

Année 2007

**MISE AU POINT D'OUTILS POUR  
L'ÉVALUATION CLINIQUE DE CHIENS  
ATTEINTS DE MYOPATHIE DYSTROPHIQUE**

THESE

Pour le

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

Présentée et soutenue publiquement devant

LA FACULTE DE MEDECINE DE CRETEIL

Le .....

par

**Marie-Cécile, Sylvie, Charline CORDAZZO**

Née le 31 juillet 1979 à Arras (Pas-de-Calais)

JURY

Président : M. ....

*Professeur à la Faculté de Médecine de CRETEIL*

Membres

Directeur : Dr. Stéphane BLOT

*Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort*

Assesseur : Dr. Laurent TIRET

*Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort*



**LISTE DES MEMBRES DU CORPS ENSEIGNANT**

Directeur : M. le Professeur COTARD Jean-Pierre

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

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

**DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET PHARMACEUTIQUES (DSBP)**

Chef du département : M. BOULOUIS Henri-Jean, Professeur - Adjoint : M. DEGUEURCE Christophe, Professeur

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

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

Chef du département : M. FAYOLLE Pascal, Professeur - Adjoint : M. POUCHELON Jean-Louis, Professeur

<p><b>- UNITE DE MEDECINE</b> M. POUCHELON Jean-Louis, Professeur* Mme CHETBOUL Valérie, Professeur M. BLOT Stéphane, Maître de conférences M. ROSENBERG Charles, Maître de conférences Mme MAUREY Christelle, Maître de conférences contractuel</p> <p><b>- UNITE DE CLINIQUE EQUINE</b> M. DENOIX Jean-Marie, Professeur M. AUDIGIE Fabrice, Maître de conférences* Mme GIRAUDET Aude, Professeur contractuel Mme MESPOULHES-RIVIERE Céline, Maître de conférences contractuel M. PICCOT-CREZOLLET Cyrille, Maître de conférences contractuel</p> <p><b>-UNITE DE REPRODUCTION ANIMALE</b> Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, Maître de conférences* (rattachée au DPASP) M. NUDELMANN Nicolas, Maître de conférences M. FONTBONNE Alain, Maître de conférences M. REMY Dominique, Maître de conférences (rattaché au DPASP) M. DESBOIS Christophe, Maître de conférences Melle CONSTANT Fabienne, Maître de conférences (rattachée au DPASP) Melle LEDOUX Dorothée, Maître de conférences Contractuel (rattachée au DPASP)</p>	<p><b>- UNITE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE</b> M. FAYOLLE Pascal, Professeur * M. MAILHAC Jean-Marie, Maître de conférences M. MOISSONNIER Pierre, Professeur Mme VIATEAU-DUVAL Véronique, Maître de conférences Mlle RAVARY Bérangère, Maître de conférences (rattachée au DPASP) M. ZILBERSTEIN Luca, Maître de conférences contractuel M. HIDALGO Antoine, Maître de conférences contractuel</p> <p><b>- UNITE DE RADIOLOGIE</b> Mme BEGON Dominique, Professeur* Mme STAMBOULI Fouzia, Maître de conférences contractuel</p> <p><b>-UNITE D'OPHTALMOLOGIE</b> M. CLERC Bernard, Professeur* Melle CHAHORY Sabine, Maître de conférences contractuel</p> <p><b>- UNITE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES</b> M. CHERMETTE René, Professeur M. POLACK Bruno, Maître de conférences* M. GUILLOT Jacques, Professeur Mme MARIIGNAC Geneviève, Maître de conférences contractuel</p> <p><b>-UNITE DE NUTRITION-ALIMENTATION</b> M. PARAGON Bernard, Professeur * M. GRANDJEAN Dominique, Professeur</p>
--	--

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

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

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

Mme CALAGUE, Professeur d'Education Physique

\* Responsable de l'Unité

AERC : Assistant d'Enseignement et de Recherche Contractuel

## **REMERCIEMENTS**

A notre Président du Jury  
Professeur à la faculté de Médecine de Créteil,  
Qui nous fait l'honneur de bien vouloir présider notre jury de thèse,  
Qu'il reçoive ici le témoignage de notre reconnaissance et de notre respectueux hommage.

Aux membres du Jury

Monsieur le Docteur BLOT,  
Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort,  
Qu'il trouve ici l'expression de notre profond respect et de toute notre gratitude.

Monsieur le Docteur TIRET,  
Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort,  
Sincères remerciements.

A Monsieur le Docteur Moez SANAA,  
Qui m'a guidée dans les dédales des statistiques avec beaucoup de patience,  
Qu'il trouve ici mes vifs remerciements.

A tout le personnel de l'Unité d'Etude et de Thérapies des Myopathes canines (UETM),  
vétérinaires et animaliers : sans eux, rien n'aurait été possible !

A Monsieur le Docteur Bertrand DEPUTTE, pour ses précieux conseils en Ethologie et sa  
gentillesse.

A Monsieur le Docteur Dan ROSENBERG, pour sa documentation.

A Carole DROUGARD et Inès BARTHELEMY, pour leur collaboration.

Ce travail a pu être réalisé grâce au concours du service informatique de l'ENVA,  
Et il a été subventionné par l'Association Française contre les Myopathies.

Que tous en soient remerciés ici.



A tous les enfants atteints de myopathie,  
Auxquels je dédie cette thèse,  
Qu'ils gardent espoir...

A mes parents,  
Pour leur soutien quelles que soient les circonstances,  
En témoignage de ma profonde affection.

A mes amis et mes proches,  
Pour avoir supporté mon absence.





# SOMMAIRE

<b>GLOSSAIRE</b> .....	<b>5</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	<b>7</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>9</b>

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

### CHAPITRE 1 : STRUCTURE ET FONCTION DU MUSCLE STRIE SQUELETTIQUE.....13

I. ORGANISATION ANATOMIQUE.....	13
I. A. <i>Structure du muscle</i> .....	13
I. B. <i>Vascularisation</i> .....	13
I. C. <i>Innervation</i> .....	13
I. C. 1) La zone de jonction neuromusculaire ou plaque motrice .....	14
I. C. 2) Le fuseau neuromusculaire.....	15
I. D. <i>La zone de jonction myotendineuse</i> .....	15
II. ORGANISATION CELLULAIRE .....	16
II. A. <i>Organisation en syncytium</i> .....	16
II. B. <i>Les myofibrilles</i> .....	16
II. C. <i>Les organites et autres structures intracellulaires</i> .....	18
III. ORGANISATION MOLECULAIRE.....	19
III. A. <i>Microscopie photonique</i> .....	19
III. B. <i>Microscopie électronique</i> .....	19
III. B. 1) Les filaments épais de myosine .....	19
III. B. 2) Les filaments fins d'actine.....	20
IV. HISTOPHYSIOLOGIE.....	21
IV. A. <i>La contraction musculaire</i> .....	21
IV. A. 1) Modifications morphologiques.....	21
IV. A. 2) Mécanismes de la contraction musculaire : le couplage excitation-contraction .....	22
IV. B. <i>Les différents types de fibres musculaires striées</i> .....	23
IV. C. <i>Rôle métabolique du muscle</i> .....	24
V. DIFFERENCIATION ET CROISSANCE DES FIBRES MUSCULAIRES STRIEES .....	25
V. A. <i>Différenciation des myoblastes</i> .....	25
V. B. <i>Croissance du muscle après la naissance</i> .....	25

### CHAPITRE 2 : SUPPORT GENETIQUE DE LA DYSTROPHIE MUSCULAIRE DE DUCHENNE.....27

I. LA DYSTROPHINE : IDENTIFICATION DU GENE ET DE SES PRODUITS .....	27
I. A. <i>Le gène de la dystrophine</i> .....	27
I. A. 1) Localisation du gène .....	27
I. A. 2) Isolement, clonage et produits du gène .....	27
I. B. <i>Structure primaire de la dystrophine</i> .....	28
I. C. <i>Les isoformes de la dystrophine</i> .....	30
I. C. 1) Isoformes de 427 kD .....	30
I. C. 2) Isoformes de plus faible poids moléculaire .....	30
I. D. <i>Expression de la dystrophine</i> .....	31
I. D. 1) Expression de la dystrophine musculaire .....	31
I. D. 2) Expression de la dystrophine dans l'encéphale .....	31
I. E. <i>Le complexe dystrophine-glycoprotéines et protéines associées à la dystrophine</i> .....	31
I. E. 1) Nature du complexe.....	31
I. E. 2) Composition, variabilité et rôle du complexe protéique associé à la dystrophine.....	34
I. F. <i>Les protéines homologues de la dystrophine : utrophines et dystrobrevines</i> .....	34
I. G. <i>Rôles de la dystrophine</i> .....	36
I. G. 1) Les hypothèses d'un rôle structural .....	36
I. G. 1) a. Maintien de la stabilité membranaire .....	36
I. G. 1) b. Fonctions particulières dans des zones spécialisées.....	36
I. G. 2) Les hypothèses d'un rôle métabolique.....	37
I. G. 2) a. Un rôle dans le métabolisme calcique ? .....	37
I. G. 2) b. Un rôle dans la croissance en longueur des myofibrilles ? .....	37

II. GENOTYPE DES SUJETS ATTEINTS DE DMD .....	38
II. A. Génotype des patients humains myopathes .....	38
II. B. Génotype du chien GRMD.....	40
II. C. Conséquences de cette mutation.....	42
III. MODE DE TRANSMISSION DE LA DMD .....	43
IV. APPLICATION AU DIAGNOSTIC GENETIQUE.....	46
<b>CHAPITRE 3 : DESCRIPTION DE LA DYSTROPHIE MUSCULAIRE DE DUCHENNE ET DE LA MYOPATHIE DYSTROPHIQUE DU GOLDEN RETRIEVER.....</b>	<b>49</b>
I. HISTORIQUE DE LA DMD .....	50
I. A. Historique de la maladie chez l'homme.....	50
I. B. Historique du modèle animal.....	50
II. EPIDEMIOLOGIE .....	52
III. ETUDE CLINIQUE .....	53
III. A. Phénotype clinique chez l'homme .....	53
III. A. 1) L'atteinte musculaire.....	53
III. A. 2) L'atteinte cardiaque.....	55
III. A. 3) L'atteinte respiratoire .....	55
III. A. 4) Le retard mental.....	55
III. A. 5) Les troubles digestifs.....	55
III. A. 6) Cas des femmes porteuses symptomatiques .....	56
III. B. Phénotype clinique chez le chien GRMD.....	56
III. B. 1) Forme néonatale fulminante .....	56
III. B. 2) Forme classique : mâles et femelles homozygotes.....	57
III. B. 2) a. 0 à 6 semaines.....	57
III. B. 2) b. 6 à 9 semaines .....	57
III. B. 2) c. 9 à 12 semaines.....	57
III. B. 2) d. 12 semaines à 14 mois .....	58
III. B. 2) e. 3 à 6 ans.....	60
III. B. 3) Femelles hétérozygotes (porteuses) .....	60
III. B. 4) Bilan : formes cliniques de la maladie chez le chien .....	61
III. B. 4) a. Forme progressive ou subaiguë .....	61
III. B. 4) b. Forme fulminante .....	63
III. C. Comparaison clinique homme-chien.....	63
IV. ETUDE PARA-CLINIQUE .....	65
IV. A. Phénotype lésionnel chez l'homme.....	65
IV. A. 1) Phénotype Duchenne.....	65
IV. A. 1) a. Lésions microscopiques du muscle strié squelettique.....	65
IV. A. 1) b. Etude immunohistochimique du muscle squelettique.....	67
IV. A. 1) c. Lésions cardiaques.....	69
IV. A. 1) d. Autres lésions.....	69
IV. A. 2) Femmes porteuses .....	69
IV. B. Anomalies para-cliniques présentes chez le chien GRMD.....	70
IV. B. 1) Etude radiographique.....	70
IV. B. 2) Étude biochimique.....	74
IV. B. 2) a. Les créatine-kinases sériques.....	74
IV. B. 2) b. Les électrolytes : sodium, potassium, CO <sub>2</sub> .....	74
IV. B. 2) c. Les paramètres hépatiques : ALAT, PAL, PT .....	74
IV. B. 3) Etude électrophysiologique .....	75
IV. B. 4) Etude électrocardiographique et échographique de l'atteinte cardiaque.....	77
IV. B. 5) Étude tomodensitométrique.....	79
IV. B. 6) Étude nécropsique .....	79
IV. B. 7) Étude histologique .....	82
IV. B. 7) a. Forme néonatale .....	82
IV. B. 7) b. Forme classique.....	83
IV. B. 7) b. α. Lésions du muscle strié squelettique .....	83
IV. B. 7) b. β. Lésions du muscle strié cardiaque.....	84
IV. B. 7) c. Lésions observées chez les femelles hétérozygotes .....	85
<b>CONCLUSION DE L'ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>87</b>

# ETUDE EXPERIMENTALE

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>91</b>
<b>I. MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>93</b>
I. A. Animaux étudiés.....	93
I. B. Protocole d'étude.....	93
I. C. Intervenants.....	94
I. D. Grille de scores cliniques.....	94
I. D. 1) Elaboration d'un système de cotation .....	94
I. D. 2) Protocole d'utilisation.....	95
I. D. 2) a. Matériel spécifique.....	95
I. D. 2) b. Formation des opérateurs.....	95
I. D. 2) c. Mode opératoire.....	96
I. D. 2) d. Réalisation de la notation pour chaque critère.....	96
I. D. 3) Traitement des données.....	102
I. D. 3) a. Saisie des données.....	102
I. D. 3) b. Tri des notes.....	102
I. D. 3) c. Simplification des données.....	102
I. D. 4) Validation statistique de l'échelle.....	102
I. E. Analyse d'enregistrements vidéo.....	104
I. E. 1) Les caméras Axis.....	104
I. E. 1) a. Descriptif et mode de fonctionnement.....	104
I. E. 1) b. Contraintes techniques.....	104
I. E. 1) c. Paramétrage des caméras et échantillonnage des séquences.....	105
I. E. 1) d. Mise en place du système.....	106
I. E. 1) e. Sauvegarde des données.....	107
I. E. 1) f. Echantillonnage des animaux.....	107
I. E. 1) g. Tri des fichiers AVI.....	107
I. E. 2) Le logiciel Labwatcher.....	108
I. E. 3) Choix des comportements étudiés.....	109
I. E. 3) a. Comportements relatifs à l'activité motrice.....	109
I. E. 3) b. Comportements relatifs à l'activité alimentaire.....	110
<b>II. RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>111</b>
II. A. Grille de scores cliniques.....	111
II. A. 1) Analyse statistique.....	111
II. A. 1) a. Etude de la spécificité.....	111
II. A. 1) b. Etude de la sensibilité.....	111
II. A. 1) c. Etude de la reproductibilité.....	112
II. A. 1) c. $\alpha$ . Étude de la répétabilité : variabilité intra-observateur.....	112
II. A. 1) c. $\beta$ . Étude de la fiabilité : calcul de la concordance inter-observateur critère par critère.....	116
II. A. 1) c. $\gamma$ . Etude globale de la reproductibilité par calcul de variabilité à partir des notes pondérées par les coefficients kappa.....	121
II. A. 2) Discussion.....	123
II. B. Analyse de l'activité par enregistrements vidéo.....	126
II. B. 1) Traitement et interprétation des résultats.....	126
II. B. 1) a. Traitement des résultats fournis par le logiciel.....	126
II. B. 1) b. Résultats et interprétation de l'activité alimentaire.....	130
II. B. 1) b. $\alpha$ . Analyse graphique de l'activité alimentaire.....	130
II. B. 1) b. $\beta$ . Analyse statistique de l'activité alimentaire.....	133
II. B. 1) c. Résultats et interprétation de l'activité locomotrice.....	133
II. B. 1) c. $\alpha$ . Analyse graphique de l'activité locomotrice.....	135
II. B. 1) c. $\beta$ . Analyse statistique de l'activité locomotrice.....	137
II. B. 2) Discussion.....	139
<b>CONCLUSION DE L'ETUDE EXPERIMENTALE .....</b>	<b>141</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>143</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>147</b>



## GLOSSAIRE

Ici figurent les termes suivis d'un astérisque dans le texte.

**Coloration par le rouge d'Alizarine** : méthode de mise en évidence du calcium intracellulaire, par utilisation d'une molécule colorante chélateur du calcium qui apparaît en rouge orangé.

**Coloration de Von Kossa** : Révélation des sels de calcium (phosphate, carbonate, sulfate, oxalate) en leur substituant un cation métallique lourd (le nitrate d'argent) que l'on visualisera après réduction en argent métallique noir. Au final, les sels de calcium apparaissent en noir (sur fond rose si on a effectué une contre-coloration à l'éosine).

**Décharges complexes répétitives** : décharges répétitives polyphasiques à haute fréquence qui peuvent être constantes ou diminuer decrescendo et se terminent toujours brutalement.

**Electromyogramme** : enregistrement et étude de l'activité électrique spontanée d'un muscle, par insertion d'une électrode.

**Exactitude** : degré de proximité d'une valeur mesurée/déterminée par rapport à la réalité.

**Exon skipping (saut d'exon)** : Technique de thérapie génique ayant pour objectif de supprimer la partie du gène comprenant la mutation et de permettre à la cellule de produire de façon durable la protéine manquante, tronquée mais fonctionnelle (ex : la dystrophine), grâce à l'injection dans la cellule d'un oligonucléotide qui va masquer l'exon défectueux et rétablir le cadre de lecture.

**Fiabilité (ou précision)** : Proximité de l'accord entre plusieurs mesures d'une série. Propriété d'un instrument de mesure à pouvoir donner des résultats similaires ou très proches dans des conditions identiques, soit chez le même sujet à des moments différents s'il n'y a pas eu de variation de son état (reproductibilité intra-observateur dans le cas présent), soit chez le même sujet au même moment, noté simultanément par deux ou plusieurs observateurs (reproductibilité inter-observateur).

**Fibre dégénérative** : fibre musculaire hypertrophiée, arrondie, hyperéosinophile au cytoplasme granuleux et/ou fragmenté.

**Fibre en cours de régénération** : fibre musculaire petite et basophile.

**Fibre hyaline** : fibre musculaire arrondie, de diamètre augmenté et au cytoplasme homogène hyperacidophile dépourvu de striation. Observée au cours des dystrophinopathies.

**Fibres révertantes** : myocytes immunopositifs occasionnels s'expliquant par des mutations secondes somatiques (souvent une délétion) avec retour à l'expression de dystrophine.

**Ondes positives lentes** : signaux bioélectriques survenant simultanément aux potentiels de fibrillation (= potentiels de fibrillation enregistrés à proximité de fibres musculaires dont la conduction du potentiel d'action est bloqué). Elles se caractérisent par une morphologie monophasique avec un pic positif et un lent retour à la ligne de base. L'amplitude et la durée sont très variables.

**PCR (Polymerase Chain Reaction)** : technique d'amplification exponentielle in vitro du nombre de copies d'une séquence spécifique d'ADN (l'amplicon), même si la quantité initiale est très faible (jusqu'à une copie), par répétition de réaction d'élongation en présence d'ADN polymérase thermostable et d'amorces nucléotidiques spécifiques. Le produit de la PCR peut ensuite être détecté par électrophorèse sur gel, ou servir pour une analyse RFLP.

Les régions amplifiées ont généralement une taille comprise entre 150 et 3000 pb.

Cette technique est basée sur la combinaison de deux facteurs :

- les propriétés de synthèse enzymatique et d'initiation « ADN double brin spécifique » des « ADN polymérase ADN dépendantes thermostables »

- les propriétés d'hybridation et de déshybridation des brins complémentaires d'ADN en fonction de la température.

Ces éléments permettent de contrôler l'activité enzymatique grâce à des transitions de température (assurées par un thermocycleur) répétées de manière cyclique.

**Potentiel de fibrillation** : potentiel d'action d'une fibre musculaire, laquelle se contracte quand survient ce potentiel.

**Reproductibilité** : Précision entre 2 observateurs. Une échelle est reproductible lorsque 2 observateurs évaluant un même animal, au même moment, donnent des scores similaires en l'absence de toute concertation.

**RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)** : technique qui permet de différencier les organismes par l'analyse de leur séquence dérivée du clivage de leur ADN. Si pour 2 organismes, la distance entre les sites de clivage d'une enzyme de restriction spécifique est différente, la longueur des fragments obtenus sera différente après digestion de l'ADN par une enzyme de restriction. L'analogie entre les séquences peut permettre de distinguer des brins d'ADN ou des espèces.

Une PCR est souvent nécessaire au préalable pour obtenir des quantités suffisantes d'ADN.

**Sensibilité** : capacité de l'échelle à distinguer 2 états de gravité légèrement différents. Elle peut concerner 2 sujets différents au même moment ou le même sujet à des temps différents de son évolution clinique. Elle nécessite le suivi des sujets.

**Séquençage d'ADN** : caractérisation de l'ordre des nucléotides dans un fragment d'ADN, grâce à des amorces oligonucléotidiques, d'une ADN polymérase et de nucléotides marqués.

**Validité** : capacité de l'échelle à mesurer ce pour quoi elle a été construite et à varier avec ce qu'elle mesure.

**Validation statistique** : processus de vérification qui vise à démontrer qu'une méthode d'évaluation est fiable, valide et reproductible pour l'usage recherché. Les paramètres fondamentaux comprennent l'exactitude\*, la précision, la spécificité, la sensibilité, la reproductibilité et la stabilité.

**Western Blot** : méthode de détection d'une protéine spécifique par migration des composants de l'échantillon sur un gel (séparation des molécules par électrophorèse, puis transfert sur membrane de nitrocellulose et révélation grâce à des anticorps spécifiques coloré, radioactif ou fluorescent). Cette technique fournit également des informations sur la taille de la protéine.

NB : la technique de Southern Blot est utilisée pour la détection d'ADN et celle de Northern Blot pour l'ARN.

## LISTE DES ABREVIATIONS

**AG** : anesthésie générale.

**ANOVA** : analyse de variance.

**BF** : muscle biceps fémoral.

**BMD** : dystrophie musculaire de Becker. Myopathie humaine héréditaire due à la synthèse d'une dystrophine anormale ou à une synthèse quantitativement insuffisante de dystrophine dans le muscle.

**CK** : créatine kinase. Enzyme musculaire.

**D** : droite.

**DAG** : Dystrophin Associated Glycoprotein.

**DAP** : Dystrophin Associated Protein.

**Déc** : décubitus.

**DMD** : dystrophie musculaire de Duchenne. Myopathie héréditaire humaine due à l'absence de dystrophine dans les muscles.

**Dp** : dystrophine. Abréviation utilisée pour nommer les isoformes de la dystrophine.

**DRP** : Dystrophin Related Protein. Utrophine, protéine autosomale homologue de la dystrophine.

**EMG** : électromyogramme.

**G** : gauche.

**GRMD** : Golden Retriever Muscular Dystrophy. Modèle animal canin de la DMD.

**HFMD** : Hypertrophic Feline Muscular Dystrophy. Modèle animal félin de la DMD.

**IM** : intra-musculaire.

**kb** : kilobases.

**kD** : kiloDaltons.

**MANOVA** : analyse de variance multivariée.

**mdx** : X-linked muscular dystrophy. Modèle animal murin de la DMD.

**NOS** : Nitric Oxyde Synthase = enzyme monoxyde d'azote synthétase. nNOS : isoforme neuronale.  
iNOS : isoforme inductible.

**PM** : poids moléculaire.

**ST** : muscle semi-tendineux.

**TB** : muscle triceps brachial.

**UL** : muscle ulnaire latéral.





## INTRODUCTION

Le terme de myopathie au sens large recouvre un ensemble de lésions de la fibre musculaire striée squelettique.

Les myopathies dégénératives au sens strict correspondent aux affections primitives non inflammatoires et non tumorales de la fibre musculaire striée, excluant d'une part les anomalies du développement embryonnaire du muscle, d'autre part les lésions dégénératives musculaires secondaires à des lésions du système nerveux périphérique ou central. [36]

Des remaniements inflammatoires secondaires, en général modérés, sont également présents, ce qui distingue les myopathies des myosites, dans lesquelles les lésions inflammatoires du tissu conjonctif interstitiel apparaissent initialement. [36]

Le terme de dystrophie musculaire fait, lui, référence à un groupe de myopathies primitives héréditaires caractérisées sur le plan histo-pathologique par l'association :

- d'images de dégénérescence et de nécrose initiales des fibres, d'une sclérose secondaire,
- et d'images de régénération progressive concomittante des muscles squelettiques.

Ces affections résultent d'un déficit partiel ou total en une protéine du cytosquelette musculaire : la dystrophine. [36, 40]

Cf. annexe 1 : Classification des myopathies

Parmi les nombreuses myopathies humaines et animales identifiées, ce travail sera consacré à l'étude de la dystrophie musculaire de Duchenne chez l'homme et chez le chien Golden Retriever.

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) se caractérise par des phénomènes de dégénérescence/nécrose suivis de régénération du muscle qui conduisent à son remplacement par du tissu fibreux et de la graisse [16]. Cette myopathie humaine est, parmi le très grand nombre de dystrophies musculaires existant chez l'homme, sans conteste la plus importante par sa fréquence (un garçon affecté sur 3300) et par la gravité de ses répercussions cliniques (décès en général avant l'âge de 30 ans par insuffisance respiratoire). [40]

Plusieurs modèles animaux ont été décrits [15, 38] chez la souris, le hamster, le poulet, le chat [53] et le chien. Si le chien [19] et la souris [15] partagent avec l'homme le même support génétique (mutations sur le gène codant pour la dystrophine porté par le chromosome X), il n'en est pas de même pour l'expression phénotypique. En effet, la souris semble peu affectée cliniquement par la maladie et surtout l'est tardivement (âge supérieur à un an). Le chien, par contre, présente des troubles locomoteurs dès l'âge de 6 semaines, et même s'il ne perd que rarement la marche, du fait de sa quadrupédie, l'évolution de la maladie se rapproche beaucoup de celle de l'homme avec en particulier une atteinte cardiaque et respiratoire importante. [40]

Dans l'étude bibliographique, nous rappellerons dans un premier chapitre les bases histo-physiologiques du fonctionnement musculaire normal afin de mieux comprendre les mécanismes pathologiques des myopathies, puis nous évoquerons les connaissances actuelles concernant la dystrophine, protéine du cytosquelette dont l'absence est responsable des dystrophinopathies humaines et animales. Enfin, nous aborderons l'étude de la DMD chez l'homme, et enfin chez le chien Golden Retriever, sur un plan clinique et paraclinique.

