à remercier toutes les familles qui leur ont permis d'inclure leur chien dans ce projet.

BIBLIOGRAPHIE

1. Beal MW, Poppenga RH, Birdsall WJ, Hughes D. Respiratory failure attributable to moxidectin intoxication in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 1999; 215: 1813-1817.
2. Besignor E, Carlotti DN. Essai de traitement de la démodécie généralisée du chien par la moxidectine : résultats préliminaires (18 cas). *Bull Acad Vet Fr* 1998; 71: 345-349.
3. Campbell WC, Benz GW. Ivermectin: a review of efficacy and safety. *J Vet Pharmacol Ther* 1984; 7: 1-16.
4. Campbell WC. Use of ivermectin in dogs and cats. In: Campbell WC, ed. *Ivermectin and abamectin*. New-York: Springer-Verlag inc, 1989: 245-259.
5. Chailleux N, Paradis M. Efficacy of selamectin in the treatment of naturally acquired cheyletiellosis in cats. *Can Vet J* 2002; 43: 767-770.
6. Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. Human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* 2001; 11: 1156-1166.
7. Delucchi L, Castro E. Use of doramectin for treatment of notoedric mange in five cats. *J Am Vet Med Assoc* 2000; 216: 215-216.
8. Fassler PE, Tranquilli WJ, Paul AJ, Soll MD, DiPietro JA, Todd KS. Evaluation of the safety of ivermectin administered in a beef-based formulation to ivermectin-sensitive collies. *J Am Vet Med Assoc* 1991; 199: 457-460.
9. Fromm MF. P-glycoprotein: defence mechanisms limiting oral bioavailability and CNS accumulation of drugs. *Int J Clin Pharm Th* 2000; 38: 69-74.
10. Garfield RA, Reedy LM. The use of oral milbemycin oxime (Interceptor[®]) in the treatment of chronic generalized canine demodicosis. *Vet Dermatol* 1992; 3: 231-235.
11. Geyer J, Döring B, Godoy JR, Leidolf R, Moritz A, Petzinger E. Frequency of the nt230(del4) MDR1 mutation in collies and related dog breeds in Germany. *J Vet Pharmacol Ther* 2005; 28: 545-551.
12. Geyer J, Klintzsch S, Meerkamp K et al. Detection of the nt230(del4) MDR1 mutation in white Swiss shepherd dogs: case reports of doramectin toxicosis,

- breed predisposition, and microsatellite analysis. *J Vet Pharmacol Ther* 2007; 30 (5): 482-485.
13. Griffin J, Fletcher N, Clemence R, Blanchfower S, Brayden DJ. Selamectin is a potent substrate and inhibitor of human and canine P-glycoprotein. *J Vet Pharmacol Ther* 2005; 28: 257-265.
 14. Hadrick MK. Ivermectin toxicosis in two Australian shepherds. *J Am Vet Med Assoc* 1995; 206: 1147-1150.
 15. Henik RA, Kellum HB, Bentjen SA, Mealey KL. Digoxin and mexiletine sensitivity in a collie with the MDR1 mutation. *J Vet Intern Med* 2006; 20: 415-417.
 16. Hopper K, Aldrich J, Haskins SC. Ivermectin toxicity in 17 collies. *J Vet Intern Med* 2002; 16: 89-94.
 17. Hugnet C, Bentjen SA, Mealey KL. Frequency of the mutant MDR1 allele associated with multidrug sensitivity in a sample of collies from France. *J Vet Pharmacol Ther* 2004; 27: 227-229.
 18. Johnstone IP. Doramectin as a treatment for canine and feline demodicosis. *Aust Vet Pract* 2002; 32: 98-103.
 19. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 1976; 455 (1): 152-162.
 20. Kawabata A, Momoi Y, Inoue-Murayama M, Iwasaki T. Canine *mdr1* gene mutation in Japan. *J Vet Med Sci* 2005; 67 (11): 1103-1107.
 21. Lankas GR, Gordon LR. Toxicology. In: Campbell WC, ed. *Ivermectin and abamectin*. New-York: Springer-Verlag inc, 1989: 89-112.
 22. Matheny CJ, Lamb MW, Brouwer KLR, Pollack GM. Pharmacokinetic and pharmacodynamic implications of P-glycoprotein modulation. *Pharmacotherapy* 2001; 21 (7): 778-96.
 23. McTier TL, Hair A, Walstrom DJ, Thompson L. Efficacy and safety of topical administration of selamectin for treatment of ear mite infestation in rabbits. *J Am Vet Med Assoc* 2003; 223: 322-324.
 24. Mealey KL, Bentjen SA, Gay JM, Cantor GH. Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the MDR1 gene. *Pharmacogenetics* 2001; 11: 727-733.