Le chien GRMD est reconnu comme un modèle presque parfait de la myopathie de Duchenne. Cependant, pour pouvoir utiliser ce modèle lors d'essais thérapeutiques pré-cliniques, il faut pouvoir disposer d'outils qui permettent d'évaluer la variation de l'état clinique des animaux testés.

L'étude expérimentale, menée au sein de l'Unité d'Etude et de Thérapie des Myopathies canines de l'ENV d'Alfort, a donc eu pour objectifs de développer des outils d'étude quantitatifs et reproductibles afin de maîtriser le modèle canin dans son utilisation en tant qu'outil thérapeutique, notamment pour permettre de suivre de façon objective l'évolution clinique des chiens d'une part et d'évaluer les bénéfices apportés par la thérapie future d'autre part.

# ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE



# CHAPITRE 1 : STRUCTURE ET FONCTION DU MUSCLE STRIE SQUELETTIQUE

L'organisme comporte plus de 400 muscles striés squelettiques qui représentent environ 50 % de la masse corporelle. [7, 20]

## I. ORGANISATION ANATOMIQUE

### I. A. STRUCTURE DU MUSCLE

Un muscle squelettique est constitué de faisceaux musculaires formés eux-mêmes d'un ensemble de cellules appelées fibres musculaires ou myocytes.

La cohésion de l'ensemble est assurée par un tissu conjonctif formé de :

- l'endomysium disposé autour des fibres musculaires,
- le pérимыsium qui entoure les faisceaux,
- l'épimysium qui représente l'enveloppe conjonctive délimitant le muscle.

Les muscles striés squelettiques s'insèrent sur les pièces osseuses du squelette par l'intermédiaire des tendons. Ils peuvent parfois se prolonger par une aponévrose ou un fascia. [20]

### I. B. VASCULARISATION

On trouve à l'intérieur du muscle la présence d'un réseau vasculaire complet, c'est-à-dire :

- des artères (amènent le sang riche en oxygène et en glucose), qui cheminent entre les fascicules dans le tissu interstitiel ;
- des artérioles, qui pénètrent dans la région centrale des fascicules et donnent naissance à des capillaires (lien d'échange entre le réseau sanguin et la fibre musculaire),
- des veines (convoient les déchets de production du muscle : acide lactique, CO<sub>2</sub>...). [7, 20]

### I. C. INNERVATION

Le muscle reçoit 2 catégories de fibres nerveuses :

- Afférentes ou sensibles, elles recueillent l'information dans le muscle et la transmettent aux centres nerveux.
- Efférentes ou motrices, elles transmettent au muscle les commandes du système nerveux. Elles font la jonction entre la fibre nerveuse et la fibre musculaire, constituant la plaque motrice.

## I. C. 1) La zone de jonction neuromusculaire ou plaque motrice

Elle correspond à la terminaison d'un neurone moteur, issu des cornes antérieures de la moelle épinière, sur la cellule musculaire striée. La plaque motrice est une synapse chimique puisque la transmission de l'excitation d'une cellule à l'autre se fait par l'intermédiaire d'un neuromédiateur : l'acétylcholine.

La plaque motrice est une structure composite, où la terminaison de l'axone perd sa gaine de myéline, s'élargit et n'est plus entourée que par quelques cellules de Schwann. A ce niveau, le cytoplasme axonal est riche en mitochondries et en vésicules synaptiques qui contiennent l'acétylcholine.

La terminaison de l'axone est placée dans une dépression en gouttière située dans le cytoplasme de la fibre striée. A ce niveau, le sarcolemme présente de nombreux replis parallèles.

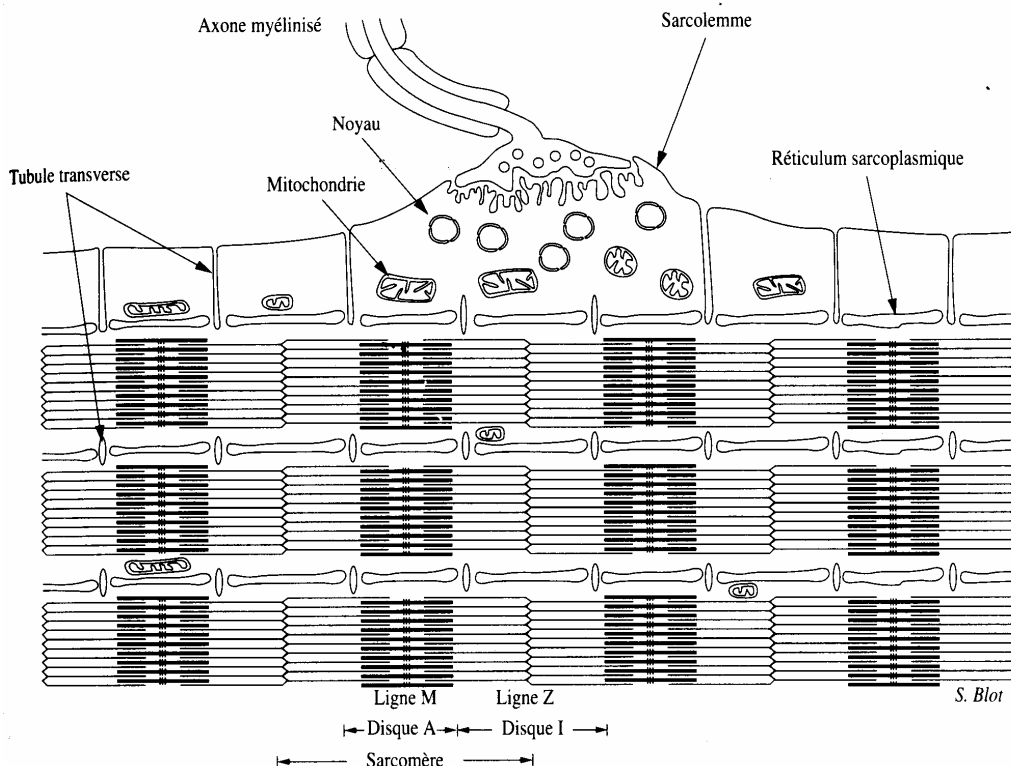
Les 2 membranes de l'axone et de la fibre striée sont séparées par un espace de 50 à 100 nm : la fente synaptique.

Dans le sarcolemme sous-jacent, on observe de nombreuses mitochondries et des noyaux. [20]

La lame basale qui sépare l'axone de la fibre musculaire renferme les protéines impliquées dans la réinnervation et la néoformation de la plaque motrice. [7]

Cf. figure 1.

Figure 1 : Architecture d'une fibre musculaire dans la région de la plaque motrice (d'après [7])



## I. C. 2) Le fuseau neuromusculaire [7, 20]

Le fuseau neuromusculaire est un organe sensoriel complexe composé :

- de fibres musculaires spécialisées : les fibres intrafusales ;
- d'une innervation motrice (les motoneurones gamma) et sensitive (entre autres, les fibres proprioceptives) ;
- de vaisseaux sanguins ;
- d'une capsule conjonctive qui entoure l'ensemble et rattache le fuseau à chaque extrémité soit au tendon, soit à l'endomysium.

Cette structure joue le rôle de mécanorécepteur qui répond aux variations passives ou actives de la longueur du muscle ; elle assure ainsi un contrôle rétroactif de la contraction musculaire, autorisant une coordination musculaire et le maintien d'un tonus musculaire adéquat. [7, 20]

***NB :** Notion d'unité motrice. L'ensemble est constitué par une fibre nerveuse (un neurone) et n fibres musculaires innervées par la fibre nerveuse. Le terme d'unité motrice s'explique par le fait que la commande issue du neurone provoque la contraction de toutes les fibres musculaires innervées par ce neurone.*

*Les nerfs périphériques assurent non seulement la commande motrice mais ont aussi un rôle trophique sur le muscle : un muscle privé de son innervation subit une atrophie rapide et sévère. [20]*

## I. D. LA ZONE DE JONCTION MYOTENDINEUSE

La jonction myotendineuse est le lieu de couplage entre la partie contractile musculaire et le tendon.

A chacune de leur extrémité, les cellules musculaires striées se prolongent par des faisceaux de fibres de collagène qui constituent le tendon du muscle ou s'insèrent sur les cloisons conjonctives du faisceau musculaire.

Les fibres de collagène s'enfoncent dans des invaginations plus ou moins profondes du sarcolemme, mais elles sont toujours extracellulaires et séparées du sarcoplasme par le sarcolemme recouvert de la lame basale. Ce dispositif, extrêmement solide, assure la transmission de la traction exercée par la fibre striée aux points d'insertion du muscle. [7, 20]

## II. ORGANISATION CELLULAIRE

### II. A. ORGANISATION EN SYNCYTIUM

Une fibre musculaire résulte de la fusion de plusieurs cellules indifférenciées à noyau unique appelées myoblastes. Le myotube qui résulte de cette fusion est caractérisé par des noyaux en position centrale. Puis, lors de la différenciation du myotube en fibre musculaire, les noyaux vont se placer en périphérie de la cellule musculaire. [1, 6]

Après la naissance et l'âge adulte, le calibre et la longueur des fibres musculaires augmentent progressivement. Chez le chien à l'âge adulte, les fibres musculaires ont un calibre moyen compris entre 40 et 50  $\mu\text{m}$ .

L'augmentation de taille des fibres est liée à l'addition de myofibrilles. [7]

Les myocytes sont délimités par une membrane cytoplasmique (le sarcolemme) et contiennent dans leur cytoplasme (ou sarcoplasme) des myofibrilles qui constituent le support de la contraction musculaire. En périphérie, juste sous le sarcolemme, sont disposés de nombreux noyaux, de l'ordre d'une centaine par cellule : une cellule musculaire correspond donc à la définition d'un syncytium. [20]

Ces fibres musculaires présentent une alternance de zones claires et de zones foncées.

### II. B. LES MYOFIBRILLES

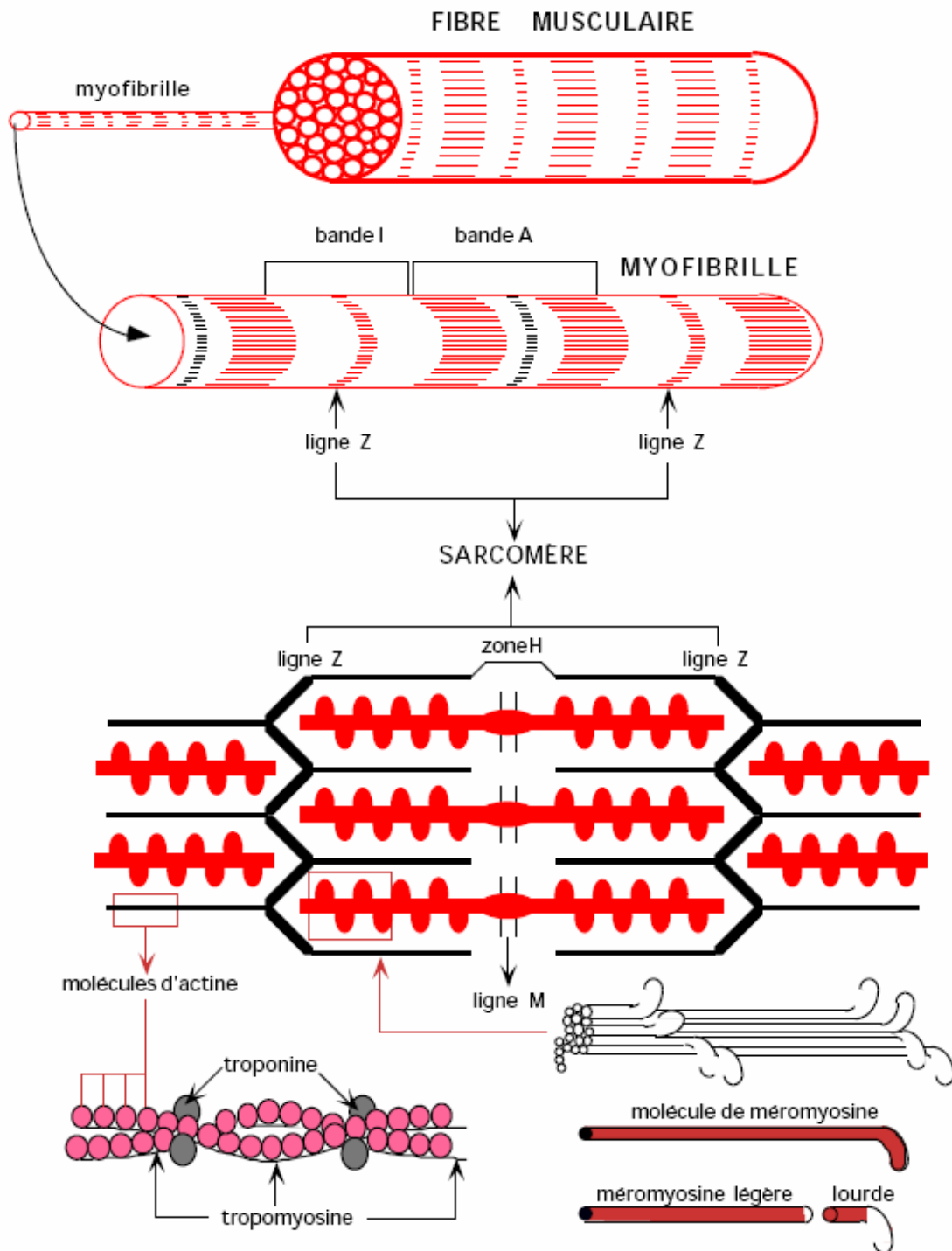
Les trois quarts du volume sarcoplasmique sont occupés par les myofibrilles, qui sont des cylindres parallèles, allongés dans le sens de la cellule, de même longueur, mais de diamètre beaucoup plus faible (environ 1  $\mu\text{m}$ ). [7, 20]

L'orientation et le nombre de ces myofibrilles sont responsables des striations longitudinales visibles dans le sarcoplasme. [20]

Cf. figure 2.



Figure 2 : Du muscle à la protéine (d'après [21])



## II. C. LES ORGANITES ET AUTRES STRUCTURES INTRACELLULAIRES [7, 20]

- Les noyaux et les organites impliqués dans la synthèse protéique occupent un volume cellulaire réduit. [7]
- **Le cytoplasme** contient de nombreuses substances : glycogène, lipides, ATP (Adénosine TriPhosphate), myoglobine (pigment responsable de la coloration rouge du muscle), nombreuses enzymes et acides aminés. [20]
- **Les mitochondries** sont nombreuses et disposées entre le sarcoplasme et les myofibrilles. [20]
- **Le réticulum sarcoplasmique** ou endoplasmique lisse : il est constitué d'un réseau de canalicules disposés longitudinalement et se ramifiant dans le sarcoplasme de la fibre autour des myofibrilles. Ces tubes forment à leurs extrémités des dilatations sacculaires appelées citernes terminales (réservoirs d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ ), reliées entre elles par des anastomoses.
- **Le système T** : système de tubules transverses, provenant d'une invagination de la membrane cytoplasmique, situé à la jonction entre disques A et I. A ce niveau, l'ensemble formé par un tubule transverse et 2 citernes terminales porte le nom de triade.  
Avec le sarcolemme, les tubules T jouent un rôle important dans la propagation de l'influx nerveux jusqu'à l'appareil contractile.  
Associé au réticulum sarcoplasmique, le système T permet aussi le couplage excitation-contraction.
- **Protéines** permettant le maintien de la structure cellulaire et intervenant dans la contraction musculaire : dystrophine, complexe membranaire glycoprotéique, mérosine...

### III. ORGANISATION MOLECULAIRE

#### III. A. MICROSCOPIE PHOTONIQUE [7, 20]

Les myofibrilles sont des éléments allongés, disposés parallèlement les uns aux autres et parallèlement à la direction de la fibre. Ils produisent eux aussi l'alternance de bandes claires et foncées.

**Leur diamètre est de 1  $\mu\text{m}$  et leur longueur peut atteindre la longueur d'une fibre musculaire (jusqu'à plusieurs centimètres).**

Les myofibrilles renferment les protéines contractiles, actine et myosine.

Leur organisation spatiale montre la répétition régulière d'un motif transversal, qui comprend :

- une zone foncée, ou disque A (anisotrope en lumière polarisée), qui renferme les filaments longitudinaux épais (myosine) ;
- une zone claire, ou disque I (isotrope), qui contient les filaments fins (actine, troponine et tropomyosine).

Au milieu du disque A, on trouve une ligne transversale foncée, la ligne M, entourée d'une zone plus claire, la zone H (ou disque de Hensen).

Au milieu du disque I, apparaît une ligne sombre, ou strie Z. (cf. figure 2)

Cette disposition se répète régulièrement tout au long des myofibrilles.

L'unité structurale comprise entre 2 stries Z successives est le **sarcomère**. C'est l'unité contractile de base, d'une longueur de 3  $\mu\text{m}$  au repos. La longueur du sarcomère varie selon l'intensité de la contraction.

La répétition des sarcomères tout au long de la fibre lui donne son caractère strié.

#### III. B. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Chaque myofibrille est constituée de l'enchaînement de filaments épais (myofilaments de myosine) et de filaments fins (myofilaments d'actine). Cette alternance de filaments épais et minces produit les striations transversales des fibres musculaires, constituées des stries Z et des disques H et M. [20]

##### III. B. 1) Les filaments épais de myosine

Ce sont des bâtonnets de 1,5  $\mu\text{m}$  de long et 15 nm de large et disposés parallèlement les uns aux autres à l'emplacement du disque A.

La myosine est formée d'une baguette ou queue (méromyosine légère) et d'une extrémité globuleuse ou tête (méromyosine lourde) qui forme un coude. La queue est composée de 2 brins enroulés l'un sur l'autre. La tête est volumineuse et présente 2 éléments caractéristiques : un site d'union sur l'actine et un site ATPasique avec présence d'enzyme ATPase.

Les monomères de myosine sont disposés par paire et s'arrangent le long du filament de myosine en décrivant une hélice. Ces projections permettent le contact entre les filaments épais et les filaments fins au cours de la contraction musculaire.

La myosine constitue 38 % des protéines totales du muscle. [20]

### III. B. 2) Les filaments fins d'actine

Ils mesurent 1  $\mu\text{m}$  de longueur, 5 à 7 nm d'épaisseur et ont un aspect perlé.

Ils sont parallèles entre eux et situés de part et d'autre du disque Z, sur toute la longueur du disque I. Le disque H est dépourvu de filaments fins, d'où sa coloration plus claire. [20]

Les filaments fins sont constitués essentiellement d'actine, et secondairement de tropomyosine et de troponine.

Les molécules d'actine, sphériques, sont assemblées en 2 chaînes hélicoïdales torsadées :

- les molécules allongées de tropomyosine se logent entre les chaînes d'actine et suivent donc un trajet hélicoïdal.

- les molécules de troponine (complexe protéique globulaire) sont fixées au filament par la tropomyosine et se présentent à intervalles réguliers. [20]

Le complexe troponine est composé de la troponine C (interaction avec les ions  $\text{Ca}^{2+}$ ), de la troponine T (interaction avec la tropomyosine) et la troponine I (inhibition de l'ATPase).

Des ponts d'union avec la myosine sont régulièrement disposés sur le filament d'actine.

L'agencement des filaments d'actine et de myosine permet de comprendre :

- la forte densité du disque A, due à l'association de 2 variétés de filaments,

- la moins forte densité du disque H, due à l'absence de filaments fins,

- et la faible densité de la bande I due à la seule présence des filaments fins.

Le disque Z correspond à l'interpénétration des filaments d'actine de 2 sarcomères voisins. [20]

## **IV. HISTOPHYSIOLOGIE**

### **IV. A. LA CONTRACTION MUSCULAIRE**

Il s'agit d'une contraction volontaire, contrôlée par le système nerveux central. Elle se traduit par la production d'un travail mécanique du fait du raccourcissement de la longueur des cellules, donc du muscle squelettique.

#### **IV. A. 1) Modifications morphologiques**

Lors de la contraction musculaire, les myofibrilles subissent une diminution de leur longueur due à un raccourcissement du sarcomère. Au maximum de sa contraction, la longueur du sarcomère diminue de 20 à 50 %.

Lorsque la cellule est en état de contraction, on observe un tassement du sarcomère, avec un rapprochement des deux disques Z, sans variation de la longueur du disque A, et la disparition plus ou moins complète du disque H (cf. figure 3).

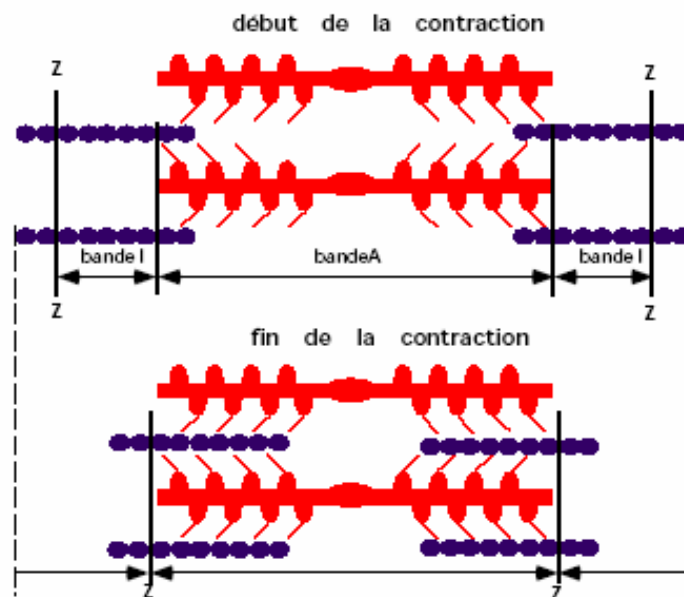
Lors de l'élongation de la fibre musculaire striée, le sarcomère apparaît étiré. Les deux disques Z sont éloignés alors que la longueur du disque A n'est pas modifiée, celle du disque H est augmentée.

En microscopie électronique, on retrouve ces mêmes modifications et l'on constate également qu'il n'y a pas de modification de longueur des filaments d'actine ou de myosine. Lors de la contraction, les filaments d'actine pénètrent et progressent entre les filaments de myosine ; ce qui aboutit de ce fait à une diminution de la longueur du disque H.

A l'inverse, lors de l'extension, les filaments d'actine reculent et pénètrent moins dans le réseau de myosine. Le disque H a alors une longueur plus importante.

Le raccourcissement du sarcomère est réalisé par glissement des filaments d'actine sur les filaments de myosine grâce à la mobilité des têtes de la myosine (cf. figure 3).

Figure 3 : La contraction musculaire (d'après [21] et [34])



Théorie des filaments glissants : Les filaments d'actine et de myosine de par leur disposition particulière peuvent glisser les uns par rapport aux autres. Les filaments d'actine vont tirer sur la strie Z, rapprocher les 2 stries Z et ainsi raccourcir le sarcomère.

#### IV. A. 2) Mécanismes de la contraction musculaire : le couplage excitation-contraction [7, 20]

La transmission neuromusculaire résulte de la transformation d'un phénomène bioélectrique en un phénomène biochimique.

La contraction de la fibre striée squelettique est commandée par le neurone moteur qui l'innerve. L'influx nerveux se propage le long de l'axone jusqu'aux jonctions neuromusculaires. A ce niveau, l'influx nerveux (sous forme de potentiel d'action), déclenche la mobilisation des vésicules synaptiques vers la membrane présynaptique, puis la libération d'acétylcholine dans la fente synaptique.

L'acétylcholine provoque des changements de perméabilité ionique du sarcolemme et l'apparition d'une onde de dépolarisation (potentiel d'action), qui se propage le long du sarcolemme. La durée d'activité de l'acétylcholine est limitée, car elle est rapidement détruite par l'acétylcholinestérase présente dans l'appareil sous-neural.

L'onde de dépolarisation gagne la profondeur de la cellule musculaire striée par le système T, directement vers les unités contractiles que sont les sarcomères. Le système T forme une triade avec les saccules du réticulum endoplasmique qui l'entoure. Or, ces citernes du réticulum ont la remarquable propriété d'accumuler de grandes quantités de calcium du fait de l'activité d'une ATPase calcium-dépendante, si bien que la plus grande partie du calcium cellulaire y est séquestré.

L'arrivée du potentiel d'action au niveau de la triade a pour effet de libérer brusquement le calcium séquestré par ouverture de canaux ioniques. Le calcium diffuse alors librement dans le sarcoplasme, où sa concentration augmente plus de mille fois.

C'est cette augmentation de la concentration en calcium qui est à l'origine de la contraction, car elle provoque une modification dans la structure du filament fin et permet ainsi le pontage avec le filament épais.

**Au repos**, lorsque la concentration en calcium est basse, la tropomyosine et la troponine sont disposées de telle sorte qu'elles inhibent la formation des ponts.

Lorsque la concentration en calcium est élevée, celui-ci se fixe sur la troponine C qui change de forme et entraîne le déplacement de la tropomyosine qui, de superficielle, va se placer dans la rainure de l'hélice d'actine : la tropomyosine ne recouvre donc plus les sites d'interaction actine-myosine et ne s'oppose plus au pontage.

Une fois l'onde de dépolarisation passée, le calcium regagne les citernes du réticulum formant les triades, ce qui stoppe l'activité ATPasique. Le sarcomère retourne alors à sa longueur initiale.

La contraction résulte d'une succession de liaisons entre l'actine et la myosine : chaque phase de liaison est suivie d'une phase de dissociation qui permet à la myosine d'atteindre le site de liaison d'actine de l'unité suivante. Ainsi, de proche en proche, les filaments d'actine se déplacent par rapport aux filaments de myosine. Chaque liaison consomme une molécule d'ATP.

Chaque étape peut faire l'objet d'un dysfonctionnement, l'absence de l'une des protéines mises en jeu peut entraîner l'apparition d'une myopathie.

#### IV. B. LES DIFFERENTS TYPES DE FIBRES MUSCULAIRES STRIEES [8]

A l'intérieur d'un muscle, les fibres musculaires striées ne sont pas toutes identiques : elles possèdent des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles variables qui permettent de distinguer trois groupes :

- fibres de type I appelées également fibres lentes ou rouges, riches en mitochondries, fonctionnant sur le mode aérobie ;
- fibres de type II, ou fibres rapides, qui utilisent la glycolyse anaérobie, dont les fibres IIA (fonctionnement mixte aérobie ou anaérobie) et les fibres IIB ou fibres blanches (fonctionnement anaérobie). Les fibres IIc fonctionnent sur un mode mixte et seraient les précurseurs des fibres I, IIA et IIB ;
- fibres de type III chez les oiseaux.

La nature de la myosine est responsable du type des fibres : il existe de la myosine lente ou myosine rapide.

En histologie, la mise en évidence de ces trois types de fibres se fait par une coloration histo-enzymologique des enzymes telle que la SDH (succinodéhydrogénase) ou l'ATPase sur des coupes transversales de muscle congelées.

Pour une espèce donnée, la composition d'un muscle en fibres de type I et de type II, est remarquablement fixe et il existe une certaine corrélation entre le type de cellules musculaires striées et les propriétés contractiles du muscle.

L'ensemble des cellules musculaires striées, qui dépendent d'un même neurone moteur, est appelé une unité motrice ; ces cellules ont une topographie dispersée au sein du muscle. Toutes les cellules musculaires d'une unité motrice sont d'un même type, et il semble que le type des cellules musculaires soit déterminé par la cellule nerveuse qui exerce une influence permanente sur elles.

Le rapport des différents types de fibres est constant dans un muscle à l'état normal, il varie lors de myopathies.

*N.B. Chaque individu présente une répartition propre aux types de fibres (en moyenne autant de fibres de type I que de fibres de type II). Un sujet qui possède un stock important de fibres rapides peut réaliser des activités de forte intensité. Un sujet qui possède un stock important de fibres lentes sera plutôt adapté aux activités d'endurance. La pratique de certaines activités (entraînement sportif) peut amener une transformation de la répartition des fibres.*

#### IV. C. ROLE METABOLIQUE DU MUSCLE [20]

Les muscles squelettiques sont indirectement impliqués dans la néoglucogenèse du foie et du rein. En effet, les muscles délivrent à ces deux organes les précurseurs nécessaires que sont les acides aminés glucoformateurs.

Dans une proportion moins importante, les muscles libèrent certains acides aminés cétoènes qui seront réutilisés pour la cétoenèse hépatique. Les acides aminés libérés par le muscle existent à l'état libre dans le sarcoplasme ou proviennent de la dégradation ménagée de la fraction myogène.

Le rôle métabolique est particulièrement important dans le cas d'un jeûne prolongé, ou d'un syndrome de malnutrition. Il se traduit par une fonte musculaire et l'apparition d'une amyotrophie.



## **V. DIFFERENCIATION ET CROISSANCE DES FIBRES MUSCULAIRES STRIEES [7, 20]**

### **V. A. DIFFERENCIATION DES MYOBLASTES**

Les cellules musculaires se différencient à partir de cellules embryonnaires mésodermiques dérivées des somites, appelées les myoblastes.

Les myoblastes prolifèrent tout en restant apparemment indifférenciés et on peut difficilement les distinguer des cellules mésenchymateuses environnantes. Ensuite, sous l'influence de facteurs de régulation myogéniques (MyoD, Myf5), ils fusionnent entre eux pour former des cellules musculaires multinucléées et ils commencent à élaborer les protéines spécialisées caractéristiques du muscle différencié. La fusion implique des mécanismes de reconnaissance mutuelle et spécifique entre les myoblastes : en effet, ils ne fusionnent pas avec les cellules adjacentes non musculaires.

Chez l'embryon, la fusion des myoblastes avec la cellule syncytiale immature est progressive afin de permettre l'accroissement des fibres au cours du développement embryonnaire. Une fois la fusion des myoblastes effectuée, la division cellulaire devient impossible. L'augmentation de la taille de la fibre se produit ensuite par l'augmentation du nombre et de la taille des myofibrilles.

Chez l'adulte, des cellules indifférenciées myoblastiques persistent sous forme de cellules satellites. Ce sont des petites cellules aplaties mononucléées, pauvres en cytoplasme, situées entre la basale et le sarcolemme des fibres musculaires striées. Lors de lésions musculaires, elles prolifèrent et donnent par fusion naissance à de nouvelles fibres musculaires (régénération myoblastique).

### **V. B. CROISSANCE DU MUSCLE APRES LA NAISSANCE**

L'accroissement du volume musculaire se caractérise par une augmentation de la longueur et de la largeur de chaque fibre, sans élaboration de nouvelles myofibrilles.

La croissance en longueur s'accompagne d'un allongement des myofibrilles. A l'extrémité de la fibre, les myofibrilles s'achèvent à courte distance du sarcolemme par une strie Z. L'allongement de chaque myofibrille s'effectue par synthèse des filaments d'actine et de myosine et formation d'une nouvelle strie Z. La croissance en longueur se fait donc par adjonction de nouveaux sarcomères à l'extrémité de chaque myofibrille, grâce à un processus semblable à celui de la myofibrillogenèse.

La croissance de la fibre se traduit par une augmentation considérable de la masse sarcoplasmique, et parallèlement du nombre des noyaux.

L'accroissement numérique des noyaux dépend des cellules satellites. Chacune d'elles se divise et donne naissance à deux cellules satellites dont l'une fusionne avec la fibre musculaire en lui apportant ainsi son noyau. Un processus comparable se produit au cours des phénomènes d'hypertrophie compensatrice des muscles.



## CHAPITRE 2 : SUPPORT GENETIQUE DE LA DYSTROPHIE MUSCULAIRE DE DUCHENNE

La DMD, ainsi que la GRMD, sont des myopathies dégénératives héréditaires associées à l'absence de la dystrophine, une protéine située sous le sarcolemme de la cellule musculaire, qui relie le cytosquelette à la matrice extracellulaire et qui joue un rôle crucial dans la stabilisation des membranes des fibres musculaires pendant leur contraction.

Voyons ici comment est caractérisée l'absence du gène et quelles en sont les conséquences moléculaires et cellulaires.

### I. LA DYSTROPHINE : IDENTIFICATION DU GENE ET DE SES PRODUITS

#### I. A. LE GENE DE LA DYSTROPHINE

##### I. A. 1) Localisation du gène

La localisation chromosomique du gène impliqué dans la dystrophie musculaire de Duchenne a été suspectée précocément car son mode de transmission est caractéristique de l'implication du chromosome X. En effet, la maladie affecte presque uniquement des garçons (dont le chromosome X provient de la mère) et se transmet dans deux tiers des cas environ par des mères non atteintes mais vectrices (possédant un chromosome X normal et un autre porteur de l'anomalie génique). [26, 36]

Trois techniques ont abouti à localiser le gène sur le bras court du chromosome X, en région Xp21 :

- l'étude des translocations chromosomiques impliquant le chromosome X et un autosome dans les rares cas de myopathie de Duchenne survenant chez des filles [26] ;
- le clonage de position, reposant sur le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) ;
- l'étude cytogénétique du chromosome X des patients atteints simultanément de diverses affections liées au chromosome X [24].

##### I. A. 2) Isolement, clonage et produits du gène

L'isolement des premières portions du gène en 1986, puis le séquençage complet en 1987 ont montré que le gène de la dystrophine ou **gène DMD est le plus grand** des gènes actuellement connus chez l'homme.

Il comprend 2,5 millions de paires de bases et contient 79 séquences codantes (exons), représentant à lui seul 1% de la longueur totale du chromosome X ; le nombre d'introns qui le composent est également élevé (un nucléotide sur 200 n'est pas codant). [26, 36, 44]

La transcription de ces exons produit un ARN messager de 14000 nucléotides.

Le gène DMD code pour les quatre isoformes longues et les quatre isoformes courtes actuellement connues de dystrophine [36] ; les 8 promoteurs ont été identifiés à ce jour. [30] Par exemple, il existe un promoteur s'exprimant spécifiquement dans le muscle, l'autre dans le cerveau. Le promoteur du cerveau est hautement spécifique de l'organe alors que le promoteur musculaire est actif dans plusieurs types cellulaires tels que le muscle strié, le muscle lisse, les cellules gliales et peut-être les neurones. [43] La grande taille du gène de la dystrophine explique qu'il soit la cible de mutations fréquentes et que la DMD soit aussi répandue dans les populations humaines et animales [42, 46].

## I. B. STRUCTURE PRIMAIRE DE LA DYSTROPHINE (cf. figure 4)

Elle a été déduite de la séquence en nucléotides de l'ARN messager de 14 kb transcrit à partir du gène DMD. [32]

La dystrophine est formée de l'enchaînement de 3685 acides aminés et possède un poids moléculaire de 427 kD, ce qui en fait l'une des plus grandes protéines connues. [36]. Elle a une longueur d'environ 175 nm. [40]

Cette protéine de forme allongée et articulée a été isolée en 1987 [44]. Elle est normalement présente dans le tissu musculaire strié squelettique, en position sous-sarcolemmale [36], dans les fibres musculaires striées cardiaques et les fibres musculaires lisses, et dans certains neurones. [26, 36]

La dystrophine permet d'ancrer l'actine du cytosquelette à la laminine extra-cellulaire.

La protéine est composée de **quatre domaines** fonctionnels distincts et de quatre régions charnières riches en proline qui la rendent plus flexible [26].

Le **domaine N-terminal** est composé de plus de 240 acides aminés ; il possède une analogie de séquence et de fonction avec des protéines du cytosquelette : la  $\beta$ -spectrine et l' $\alpha$ -actinine. Ce domaine permet de lier la dystrophine avec l'actine, elle-même reliée au cytosquelette sous-jacent. [2, 22, 30, 32, 36, 44].

Le **domaine central** est composé de 2840 acides aminés, répartis en 24 séquences d'environ 109 acides aminés chacune. Il contient les quatre zones charnières non répétées, riches en résidus proline, conférant à la dystrophine sa flexibilité. Supposé avoir une forme de bâtonnet d'une longueur de 125 à 175 nm, il possède des propriétés d'auto-association permettant à deux molécules de dystrophine de s'associer anti-parallèlement ou permettant l'association de la dystrophine avec ses protéines homologues. Comme le domaine N-terminal, mais avec plus d'affinité, le domaine central lie la F-actine. Au sein de la quatrième zone charnière du domaine central, à cheval entre le domaine central et le domaine riche en cystéine, est présent un domaine nommé WW. [2, 32, 36, 44]

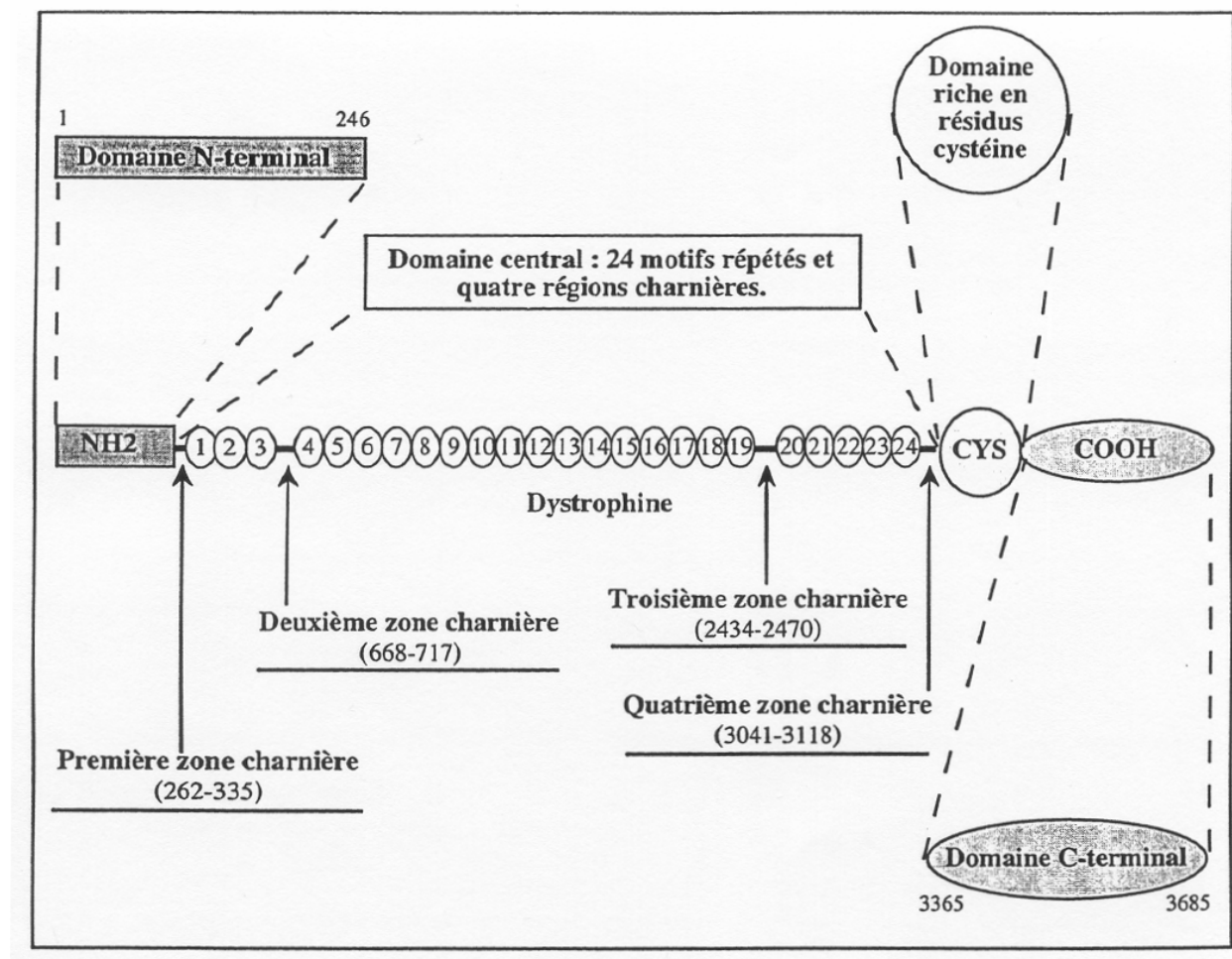
Le **troisième domaine**, riche en cystéine, est composé de plus de 280 acides aminés. Il possède deux sites potentiels de fixation au calcium (EF1 et EF2) et un site de fixation potentiel du zinc (le domaine ZZ). [2, 36]

Les domaines WW, ZZ, EF1 et EF2 constituent une région de la dystrophine liant le bêta-dystroglycane, protéine transmembranaire de 43 kD appartenant au complexe protéique associé à la dystrophine. [36, 44]

Le **domaine C-terminal** est composé de 320 acides aminés et contient le site de liaison à la dystrobrevine et aux syntrophines, protéines cytoplasmiques sous-sarcolemmales. Cette partie de la molécule interagit avec la membrane plasmique par l'intermédiaire d'une des « glycoprotéines associées à la dystrophine », le bêta-dystroglycane. Il contient également un site CC de fixation à l'actine. [36, 44]

Certaines régions apparaissent donc plus importantes que d'autres. Par exemple, une délétion dans la zone des motifs ne modifierait pas la fonctionnalité de la protéine, alors que l'absence des zones charnières, véritables articulations de la molécule, ou l'absence du domaine riche en cystéine aboutirait à une inefficacité complète de la dystrophine dans son rôle de stabilisation membranaire.

Figure 4 : Représentation schématique de la dystrophine



La dystrophine est composée de 4 domaines structuraux : le domaine N-terminal et le domaine central (analogues aux domaines correspondants de la bêta-spectrine), le domaine riche en cystéine et le domaine C-terminal. Trois de ces domaines (N-terminal, central répété et C-terminal) sont susceptibles de se lier à la F-actine du cytosquelette des fibres musculaires. [32, 36, 44]

## I. C. LES ISOFORMES DE LA DYSTROPHINE

### I. C. 1) Isoformes de 427 kD

Quatre promoteurs spécifiques de tissu, situés à l'extrémité 5' du gène DMD produisent un ARN messager, d'une longueur totale de 14 kb, à l'origine de quatre isoformes de 427 kD, dont la dystrophine musculaire. [36]

Cf. tableau 1

Tableau 1 : Isoformes de longueur totale (d'après [30] et [36])

Nom de l'isoforme	PM (kD)	Taille du transcrit (kb)	Exons du gène DMD	Promoteur	Distribution tissulaire chez l'adulte
M-dystrophine	427	14	1-79	P <sub>M</sub> (M : muscle)	Muscle (lisse, squelettique, cardiaque) +/- cellules gliales
B-dystrophine	427	14	1-79	P <sub>B</sub> (B : brain)	Encéphale (cortex, hippocampe)
P-dystrophine	427	14	1-79	P <sub>P</sub> (P : Purkinje cell)	Cervelet
L-dystrophine	427	14	1-79		Lymphocytes

### I. C. 2) Isoformes de plus faible poids moléculaire

Quatre autres promoteurs, également spécifiques de tissu, sont à l'origine d'ARN messagers incomplets et d'isoformes de la dystrophine de plus faible poids moléculaire. [36]

Tableau 2 : Isoformes courtes (d'après [30] et [36])

Nom de l'isoforme	PM (kD)	Taille du transcrit (kb)	Exons du gène DMD	Localisation du promoteur	Distribution tissulaire chez l'adulte
Dp260	260		30-79		Rétine (couche plexiforme externe)
Dp140	140	7,5	51-79	Dans l'intron 44 du gène DMD	Encéphale (cortex, hippocampe, bulbe olfactif), moelle épinière et rein
Dp116	116	5,2	56-79	Entre les exons 55 et 56 du gène DMD	Cellules de Schwann
Dp71	71	4,5	63-79	Entre les exons 62 et 63 du gène DMD	Ubiquitaire (tissus non musculaires sauf chez le fœtus)

## I. D. EXPRESSION DE LA DYSTROPHINE

### I. D. 1) Expression de la dystrophine musculaire

La dystrophine est une protéine du cytosquelette, présente à la face interne de la membrane sarcolemmique.

L'isoforme M, très peu abondante dans le tissu musculaire strié, représente environ 0,002 % des protéines musculaires squelettiques. Elle constitue par contre 5 % environ de la fraction cytosquelettique du sarcolemme musculaire. [22, 24, 36, 40]

Le long du sarcolemme, la dystrophine a une distribution préférentielle périodique costamérique, en regard des bandes I, zones d'ancrage des filaments d'actine au sarcolemme. La dystrophine est plus abondante dans certaines régions spécialisées : les jonctions myotendineuses et les jonctions neuromusculaires. La quantité de dystrophine n'est pas affectée par le type de fibre musculaire. [22, 36, 40, 44]

La dystrophine est également présente le long du sarcolemme et dans les tubules T des fibres striées cardiaques, sauf dans les régions transverses de contact entre les cardiomyocytes (fascia adherens des disques intercalaires). [2, 36]

Dans les fibres musculaires lisses des viscères, elle possède une distribution ponctuée le long du sarcolemme, alternant avec une autre protéine du cytosquelette : la vinculine. Dans ces tissus, la dystrophine a été détectée en particulier dans les poumons, les organes digestifs et les uretères. [2, 36, 40, 44]

### I. D. 2) Expression de la dystrophine dans l'encéphale

Le seul tissu non musculaire exprimant des quantités significatives de dystrophine est l'encéphale (10 % de la quantité en protéine et en ARNm présente dans le muscle), où le promoteur P<sub>B</sub> est majoritairement actif, bien qu'une faible expression de M-dystrophine existe. La dystrophine (isoforme C) est concentrée en région post-synaptique des neurones du cortex de l'hippocampe. [36]

## I. E. LE COMPLEXE DYSTROPHINE-GLYCOPROTEINES ET PROTEINES ASSOCIEES A LA DYSTROPHINE

### I. E. 1) Nature du complexe [13, 26, 36]

La dystrophine n'est pas directement liée à la membrane plasmique de la fibre musculaire, mais par l'intermédiaire d'un complexe de protéines divisé en 3 sous-groupes :

- le sous-groupe des dystroglycanes ;
- le sous-groupe des sarcoglycanes ;

Dystroglycanes et sarcoglycanes, transmembranaires, étaient autrefois dénommés « DAG » (glycoprotéines associés à la dystrophine).

- le sous-groupe cytoplasmique, comprenant : les syntrophines (anciennement « DAP » : protéines associées à la dystrophine), l'alpha-dystrobrevine (protéine à la fois homologue de et associée à la dystrophine), et une enzyme : la monoxyde d'azote synthétase neuronale (nNOS). Cette enzyme, stimulée par l'acétylcholine et le glutamate, serait impliquée dans la modulation

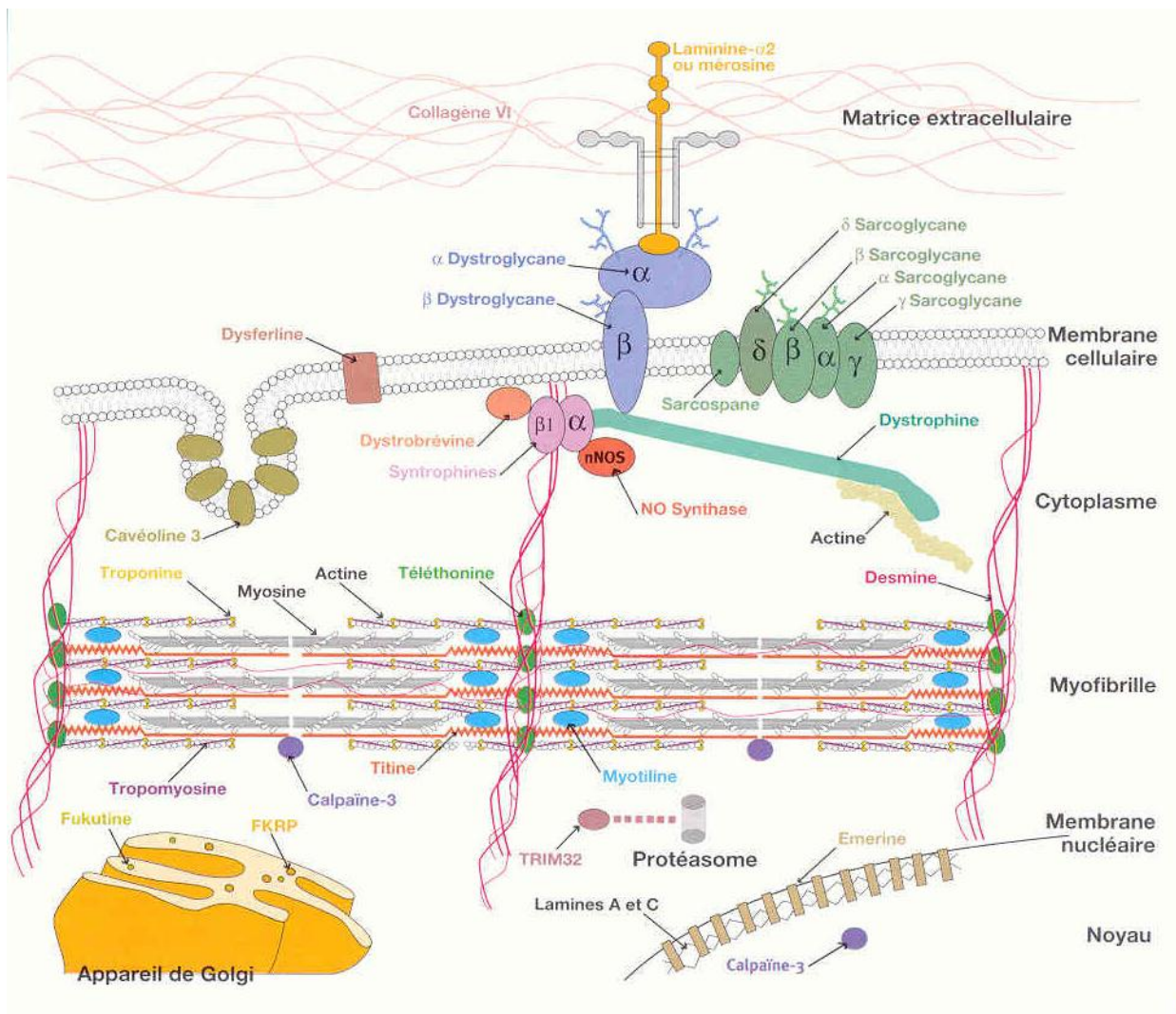
de la contraction musculaire, la respiration mitochondriale, le métabolisme glucidique et la transmission de l'influx nerveux.

- enfin, le sarcospan, protéine de découverte récente.

Les trois sous-complexes associés à la dystrophine et le sarcospan sont interdépendants : la cohésion du complexe, nécessaire à la stabilité de la membrane plasmique musculaire, dépend de l'expression et de la localisation correctes de chacune de ses parties.

Cf. figure 5 et Tableau 3.

**Figure 5** : Représentation schématique du complexe protéique associé à la dystrophine dans le muscle strié squelettique (d'après [1] et [6])





**Tableau 3** : Les membres du complexe dystrophine-glycoprotéines et protéines associées à la dystrophine (d'après [36]).