25. Mealey KL, Bentjen SA, Waiting DK. Frequency of the mutant MDR1 allele associated with ivermectin sensitivity in a sample population of collies from the northwestern United States. *Am J Vet Res* 2002; 63: 479-481.
26. Mealey KL, Gay JM, Martin LG, Waiting DK. Comparison of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in MDR1-1 Δ and MDR1 wildtype dogs. *J Vet Emerg Crit Car* 2007; 17 (1): 61-6.
27. Mealey KL, Munyard KA, Bentjen SA. Frequency of the mutant MDR1 allele associated with multidrug sensitivity in a sample of herding breed dogs living in Australia. *Vet Parasitol* 2005; 131: 193-196.
28. Mealey KL, Northrup NC, Bentjen SA. Increased toxicity of P-glycoprotein-substrate chemotherapeutic agents in a dog with the MDR1 deletion mutation associated with ivermectin sensitivity. *J Am Vet Med Assoc* 2003; 223 (10): 1453-1455.
29. Mealey KL. Adverse drug reactions in herding-breed dogs: the role of P-glycoprotein. *Compend Contin Educ Pract Vet* 2006; 28: 23-33.
30. Mealey KL. Therapeutic implications of the MDR-1 gene. *J Vet Pharmacol Ther* 2004;27:257-264.
31. Mueller RS, Bettenay SV. Milbemycin oxime in the treatment of canine demodicosis. *Aust Vet Pract* 1995; 25: 122-125.
32. Mueller RS, Hastie K, Bettenay SV. Daily oral ivermectin for treatment of generalized demodicosis in 23 dogs. *Aust Vet Pract* 1999; 29: 132-137.
33. Neff MW, Robertson KR, Wong AK et al. Breed distribution and history of canine *mdr1-1 Δ* , a pharmacogenetic mutation that marks the emergence of breeds from the collie lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 11725-11730.
34. Nelson OL, Carsten E, Bentjen SA, Mealey KL. Ivermectin toxicity in an Australian shepherd dog with the MDR1 mutation associated with ivermectin sensitivity in collies. *J Vet Intern Med* 2003; 17: 354-356.
35. Pagé N, de Jaham C, Paradis M. Observations on topical ivermectin in the treatment of otoacariasis, cheyletiellosis, and toxocariasis in cats. *Can Vet J* 2000; 41: 773-776.
36. Paradis M, Laperrière É. Efficacy of daily ivermectin treatment in a dog with amitraz-resistant, generalized demodicosis. *Vet Dermatol* 1992; 3: 85-88.

37. Paradis M, Scott DW, Villeneuve A. Efficacy of ivermectin against *Cheyletiella blakei* infestation in cats. J Am Anim Hosp Assoc 1990; 26: 125-128.
38. Paradis M, Villeneuve A. Efficacy of ivermectin against *Cheyletiella yasguri* infestation in dogs. Can Vet J 1988; 29: 633-635.
39. Paradis M. Ivermectin in small animal dermatology. Part II: Extralabel applications. Compend Contin Educ Pract Vet 1998; 20: 459-469.
40. Paradis M. New approaches to the treatment of canine demodicosis. Vet Clin North Am Small Anim Pract 1999; 29: 1425-1436.
41. Paul AJ, Hutchens DE, Firkins LD, Borgstrom M. Dermal safety study with imidacloprid/moxidectin topical solution in the ivermectin-sensitive collie. Vet Parasitol 2004; 121: 285-291.
42. Paul AJ, Hutchens DE, Firkins LD, Keehan CM. Effects of dermal application of 10,0% imidacloprid-0,08% ivermectin in ivermectin-sensitive collies. Am J Vet Res 2004; 65: 277-278.
43. Paul AJ, Tranquilli WJ, Hutchens DE. Safety of moxidectin in ivermectin-sensitive collies. Am J Vet Res 2000; 61: 482-483.
44. Paul AJ, Tranquilli WJ, Seward RL, Todd KS, DiPietro JA. Clinical observations in collies given ivermectin orally. Am J Vet Res 1987; 48: 684-685.
45. Preston JM. Adverse reactions to unapproved applications. Vet Rec 1983; 112: 286.
46. Pulliam JD, Preston JM. Safety of ivermectin in target animals. In: Campbell WC, ed. Ivermectin and abamectin. New-York: Springer-Verlag inc, 1989: 149-161.
47. Pulliam JD, Seward RL, Henry RT, Steinberg SA. Investigating ivermectin toxicity in collies. Vet Med 1985; 7: 33-40.
48. Ristic Z, Medleau L, Paradis M, White-Weithers NE. Ivermectin for treatment of generalized demodicosis in dogs. J Am Vet Med Assoc 1995; 207: 1308-1310.
49. Roulet A, Puel O, Gesta S et al. MDR1-deficient genotype in collie dogs hypersensitive to the P-glycoprotein substrate ivermectin. Eur J Pharmacol 2003; 460: 85-91.
50. Sartor LL, Bentjen SA, Trepanier L, Mealey KL. Loperamide toxicity in a collie with the MDR1 mutation associated with ivermectin sensitivity. J Vet Intern Med 2004; 18: 117-118.

51. Schinkel AH, Smit JJM, van Tellingen O et al. Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* 1994; 77: 491-502.
52. Schinkel AH, Wagenaar E, Mol CAAM, van Deemter L. P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J Clin Invest* 1996; 97 (11): 2517-2524.
53. Seelig A. A general pattern for substrate recognition by P-glycoprotein. *Eur J Biochem* 1998; 251: 252-261.
54. Seward RL. Reactions in dogs given ivermectin. *J Am Vet Med Assoc* 1983; 183: 493.
55. Tranquilli WJ, Paul AJ, Todd KS. Assessment of toxicosis induced by high-dose administration of milbemycin oxime in collies. *Am J Vet Res* 1991; 52: 1170-1172.
56. Tranquilli WJ. Ivermectin toxicosis in two Australian shepherds. *J Am Vet Med Assoc* 1995; 206: 1150.
57. Wachter VJ, Salphati L, Benet LZ. Active secretion and enterocytic drug metabolism barriers to drug absorption. *Adv Drug Deliver Rev* 2001; 46: 89-102.
58. Wagner R, Wendlberger U. Field efficacy of moxidectin in dogs and rabbits naturally infested with *Sarcoptes* spp., *Demodex* spp. and *Psoroptes* spp. mites. *Vet Parasitol* 2000 ; 93: 149-158.
59. Yas-Natan E, Shamir M, Kleinbart S, Aroch I. Doramectin toxicity in a collie. *Vet Rec* 2003; 153: 718-720.

DISCUSSION GÉNÉRALE DES RÉSULTATS

L'objectif premier de la présente étude était de retracer un éventuel génotype hétérozygote pour la mutation nt228(del4) du gène *ABCB1* (*ABCB1-1Δ*) chez des chiens non apparentés à la lignée des colleys et ayant exprimé des signes de neurotoxicité subchronique lorsque traités quotidiennement avec une LMS pour une DCG. L'hypothèse que nous avons testée proposait que ces chiens soient hétérozygotes pour la mutation *ABCB1-1Δ*, ceci entraînant potentiellement une diminution d'activité de la gp-P se traduisant par une subséquente neurotoxicose. À la lumière des résultats obtenus, l'hypothèse avancée semble invalidée puisque la mutation en question n'a pu être dépistée que chez un seul des 28 chiens testés. Ce candidat, un croisé Labrador identifié hétérozygote, recevait comme LMS de l'ivermectin à une dose orale quotidienne exceptionnellement élevée de $0,67 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ depuis 7 semaines lorsque des signes neurologiques centraux commencèrent à se manifester. Nous ne pouvons infirmer que son bagage génétique soit totalement étranger aux expressions de toxicité; en effet, une augmentation de sensibilité à la neurotoxicité aux LMS chez les chiens hétérozygotes pour la mutation *ABCB1-1Δ*, telle qu'observée précédemment, demeure une possibilité à prouver formellement lors d'études cliniques futures. Néanmoins, le haut dosage d'ivermectin lui-même représente une explication plausible en soit. La généalogie de ce chien nous étant inconnue, nous ne sommes pas en mesure de déterminer s'il compte parmi ses ancêtres un individu descendant d'une race de chiens de berger; cependant, cette éventualité nous apparaît la plus probable pour expliquer la présence de l'allèle *ABCB1-1Δ*.

Au moment de l'apparition des réactions adverses, près de la moitié des chiens recrutés (13/28) recevaient $0,50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ou plus d'ivermectin quotidiennement, soit des doses avoisinant la limite supérieure de l'intervalle thérapeutique rapporté pour traiter une DCG. De tels dosages peuvent être considérés à risque de potentialiser une toxicité via un phénomène de saturation des mécanismes d'élimination, comme semble le suggérer le cas du Labrador croisé recevant $0,67 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ d'ivermectin quotidiennement. De plus, des interactions pharmacologiques non implicites dans les rapports de description des cas recrutés pourraient être

impliquées (exemple : inhibition du cytochrome P450 3A avec du jus de pamplemousse), ainsi que certaines molécules non mentionnées, mais aussi administrées conjointement aux LMS, pourraient aussi éventuellement se révéler être des substrats de la gp-P encore non identifiés.

Parmi les candidats recrutés, des interactions médicamenteuses peuvent être suspectées chez 10 des 28 chiens (35,7%) qui recevaient différents substrats connus ou putatifs de la gp-P simultanément avec une LMS. Cette observation suggère que des réactions adverses pourraient bien être imputables à des interactions pharmacologiques plus fréquemment que ce qui est généralement soupçonné. Elle souligne également l'importance d'être prudent lors de l'élaboration d'une pharmacothérapie composée de multiples médicaments pour un patient donné, ceci en portant une attention particulière au potentiel de chaque molécule d'être substrat et/ou inhibiteur de la gp-P et du cytochrome P450 3A.

D'autres hypothèses peuvent être considérées pour tenter d'expliquer les manifestations de neurotoxicité chez les chiens recrutés. Tout d'abord, une relation de cause à effet entre la manifestation clinique observée et la médication en cours n'a pas été systématiquement démontrée pour la plupart des chiens ayant reçu plusieurs médicaments simultanément (i.e. reprendre l'administration de la LMS après la résolution des signes de toxicité).

Puisque des polymorphismes dans l'expression du gène *ABCB1* et d'autres gènes de la superfamille de transporteurs ABC sont décrits chez l'humain, il pourrait s'avérer qu'il en existe aussi chez le chien qui prédisposeraient certains individus à des réactions adverses à différentes molécules. Il est possible que les signes de neurotoxicité observés soient le résultat d'une mutation génétique présentement non décrite (faux-sens, non-sens, insertion ou délétion), affectant la structure de la gp-P elle-même ou d'une autre protéine de transport pour les LMS, de la même sous-famille (*ABCB* codant pour les MDRs) ou non (exemple : *ABCC* codant pour les MRPs). De plus, des mutations au niveau des régions de contrôle génétique influençant le niveau d'expression du gène *ABCB1* ou d'autres gènes de la superfamille de transporteurs ABC pourraient prédisposer certains chiens à réagir

de façon aberrante à différentes molécules. De nouvelles ressources génétiques, telles les analyses SNP, pourraient s'avérer utiles dans le cadre de futures études cliniques s'intéressant à la neurotoxicité aux LMS.

Parmi les candidats recrutés pour l'étude, quatre chiens étaient affectés de maladies concomitantes (hyperadrénocorticisme, lymphome épithéliotrope, insuffisance rénale chronique et hémangiopéricytome). Des perturbations métaboliques induites par ces pathologies pourraient avoir modifié la fonction de la gp-P ou une autre étape du métabolisme des LMS. Dans de telles circonstances, d'autres phénomènes de transport pourraient être favorisés sous différentes conditions non physiologiques.