Composant	Synonymes	PM (kD)	Locus du gène	Expression dans le muscle	Liaison aux autres protéines
Dystrophine	Dp427	427	Xp21.2	Cytosquelette membranaire	Actine par les domaines N-terminal, central et C-terminal. Bêta-dystroglycane par les domaines central et riche en cystéine. Syntrophines et dystrobrevines par le domaine C-terminal.
Syntrophines	59DAP	59		Cytosquelette membranaire	Se lie au domaine C-terminal de la dystrophine et de la dystrobrevine.
alpha-syntrophine			20q11.2	Sous-synaptiques	
bêta1-syntrophine			8q23-24		
bêta2-syntrophine			16q22-23	Jonction neuro-musculaire	
Sarcoglycanes					Le sous-complexe des sarcoglycanes est indirectement lié à la dystrophine par l'intermédiaire du bêta-dystroglycane.
alpha-sarcoglycane	50DAG, A2, adhaline	50	17q21	Sarcolemme	
bêta-sarcoglycane	43DAG, A3b	43	4q12	Sarcolemme	
gamma-sarcoglycane	35DAG, A4	35	13q12	Sarcolemme	
delta-sarcoglycane	35DAG, A4		5q33-34	Sarcolemme	
epsilon-sarcoglycane		48	7q21-q22	Sarcolemme	
Sarcospan	25DAP, A5	25	12p11.2	Sarcolemme	Lié aux sarcoglycanes.
Dystroglycanes					
alpha-dystroglycane	156DAG	156	3p21	Extra-cellulaire	Se lie à la chaîne alpha-2 de la laminine
bêta-dystroglycane	43DAG, A3a	43	3p21	Sarcolemme	Se lie par sa portion cytoplasmique aux domaines riches en cystéine et C-terminal de la dystrophine et par sa portion transmembranaire à l'alpha-dystroglycane.
Dystrobrevines		71	2p22-23	Cytosquelette membranaire	
nNOS				Membrane post-synaptique de la jonction neuro-musculaire.	Se lie indirectement à la dystrophine par l'intermédiaire de l'alpha-syntrophine.

## **I. E. 2) Composition, variabilité et rôle du complexe protéique associé à la dystrophine [36]**

Le complexe protéique associé à la dystrophine présente une composition variable en fonction du tissu dans lequel il est exprimé (muscle squelettique, muscle cardiaque, muscle lisse, tissu nerveux), et de sa localisation cellulaire (pour le muscle strié squelettique, il est différent au niveau du sarcolemme extrajonctionnel et de la membrane post-synaptique).

D'un poids moléculaire avoisinant 1200 kb, il comprend dans le sarcolemme du muscle strié squelettique :

- une molécule de dystrophine (ou d'utrophine à la jonction neuromusculaire),
- les 2 dystroglycane,
- les 4 sarcoglycane alpha à delta,
- le sarcospan,
- 2 des 3 syntrophines,
- une dystrobrevine,
- nNOS.

A l'extrémité cytoplasmique du complexe, la molécule de dystrophine est reliée à 24 monomères d'actine ; à l'autre extrémité, l' $\alpha$ -dystroglycane est lié à la laminine.

Le complexe relie ainsi la F-actine du cytosquelette membranaire à la laminine (chaîne  $\alpha$ 2) de la matrice extracellulaire, protège la F-actine de la dépolymérisation et assure la stabilité de la membrane plasmique musculaire au cours de la contraction.

Les syntrophines du complexe pourraient moduler la fonction des canaux sodiques membranaires, notamment dans le myocarde.

## **I. F. LES PROTEINES HOMOLOGUES DE LA DYSTROPHINE : UTROPHINES ET DYSTROBREVINES [32, 36]**

Il existe toute une famille de protéines apparentées aux dystrophines. Cette famille est caractérisée par la présence d'un domaine ZZ dans la région riche en cystéine et d'un domaine CC (alpha-hélicoïdal) dans la région C-terminale. Elle est divisée en deux sous-familles : les « dystrophin-related proteins » ou « DRP » actuellement appelées utrophines, et les dystrobrevines. Elles sont présentes notamment dans le tissu musculaire et le tissu nerveux. Certaines sont liées au chromosome X, d'autres sont autosomiques :

- L'utrophine ou DRP1, équivalent autosomique de la dystrophine ;
- DRP2, protéine homologue de Dp116 ;
- Les isoformes courtes d'utrophine ;
- Les dystrobrevines, homologues et associées à la dystrophine.

Cf. récapitulatif dans le tableau 4.

Tableau 4 : Les protéines homologues de la dystrophine (d'après [36])

Protéine	Homologue de	PM (kD)	Locus du gène (homme)	Expression dans le muscle	Expression extra-musculaire	Liaison aux autres protéines
<b>Complexe Utrophine</b>						
Utrophine ou DRP1	M-dystrophine	395	6q24	Muscle lisse surtout (vaisseaux sanguins et myomètre) Sarcolemme du fœtus, sarcolemme des jonctions neuromusculaires et myo-tendineuses chez l'adulte, sarcolemme des fibres régénératives	Cellules de Schwann, cellules endothéliales	Liaison aux syntrophines bêta1 et bêta2, et au bêta-dystroglycane. Liaison indirecte aux sarcoglycane et alpha-dystroglycane via le bêta-dystroglycane
DRP2	Dp116		Xq22	Non	Surtout encéphale et moelle épinière humains et murins/ œil, rein, dents, œsophage, colon, épидidyme et ovaire de souris	Liaison par le domaine C-terminal aux dystroglycane, dystrobrevine et syntrophines des tissus dans lesquels DRP2 est exprimée
G-utrophine	Dp116	113	Gène de l'utrophine	Non	Encéphale	
Up71	Dp71	71	Gène de l'utrophine	Non	Large	
Up140	Dp140	140	Gène de l'utrophine	Non	Large	
<b>Complexe des dystrobrevines</b>						
Alpha-dystrobrevine 1	Domaines riche en cystéine et C-terminal de la dystrophine	84	18q12	Restreinte aux jonctions neuromusculaires	Encéphale, poumon	Association préférentielle à l'utrophine et au domaine C-terminal de la dystrophine
Alpha-dystrobrevine 2		65	18q12	Sarcolemme, préférentiellement de la jonction neuromusculaire	Encéphale, poumon	Association à la dystrophine
Bêta-dystrobrevine	Alpha-dystrobrevine	71	2p22-23	Faible	Cœur, encéphale, rein, placenta, pancréas	Association à Dp71, la dystrophine et les syntrophines

## I. G. ROLES DE LA DYSTROPHINE [36,40]

La structure de la dystrophine, son expression, ses associations moléculaires, ses isoformes et ses homologues sont de mieux en mieux connus et de nouvelles mutations affectant le gène de la dystrophine sont constamment répertoriées, mais les rôles exacts de la dystrophine demeurent hypothétiques.

Les principales suppositions concernant les fonctions de la dystrophine découlent des effets de son absence et des analogies structurales qu'elle peut présenter avec d'autres protéines. Son principal rôle serait essentiellement la stabilisation de la membrane en permettant l'amarrage du cytosquelette et l'organisation de la distribution des glycoprotéines membranaires.

### I. G. 1) Les hypothèses d'un rôle structural

#### I. G. 1) a. Maintien de la stabilité membranaire

Dans le muscle squelettique, l'association de la dystrophine à la membrane sarcolemmale est supposée maintenir la stabilité membranaire, essentielle notamment lors de la contraction musculaire [2]. Cette hypothèse découle notamment de l'analogie structurale que présente le domaine central de la dystrophine avec la spectrine, protéine qui maintient la déformabilité et l'intégrité des hématies quand elles franchissent les capillaires [44]. Elle est confortée par l'observation chez les patients déficients en dystrophine, atteints de dystrophie musculaire de Duchenne, de lésions sarcolemmales en microscopie électronique appelées « delta lésions », qui correspondent à des zones focales d'interruption du sarcolemme, ainsi que d'une libération dans le sérum d'enzymes spécifiques du muscle. De plus, l'activité mécanique augmente la proportion de fibres dégénératives\* (incorporant un colorant vital), suggérant que la dystrophine apporte au sarcolemme une résistance mécanique aux "stress" subis pendant l'alternance contraction / relaxation musculaire.

#### I. G. 1) b. Fonctions particulières dans des zones spécialisées

Au niveau des jonctions neuromusculaires, la dystrophine est exprimée dans les « creux » membranaires, riches en canaux sodiques voltage-dépendants, et absente des « crêtes », où se situent les récepteurs de l'acétylcholine. La relative abondance de la dystrophine dans ces régions spécialisées suggère qu'elle pourrait participer à leur organisation topographique.

De même, certains travaux sur le muscle de souris déficiente en dystrophine montrent qu'en l'absence de dystrophine, les replis latéraux de la jonction myotendineuse et les associations entre le sarcolemme et les filaments conjonctifs sont moins développés que chez la souris normale. La dystrophine pourrait donc avoir une importance structurale au niveau des jonctions myotendineuses. [2].

Enfin, l'étude de la formation embryonnaire de l'encéphale montre que l'expression de Dp71 par les astrocytes périvasculaires coïncide avec l'élaboration de la barrière hémato-encéphalique.

## I. G. 2) Les hypothèses d'un rôle métabolique

### I. G. 2) a. Un rôle dans le métabolisme calcique ?

L'observation dans le muscle de l'homme et de la souris déficients en dystrophine de concentrations intracellulaires élevées en calcium, d'une augmentation de l'activité des canaux ioniques calciques et de modifications de l'activité des protéases sensibles au calcium suggère que la dystrophine pourrait jouer un rôle dans le métabolisme calcique. Toutefois ce rôle pourrait être indirect, via la stabilisation du sarcolemme, les lésions membranaires dues à l'absence de dystrophine entraînant secondairement un afflux anormal de calcium dans la cellule [2].

### I. G. 2) b. Un rôle dans la croissance en longueur des myofibrilles ?

L'hypothèse selon laquelle la dystrophine jouerait un rôle dans la croissance en longueur des fibres musculaires provient de deux observations faites chez la souris mdx, déficiente en dystrophine :

(1) la vague de nécrose musculaire chez la souris mdx survient à un âge où chez les souris témoins, le taux d'addition de sarcomères à l'extrémité des fibres est maximal,

(2) dans le diaphragme de souris mdx âgées, les fibres sont plus courtes de 35 % par rapport à celles de souris témoins. On voit à quel point ces constatations sont des arguments indirects en faveur de l'hypothèse avancée : de nombreux travaux seraient nécessaires pour confirmer celle-ci.

## **Conclusion.**

La découverte de la dystrophine et de son gène, le gène DMD, en 1987, a été une étape décisive dans la connaissance des dystrophinopathies, maladies dues à une mutation du gène DMD, au premier rang desquelles la dystrophie musculaire de Duchenne. A titre d'exemple, cette découverte a permis le diagnostic génétique des individus souffrant de dystrophie musculaire de Duchenne, mais également des individus porteurs, et le diagnostic génétique antenatal de l'affection. Elle a également permis le développement d'anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre un ou plusieurs des domaines structuraux de la dystrophine, ces anticorps étant la clef du diagnostic par biologie moléculaire et par immunohistochimie. La connaissance du gène de la dystrophine est par ailleurs cruciale dans la conception de méthodes de thérapie génique pour le traitement des dystrophinopathies. Enfin, la connaissance du complexe protéique associé à la dystrophine a conduit à l'identification de la cause de multiples myopathies héréditaires rares dues à une mutation d'un gène codant pour l'une des protéines associées à la dystrophine. [36]

## II. GENOTYPE DES SUJETS ATTEINTS DE DMD

### II. A. GENOTYPE DES PATIENTS HUMAINS MYOPATHES

216 mutations différentes du gène DMD sont répertoriées comme étant à l'origine de dystrophinopathies. [36]

Plus de 65 % des cas de myopathie de Duchenne et 85 % des cas de dystrophie musculaire de Becker résultent d'une **délétion** détectable (de grande taille, entre 6 et 2000 kb) dans les parties codantes du gène DMD, ou à une duplication anormale d'une partie du gène ; les autres cas sont dus à des mutations de petite taille (inférieure à un exon) : substitution d'un nucléotide, insertion ou délétion ponctuelle dans une région codante ou non (cf. tableau 5).

Les mutations ponctuelles, à l'origine d'un tiers des cas de DMD, sont les plus difficiles à diagnostiquer (elles correspondent à la modification d'un nucléotide sur les 2,5 millions que contient le gène DMD). [26, 36, 43, 44]

Tableau 5 : Mutations du gène DMD à l'origine des phénotypes Duchenne et Becker chez l'homme (D'après [36] et [40]).

<b>DMD</b>		<b>BMD</b>
65 %	délétions et duplications intragéniques de grande taille (aboutissant à des molécules de dystrophine sévèrement tronquées)	85 %
18 %	petites mutations non-sens (à l'origine d'un codon-stop)	
8 %	petites délétions et insertions (de moins de 52 paires de bases)	
7 %	petite mutation d'un site d'épissage (aboutissant à des anomalies de maturation de l'ARN pré-messager)	7 %
< 2 %	petites mutations faux-sens (substitution de nucléotide)	8 %

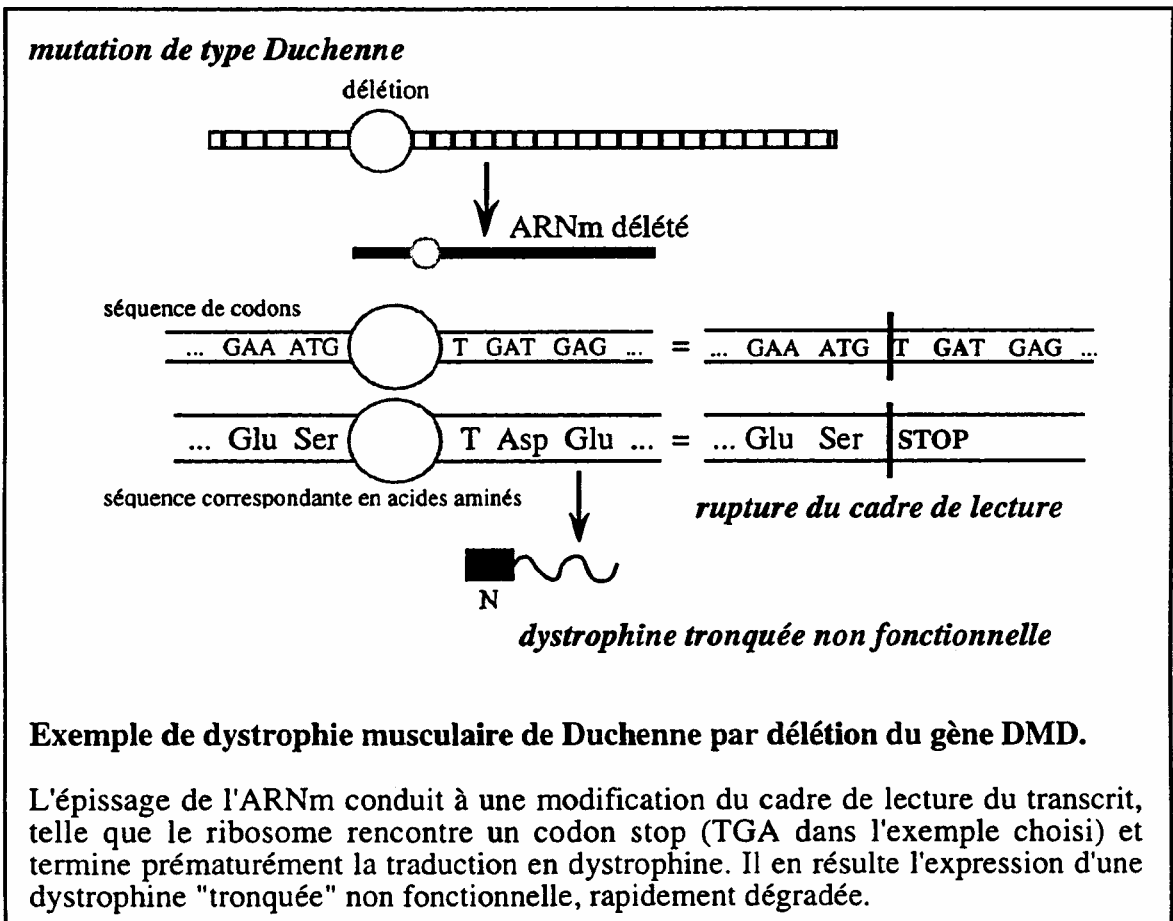
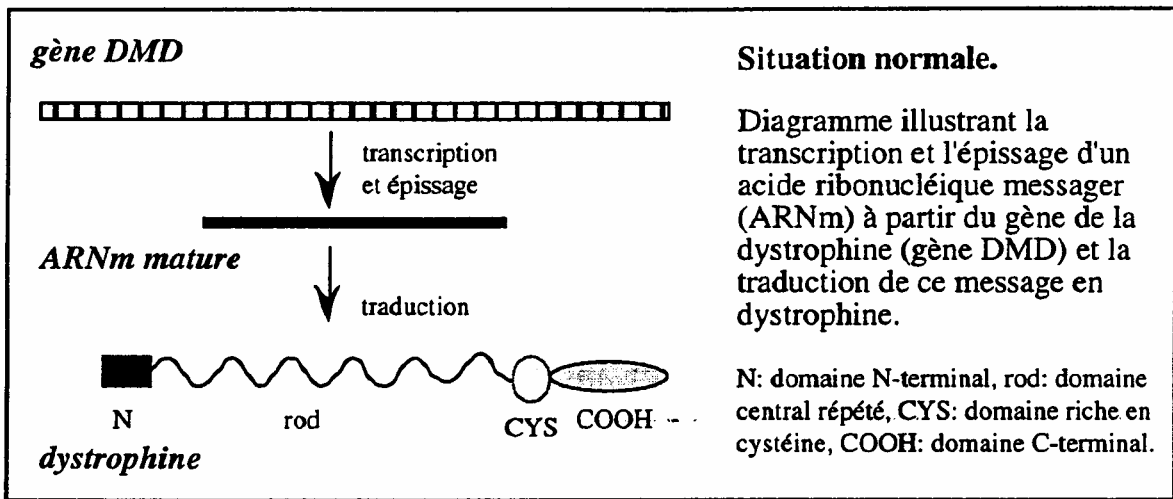
L'étude des délétions, mutations les plus fréquentes du gène DMD, a montré que dans la majorité des cas, le phénotype Duchenne, Becker ou intermédiaire résultant est prévisible en se conformant à « l'hypothèse de l'interruption du cadre de lecture ». [36]

L'hypothèse de l'interruption du cadre de lecture (cf. figure 6) postule que les mutations à l'origine de dystrophie musculaire de Duchenne, quelle que soit leur taille, aboutissent à une désorganisation des triplets de codons de l'ADN et de l'ARNm produit à partir du gène DMD muté [36], entraînant une perte du cadre de lecture. Les cassures localisées dans ces exons introduisent un codon stop prématuré qui empêche la production de la protéine, si bien que dans le muscle d'un enfant atteint de DMD, la dystrophine est absente de la surface des fibres musculaires. [43]

Lors de dystrophie musculaire de Becker par contre, la séquence de nucléotides resterait codante (conservation du cadre de lecture) [2, 24, 36].

92 % des cas comportant une délétion se conforment à cette hypothèse. Certaines exceptions existent cependant [24] et certaines délétions ont des conséquences totalement imprévisibles (par exemple délétions des quatorze premiers exons du gène DMD) ; certaines délétions qui maintiennent le cadre de lecture ("in-frame") sont associées à un phénotype sévère et certaines délétions qui rompent le cadre de lecture ("frameshift") sont associées à un phénotype léger. [36]

Figure 6 : L'hypothèse de la rupture du cadre de lecture dans les cas de DMD (D'après [36], [39])



## II. B. GENOTYPE DU CHIEN GRMD

La dystrophie musculaire du Golden Retriever est héréditaire, transmise sur un mode récessif lié au chromosome X [17]. Spontanément, seuls les mâles sont donc atteints. Cependant, la création de la lignée GRMD par consanguinité a produit des femelles homozygotes, également dystrophiques. [36]

La mutation au niveau de l'ADN a été identifiée en 1992 [45]. Les chiens Golden Retriever dystrophiques présentent une mutation ponctuelle (G remplacé par A) sur un site d'épissage de l'extrémité 3' de l'intron 6 du gène DMD. La mutation est de type non-sens, la **délétion de l'exon 7** (119 paires de bases) déplace le cadre de lecture et introduit un codon-stop dans l'exon 8 N-terminal [36] (figure 7).

L'ARN messager, après transcription et épissage anormaux, est tronqué : la longueur de l'ARNm est estimée à 5% de la longueur normale [30, 36].

De plus, cet ARNm est présent en quantité très réduite, ce qui peut être attribué à :

- soit une forte instabilité du transcrit mutant ;
- soit un très faible niveau de transcription lié à un défaut dans le métabolisme intranucléaire durant la synthèse d'ARNm ;
- soit au fait que l'exon délété (et donc la formation d'un codon stop prématuré) se situe très près de l'extrémité 5' du transcrit.

[4, 18, 28, 36, 40, 45].

Les chiens GRMD expriment (en très faible quantité, détectable par Western Blot mais pas par immunohistochimie) une dystrophine tronquée de 390 kD (91 % de la taille normale) provenant de deux transcrits alternatifs du gène : transcrit « 2-10 » exempt des exons 3 à 9 et transcrit « 4-13 » exempt des exons 5 à 12, qui possèdent une séquence de lecture ininterrompue et contiennent respectivement 92 % et 89 % de la séquence codante de dystrophine. [36]

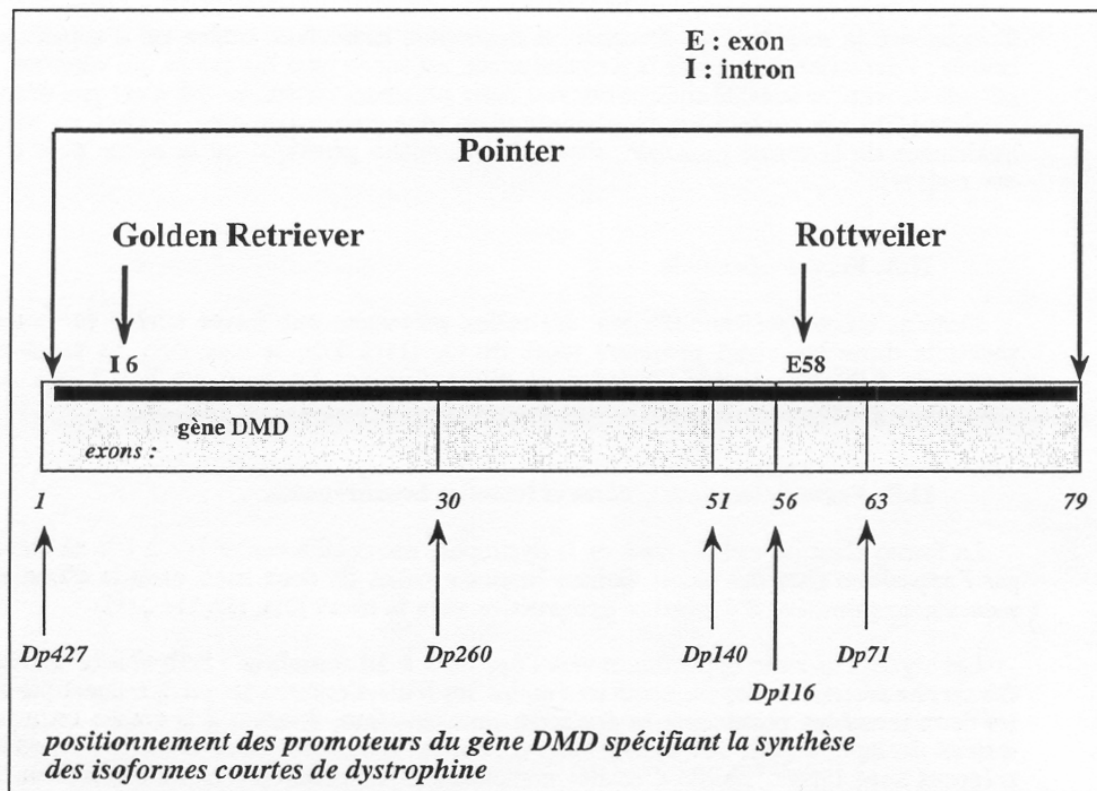
La découverte de cette isoforme de 390 kD pourrait expliquer la grande variabilité de sévérité clinique entre les animaux [30].

Chez les chiens mâles et les femelles homozygotes dystrophiques, la dystrophine de longueur totale est absente des myofibres striées squelettiques et cardiaques. Elle est exprimée en quantité réduite dans le muscle et le cœur des femelles hétérozygotes [12, 18, 19, 36].

Les mutations canines touchant le gène DMD actuellement connues sont reportées dans la figure 7.



Figure 7 : Positionnement des mutations canines connues sur le gène DMD



La mutation ponctuelle du gène DMD chez le chien Golden Retriever est située en amont du promoteur Dp260 : le chien GRMD n'exprime pas la dystrophine mais exprime toutes les isoformes courtes de dystrophine.

Le chien Rottweiler est porteur d'une mutation ponctuelle du gène DMD située entre les promoteurs de Dp116 et Dp71 : il s'agit d'une substitution ponctuelle dans l'exon 58, de type non-sens (introduisant un codon-stop). Le chien Rottweiler dystrophinopathe n'exprime ni dystrophine, ni Dp260, ni Dp140, mais exprime normalement les isoformes courtes Dp116 et Dp71.