Dans un second temps, nous avons aussi cherché à évaluer la prévalence d'allèles affectés par la mutation *ABCB1-1Δ* dans la population de colleys et de bergers australiens de la province de Québec, ceci afin de dresser une comparaison avec la prévalence rapportée dans différents pays. Par extrapolation des données obtenues pour notre échantillonnage, la population de colleys du Québec semble ségréguer des allèles mutants dans une proportion beaucoup plus forte (90,0%) que n'importe où ailleurs à ce jour. En effet, la prévalence d'allèles *ABCB1-1Δ* chez les colleys en provenance d'autres régions géographiques varie entre 50,9 et 81,7%, avec un pourcentage d'homozygotes mutants de 24,2 à 48,0%^{12, 14, 85-88} (contre 73,3% d'homozygotes mutants québécois). Au Québec, la reproduction répétée d'individus apparentés (de près ou de loin) est vraisemblablement la principale cause à cette haute prévalence de la mutation : considérant que cette race apparaît moins populaire au Québec qu'elle ne l'a déjà été, la diversité génétique ne peut être maintenue aussi aisément avec les quelques éleveurs encore actifs.

Les résultats obtenus pour les bergers australiens semblent indiquer la tendance inverse. En effet, la prévalence de la mutation *ABCB1-1Δ* au sein de l'échantillon de bergers australiens du Québec, à 10,0%, est plus faible que ce qui a été rapporté précédemment aux États-Unis (18,8%, variétés standard et miniature

confondues)¹⁴, en Allemagne (19,5%)¹², au Japon (33,3%)⁸⁶ et en Australie (42,9%)⁸⁸. Le pourcentage de bergers australiens homozygotes mutants en provenance de ces pays s'étend entre 2,2 et 21,4%^{12, 14, 86, 88} (alors qu'aucun homozygote mutant n'a été identifié dans notre étude); cependant, le nombre de chiens testés dans certains pays était relativement faible (n = 9 pour l'étude japonaise⁸⁶ et n = 14 pour l'étude australienne⁸⁸). Des explications possibles à cette faible prévalence de la mutation *ABCB1-1Δ* chez les bergers australiens de la province de Québec incluent la proximité géographique des États-Unis (où une faible prévalence est rapportée) et l'arrivée relativement récente de cette race au Québec; donc la jeunesse d'un bassin génétique où la mutation n'est que peu dispersée et influencé par un nombre d'éleveurs encore restreint pour le moment.

Dans le but d'évaluer la prévalence de la mutation *ABCB1-1Δ* et sa distribution à l'échelle nationale, il serait intéressant de réaliser un dépistage auprès de chiens appartenant à des races descendant de l'arbre généalogique des colleys en provenance des autres provinces et territoires canadiens.

L'identification du statut d'un chien en regard de la mutation *ABCB1-1Δ* présente des intérêts et des applications multiples. Chez les races pour lesquelles la prévalence d'allèles mutants est faible, comme les bergers australiens^{14, 15}, les bobtails¹⁴ et les Border collies¹², l'élimination des allèles mutants du bassin génétique pourrait être réalisable le temps d'une génération, ceci en ne reproduisant que des individus identifiés homozygotes normaux. Pour les races présentant une forte prévalence de la mutation et pour lesquelles les individus homozygotes normaux sont rares, comme les colleys^{12, 14, 85-88}, l'éradication rapide de la mutation par reproduction sélective semble irréaliste pour l'instant et serait même non avisée puisqu'elle mènerait à une situation d'entonnoir génétique. Dans de telles circonstances, l'élimination des allèles *ABCB1-1Δ* pourrait être étalée sur plusieurs générations, initialement en ne reproduisant pas les individus homozygotes mutants, puis éventuellement en n'ayant plus recours aux individus hétérozygotes pour la reproduction. Par la même occasion, la connaissance du statut d'un chien quant à la mutation *ABCB1-1Δ* permet l'élaboration d'une

pharmacothérapie individualisée efficace et sécuritaire. De nombreux médicaments sont des substrats et/ou inhibiteurs connus de la gp-P, incluant plusieurs antimicrobiens, des agents antinéoplasiques, quelques médicaments cardiovasculaires, des opioïdes, des hormones stéroïdiennes et bien d'autres (voir Tableau III, p.14 et Tableau IV, p.15)^{17, 22, 72, 73}.

Puisque les chiens beagles testés au cours de notre étude sont tous homozygotes normaux, donc non porteurs de la mutation *ABCB1-1Δ*, et que des représentants de cette race avaient déjà été mis à l'épreuve dans des études de toxicité sans manifester de sensibilité particulière à différentes LMS^{6, 40}, nos résultats corroborent qu'ils peuvent être considérés comme des modèles de type sauvage adéquats lors de l'étude de ladite mutation.

CONCLUSIONS

La pharmacogénétique est une branche de la pharmacologie s'intéressant au comportement de différentes substances et aux variations de réponse à celles-ci relativement au bagage génétique d'un individu. De ce fait, elle représente une source d'explications rationnelles pour certaines réactions adverses ou idiosyncrasiques face à certains médicaments, de même que pour les différences individuelles de succès d'un traitement. Nombreux en sont les impacts sur le domaine médical puisqu'elle permet l'élaboration de pharmacothérapies personnalisées efficaces et sécuritaires en évaluant le risque potentiel d'une molécule donnée pour un patient particulier¹⁷.