Le chien Pointer est l'un des rares modèles animaux spontanés à présenter une mutation du gène DMD qui ne soit pas une mutation ponctuelle, mais une délétion du gène (anomalie génétique la plus fréquente chez les patients humains atteints de dystrophie musculaire de Duchenne). La délétion du gène DMD chez le Pointer est de très grande taille, concernant la quasi-totalité du gène (des promoteurs à l'exon 79) : aucune isoforme courte n'est exprimée. (D'après [18, 36, 45])

## II. C. CONSEQUENCES DE CETTE MUTATION

Aussi bien chez l'homme que chez le chien, la dystrophine mutée non fonctionnelle ou absente ne peut plus jouer son rôle de « ressort », elle n'assure plus le raccourcissement de la cellule musculaire pendant la contraction en réponse au raccourcissement des myofibrilles, ce qui entraîne une rupture de la membrane plasmique et la nécrose de la fibre musculaire. En effet, la fragilisation de la membrane plasmique et l'activation de canaux membranaires perméables au calcium entraînent une élévation de la concentration intracellulaire de cet ion, ce qui pourrait activer des protéases sensibles au calcium. L'ensemble de ces événements conduit à la nécrose des fibres musculaires et à la dégénérescence du tissu musculaire. Il semble que les fibres rapides (type IIb) soient préférentiellement affectées avant les fibres lentes. D'autre part, le TGF- $\beta$ 1 libéré par les fibres nécrotiques pourrait contribuer à la perte de la capacité de régénération des muscles en réduisant le taux de fusion et la différenciation des cellules satellites. De même, il pourrait se produire un épuisement des cellules satellites au bout d'un certain nombre de cycles nécrose/régénération. [30]

Enfin, il se pourrait que l'absence de dystrophine entraîne une absence d'organisation du cytosquelette qui normalement participe à l'agrégation des canaux ioniques et des récepteurs aux neurotransmetteurs. [30]

### III. MODE DE TRANSMISSION DE LA DMD

Chez l'homme, la dystrophie musculaire de Duchenne est une maladie génétique à transmission récessive liée au chromosome X [17] ; environ deux tiers des patients DMD sont porteurs de délétions détectables sur le gène codant pour la dystrophine. Chez les patients atteints de DMD, à la fois la protéine, la dystrophine et son transcrit sont soit sévèrement déficients, soit complètement absents. [40]

Ce mode de transmission est confirmé par la localisation du gène DMD sur le chromosome X.

La maladie est transmise par une femelle vectrice, qui est le plus souvent asymptomatique, et ne manifeste que très rarement des anomalies cliniques, électromyographiques ou histologiques. [46]

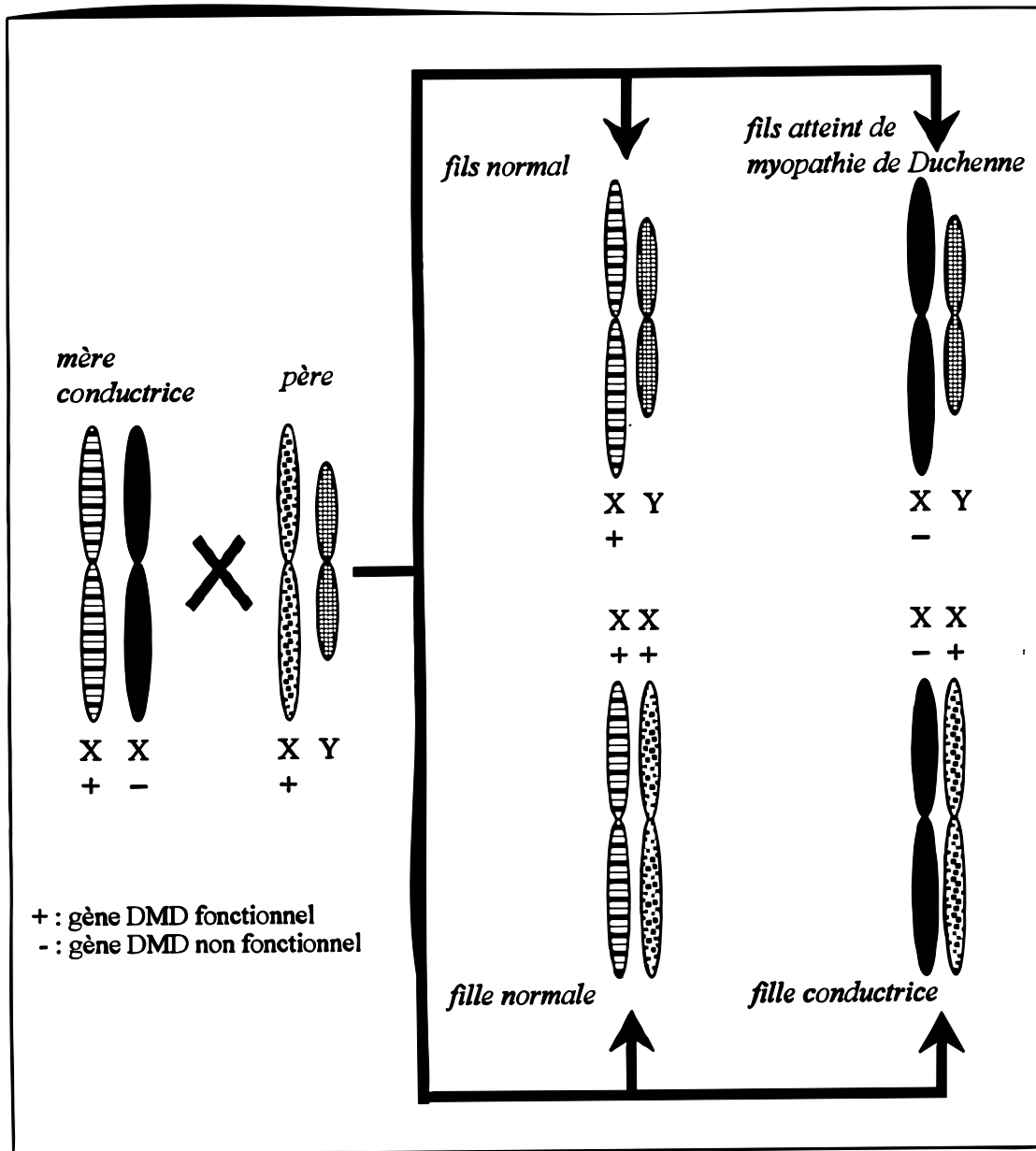
Cf. figure 8.

Les mâles sont donc principalement touchés par cette affection, cependant, dans de très rares cas, une translocation entre le chromosome X et un autosome peut être à l'origine de la maladie chez une fille. [36]

Cf. figure 9.

De même, chez le chien, en 1988, grâce aux croisements d'un mâle malade avec des femelles saines et en procédant à des croisements en retour, Cooper et coll. [17-18] ont démontré la transmission de la maladie sur un mode récessif lié au chromosome X. Au niveau moléculaire, la même équipe a démontré l'absence de dystrophine et de son transcrit chez les chiens GRMD. [40]

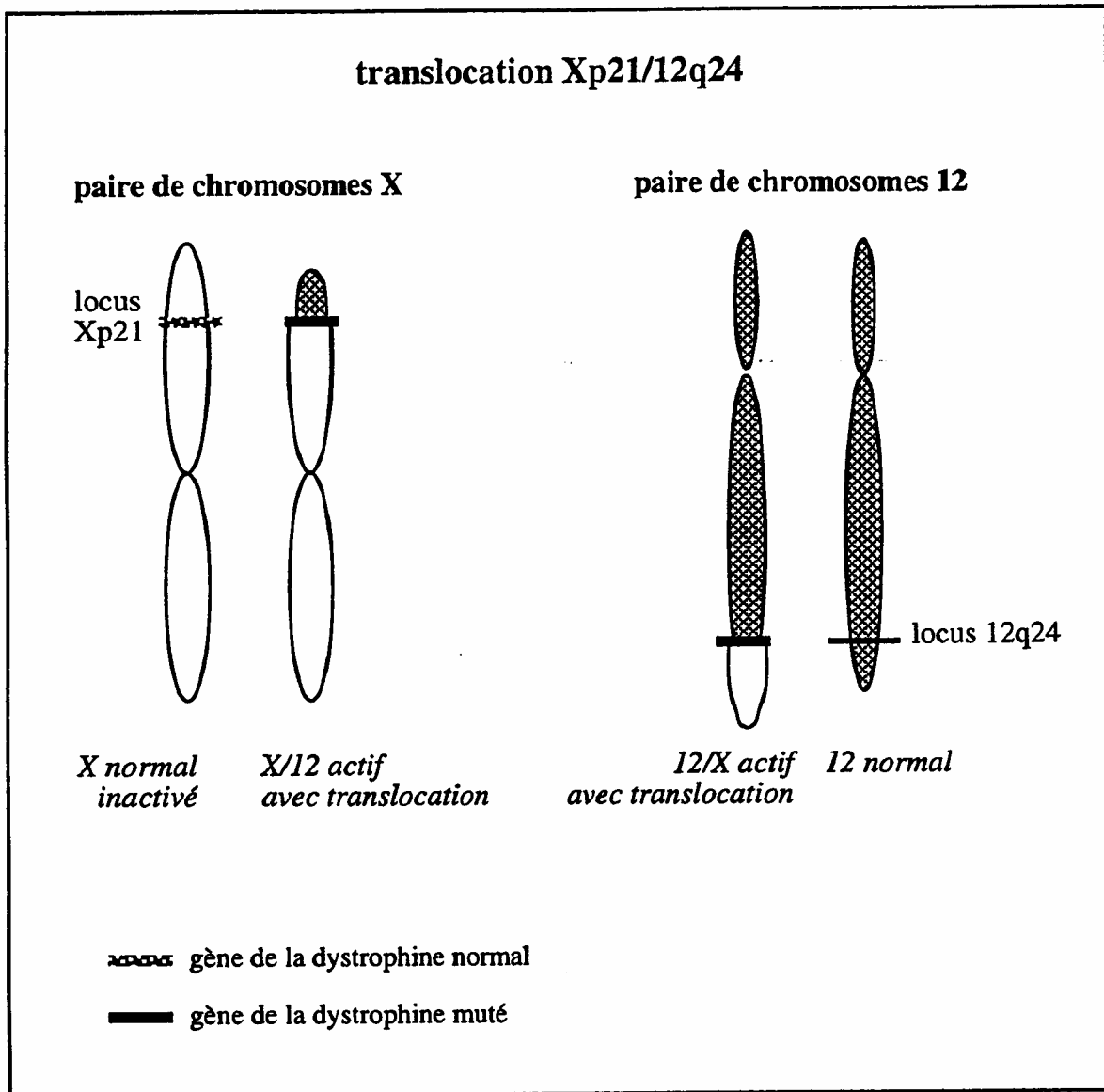
Figure 8 : Mode de transmission de la DMD (cas héréditaires)



La myopathie de Duchenne est transmise sur le mode récessif lié au sexe. Les mères peuvent être conductrices de la maladie : l'un de leurs chromosomes X contient un gène fonctionnel assurant la synthèse de la dystrophine tandis que l'autre est inactif. La production de protéine est réduite de moitié par rapport à la normale, mais le phénotype est généralement normal. En revanche, chez les garçons ayant reçu de leur mère le chromosome X porteur du gène anormal, la dystrophine ne peut plus être synthétisée. (D'après [26], [36])

Figure 9 : Mode de transmission de la DMD (cas sporadiques)

Une translocation entre le chromosome X et un autosome peut être à l'origine de phénotype Duchenne chez une fille.



La myopathie de Duchenne atteint en principe uniquement les garçons ; mais de rares cas de filles atteintes ont été observés. Par exemple, une translocation entre un chromosome X et un chromosome 12 détruit vraisemblablement le gène normal de la dystrophine. Dans de tels cas, le chromosome X est inactivé et le chromosome X affecté par la translocation est le seul fonctionnel. La myopathie apparaît donc.

(D'après [26], [36]) aléatoire

## IV. APPLICATION AU DIAGNOSTIC GENETIQUE

La caractérisation de la mutation chez le chien GRMD a permis à Bartlett et coll. [4] de mettre au point un test génétique fiable pour différencier rapidement les animaux sains des porteurs ou des malades. Auparavant, le diagnostic se faisait grâce aux valeurs de créatine kinase et aux symptômes, ce qui imposait d'attendre que les chiots aient un minimum de 6 semaines. Aujourd'hui, ce test s'effectue après extraction de l'ADN à partir de prélèvements sanguins ou de biopsies provenant d'animaux vivants ou décédés. Il est ensuite pratiqué une amplification par PCR\*, «Polymerase Chain Reaction », du segment d'ADN contenant l'exon 7 en utilisant comme amorces les séquences complémentaires des introns encadrant l'exon 7 (F-primer GF2 pour l'intron 6 et R-primer GR2 pour l'intron 7), ce qui aboutit à un produit PCR de 310 paires de bases. [40]

Ainsi, il est possible d'obtenir le diagnostic de 3 manières [45] :

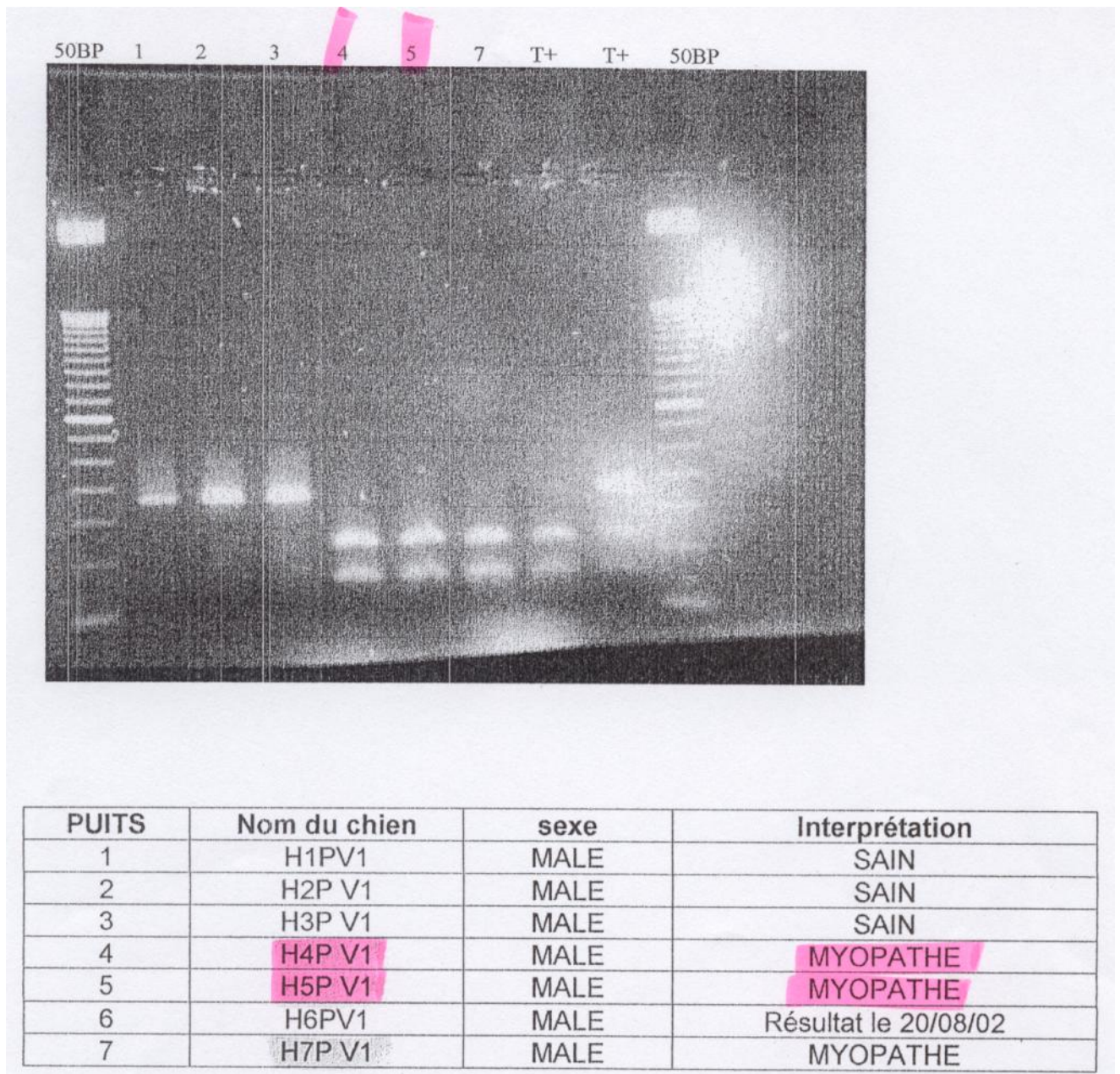
- soit par séquençage\* de l'ADN ;
- soit en réamplifiant le produit PCR avec d'autres amorces : F-primer GF2 complémentaire de l'intron 6 et une autre amorce RFLP (restriction fragment length polymorphism), muté pour une paire de base, complémentaire de la jonction intron 6-exon 7. Le produit résultant est de 130 paires de bases, l'allèle sauvage comportant un site de coupure pour l'enzyme de restriction Stu 1. Ainsi, l'allèle sauvage sera digéré par Stu 1 en deux fragments de 100 et 30 paires de bases, alors que l'allèle GRMD non.

- soit en digérant directement le produit de 310 paires de bases par l'enzyme de restriction SAU 961. L'allèle GRMD, comportant un site de coupure pour cette enzyme du fait de la mutation ponctuelle, sera coupé en deux fragments de 120 et 190 paires de bases alors que l'allèle sauvage ne sera pas digéré.

Dans les deux derniers cas, le diagnostic se fait facilement après migration sur un gel d'agarose. L'utilisation des deux enzymes de restriction différentes digérant respectivement l'allèle sauvage ou l'allèle muté élimine toute possibilité de résultat ambigu par digestion incomplète. [40]

Cf. exemple de diagnostic génétique en figure 10.

Figure 10 : Diagnostic génétique pour une portée de chiots Golden Retriever (Image UETM)



Le diagnostic est effectué par amplification du matériel génomique par PCR suivie d'une digestion par l'enzyme Sau96 I et d'une migration sur gel.

Chez les chiens affectés comme H4PV1 (T-fou) et H5PV1 (T-fal), on observe 2 bandes de 120 et 190 bp, alors que chez les chiens sains, l'enzyme ne coupe pas l'ADN et on obtient qu'un seul fragment après migration.





## **CHAPITRE 3 : DESCRIPTION DE LA DYSTROPHIE MUSCULAIRE DE DUCHENNE ET DE LA MYOPATHIE DYSTROPHIQUE DU GOLDEN RETRIEVER**

Les myopathies désignent les affections des cellules musculaires striées. Elles regroupent 3 grandes entités pathologiques : les myopathies dégénératives, les myopathies inflammatoires, et le syndrome myasthéniforme (qui affecte la jonction neuro-musculaire).

De façon générale, une myopathie se manifeste par une diminution progressive de la force locomotrice, de la motricité respiratoire et digestive, ainsi qu'une réduction de la fonction cardiaque. [8]

Les dystrophies musculaires forment un groupe hétérogène de myopathies dégénératives héréditaires caractérisées par une faiblesse musculaire progressive [46].

Chez l'homme, plus de 20 formes différentes de dystrophie musculaire ont été identifiées (dystrophie musculaire de Duchenne, dystrophie musculaire des ceintures, dystrophie musculaire facio-scapulo-humérale, dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss, etc.) et leurs bases génétiques ont été définies, permettant ainsi une classification plus précise que l'utilisation de critères cliniques et histologiques seuls. [46, 6]

Certaines de ces maladies sont transmises par le chromosome X, d'autres suivent un mode autosomal récessif ou dominant. [46]

La myopathie de Duchenne -la forme de dystrophie musculaire la plus fréquente chez l'homme- a été découverte chez l'homme en 1868. [42]

Dans le cas de la dystrophie musculaire de Becker (une forme atténuée de la DMD), la dystrophine n'est pas absente, mais elle a subi une mutation et sa structure altérée n'est que partiellement fonctionnelle. [46]

Depuis, plusieurs autres protéines impliquées dans d'autres dystrophies musculaires ont été identifiées, dont certaines sont liées directement ou indirectement à la dystrophine [46].

Deux modèles animaux précieux ont été validés : la souris muscular dystrophy X (mdx) et le chien Golden Retriever (GRMD). Ces modèles génétiques sont indispensables pour étudier la maladie et ses mécanismes, mais aussi et surtout pour envisager des essais thérapeutiques [42].

Le chat fait également partie des espèces qui peuvent être touchées par l'absence de dystrophine, mais l'expression clinique est très différente de celle des maladies humaine et canines, et les chats atteints supportent beaucoup mieux leur handicap. [36]

# I. HISTORIQUE DE LA DMD

## I. A. HISTORIQUE DE LA MALADIE CHEZ L'HOMME

Les myopathies ou dystrophies musculaires de Duchenne (DMD) et de Becker (BMD) sont des maladies humaines dégénératives de la fibre musculaire striée, familiale ou sporadique, de transmission récessive liée au chromosome X, affectant presque uniquement les garçons et caractérisées par l'absence dans le muscle de dystrophine [26, 36].

D'évolution progressive et invariablement fatale, la dystrophie musculaire de Duchenne est la plus fréquente et parmi les plus graves des myopathies héréditaires humaines.

Les premiers cas ont été décrits par Meryon en 1852 et Duchenne de Boulogne en 1868. Ce n'est qu'en 1950 que cette maladie pris son nom de " myopathie dystrophique de Duchenne ". [36, 40, 42, 43].

La myopathie de Becker est plus rare et moins grave. Les premiers cas ont été décrits par Becker et Keiner en 1955 [25, 36].

Le gène responsable a été initialement localisé sur le chromosome X en région Xp21 en 1982.

En 1986, le gène a été identifié, il est appelé DMD.

En 1987, le support moléculaire de cette maladie a été identifié : l'absence de la dystrophine, une protéine associée aux fibres musculaires, est à l'origine de la dystrophie musculaire de Duchenne.

Les premiers essais de thérapie chez l'animal ont débuté en 1992, chez l'homme en 2000. [1, 42, 46]

## I. B. HISTORIQUE DU MODELE ANIMAL

La possibilité de guérir certaines maladies neuromusculaires d'origine génétique chez l'homme suppose une meilleure connaissance de la physiopathogénie de ces affections. Les recherches actuelles, notamment sur la myopathie de Duchenne, recourent obligatoirement à des modèles animaux. De ces expériences, les chercheurs espèrent tirer des enseignements qui leur permettront de mettre au point des thérapies capables de traiter les patients souvent jeunes.

Afin d'aborder les mécanismes de thérapie dans les maladies génétiques neuromusculaires, il est primordial de valider de véritables modèles génétiques animaux. L'utilisation d'animaux domestiques dont les maladies sont similaires à celles des hommes constitue ainsi une étape vitale et incontournable pour aboutir à des succès thérapeutiques.

Divers modèles animaux ont été validés, mais le chien Golden Retriever atteint de dystrophinopathie est le modèle animal le plus proche de l'enfant dystrophique.

La mutation GRMD est une mutation spontanée qui a été isolée aux Etats-Unis.

Les premiers cas de myopathies héréditaires du Golden Retriever ont tout d'abord été observés par De Lahunta sur deux chiots mâles de la même portée. Ensuite d'autres observations ont fait part de 7 autres cas impliquant 4 portées différentes toujours de race Golden Retriever. Un cas similaire avait été décrit dans la littérature en 1958 par Meier [40].

L'affection canine, décrite pour la première fois par Valentine et coll. en 1986 et Kornegay et coll. en 1988 [31, 48], est appelée «GRMD» (Golden Retriever Muscular Dystrophy), « GXMD» (Golden Retriever X-linked Muscular Dystrophy) et « canine xmd » (canine X-linked Muscular Dystrophy).

La nature de la maladie a été mise en évidence par Valentine et coll. en 1988 [16, 17, 42, 43], puis Cooper et coll. ont montré que cette dystrophie musculaire était bien liée au chromosome X [17, 18, 42].

Dans tous les cas, les chiens présentaient des signes cliniques dès l'âge de 8 à 10 semaines, notamment des anomalies de la démarche avec en particulier : des sautilllements sur les postérieurs, une abduction des extrémités avec une adduction des coudes et des genoux, une amyotrophie progressive surtout des muscles temporaux et du tronc et une augmentation très importante des créatine-kinases plasmatiques. L'atteinte musculaire primitive a été confirmée grâce à l'électromyographie avec la présence de décharges complexes répétitives\* et l'histologie musculaire montrant des phénomènes de nécrose et de régénération ainsi que des infiltrations par du tissu fibreux, concernant tous les muscles y compris la langue [40, 43].

Une colonie de chiens atteints a été créée dès 1986 à partir d'un chien mâle Golden Retriever adulte, comprenant des individus de petit format (croisés Beagle) et de grand format (croisés Retriever) [19, 36, 48].

Des colonies de chiens GRMD sont maintenant établies aux Etats-Unis, en Australie, en Italie et en France. [37]

Depuis, des dystrophinopathies semblables à celle du GRMD ont été mises en évidence chez de nombreuses races canines, dont le Labrador Retriever, le Rottweiler, le Pointer, le Grœnendæle, le Samoyède...

La dystrophie musculaire touche également le chat et la souris. [36, 46]

La dystrophie musculaire de Duchenne est une myopathie fréquente, invariablement fatale. Elle ne pourra jamais être éradiquée totalement par le conseil génétique, consistant à dépister dans les familles à risque les enfants porteurs de l'anomalie génétique, car dans un tiers des cas environ la maladie est sporadique, spontanée, la mutation survenant au cours de la vie embryonnaire. C'est pourquoi de nombreux travaux s'orientent vers les perspectives thérapeutiques. [36]

Les premiers traitements étaient non spécifiques : la corticothérapie à long terme apporte un léger regain de fonction, des interventions chirurgicales (téno- et myotomies) retardent l'apparition des contractures et déformations squelettiques, des prothèses orthopédiques retardent l'âge de l'impotence fonctionnelle totale. [36]

Mais depuis 1984 et la découverte du premier modèle animal de dystrophinopathie (le modèle murin mdx), une révolution des connaissances a eu lieu en matière de dystrophinopathies. C'est grâce aux trois modèles animaux actuellement connus (la souris mdx, le chien GRMD, le chat HFMD) que la pathogénie de la DMD (encore incomplètement comprise) a commencé d'être élucidée. Et à chaque voie pathogénique découverte correspond un espoir thérapeutique. [36]

Ces modèles animaux sont identifiés sur la base du postulat suivant [27] :

- la dystrophine est une protéine hautement conservée au cours de l'évolution des Vertébrés,
- l'absence de dystrophine apparaît totalement spécifique des dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker humaines,
- le gène de la dystrophine est probablement situé sur le chromosome X chez tous les Mammifères placentaires.