D'après les résultats de cette étude, nous pouvons conclure qu'il existe actuellement peu d'évidence quant à l'implication de la mutation *ABCB1-1Δ* dans la manifestation des signes de neurotoxicité observés chez les chiens (autre ceux appartenant à des races de la lignée des colleys) recevant quotidiennement une LMS comme traitement pour une DCG. Ainsi, d'autres avenues devront être explorées pour tenter de trouver une explication aux manifestations de toxicité observées. Quoique les résultats obtenus aient invalidé l'hypothèse testée, ils nous ont cependant permis de mettre en relief certains aspects à ne pas perdre de vue lors de la prescription d'une thérapie médicale à un patient donné. Dans notre étude, il semblerait que pour environ un tiers des cas de manifestations de neurotoxicité, des interactions médicamenteuses soient plausiblement responsables. Ces observations soulignent l'importance d'être avisé du potentiel de réaction adverse lors de l'administration simultanée de certaines molécules, comme celles connues pour interagir avec la gp-P et/ou le cytochrome P450 3A. Il n'en reste pas moins que le génotype d'un individu peut affecter sa réponse à certains médicaments. Par contre, avant d'exclure d'office un médicament des options thérapeutiques d'un patient en se basant uniquement sur son phénotype, les tests de dépistage appropriés devraient idéalement être réalisés au préalable. Les recherches pharmacogénétiques en cours et futures, particulièrement celles s'intéressant à la superfamille de transporteurs ABC, devraient apporter davantage de compréhension face à de multiples réactions médicamenteuses soi-disant idiosyncrasiques.

Comparativement avec toute autre région géographique pour laquelle des données ont été obtenues au moment de la publication du présent mémoire, la prévalence d'allèles *ABCB1-1Δ* chez les colleys de la province de Québec apparaît être significativement plus élevée, alors qu'elle y semble plus faible chez les bergers australiens. Le dépistage de cette mutation auprès de chiens représentant les races déjà identifiées comme potentiellement affectées pourrait grandement contribuer à non seulement tenter de graduellement l'éliminer de leur bassin génétique, mais aussi à concevoir des thérapies médicales individualisées sécuritaires pour chacun d'entre eux.

BIBLIOGRAPHIE

1. Hadrick M.K., Bunch S.E. et Kornegay J.N. Ivermectin toxicosis in two Australian shepherds. *Journal of American Veterinary Medical Association* 1995; 206 (8): 1147-1150.
2. Hopper K., Aldrich J. et Haskins S.C. Ivermectin toxicity in 17 collies. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2002; 16: 89-94.
3. Preston J.M. Adverse reactions to unapproved applications. *Veterinary Record* 1983; 112: 286.
4. Seward R.L. Reactions in dogs given ivermectin. *Journal of American Veterinary Medical Association* 1983; 183: 493.
5. Tranquilli W.J. Ivermectin toxicosis in two Australian shepherds. *Journal of American Veterinary Medical Association* 1995; 206 (8): 1150.
6. Campbell W.C. et Benz G.W. Ivermectin: a review of efficacy and safety. *Journal of Pharmacology* 1984; 7: 1-16.
7. Beal M.W., Poppenga R.H., Birdsall W.J. et Hughes D. Respiratory failure attributable to moxidectin intoxication in a dog. *Journal of American Veterinary Medical Association* 1999; 215 (12): 1813-1817.
8. Tranquilli W.J., Paul A.J. et Todd K.S. Assessment of toxicosis induced by high-dose administration of milbemycin oxime in collies. *American Journal of Veterinary Research* 1991; 52: 1170-1172.
9. Yas-Natan E., Shamir M., Kleinbart S. et Aroch I. Doramectin toxicity in a collie. *Veterinary Record* 2003; 153: 718-720.
10. Mealey K.L., Bentjen S.A., Gay J.M. et Cantor G.H. Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *MDR1* gene. *Pharmacogenetics* 2001; 11: 727-733.
11. Roulet A., Puel O., Gesta S., et al. *MDR1*-deficient genotype in collie dogs hypersensitive to the P-glycoprotein substrate ivermectin. *European Journal of Pharmacology* 2003; 460: 85-91.
12. Geyer J., Döring B., Godoy J.R., Leidolf R., Moritz A. et Petzinger E. Frequency of the nt230(del4) *MDR1* mutation in collies and related dog breeds in Germany. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 2005; 28: 545-551.
13. Geyer J., Klintzsch S., Meerkamp K., et al. Detection of the nt230(del4) *MDR1* mutation in white Swiss shepherd dogs: case reports of doramectin toxicosis, breed predisposition, and microsatellite analysis. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 2007; 30 (5): 482-485.
14. Neff M.W., Robertson K.R., Wong A.K., et al. Breed distribution and history of canine *mdr1-1Δ*, a pharmacogenetic mutation that marks the emergence of breeds from the collie lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; 101: 11725-11730.
15. Nelson O.L., Carsten E., Bentjen S.A. et Mealey K.L. Ivermectin toxicity in an Australian shepherd dog with the *MDR1* mutation associated with ivermectin sensitivity in collies. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2003; 17: 354-356.
16. Griffin J., Fletcher N., Clemence R., Blanchflower S. et Brayden D.J. Selamectin is a potent substrate and inhibitor of human and canine P-glycoprotein. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 2005; 28: 257-265.