Ainsi, tout animal qui présente une absence de dystrophine musculaire et hérite de cette anomalie sur un mode lié au chromosome X est un modèle animal potentiel de la dystrophie musculaire de Duchenne. [36]

Contrairement à la souris mdx qui développe une dystrophie musculaire modérée non létale, tout en présentant une analogie moléculaire avec la myopathie de Duchenne (localisation identique de la mutation, absence de dystrophine), la myopathie GRMD semble être un modèle plus pertinent, aussi bien génétique (même gène muté), biochimique (absence de dystrophine) que clinique (atrophie progressive des fibres musculaires) de la myopathie de Duchenne. [43]

## II. EPIDEMIOLOGIE

La transmission de la dystrophie musculaire de Duchenne est de type récessif lié au sexe.

Dans deux tiers des cas environ (cas familiaux), la mère d'un garçon dystrophique est porteuse sur un de ses chromosomes X d'une mutation (le plus souvent une délétion) du gène DMD, gène codant pour la dystrophine. L'autre chromosome X, normal, est responsable du phénotype normal chez la mère. [36]

Dans l'autre tiers des cas (cas sporadiques), la mutation du gène DMD survient dans un gamète ou chez l'embryon [26].

L'incidence de la DMD est d'un cas pour 3500 naissances viables de garçons (soit environ 110 naissances par an en France), et la prévalence dans la population totale de trois pour cent mille individus. L'incidence de la BMD est plus faible : trois à six cas pour cent mille naissances de garçons, avec une prévalence d'un pour cent mille individus. De rares filles sont atteintes de dystrophie musculaire de Duchenne (figure 9) [25, 26, 36].

L'une des raisons pour lesquelles la DMD est la dystrophie musculaire humaine la plus fréquente est que le gène de la dystrophine, étant de très grande taille, est plus fréquemment la cible de mutations qu'un gène de petite taille. [46]

Chez le chien, aucune donnée statistique n'a encore été publiée sur l'incidence de cette maladie, mais vu le nombre de descriptions cliniques de chiens dystrophiques, c'est la plus fréquente des myopathies héréditaires. Plusieurs difficultés résident dans l'évaluation de la fréquence de cette affection dans la race Golden Retriever en France : tout d'abord les chiens étudiés en France ont été importés des Etats-Unis ; ensuite le taux de mortalité néonatale sans diagnostic provoque un biais dans la comptabilisation de chiens atteints.

### III. ETUDE CLINIQUE

#### III. A. PHENOTYPE CLINIQUE CHEZ L'HOMME

La définition du phénotype ne fait pas appel à la connaissance du génotype, auquel il n'est qu'incomplètement corrélé. Le phénotype est divisé en trois catégories selon deux critères non génétiques:

- l'âge de la perte d'indépendance locomotrice : avant douze ans pour la DMD, entre 12 et 16 ans pour les phénotypes intermédiaires, après 16 ans pour la BMD ;
- et la quantité de dystrophine détectable dans le muscle par Western-Blot : moins de 3 % de la quantité normale lors de DMD, 3 à 20 % dans les phénotypes intermédiaires, et plus de 20 % de la quantité normale de dystrophine lors de BMD. Ce deuxième critère permet de définir le phénotype d'un individu dystrophinopathe âgé de moins de seize ans [36].

Le phénotype Duchenne ne présente pas de variation individuelle majeure, probablement parce que, chez tous les patients, aucune dystrophine fonctionnelle n'est présente dans le muscle. Par contre le phénotype Becker est très variable car une dystrophine de taille, de stabilité et de capacité fonctionnelle différentes est présente en fonction des individus [36].

La suspicion clinique de DMD est encore à l'heure actuelle réalisée tardivement dans les cas sporadiques : en moyenne à l'âge de quatre ans, quand les enfants sont scolarisés et que les personnels enseignants notent soit un retard soit des anomalies du développement moteur (capacité à s'asseoir, se lever, marcher ou monter des escaliers) [36].

#### III. A. 1) L'atteinte musculaire

L'évolution de la maladie chez l'homme suit deux périodes : la première durant les dix premières années où la marche est conservée, la deuxième où la station debout devient impossible et se termine par la mort de l'individu [39,40].

La phase pré-clinique est assez difficile à préciser dans le temps. En effet, dès la période fœtale, le taux de créatine-kinase sérique est parfois déjà élevé et des lésions histologiques caractéristiques de la maladie peuvent être visibles dans les premières semaines de la vie, voire sur le fœtus. De plus, contrairement aux autres myopathies congénitales, il n'y aurait pas d'hypotonie néonatale. Ainsi, la date exacte de début de la maladie est quasiment impossible à définir. Seul est décelable chez l'enfant, un retard à la marche (entre 15 et 18 mois), laquelle se fait sur la pointe des pieds. [40]

Les premiers signes sont manifestes avant deux ans : anomalies de posture, de démarche et du relevé [25, 26, 36].

**Entre 3 et 6 ans commence la "phase de début"**. Les troubles de la démarche deviennent évidents vers l'âge de 3 ans, l'enfant présente des difficultés à courir et à sauter, les chutes sont anormalement fréquentes. Par contre, la descente d'escalier, l'apprentissage du vélo et les activités faisant intervenir les membres supérieurs sont normaux. Progressivement, une lordose lombaire va s'installer avec une accentuation de la marche sur les orteils due à la rétraction des tendons d'Achille. De plus, des troubles statiques provoquent une démarche dandinante. Enfin, on observe une **hypertrophie musculaire** essentiellement sur les mollets où les muscles sont fermes à la palpation. Ces muscles subissent ensuite une **infiltration par du tissu fibro-adipeux**, nommée « pseudo-hypertrophie ». [36, 40]

Au contraire, une **amyotrophie et une faiblesse** précoces sont perceptibles dans les muscles biceps, triceps, extenseurs de la hanche et vaste médial, pectoral, brachioradial et droit du fémur [25, 36]. La faiblesse musculaire épargne les muscles oculomoteurs, faciaux et pharyngés.

**Le signe de Gowers**, très évocateur, est manifeste à cinq ans : il s'agit de l'utilisation systématique des membres supérieurs en appui sur les genoux lors du relevé à partir de la position accroupie [36].

En fait, jusqu'à l'âge de 6 ans, le déficit musculaire se développe surtout en partie proximale. Les membres inférieurs et le tronc sont les plus atteints [40].

**La phase secondaire (de 6 à 10 ans)** s'accompagne de chutes beaucoup plus fréquentes et d'autant plus gênantes que l'enfant n'arrive pas à se relever seul. On note l'apparition d'un déficit sur les muscles fléchisseurs du cou et sur les membres supérieurs, seuls les muscles innervés par les nerfs crâniens semblent épargnés. [40]

Des **contractures** (contractions permanentes d'un muscle) sont observées dès huit ans ; souvent symétriques, elles commencent dans les muscles du mollet et le tenseur du fascia lata. Quand l'enfant devient incapable de marcher, elles s'étendent aux hanches, genoux, épaules et poignets [36].

Enfin, les réflexes sont extrêmement diminués voire absents [40].

**La période transitoire** correspond à la phase de **perte de la démarche** [40].

En moyenne à l'âge de neuf ans et demi, et **toujours avant douze ans**, les enfants atteints de myopathie de Duchenne perdent toute capacité de locomotion et sont contraints à vivre en fauteuil roulant [25, 26, 36, 41].

Après l'âge de 10 ans, cette perte de la locomotion est souvent précipitée par une maladie infectieuse ou un épisode chirurgical demandant un alitement. On remarque alors une déformation par rétraction des muscles sur les membres inférieurs, un varus des pieds et une flexion des coudes. Ces déformations provoquent des ankyloses articulaires très importantes. L'enfant développe également une déformation rachidienne avec une cyphose lombaire modérée progressant vers une **cyphoscoliose thoracolombaire**. Les radiographies montrent une altération osseuse caractérisée par une atrophie réduisant le diamètre et donnant une forme d'haltère aux os. [36, 40]

**La phase finale** commence généralement vers la fin de la vingtième année ; les muscles sont totalement inactifs comme «paralysés» (sauf les muscles oculo-moteurs qui sont toujours intacts), les muscles fléchisseurs des doigts des mains et des pieds gardent encore une certaine force. La déglutition devient difficile du fait de la macroglossie. Enfin, les complications de décubitus et une défaillance cardio-respiratoire sont souvent responsables de la mort de l'individu. [40]

La donnée de laboratoire la plus intéressante est le dosage de la **créatine-kinase sérique** (cf. annexe 2). Le taux enzymatique de créatine-kinase sérique est considérablement **augmenté dès la naissance**, car les lésions de myopathie de Duchenne existent déjà chez le fœtus ; un **pic** est atteint **entre un et trois ans**, avant l'apparition des signes cliniques. Il diminue ensuite progressivement, mais se maintient à des valeurs au moins 20 fois supérieures aux valeurs de référence pendant plusieurs années. Vers dix ans, la diminution du taux de créatine-kinase est brutale, liée à la cessation de l'activité locomotrice. [26, 36, 41]

### III. A. 2) L'atteinte cardiaque

Elle est souvent précoce (5 ans) et évolutive. Il n'y a pas d'insuffisance clinique avant au moins l'âge de 10 ans. [40]

L'atteinte simultanée des muscles squelettiques et cardiaque est fréquente (de 65 % à 95 % des cas après 21 ans selon les auteurs), mais ne se traduit cliniquement en général que par des **anomalies de l'électrocardiogramme**. [36]

Des anomalies électriques sont visibles dans 60 à 90 % des cas sans valeur pronostique : les ondes Q sont étroites et profondes et on retrouve des grandes ondes R en précordiale droite. Une tachycardie sinusale n'est pas rare. [40]

Deux types de symptômes cardiaques peuvent exister en phase d'état. Les premiers sont liés à une dilatation du ventricule gauche : anomalies morphologiques du tracé électrocardiographique, troubles du rythme cardiaque et troubles de la conduction [41], dilatation du ventricule gauche avec réduction de la fraction d'éjection, corrélées avec l'âge (cardiopathie progressive) et présentant une valeur pronostique [36]. Les seconds, plus rares, sont liés à une **cardiomyopathie dilatée** responsable avant vingt ans d'une insuffisance cardiaque congestive fatale [36].

L'échocardiographie, examen de choix, est souvent gênée par la déformation du thorax, mais on peut voir une hypertrophie compensatrice droite de l'insuffisance respiratoire. [40]

### III. A. 3) L'atteinte respiratoire

Une insuffisance respiratoire débute après la perte de la capacité locomotrice et apparaît favorisée par la position assise permanente en chaise roulante et les déformations de la colonne vertébrale.

La mort survient avant l'âge de trente ans (moyenne de 17 ans), le plus souvent suite à un épisode d'**insuffisance respiratoire aiguë** (dans plus de 90 % des cas), par exemple liée à une infection pulmonaire, ou plus rarement des suites d'une **arythmie cardiaque** [25, 26, 36, 40].

### III. A. 4) Le retard mental

Trente pour cent des patients environ présentent un **retard mental**, objectivé par un quotient intellectuel moyen de 80 [25, 26, 36].

Des signes psychiatriques sont présents chez les individus dont la mutation affecte l'expression de Dpl40 (normalement présente dans l'encéphale) [36].

Cependant, aucune corrélation n'a pu être mise en évidence avec la progression de la maladie. [40]

### III. A. 5) Les troubles digestifs

Certains signes relevant d'un trouble musculaire lisse digestif sont également reportés (dysphagie, vomissements, constipation chronique fréquente, délai à la vidange gastrique, plus rarement dilatations gastriques aiguës) [36, 40].

### III. A. 6) Cas des femmes porteuses symptomatiques

Parmi les femmes porteuses de DMD, la moitié présentent des taux anormalement élevés de créatine-kinase sérique (deux à dix fois la valeur usuelle supérieure), mais les deux tiers ne présentent pas de signe clinique et sont asymptomatiques [25, 36].

Chez les femmes porteuses symptomatiques, l'âge d'apparition des signes cliniques varie de la première à la quatrième décennie (moyenne de 34 ans). Les formes les plus précoces sont généralement les plus sévères (perte de l'indépendance locomotrice en fin d'évolution). Les formes les plus bénignes se manifestent par des **douleurs** et des **crampes musculaires** à l'exercice (5 % des femmes porteuses). La **faiblesse musculaire** (20 % des femmes porteuses) est le plus souvent légère et asymétrique, et affecte les groupes musculaires proximaux. Un quart des femmes porteuses présente des anomalies cardiaques (dilatation ventriculaire gauche, et plus rarement cardiomyopathie dilatée) [36].

### III. B. PHENOTYPE CLINIQUE CHEZ LE CHIEN GRMD

Les études cliniques menées essentiellement par Kornegay et coll. ainsi que par Valentine et coll. l'ont été sur une colonie de chiens GRMD issue d'un mâle Golden Retriever malade et croisé avec des femelles Beagles ou croisées Retriever. [31, 40, 50, 51, 52]

Il existe 2 formes cliniques de la maladie : une forme néonatale fulminante et une forme progressive.

Le chien GRMD est cliniquement le modèle animal le plus proche de l'affection humaine. La similitude clinique est maximale chez les chiens mâles ; les femelles homozygotes présentent à partir de trois mois des signes moins prononcés [12, 50] ; les femelles porteuses sont asymptomatiques [19].

Comparée à la maladie chez l'homme, la dystrophie musculaire canine est d'apparition plus brutale ; l'évolution, très rapide la première année, est suivie chez les chiens qui survivent d'une période de relative stabilité clinique pouvant durer plusieurs années, ce qui n'est pas décrit chez l'enfant ; la **variabilité du phénotype** est plus grande que chez l'enfant, en raison de l'existence de la forme néonatale, alors que l'anomalie génétique est la même pour tous les chiens [36, 38, 39].

#### III. B. 1) Forme néonatale fulminante

Certains chiots, préférentiellement des mâles, présentent une **forme sévère** de la maladie, responsable d'une mortalité néonatale importante, surtout lors des deux premières semaines de vie. [29, 36, 37, 40]

Dès la naissance, ces chiots montrent des signes de faiblesse, de déshydratation et d'hypothermie. Une nécrose musculaire généralisée se développe rapidement (elle débute même in utero pour certains muscles), particulièrement marquée pour les muscles respiratoires [27, 36, 50]. Le décès survient par insuffisance respiratoire ou du fait de l'atteinte précoce de la langue (macroglossie) entraînant des troubles de la déglutition. [36, 40]



Les taux de créatine-kinase observés sont particulièrement élevés, ce qui permet un diagnostic précoce de la maladie.

A l'autopsie, les chiots montrent des lésions de nécrose musculaire massive, en particulier pour les muscles trapèze, brachiocéphalique, deltoïde, extenseur radial du carpe, sartorius et surtout la langue et les muscles respiratoires (diaphragme et muscles intercostaux) [37].

### III. B. 2) Forme classique : mâles et femelles homozygotes

La forme clinique « classique » de la dystrophie musculaire canine liée à l'X se caractérise par l'apparition chez des chiots Golden Retriever mâles de deux mois environ, d'une atteinte musculaire primitive d'**évolution progressive vers la mort** [12, 31, 36, 48, 50].

#### III. B. 2) a. 0 à 6 semaines

Dès la naissance, chez les chiots malades, le taux sérique de créatine-kinase (CK) est 500 à 1000 fois plus élevé que la normale, alors que cette élévation n'est que 10 à 20 fois supérieure chez les chiots sains (due au traumatisme de la naissance). Ce taux diminue dès le deuxième jour pour n'atteindre que 6 à 100 fois la normale chez les mêmes chiots malades. [40]

De 3 à 6 semaines, le taux de CK augmente rapidement pour atteindre un pic de l'ordre de 100 fois la normale à 6-8 semaines. Il n'y a pas de différence significative entre les mâles et les femelles malades. Pour les femelles porteuses, ce taux peut être modérément augmenté. Dans cette tranche d'âge, excepté des retards de croissance et l'élévation de la CK sérique, on n'observe aucun signe clinique de maladie neuromusculaire. [40]

#### III. B. 2) b. 6 à 9 semaines

Les premiers signes cliniques apparaissent vers l'âge de **8 semaines** : on constate une activité restreinte liée à une **fatigabilité** excessive, et une **démarche anormale** (les membres sont raides, les foulées courtes, les pieds traînent par terre) ; les deux membres postérieurs se déplacent simultanément, donnant à la course un aspect de sauts de lapin ou « bunny hopping » [31, 36, 40, 48, 50, 51].

Un écartement exagéré des doigts peut apparaître précocement. [40]

Deux des signes constants et précoces sont l'impossibilité d'écarter complètement la **mâchoire** et un **aboïement** faible [12].

Le poids corporel est souvent inférieur à celui des chiots sains de la même portée.

Le taux de CK varie entre 50 et 100 fois la normale. [40]

Ces signes précoces sont plus sévères chez les chiens de grande taille (type Retriever) que chez ceux de petit format (croisés Beagle). A ce stade, les symptômes sont d'intensité comparable chez les femelles homozygotes et les mâles dystrophiques [36, 50].

#### III. B. 2) c. 9 à 12 semaines

Les troubles locomoteurs deviennent plus marqués avec des anomalies de posture :

- les deux membres postérieurs simultanément sont ramenés sous le corps à l'arrêt ;
- une abduction des coudes et adduction des jarrets, hyperextension des carpes et hyperflexion des tarses, abduction des griffes ;

- une démarche de plus en plus raide. [36, 40, 48, 50].

L'amyotrophie généralisée devient visible en particulier pour les muscles du tronc et des temporaux, l'ouverture buccale devient très réduite. [40]

Par contre, les muscles proximaux des membres (notamment des cuisses) semblent épargnés ; certains muscles comme le semi-membraneux et le semi-tendineux subissent une hypertrophie [36, 40, 46].

Les chiots mâles de grande taille semblent plus sévèrement atteints ; quant aux femelles myopathes, elles présentent des formes moins sévères de la maladie. [31, 36, 40, 50].

### III. B. 2) d. 12 semaines à 14 mois

Les signes cliniques déjà décrits s'aggravent progressivement jusque l'âge de 6 mois, puis se stabilisent, voire régressent légèrement [36, 40, 50].

#### Appareil musculo-squelettique

L'amyotrophie des muscles du tronc, des temporaux et des muscles des membres s'aggrave.

Des contractures dues à la fibrose des muscles proximaux (qui deviennent très fermes à la palpation) empêchent l'extension complète des épaules et des coudes [36, 40, 48, 50].

La colonne vertébrale se déforme (**cyphose lombaire**, lordose), à cause de la faiblesse musculaire générale. [36]

Les radiographies peuvent montrer des déviations dorsales du processus xiphoïde, des déformations des cartilages costaux.

Les rétractions articulaires sont de plus en plus prononcées, avec palmigradie et plantigradie s'accompagnant d'un défaut d'usure des griffes, ventro-flexion de la tête ; ces déformations d'angulation articulaire peuvent être expliquées par des rétractions musculo-tendineuses consécutives au processus de fibrose musculaire.

Une modification de la silhouette apparaît, avec les postérieurs ramenés sous l'abdomen et les antérieurs sous le thorax. [40]

Vers un an, les **anomalies de posture** s'accroissent et peuvent aboutir à une station debout plantigrade. [36]

Cf. figure 11.

Les capacités locomotrices sont nettement réduites, avec l'apparition d'une faiblesse musculaire et d'une fatigabilité accrue, en particulier des difficultés à monter les escaliers. Les chiens se couchent beaucoup plus fréquemment et sont souvent intolérants à l'effort ; néanmoins ils restent capables de marcher et de courir sur de courtes distances [40] ; la perte complète de la fonction locomotrice, constante dans la dystrophie de Duchenne de l'enfant, ne fait pas partie du tableau clinique classique chez les chiens GRMD [36, 50].

#### Appareil digestif

Les chiots présentent des difficultés à la préhension et à la mastication des aliments, ainsi qu'une macroglossie et des troubles de la déglutition pharyngée et œsophagienne (ptyalisme important, dysphagie, régurgitation qui nécessitent souvent la mise en place d'une sonde de gastrostomie à ce stade), en partie liées à une **hypertrophie de la base de la langue**, observable cliniquement, et de la musculature œsophagienne [31, 36, 40, 48, 50]. Cf. figure 11.

On peut observer un méga-œsophage ou des hernies hiatales. De plus, l'apparition de broncho-pneumonie par fausse déglutition est fréquente. [40]

### Appareil respiratoire

Dès l'âge de trois mois, un exercice même modéré provoque une augmentation de la fréquence respiratoire avec le développement d'une respiration abdominale et d'une dyspnée, témoignant d'une **insuffisance respiratoire** [36, 40, 50]. Les radiographies montrent un diaphragme hypertrophié, plat, très caudal, aux contours irréguliers. [40]

La sévérité de l'atteinte est variable, les chiens de petite taille ainsi que les femelles semblent développer des formes moins sévères de la maladie que les chiens de grande taille. [40]

La stature finale des chiots est quasiment normale [50], mais un **retard de croissance** est lié d'une part à la demande accrue en métabolites nécessaires à la synthèse protéique dans les myofibrilles en régénération, et d'autre part à la dysphagie. Une malabsorption consécutive à l'absence de dystrophine dans le muscle lisse intestinal pourrait également intervenir [36].

Figure 11 : Image caractéristique d'un chien GRMD (Valium, 8 mois)



*Cliché S. Blot, Laboratoire de Neurobiologie*

Noter :

- la palmigradie et la plantigradie marquées,
- la modification de la silhouette,
- le ptyalisme et la présence d'une sonde de gastrostomie, dont la pose est nécessaire lorsque la dysphagie est trop importante.

### III. B. 2) e. 3 à 6 ans

Les symptômes précédents restent stables ou s'aggravent progressivement.

Chez les chiens dystrophiques survivants, une euthanasie est souvent pratiquée en premier lieu pour insuffisance cardiaque terminale (hypocontractilité cardiaque, ascite, faiblesse, dyspnée) [50] ou en second lieu, pour détresse respiratoire fatale due à une pneumonie par fausse déglutition, favorisée par l'hypertrophie majeure œsophagienne et linguale [31]. La dégradation progressive de l'état général due aux difficultés de préhension et de mastication des aliments intervient également [9, 36].

L'examen neurologique reste longtemps normal, notamment avec conservation des réflexes médullaires et de la proprioception ; l'ampleur des réflexes musculo-tendineux ne diminue qu'en phase terminale quand la faiblesse et la fibrose musculaires sont extrêmes [12, 36, 40, 50].

Le taux de CK diminue jusqu'à atteindre 5 à 15 fois la normale seulement. [40]

### **III. B. 3) Femelles hétérozygotes (porteuses)**

Les signes cliniques chez les femelles hétérozygotes sont absents. Une cardiomyopathie asymptomatique est parfois présente [35, 36].

Les valeurs de créatine-kinase sérique sont soit normales (après six semaines), soit peu élevées (deux à trois fois la valeur de référence, avant six semaines) [4, 36].

### III. B. 4) Bilan : formes cliniques de la maladie chez le chien

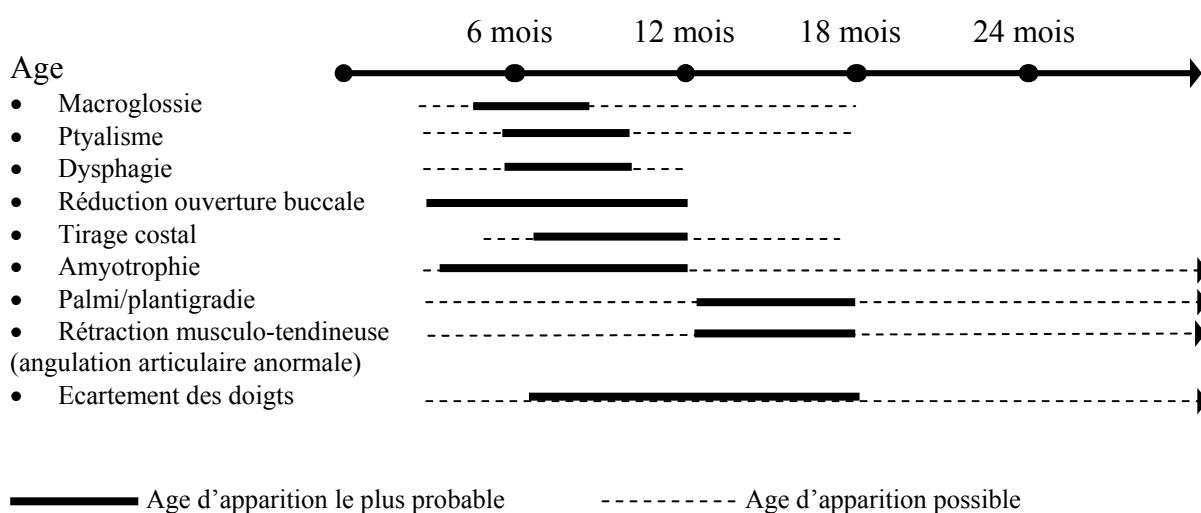
La majorité des troubles apparaissent entre 6 et 12 mois, hormis les signes musculaires qui surviennent très précocément.

Pour les cas de forme sévère de la maladie, cette majorité se rapproche plus des 3 à 6 mois, et pour la forme progressive de 9 à 12 mois

Les troubles digestifs, cardiaques et respiratoires semblent apparaître de façon indépendante par rapport à la sévérité des symptômes locomoteurs, ce qui montre toute la difficulté du suivi des chiens GRMD.