17. Mealey K.L. Adverse drug reactions in herding-breed dogs: the role of P-glycoprotein. *Compendium of Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 2006; 28: 23-33.
18. Schinkel A.H., Smit J.J.M., van Tellingen O., *et al.* Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* 1994; 77: 491-502.
19. Henik R.A., Kellum H.B., Bentjen S.A. et Mealey K.L. Digoxin and mexiletine sensitivity in a collie with the *MDR1* mutation. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2006; 20: 415-417.
20. Sartor L.L., Bentjen S.A., Trepanier L. et Mealey K.L. Loperamide toxicity in a collie with the *MDR1* mutation associated with ivermectin sensitivity. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2004; 18: 117-118.
21. Schinkel A.H., Wagenaar E., Mol C.A.A.M. et van Deemter L. P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *Journal of Clinical Investigation* 1996; 97 (11): 2517-2524.
22. Mealey K.L. Therapeutic implications of the *MDR1* gene. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 2004; 27: 257-264.
23. Mealey K.L., Northrup N.C. et Bentjen S.A. Increased toxicity of P-glycoprotein-substrate chemotherapeutic agents in a dog with the *MDR1* deletion mutation associated with ivermectin sensitivity. *Journal of American Veterinary Medical Association* 2003; 223 (10): 1453-1455.
24. Bensignor E. et Carlotti D.N. Essai de traitement de la démodécie généralisée du chien par la moxidectine : résultats préliminaires (18 cas). *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France* 1998; 71 (4): 345-349.
25. Garfield R.A. et Reedy L.M. The use of oral milbemycin oxime (Interceptor[®]) in the treatment of chronic generalized canine demodicosis. *Veterinary Dermatology* 1992; 3: 231-235.
26. Johnstone I.P. Doramectin as a treatment for canine and feline demodicosis. *Australian Veterinary Practitioner* 2002; 32 (3): 98-103.
27. Mueller R.S. et Bettenay S.V. Milbemycin oxime in the treatment of canine demodicosis. *Australian Veterinary Practitioner* 1995; 25: 122-125.
28. Mueller R.S., Hastie K. et Bettenay S.V. Daily oral ivermectin for treatment of generalized demodicosis in 23 dogs. *Australian Veterinary Practitioner* 1999; 29: 132-137.
29. Paradis M. et Laperrière É. Efficacy of daily ivermectin treatment in a dog with amitraz-resistant, generalized demodicosis. *Veterinary Dermatology* 1992; 3 (2): 85-88.
30. Ristic Z., Medleau L., Paradis M. et White-Weithers N.E. Ivermectin for treatment of generalized demodicosis in dogs. *Journal of American Veterinary Medical Association* 1995; 207 (10): 1308-1310.
31. Medleau L., Ristic Z. et McElveen D.R. Daily ivermectin for treatment of generalized demodicosis in dogs. *Veterinary Dermatology* 1996; 7: 209-212.
32. Bishop B.F., Bruce C.I., Evans N.A., *et al.* Selamectin: a novel broad-spectrum endectocide for dogs and cats. *Veterinary Parasitology* 2000; 91: 163-176.
33. Campbell W.C. Ivermectin, an antiparasitic agent. *Medicinal Research Reviews* 1993; 13 (1): 61-79.

34. Shoop W.L., Mrozik H. et Fisher M.H. Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. *Veterinary Parasitology* 1995; 59: 139-156.
35. Bennett D.G. Clinical pharmacology of ivermectin. *Journal of American Veterinary Medical Association* 1986; 189: 100-104.
36. Kass I.S., Wang C.C., Walrond J.P. et Stretton O.W. Avermectin B_{1a}, a paralyzing anthelmintic that affects interneurons and inhibitory motoneurons in *Ascaris*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1980; 77 (10): 6211-6215.
37. Paradis M. L'ivermectin chez les petits animaux. *Le médecin vétérinaire du Québec* 1987; 17: 113-116.
38. Turner M.J. et Schaeffer J.M. Mode of action of ivermectin. Tiré de: *Ivermectin and Abamectin*, W.C. Campbell éd. New-York, Springer-Verlag inc.; 1989: 73-88.
39. Wolstenholme A.J. et Rogers A.T. Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics. *Parasitology* 2005; 131: S85-95.
40. Lankas G.R. et Gordon L.R. Toxicology. Tiré de: *Ivermectin and abamectin*, W.C. Campbell éd. New-York, Springer-Verlag inc; 1989: 89-112.
41. Paul A.J., Tranquilli W.J., Seward R.L., Todd K.S. et DiPietro J.A. Clinical observations in collies given ivermectin orally. *American Journal of Veterinary Research* 1987; 48 (4): 684-685.
42. Pulliam J.D. et Preston J.M. Safety of ivermectin in target animals. Tiré de: *Ivermectin and abamectin*, W.C. Campbell éd. New-York, Springer-Verlag inc; 1989: 149-161.
43. Pulliam J.D., Seward R.L., Henry R.T. et Steinberg S.A. Investigating ivermectin toxicity in collies. *Veterinary Medicine* 1985; 7: 33-40.
44. Fassler P.E., Tranquilli W.J., Paul A.J., Soll M.D., DiPietro J.A. et Todd K.S. Evaluation of the safety of ivermectin administered in a beef-based formulation to ivermectin-sensitive collies. *Journal of American Veterinary Medical Association* 1991; 199: 457-460.
45. Paul A.J., Hutchens D.E., Firkins L.D. et Borgstrom M. Dermal safety study with imidacloprid/moxidectin topical solution in the avermectin-sensitive collie. *Veterinary Parasitology* 2004; 121: 285-291.
46. Paul A.J., Hutchens D.E., Firkins L.D. et Keehan C.M. Effects of dermal application of 10,0% imidacloprid-0,08% ivermectin in ivermectin-sensitive collies. *American Journal of Veterinary Research* 2004; 65 (3): 277-278.
47. Paul A.J., Tranquilli W.J. et Hutchens D.E. Safety of moxidectin in avermectin-sensitive collies. *American Journal of Veterinary Research* 2000; 61 (5): 482-483.
48. Campbell W.C. Use of ivermectin in dogs and cats. Tiré de: *Ivermectin and abamectin*, W.C. Campbell éd. New-York, Springer-Verlag inc; 1989: 245-259.
49. Chailleux N. et Paradis M. Efficacy of selamectin in the treatment of naturally acquired cheyletiellosis in cats. *Canadian Veterinary Journal* 2002; 43: 767-770.
50. Delucchi L. et Castro E. Use of doramectin for treatment of notoedric mange in five cats. *Journal of American Veterinary Medical Association* 2000; 216 (2): 215-216.