Cf. figure 12.

Figure 12 : Age d'apparition des différents symptômes chez le chien GRMD (d'après [40])



#### III. B. 4) a. Forme progressive ou subaiguë

Les premiers signes d'atteinte musculaire apparaissent vers l'âge de 6 à 8 semaines et évoluent graduellement jusqu'à l'âge d'un an et demi. Chez les chiens ayant passé ce cap, les signes musculaires se stabilisent.

L'évolution des troubles locomoteurs est très longue (plusieurs années) ou au contraire très rapide (quelques mois).

Suite aux observations, une cartographie des muscles les plus atteints par la dégénérescence musculaire et donc la fibrose peut être dressée.

Il en ressort que les muscles les plus touchés sont :

- les muscles temporaux, les muscles du tronc et de la sangle abdominale, donnant une silhouette caractéristique aux chiens (thorax maigre et gros abdomen) [40],
- les muscles proximaux des membres et les muscles anti-gravitaires (biceps, triceps, splenius...) expliquant la perte de la locomotion chez l'homme [40].

Le chien compense cette atteinte par sa quadrupédie qui lui permet de garder un polygone de sustentation correct et compatible avec une déambulation certes réduite mais toujours possible.

Pour les atteintes gravissimes, cette cartographie s'étend à tous les muscles, toutes les proéminences osseuses sont extrêmement visibles (pointe des hanches, pointe occipitale, ailes de l'atlas, épine scapulaire). [40]

Malgré tout, les chiens semblent très bien tolérer leur handicap locomoteur. [40]

Les signes articulaires sont beaucoup plus progressifs avec une atteinte en premier lieu des membres postérieurs (plantigradie), puis des membres antérieurs (adduction des coudes et palmigradie). Dans cette forme clinique, l'articulation de l'épaule ne semble pas affectée, à l'inverse des chiens présentant une forme précoce aigue. [40]

Il est donc possible de déterminer pour l'atteinte locomotrice différents stades cliniques [40] :

Stade 1 : amyotrophie des muscles temporaux, du tronc et des membres, avec bunny hopping.

Stade 2 : palmigradie et plantigradie.

Stade 3 : ambulation réduite.

Stade 4 : rétractions musculo-tendineuses.

Au stade 4, les chiens présentent une silhouette typique avec des aplombs complètement modifiés : ligne des membres antérieurs en arrière et ligne des postérieurs en avant de la verticale, ligne du dos convexe (signant une lordose), côtes saillantes et port de tête en ventroflexion [40].

(cf. figures 13 et 14).

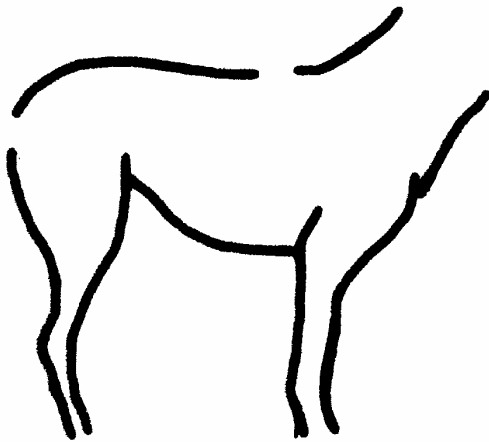


Figure 13 : Silhouette d'un chien sain (d'après [40])

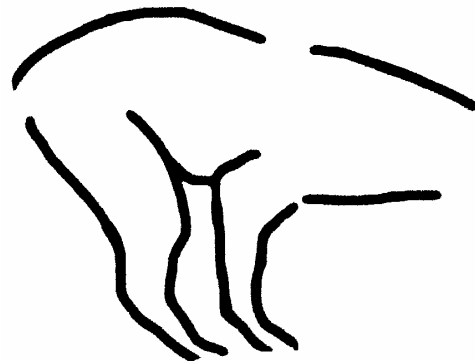


Figure 14 : Silhouette d'un chien GRMD

Comme l'encolure intervient dans l'équilibre général du chien, l'atteinte de ces muscles engendre non pas un déficit de l'équilibre mais plutôt l'impossibilité d'effectuer des virages serrés, des difficultés à descendre un escalier...

L'atteinte de l'appareil respiratoire est notable, elle a pour répercussions une intolérance à l'effort (qui peut aussi être liée à une composante cardiaque) et des bronchopneumonies.

Dans cette forme progressive, on peut parfois noter chez certains chiens une évolution beaucoup plus rapide et des symptômes beaucoup plus sévères. Les premiers signes apparaissent aussi vers 6 semaines, mais la dégradation de l'état général ne s'étale que sur 15

jours à un mois, pour se solder soit par un décès rapide, soit par une stabilisation des symptômes mais avec un handicap sévère pour le chien. [40]

### III. B. 4) b. Forme fulminante

Cette forme suraiguë existe chez des chiots décédant dans la première semaine post-natale, avec une atteinte musculaire foudroyante, des difficultés de déplacement et parfois des difficultés respiratoires. [36,40]

## III. C. COMPARAISON CLINIQUE HOMME-CHIEN [40]

L'évolution clinique de la maladie chez le chien se rapproche beaucoup de celle de l'homme avec cependant quelques particularités séparant les deux espèces :

- les premiers symptômes locomoteurs apparaissent entre 2 et 4 ans chez l'homme, âge où la marche devient normalement bien coordonnée, correspondant aux 6-8 semaines du chien. Par contre, on peut noter précocément une hypertrophie des muscles gastrocnémien, vaste latéral, deltoïde, extenseur de l'avant-bras et temporal, ce qui n'est pas le cas chez le chien, même si les muscles proximaux peuvent paraître fermes et développés en comparaison avec les autres muscles amyotrophiés. Globalement, on ne retrouve pas chez le chien la pseudo-hypertrophie musculaire secondaire au remplacement de la masse musculaire par du tissu fibreux qui est classique chez l'homme. Par contre, l'amyotrophie progressive impliquant la plupart des groupes musculaires apparaît dans les stades évolués de la maladie dans les deux espèces.

- les déformations articulaires sont du même ordre avec en particulier l'apparition d'une cyphose et d'une lordose chez le chien, secondaires à la faiblesse musculaire (chez l'homme, le plus souvent il s'agit d'une cyphose associée à une scoliose). On observe également chez le chien une courbure médiale du dernier arc costal secondaire à la fibrose du diaphragme.

- les taux de CK sont très élevés dans les deux espèces, bien que chez le chien, le taux de CK déjà très important à la naissance laisse supposer l'initiation des lésions musculaires *in utero*. Mais il a été rapporté également chez l'homme des lésions fœtales et le taux de CK peut être également très élevé à la naissance avec un pic à l'âge de 1 ou 2 ans, et précédant les signes cliniques. Le taux de CK reste élevé chez le chien même pendant les stades avancés de la maladie, indiquant qu'il y a toujours des phénomènes de nécrose. De même que chez l'homme, le taux de CK augmente avec l'exercice et diminue progressivement avec l'évolution de la maladie. Il n'a pas été possible de mettre en relation le taux de CK et la gravité de la maladie.

- l'atteinte cardiaque dans les deux espèces apparaît tardivement cliniquement, bien que des lésions du myocarde puissent être observées précocément.

- de même que chez l'homme, il pourrait y avoir, chez le chien, une relation entre la sévérité de l'atteinte et la taille des fibres musculaires ainsi que le rythme de croissance (les chiens de petite taille sont moins gravement atteints et les femelles également).

Par contre :

- la mortalité néonatale, attribuée chez le chien à une nécrose importante du diaphragme, n'est pas observée chez l'homme.

- il n'y a pas de perte de la fonction ambulatoire chez le chien du fait de sa quadrupédie. Chez l'homme, les enfants sont généralement en chaise roulante vers l'âge de 8-10 ans (essentiellement par la perte de la faculté à balancer le haut du corps et non par une perte de la force du quadriceps), ce qui aggrave les déformations articulaires et secondairement les difficultés respiratoires. Le chien de ce fait semble vivre plus longtemps car il n'a pas ce problème.

- l'atteinte œsophagienne (méga-œsophage), très fréquente chez le chien, n'est généralement pas décrite chez le patient DMD. Ceci est facilement explicable par l'importance des fibres musculaires striées dans l'œsophage du chien, contrairement à l'homme.

- le retard de croissance n'est pas décrit chez l'enfant DMD. Chez le chiot, il est particulièrement important dans les premiers stades de la maladie quand les phénomènes de nécrose sont très importants et donc la demande en protéine pour régénérer la fibre musculaire est très élevée. Les difficultés de préhension et de déglutition de la nourriture sont également à mettre en cause ainsi qu'un phénomène de compétition au sein de la portée (les chiots sains ont plus facilement accès à la nourriture).

- l'atteinte cérébrale semble avoir beaucoup moins de conséquence chez le chien que chez l'homme. En fait, il est difficile d'évaluer les pertes d'apprentissage chez le chien GRMD puisqu'aucun travail ne leur est demandé.

- la forme suraiguë de la maladie n'a pas été observée chez l'homme. Chez ce dernier, les différentes formes cliniques plus ou moins sévères dépendent de mutations différentes du même gène et non d'une évolution clinique différente pour une même mutation. La forme progressive du GRMD semble se rapprocher le plus de la DMD humaine.

**En conclusion, il est intéressant de noter que chez le chien, malgré l'identité génotypique des sujets malades pour la mutation au locus GRMD, il existe une grande variabilité phénotypique qui pourrait être un plus dans l'étude de la pathogénie de la maladie.**



## IV. ETUDE PARA-CLINIQUE

### IV. A. PHENOTYPE LESIONNEL CHEZ L'HOMME

#### IV. A. 1) Phénotype Duchenne

##### IV. A. 1) a. Lésions microscopiques du muscle strié squelettique.

###### *Lésions du muscle fœtal et nouveau-né.*

Dans le muscle fœtal dystrophique, les lésions sont limitées à l'existence **d'occasionnelles fibres hyperéosinophiles hypertrophiées** sur fond de muscle normal [27, 36].

###### *Lésions du muscle en phase d'état.*

Les lésions musculaires sont caractérisées par la coexistence :

- de lésions nécrotiques et d'images de régénération des myofibrilles,
- d'une **fibrose endomysiale** (puis pérимыsiale) multifocale précoce (perceptible avant l'âge de cinq ans), caractéristique, associée à l'infiltration du muscle par du **tissu adipeux**,
- de nombreuses **fibres hyalines\***.

[25, 27, 36]

(cf. figure 15).

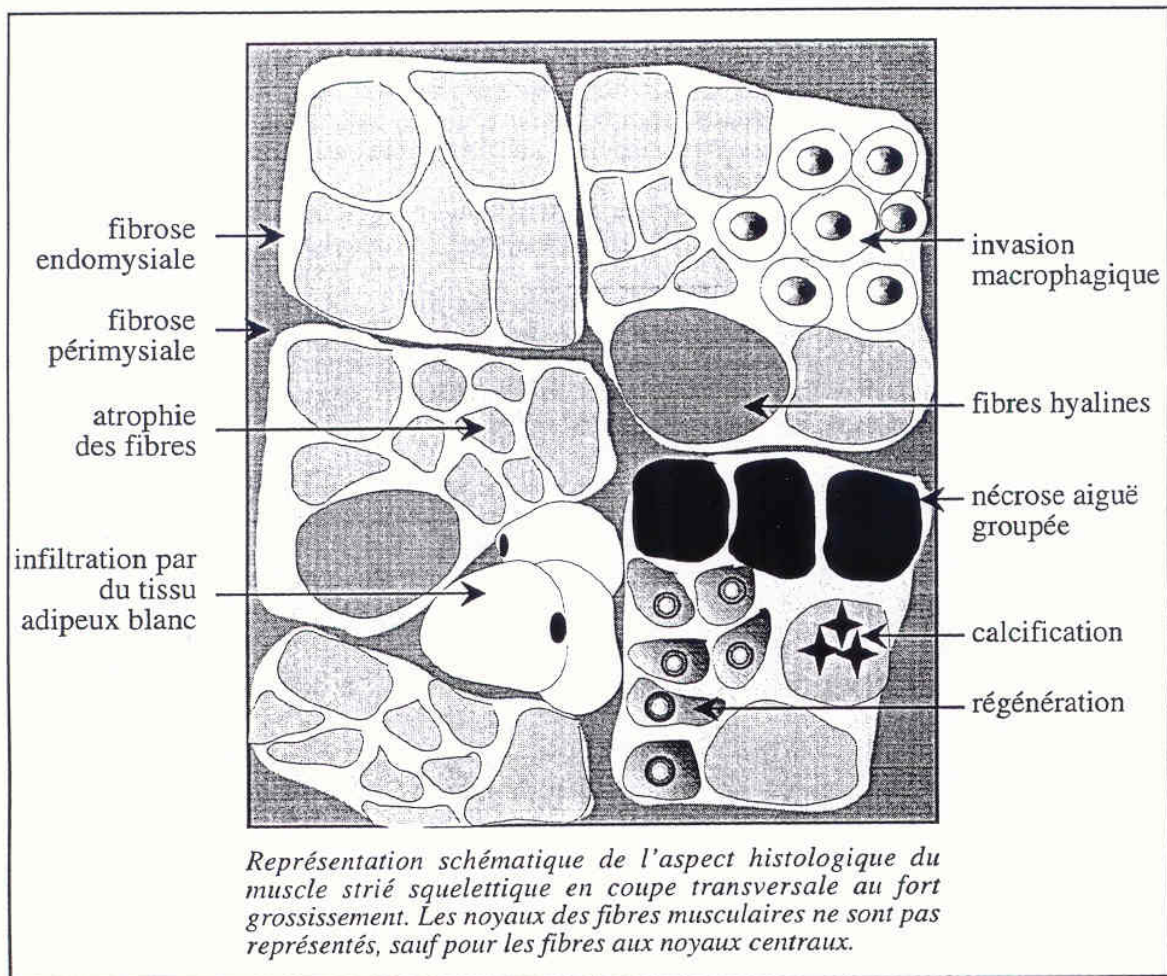
Le nombre de **fibres musculaires aux noyaux centraux** est augmenté : il dépasse nettement le pourcentage non lésionnel de 3 % des fibres. [36]

Les fibres musculaires présentent un **diamètre très hétérogène**, de petites fibres en cours de régénération côtoyant de grandes fibres hypertrophiées, dont des **fibres fragmentées**. [36]

Progressivement, **la régénération musculaire ne compense plus la nécrose** et le nombre de fibres diminue. Vers l'âge de 10 ou 11 ans, la quasi-totalité du muscle a été remplacée par un tissu fibro-adipeux [27, 36].

Les lésions épargnent les muscles oculomoteurs [36].

Figure 15 : Lésions histologiques du muscle DMD en phase d'état (d'après [25, 27, 36, 48, 49])



#### IV. A. 1) b. Etude immunohistochimique du muscle squelettique.

##### *Dystrophine* (figure 16).

Par définition, lors de dystrophie musculaire de Duchenne, quelle que soit la mutation responsable, la **quantité de dystrophine détectable par Western-Blot est inférieure à 3 %** de la quantité normale [27, 36].

Les **fibres révertantes\*** représentent généralement moins de 1 % des fibres [24, 36].

Cependant, le développement d'anticorps monoclonaux de plus en plus spécifiques d'une région particulière de la dystrophine, montre chez certains patients DMD une **immunopositivité d'une proportion modérée de fibres** : par exemple, chez plus de la moitié des patients, moins de 25% des fibres sont positives pour l'anticorps anti-domaine C-terminal de la dystrophine : ces fibres pourraient contenir une dystrophine tronquée, un intermédiaire de synthèse ou un produit de dégradation de la dystrophine [36].

##### *Utrophine.*

Une **expression sarcolemmale anormale d'utrophine** est observée dans les fibres musculaires en cours de régénération et dans certaines fibres matures, mais elle est insuffisante pour avoir un effet significatif sur la fibre musculaire [36].

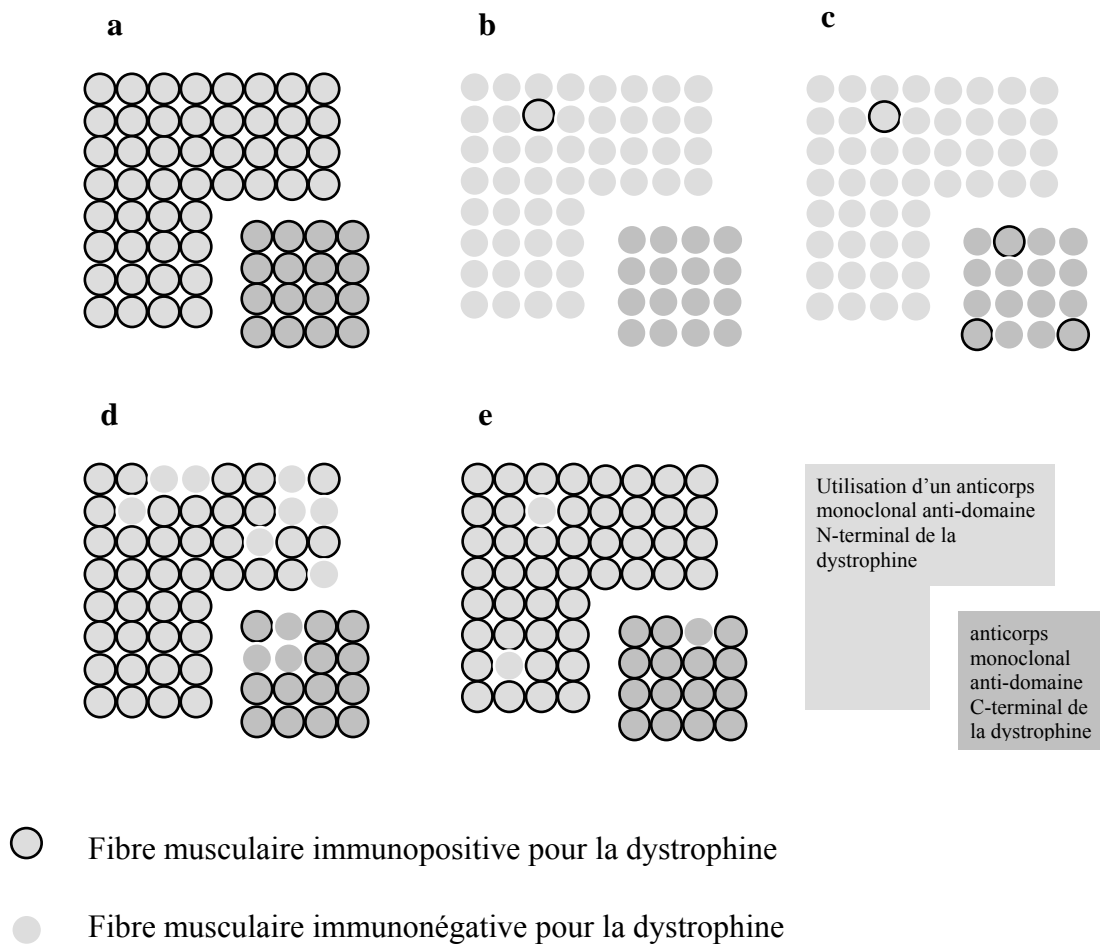
##### *Complexe protéique associé à la dystrophine.*

La myopathie de Duchenne est associée à une **diminution de l'immunomarquage pour toutes les glycoprotéines associées à la dystrophine**, sauf dans les fibres révertantes (restauration de l'ensemble du cytosquelette sous-sarcolemmal liant l'actine à la matrice extra-cellulaire). [2, 36, 41]

##### *Isoformes de myosine.*

Jusqu'à l'âge de sept ans, la proportion relative des différents types de fibres dans le muscle lésionnel est conservée (environ 30 % de fibres IIb). Après, **la proportion de fibres IIb diminue considérablement**, le muscle contenant environ 30 % de fibres intermédiaires IIa/b, et moins de 1% de fibres de type IIb. [36]

**Figure 16** : Représentation schématique de la répartition en immunohistochimie de la dystrophine dans le muscle d'individus normaux (a), souffrant de myopathie de Duchenne (b, c) ou porteurs de la maladie, symptomatiques (d) ou non (e). (D'après [36])



- Chez l'individu normal, toutes les myofibres sont immunopositives pour la dystrophine, le marquage étant régulier et linéaire le long du sarcolemme.
- Certains individus DMD possèdent des myofibres totalement immunonégatives pour la dystrophine, à l'exception de 1% des fibres : les fibres « révertantes ».
- D'autres individus DMD possèdent une proportion modérée de myofibres (moins de 25%) positives pour un anticorps anti-domaine C-terminal de la dystrophine.
- Femme porteuse symptomatique : environ 20 % des fibres sont immunonégatives pour la dystrophine.
- Femme porteuse asymptomatique : moins de 5 % des fibres sont négatives pour la dystrophine.

#### IV. A. 1) c. Lésions cardiaques.

Correspondant aux manifestations cliniques, deux types de lésions cardiaques sont observées en phase d'état : une dilatation sévère du ventricule gauche ou une cardiomyopathie dilatée. Dans le premier cas, les lésions myocardiques sont focales, intéressant la **paroi postéro-basale du ventricule gauche, et éventuellement les muscles papillaires du ventricule gauche**. Elles sont dominées par la **fibrose**, qui remplace les fibres myocardiques, et éventuellement régurgitation mitrale avec fibrose sous-endocardique secondaire dans l'atrium gauche (« jet-lesion ») [36, 41].

Les **artérioles coronaires** intra-murales des oreillettes montrent une hypertrophie musculaire marquée avec réduction de la lumière, éventuellement associée à une prolifération de l'intima [36, 41].

Les tissus cardiaques spécialisés dans la conduction sont également lésionnels. Dans le **nœud sinusal** par exemple, on observe une taille hétérogène des fibres, des fibres vacuolisées, des fibres au noyau pycnotique, des zones focales de fibrose. Dans le **nœud atrio-ventriculaire** et le réseau de Purkinje, les lésions dominantes sont la fibrose, la réduction du nombre de myocytes et leur remplacement par du tissu adipeux, ainsi que la présence de cardiomyocytes au cytoplasme vacuolisé [36, 41].

#### IV. A. 1) d. Autres lésions

Les lésions gastro-intestinales éventuelles sont une atrophie et parfois une vacuolisation de la musculaire-muqueuse et de la musculuse, progressivement remplacées par du tissu fibreux. Le retard mental observé dans un tiers des cas de dystrophie musculaire de Duchenne survient en l'absence de lésions histologiques du système nerveux central [2, 25, 36].

### IV. A. 2) Femmes porteuses

Les femmes porteuses asymptomatiques présentent une légère hétérogénéité de la taille des fibres musculaires squelettiques, un nombre augmenté de fibres aux noyaux centraux et des fibres hyalines occasionnelles. [36]

Les femmes porteuses symptomatiques présentent des lésions plus marquées : hétérogénéité marquée de la taille des fibres, nombreuses fibres aux noyaux centraux, fibres régénératives occasionnelles, groupes disséminés de petites fibres (I et II mélangées, non régénératives et non dégénératives) et augmentation multifocale de la quantité de tissu conjonctif [10, 36].

Les femmes porteuses symptomatiques possèdent 20 à 30 % de fibres totalement ou partiellement immunonégatives pour la dystrophine (figure 16) [10, 36]. Le nombre de fibres immunonégatives n'est pas corrélé avec l'intensité de la faiblesse musculaire.

Les femmes porteuses asymptomatiques ne possèdent que moins de 5 % de fibres totalement ou partiellement immunonégatives pour la dystrophine (la différence est significative avec les femmes porteuses symptomatiques). Les fibres dystrophine-immunopositives ont été formées pendant le développement par une majorité de myoblastes dont le chromosome X muté est silencieux. A l'inverse, les fibres partiellement ou totalement immunonégatives pour la dystrophine ont été formées pendant le développement par une majorité de myoblastes dont le chromosome X muté est exprimé [10, 36].