51. McTier T.L., Hair J.A., Walstrom D.J. et Thompson L. Efficacy and safety of topical administration of selamectin for treatment of ear mite infestation in rabbits. *Journal of American Veterinary Medical Association* 2003; 223 (3): 322-324.
52. Pagé N., de Jaham C. et Paradis M. Observations on topical ivermectin in the treatment of otoacariosis, cheyletiellosis, and toxocariosis in cats. *Canadian Veterinary Journal* 2000; 41: 773-776.
53. Paradis M. Ivermectin in small animal dermatology. Part II: Extralabel applications. *Compendium of Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 1998; 20: 773-776.
54. Paradis M., Scott D.W. et Villeneuve A. Efficacy of ivermectin against *Cheyletiella blakei* infestation in cats. *Journal of the American Animal Hospital Association* 1990; 26: 125-128.
55. Paradis M. et Villeneuve A. Efficacy of ivermectin against *Cheyletiella yasguri* infestation in dogs. *Canadian Veterinary Journal* 1988; 29: 633-635.
56. Wagner R. et Wendlberger U. Field efficacy of moxidectin in dogs and rabbits naturally infested with *Sarcoptes* spp., *Demodex* spp. and *Psoroptes* spp. mites. *Veterinary Parasitology* 2000; 93: 149-158.
57. Paradis M. New approaches to the treatment of canine demodicosis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 1999; 29 (6): 1425-1436.
58. Paradis M. Le traitement de la démodécie canine : données actualisées. *Informations dermatologiques vétérinaires* 2004; octobre: 6-15.
59. Scott D.W., Miller W.H.J. et Griffin C.E. Parasitic skin diseases - Canine demodicosis. Tiré de: *Muller and Kirk's Small Animal Dermatology*, 6^e éd. Philadelphie, W.B. Saunders; 2001: 457-474.
60. Desch C.E. et Hillier A. *Demodex injai*: a new species of hair follicle mite (Acari: Demodecidae) from the domestic dog (Canidae). *Journal of Medical Entomology* 2003; 40 (2): 146-149.
61. Hillier A. et Desch C.E. Large-bodied *Demodex* mite infestation in 4 dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2002; 220 (5): 623-627.
62. Mueller R.S. et Bettenay S.V. An unusual presentation of canine demodicosis caused by a long-bodied *Demodex* mite in a Lakeland terrier. *Australian Veterinary Practitioner* 1999; 29 (3): 128-131.
63. Robson D.C., Burton G.G., Bassett R., Shipstone M. et Mueller R.S. Eight cases of demodicosis caused by a long-bodied *Demodex* species (1997-2002). *Australian Veterinary Practitioner* 2003; 33 (2): 64-74.
64. Chen C. A short-tailed demodectic mite and *Demodex canis* infestation in a Chihuahua dog. *Veterinary Dermatology* 1995; 6 (4): 227-229.
65. Chen C., Hou C.C. et Bourdeau P.J. Easy way to differentiate short-tailed demodectic mite from *Demodex canis*. Seventeenth Proceedings of the American Academy of Veterinary Dermatology and American College of Veterinary Dermatology Annual Meeting, New Orleans 2002: 212.
66. Chesney C.J. Short form of *Demodex* species mite in the dog: occurrence and measurements. *Journal of Small Animal Practice* 1999; 40 (2): 58-61.
67. Mason K.V. A new species of demodex mite with *D. canis* causing canine demodicosis: a case report. Eighth Proceedings of the American Academy

- of Veterinary Dermatology and American College of Veterinary Dermatology Annual Meeting, San Diego 1993: 92.
68. Saridomichelakis M., Koutinas A., Papadogiannakis E., Papazachariadou M., Liapi M. et Trakas D. Adult-onset demodicosis in two dogs due to *Demodex canis* and a short-tailed demodectic mite. *Journal of Small Animal Practice* 1999; 40 (11): 529-532.
 69. Tamura Y., Kawamura Y., Inoue I. et Ishino S. Scanning electron microscopy description of a new species of *Demodex canis* spp. *Veterinary Dermatology* 2001; 12 (5): 275-278.
 70. Mueller R.S. Treatment protocols for demodicosis: an evidence-based review. *Veterinary Dermatology* 2004; 15 (2): 75-89.
 71. Dean M., Rzhetsky A. et Allikmets R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Research* 2001; 11: 1156-1166.
 72. Matheny C.J., Lamb M.W., Brouwer K.L.R. et Pollack G.M. Pharmacokinetic and pharmacodynamic implications of P-glycoprotein modulation. *Pharmacotherapy* 2001; 21 (7): 778-796.
 73. Seelig A. A general pattern for substrate recognition by P-glycoprotein. *European Journal of Biochemistry* 1998; 251: 252-261.
 74. Mealey K.L., Gay J.M., Martin L.G. et Waiting D.K. Comparison of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in *mdr1-1Δ* and MDR1 wildtype dogs. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 2007; 17 (1): 61-66.
 75. Fromm M.F. P-glycoprotein: defense mechanisms limiting oral bioavailability and CNS accumulation of drugs. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2000; 38: 69-74.
 76. Wachter V.J., Salphati L. et Benet L.Z. Active secretion and enterocytic drug metabolism barriers to drug absorption. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1996; 20: 99-112.
 77. Juliano R.L. et Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1976; 455 (1): 152-162.
 78. Lee J.J., Hughes C.S., Fine R.L. et Page R.L. P-glycoprotein expression in canine lymphoma: a relevant, intermediate model of multidrug resistance. *Cancer* 1996; 77 (9): 1892-1898.
 79. Mealey K.L., Barhoumi R., Rogers K. et Kochevar D.T. Doxorubicin induced expression of P-glycoprotein in a canine osteosarcoma cell line. *Cancer Letters* 1998; 126: 187-192.
 80. Barthomeuf C., Grassi J., Demeule M., Fournier C., Boivin D. et Béliveau R. Inhibition of P-glycoprotein transport function and reversion of MDR1 multidrug resistance by cniadin. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2005; 56 (2): 173-181.
 81. Ibrahim S., Peggins J., Knapton A., Licht T. et Aszalos A. Influence of beta-adrenergic antagonists, H1-receptor blockers, analgesics, diuretics, and quinolone antibiotics on the cellular accumulation of the anticancer drug, daunorubicin: P-glycoprotein modulation. *Anticancer research* 2001; 21 (2A): 847-856.
 82. Didziapetris R., Japertas P., Avdeef A. et Petrauskas A. Classification analysis of P-glycoprotein substrate specificity. *Journal of Drug Targeting* 2003; 11 (7): 391-406.

83. Lespine A., Dupuy J., Orlowski S., *et al.* Interaction of ivermectin with multidrug resistance proteins (MRP1, 2 and 3). *Chemico-Biological Interactions* 2006; 159: 169-179.
84. Borst P. et Oude Elferink R. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annual Review of Biochemistry* 2002; 71: 537-592.
85. Hugnet C., Bentjen S.A. et Mealey K.L. Frequency of the mutant *MDR1* allele associated with multidrug sensitivity in a sample of collies from France. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 2004; 27: 227-229.
86. Kawabata A., Momoi Y., Inoue-Murayama M. et Iwasaki T. Canine *MDR1* gene mutation in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science* 2005; 67 (11): 1103-1107.
87. Mealey K.L., Bentjen S.A. et Waiting D.K. Frequency of the mutant *MDR1* allele associated with ivermectin sensitivity in a sample population of collies from the northwestern United States. *American Journal of Veterinary Research* 2002; 63 (4): 479-481.
88. Mealey K.L., Munyard K.A. et Bentjen S.A. Frequency of the mutant *MDR1* allele associated with multidrug sensitivity in a sample of herding breed dogs living in Australia. *Veterinary Parasitology* 2005; 131: 193-196.

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE

IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT

Nom de l'étudiant Stéphane Bissonnette		Code permanent [REDACTED]
Sigle du programme M.Sc.	Titre du programme Sciences vétérinaires	Option Sciences cliniques

DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Auteurs Stéphane Bissonnette, Manon Paradis, Isabelle Daneau, David W. Silversides	
Titre The <i>ABCBI-1Δ</i> mutation is not responsible for subchronic neurotoxicity seen in dogs of non-collie breeds following macrocyclic lactone treatment for generalized demodicosis	
Revue Veterinary Dermatology	Date de publication Accepté pour publication

DÉCLARATION DES COAUTEURS

Déclaration		
<i>À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que (nom de l'étudiant) inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre (titre du mémoire).</i>		
Coauteur Manon Paradis	Signature [Signature]	Date 25/08/2008
Coauteur Isabelle Daneau	Signature [Signature]	Date 20/08/2008
Coauteur David W. Silversides	Signature [Signature]	Date 20/08/2008
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE

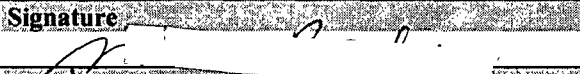


IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT

Nom de l'étudiant Stéphane Bissonnette		Code permanent [REDACTED]
Sigle du programme M.Sc.	Titre du programme Sciences vétérinaires	Option Sciences cliniques

DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Auteurs Stéphane Bissonnette, Manon Paradis, Isabelle Daneau, David W. Silversides	
Titre Prévalence de l'allèle <i>ABCBI-1Δ</i> chez des chiens colleys et bergers australiens au Québec	
Revue Le Médecin Vétérinaire du Québec	Date de publication Soumis pour publication

DÉCLARATION DES COAUTEURS

Déclaration		
<i>À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que (nom de l'étudiant) inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre (titre du mémoire).</i>		
Coauteur Manon Paradis	Signature 	Date 25/08/2008
Coauteur Isabelle Daneau	Signature 	Date 20/08/2008
Coauteur David W. Silversides	Signature 	Date 26/09/08
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date

Objet: Copyrights Veterinary Dermatology

Please note: You retain the following rights to re-use the Article, as long as you do not sell or reproduce the Article or any part of it for commercial purposes (i.e. for monetary gain on your own account or on that of a third party, or for indirect financial gain by a commercial entity). These rights apply without needing to seek permission from Blackwell Publishing.

Prior to acceptance: We ask that as part of the publishing process you acknowledge that the Article has been submitted to the Journal. You will not prejudice acceptance if you use the unpublished Article, in form and content as submitted for publication in the Journal, in the following ways:

- sharing print or electronic copies of the Article with colleagues;
- posting an electronic version of the Article on your own personal website, on your employers website/repository and on free public servers in your subject area.

After acceptance: Provided that you give appropriate acknowledgement to the Journal, the European Society of Veterinary Dermatology, American College of Veterinary Dermatology and Blackwell Publishing, and full bibliographic reference for the Article when it is published, you may use the accepted version of the Article as originally submitted for publication in the Journal, and updated to include any amendments made after peer review, in the following ways:

- you may share print or electronic copies of the Article with colleagues;
- you may use all or part of the Article and abstract, without revision or modification, in personal compilations or other publications of your own work;
- you may use the Article within your employers institution or company for educational or research purposes, including use in course packs;
- 12 months after publication you may post an electronic version of the Article on your own personal website, on your employer's website/repository and on free public servers in your subject area. Electronic versions of the accepted Article must include a link to the published version of the Article together with the following text: „The definitive version is available at www.blackwell-synergy.com.