Les myofibres déficientes en dystrophine se caractérisent également par une diminution de la quantité des protéines associées (sarcoglycanes, syntrophine) en immunohistochimie et par Western Blot. [36]

## IV. B. ANOMALIES PARA-CLINIQUES PRESENTES CHEZ LE CHIEN GRMD

### IV. B. 1) Etude radiographique [40]

#### - *Thorax*

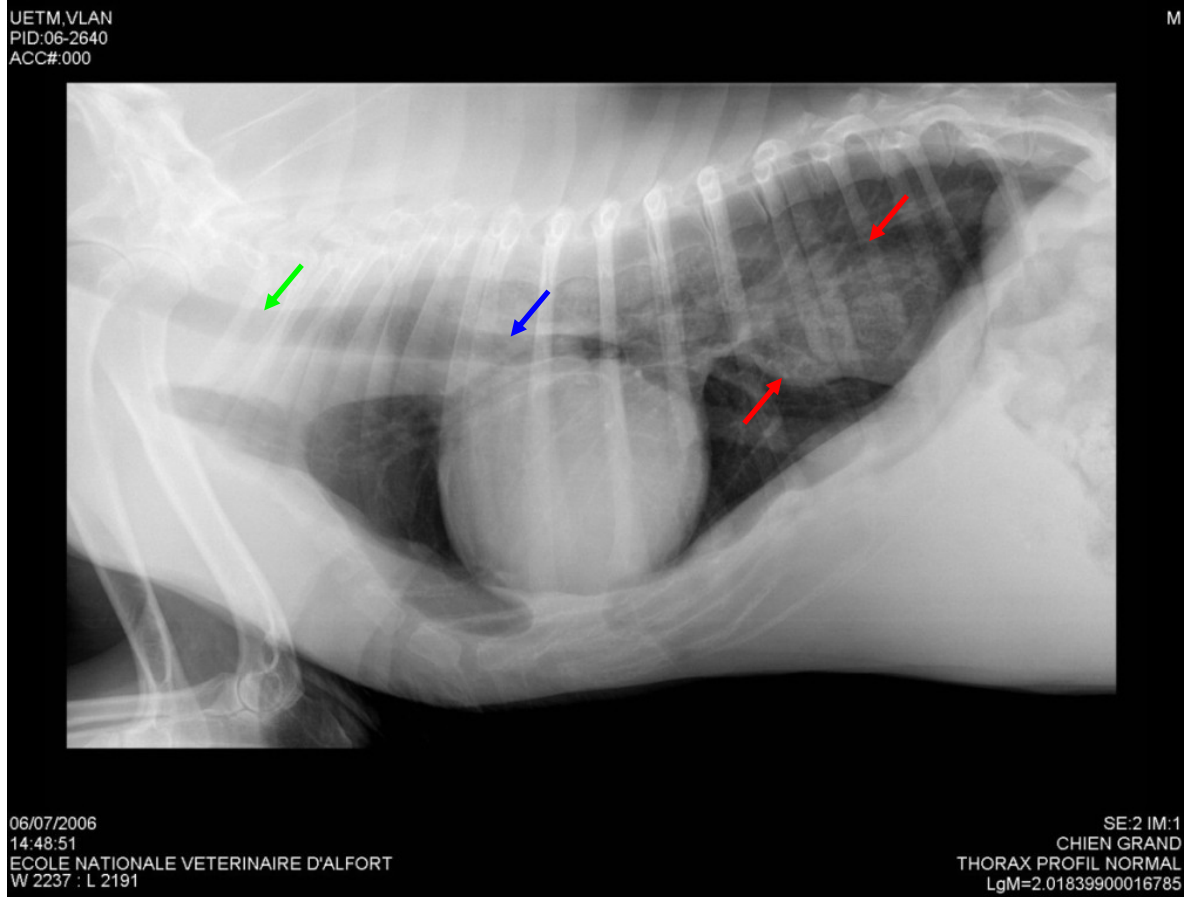
Les particularités observées chez les chiens myopathes comprennent

- un méga-œsophage fréquent (25 % des cas), pouvant être visible dès l'âge de 3 mois (cf. figures 17 et 17 bis) ;
- un aplatissement du diaphragme chez les chiens de plus de 5 mois, de plus en plus prononcé avec l'âge ;
- des bronchopneumonies fréquentes à tous les âges, associées ou non à de fausses déglutitions (cf. figure 18) ;
- une dilatation des atrium pouvant apparaître précocément (entre 0 et 6 mois), suivie d'une cardiomégalie globale ;
- un amincissement de la veine cave caudale dans certains cas.

#### - *Abdomen*

La hernie hiatale peut être mise en évidence dès l'âge de 5 mois.  
Cf. figures 19 et 19 bis.

Figure 17 : Image de méga-œsophage (cliché de profil réalisé sur Vlan, chien GRMD adulte)



(Cliché Radiologie ENVA)

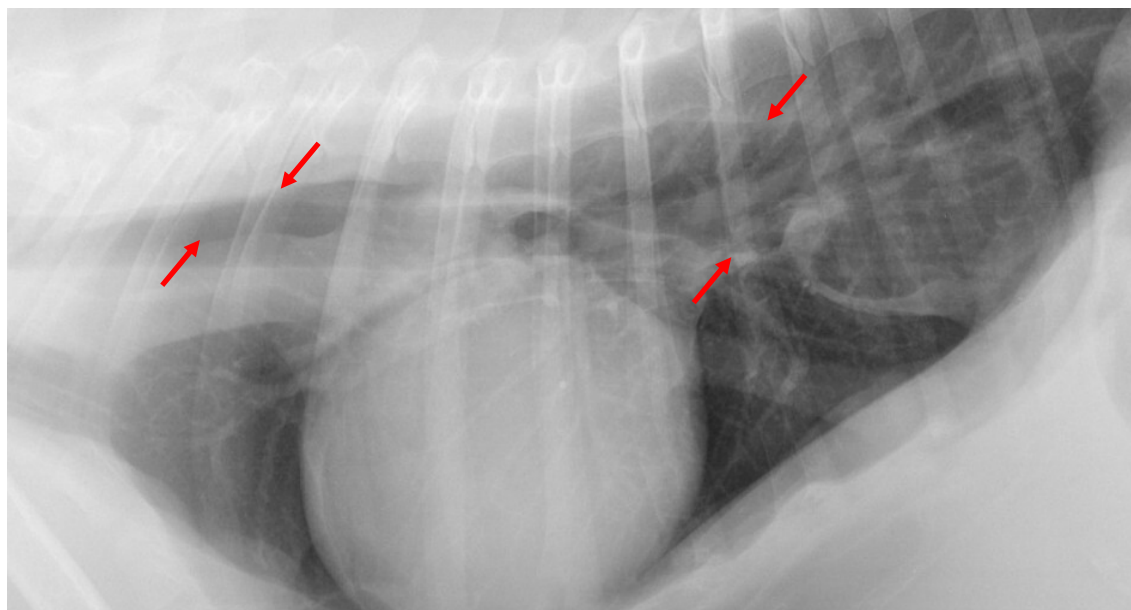
Le sternum apparaît déformé et le cœur est décollé du plancher sternal.

La trachée est déformée dans sa partie intrathoracique (flèche verte), ce qui correspond à une flaccidité trachéale.

On constate un important méga-œsophage avec contenu alimentaire (flèches rouges) qui comprime dorsalement la trachée en regard du cœur (flèche bleue).

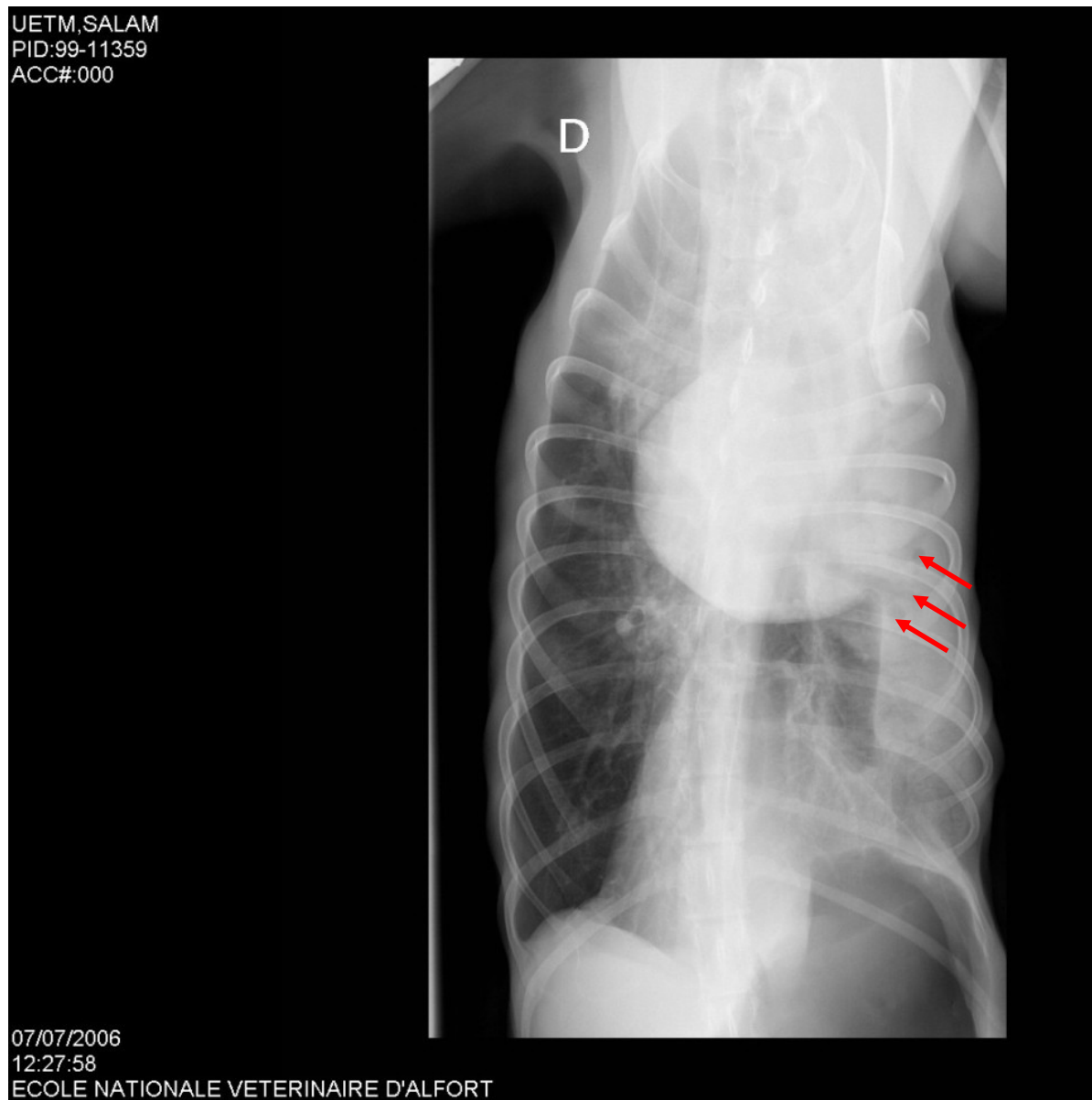
Figure 17 bis : aspect du méga-œsophage (même chien, sans contenu alimentaire).

Il apparaît sous forme de 2 lignes radiodenses normalement invisibles.



(Cliché Radiologie ENVA)

Figure 18 : Image de bronchopneumonie (cliché de face réalisé sur Salam, chien GRMD adulte)

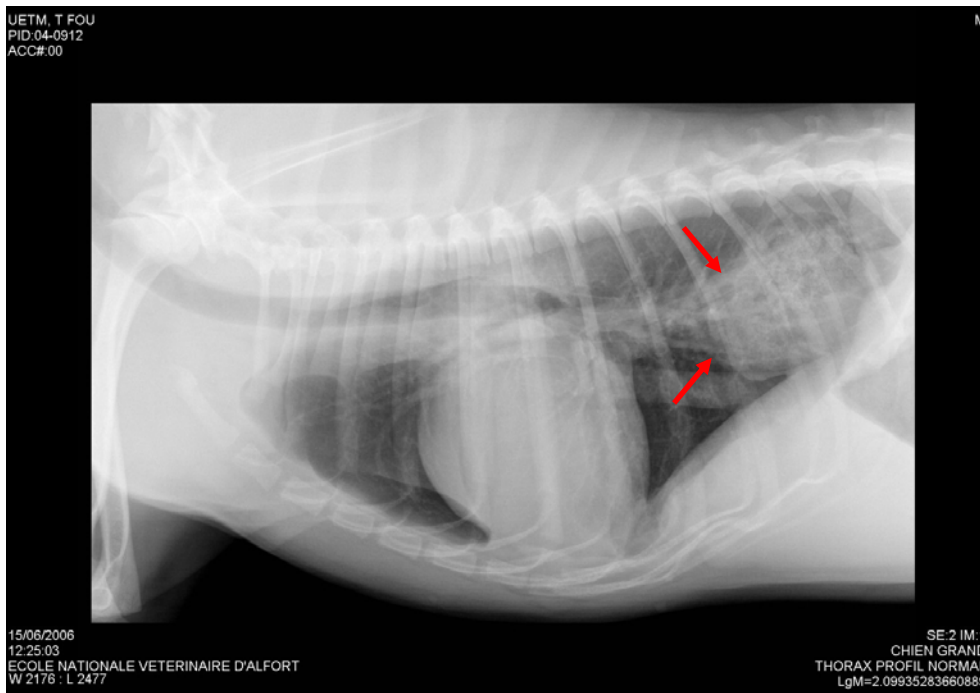


*(Cliché Radiologie ENVA)*

Le cliché de face montre une bronchopneumonie majeure à gauche, caractérisée par une augmentation de densité de type liquidien dans le champ pulmonaire et par la présence de bronchogrammes au sein des lobes pulmonaires gauches (flèches).



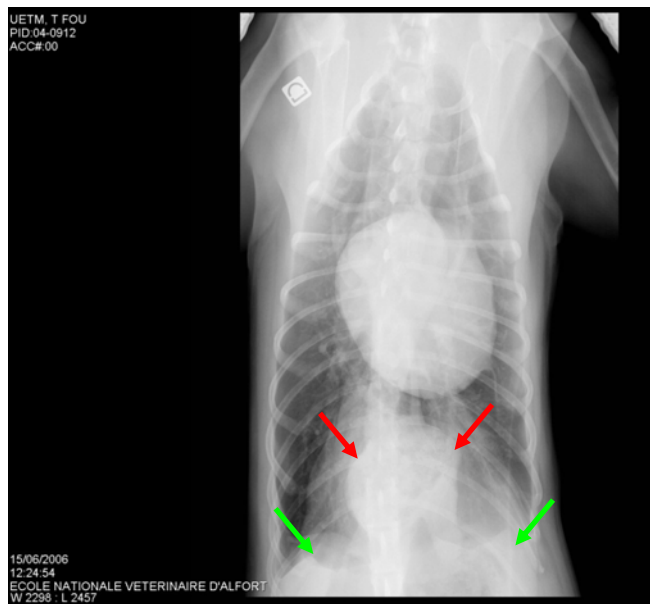
Figure 19 : Image de hernie hiatale (cliché de profil réalisé sur T-fou, chien GRMD adulte)



(Cliché Radiologie ENVA)

Une image de densité liquidienne apparaît dans le champ pulmonaire, entre le cœur et le diaphragme (flèches)

Figure 19 bis : Image de hernie hiatale (même chien, cliché de face)



(Cliché Radiologie ENVA)

L'estomac, de densité liquidienne (flèches rouges), apparaît en avant des 2 coupes diaphragmatiques (flèches vertes).

## IV. B. 2) Étude biochimique

### IV. B. 2) a. Les créatine-kinases sériques

L'augmentation du taux de créatine-kinase (CK) est très précoce et très marquée, permettant d'identifier les chiots dystrophiques dès les premiers jours de vie : dès la naissance, chez les chiots malades, le taux sérique de CK est 500 à 1000 fois plus élevé que la normale, alors que cette élévation n'est que 10 à 20 fois supérieure chez les chiots sains (due au traumatisme de la naissance). Ce taux diminue dès le deuxième jour pour n'atteindre que 6 à 100 fois la normale chez les mêmes chiots malades. [36, 40]

Ce taux atteint sa valeur maximale à l'âge de 6 ou 8 semaines, juste avant l'apparition des signes cliniques (taux supérieur à 10000 UI/l, la valeur usuelle étant inférieure à 100 UI/l). [36, 40]

Après 6 mois, les valeurs de CK sérique restent élevées, en rapport avec la persistance de la nécrose musculaire [4, 31, 36, 48]. Leur taux varie entre 1000 et 100 000 UI/L chez les chiens adultes myopathes, ces valeurs sont significativement plus élevées que celles mesurées chez des chiens sains. [40]

Ensuite le taux des CK tend à diminuer progressivement au cours du temps : en fin d'évolution, elles déclinent jusque cinq à quinze fois la valeur de référence [36, 40, 50].

Le taux sérique de CK n'est pas directement corrélé avec l'intensité des signes cliniques, mais reflète l'intensité de la nécrose musculaire ; notamment, il est rapidement augmenté après l'exercice [31, 36]. La sévérité clinique dépend également d'autres facteurs lésionnels que la nécrose, dont la fibrose musculaire [36, 50].

Cf. annexe 2.

### IV. B. 2) b. Les électrolytes : sodium, potassium, CO<sub>2</sub> [40]

La natrémie des chiens myopathes est semblable à celle des chiens sains, sauf pour la classe 6-12 mois où elle est légèrement plus élevée.

Par contre, les dosages de **potassium** signalent des valeurs **plus élevées** chez les chiens myopathes à partir de l'âge de 6 mois. Cet âge correspond à la période la plus évolutive de la maladie avec l'accentuation du phénomène de dégénérescence musculaire et donc de la sévérité des symptômes locomoteurs. Les valeurs diminuent après 24 mois, ce qui correspondrait à la stabilisation de l'évolution locomotrice.

Enfin, les dosages de bicarbonates sanguins montrent une **alcalose métabolique** nette chez les myopathes à partir de l'âge de 12 mois. Cela peut correspondre à une mauvaise évacuation du CO<sub>2</sub> due à l'insuffisance respiratoire.

### IV. B. 2) c. Les paramètres hépatiques : ALAT, PAL, PT [40]

Il existe une **augmentation significative nette des ALAT** (Alanine Amino-Transférase) chez les myopathes. Elle atteint presque 6 fois la valeur obtenue chez les chiens témoins. Cette différence peut s'expliquer surtout par l'atteinte hépatique (hépatomégalie) observée chez les chiens malades, ainsi que dans une moindre mesure par l'atteinte cardiaque (fibrose). Les ALAT augmentent entre 6 et 24 mois, période correspondant à l'évolution de l'hépatomégalie et des lésions cardiaques.

Les PAL (phosphatases alcalines) ne sont significativement augmentées chez les myopathes que tardivement (à partir de 2 ans).

Enfin, les dosages des protéines totales (PT) ne présentent aucune différence significative entre témoins et myopathes ainsi qu'entre classes d'âge.

### IV. B. 3) Etude électrophysiologique

Fréquemment, la distinction clinique entre une myopathie et une neuropathie est impossible. L'interprétation des tests neurologiques comme les réflexes tendineux peut être faussée par une réponse faible et ce, malgré l'absence de lésion neurologique, si le muscle ne fonctionne pas correctement. [7]

L'électromyographie est donc un examen complémentaire indispensable, car l'activité électrique musculaire est étroitement liée à l'état physiologique du muscle.

Dans des conditions physiologiques, une fibre musculaire ne présente pas d'activité électrique isolée, de type potentiel d'action. Si cela se produit, il s'agit d'un processus pathologique, une dénervation ou une myopathie. [7]

Les travaux effectués par Valentine et coll. [50], sur des mâles et des femelles malades à des âges différents ont montré la présence d'activité spontanée anormale dans de nombreux territoires musculaires.

Deux types d'**anomalies électromyographiques** sont notées à partir de l'âge de 8 à 10 semaines [9, 31, 36, 40, 48] :

- des **décharges complexes répétitives** (cf. figure 20), similaires à celles décrites lors de myopathie de Duchenne ou de Becker chez l'homme, mais plus occasionnelles [36, 40] ;

- une activité répétitive de type **ondes positives lentes\*** et, rarement, quelques potentiels de fibrillation\*. [40]

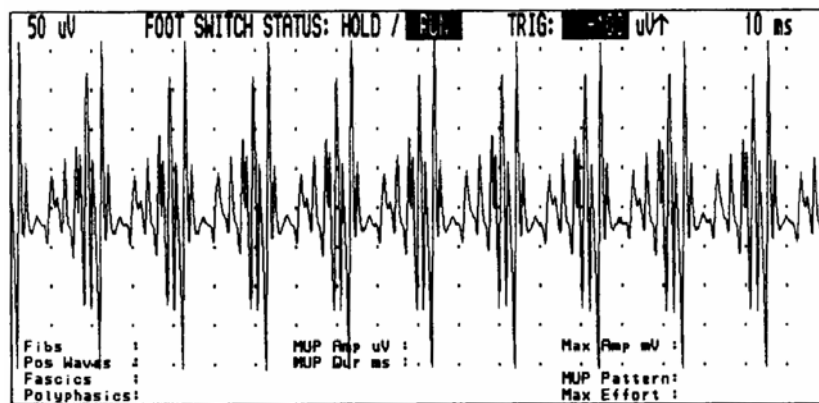
Ce type d'activité spontanée est rencontré également chez l'homme mais dans une nettement moindre importance. Chez le chien, on la rencontre également lors de pseudomyotonie liée au syndrome de Cushing ou dans la myopathie du Labrador Retriever. [40]

Les potentiels d'unités motrices des chiens malades sont, par rapport aux témoins, brefs (1,5 à 2 ms) et fréquemment polyphasiques. [40]

L'étude de la conduction nerveuse du nerf ulnaire ne met pas en évidence d'anomalie et en particulier ne montre pas de variation de l'amplitude de la réponse motrice évoquée entre les témoins et les malades. [40]

Il a été suggéré que, dans les myopathies dégénératives, la nécrose segmentaire des fibres musculaires se comporte comme une dénervation fonctionnelle des fibres et donc entraîne une hypersensibilité secondaire des fibres musculaires. [40]

Figure 20 : Exemple D'EMG\* obtenu sur un chien GRMD (d'après [20bis]).



(50  $\mu$ V/division, 10 msec/division)

L'enregistrement de l'activité spontanée, réalisé sous anesthésie générale, révèle des décharges complexes répétitives, caractérisées par des trains d'onde ayant une fréquence, une forme et une amplitude uniformes.

#### IV. B. 4) Etude électrocardiographique et échographique de l'atteinte cardiaque

Cliniquement, les signes d'insuffisance cardiaque sont peu perceptibles, l'auscultation cardiaque restant longtemps normale ; il n'y a pas de signe d'ascite ou d'épanchement pleural. Cependant, dès leur plus jeune âge, les chiens présentent un essoufflement et une intolérance à l'effort même lors d'une atteinte locomotrice modérée. [40]

Chez certains chiens âgés, la fonction cardiaque peut rapidement et brutalement décliner occasionnant une **insuffisance cardiaque** congestive terminale par hypocontractilité cardiaque. [36]. La mort est due à une **cardiomyopathie** [50], dont les signes électro- et échocardiographiques sont perceptibles à partir de deux ans [23, 35, 52].

##### *Electrocardiographie*

Chez le mâle dystrophique et la femelle homozygote, les anomalies électrocardiographiques, quoique inconstantes [31, 48], sont comparables à celles qui sont observées au cours de la myopathie de Duchenne humaine [36]. Elles sont confirmées in vitro, les cardiomyocytes présentant un potentiel d'action anormal [36].

On observe :

- une **tachycardie** et des **troubles du rythme** (tachycardie ventriculaire chez 30 % des chiens, pauses sinusales et extra-systoles ventriculaires) [35, 36, 40, 41, 52] ;
- une augmentation de ratio Q/R avec une onde Q profonde pour les malades (et les porteuses dans certains cas) et aggravation avec l'âge [40] ;
- un raccourcissement de l'intervalle PR chez les malades, qui correspond à une augmentation de la conduction atrio-ventriculaire et qui pourrait s'expliquer par un retard de la maturation du myocarde secondaire au processus dystrophique [40] ;
- une déviation de l'axe électrique vers la gauche pour les porteuses [40].

L'augmentation sensible de la fréquence cardiaque peut s'expliquer par l'hypoxie chronique liée à une mauvaise ventilation pulmonaire [40].

##### *Echocardiographie*

###### \* Données quantitatives

Les observations faites sur des chiens adultes montrent en particulier :

- une dilatation du ventricule gauche,
- une dilatation atriale au stade d'insuffisance cardiaque congestive,
- une diminution de la fraction de raccourcissement chez les chiens les plus vieux. [35, 40]

D'autre part, un épaissement des cordages et des valvules mitrales apparaît dans le jeune âge (entre 0 et 6 mois) puis régresse, pour enfin réapparaître chez des chiens âgés de plus de 24 mois. [40]

Aucune des femelles porteuses ne montre d'anomalie dans les mesures échocardiographiques. [40]

Chez l'homme, les mêmes anomalies sont retrouvées dans les stades avancés de la maladie (dilatation ventriculaire et diminution de la fraction de raccourcissement) [23, 40].

La cardiomyopathie de Duchenne est caractérisée par une fibrose progressive de l'épimyocarde en premier lieu dans la partie postéro-basale du ventricule gauche. Les signes cliniques d'insuffisance cardiaque congestive n'apparaissent que très tardivement et souvent peu avant le décès des patients [35], par contre leur tracé électrocardiographique est pratiquement toujours anormal et l'examen échographique peut montrer des anomalies de la fonction diastolique dans un premier temps puis de la fonction systolique. De même, les femmes porteuses de la maladie peuvent présenter des anomalies de leur tracé électrocardiographique [40].

\* Données qualitatives

Des lésions hyperéchogènes focales sont parfois visibles dès l'âge de 6 mois, elles débutent dans la partie inféro-postérieure du ventricule gauche et progressent vers l'apex du cœur au niveau des cordages et des muscles papillaires [36, 40, 41]. On peut en trouver également mais de plus petite taille dans le septum interventriculaire. Leur intensité diminue avec l'âge. [40] Chez les femelles porteuses, ces lésions sont présentes mais de plus petite taille et en plus petite quantité. Il existe parfois des zones hypoéchogènes autour d'un foyer hyperéchogène. [40] Ces lésions hyperéchogènes correspondent histologiquement à des zones de fibrose et de calcification du myocarde et les zones hypoéchogènes à des zones de nécrose. [35, 36, 40]

La distribution et la progression des lésions correspondent à la progression de la fibrose chez l'homme bien que la minéralisation qui suit la nécrose des myocytes soit plus prononcée chez le chien et donc très visible à l'échographie. [40]

Les femelles porteuses qui ont des lésions visibles à l'échographie (nécrose et calcification confirmées à l'histologie) ont aussi des anomalies électrocardiographiques. On peut donc penser que les femmes porteuses ont des atteintes dystrophiques du myocarde similaires. [40]

L'échocardiographie montre donc une atteinte cardiaque précoce mais ayant des répercussions fonctionnelles tardives, puisque certaines lésions sont visibles dès l'âge de 4 mois. [40] Il a également été mis en évidence que les lésions cardiaques progressaient du haut du ventricule gauche vers l'apex du cœur, c'est-à-dire selon la ligne de dépolarisation cardiaque. [40]

## **IV. B. 5) Étude tomodensitométrie**

### *Thorax*

Les images montrent une hypertrophie sévère et une fibrose des piliers du diaphragme. Tous les chiens, quel que soit leur âge, présentent une atrophie des muscles temporaux, dorsaux du cou, paravertébraux et des muscles proximaux des membres. A cela s'ajoute une hétérogénéité de la structure même des muscles avec une alternance de zones hypodenses, et de zones hyperdenses consécutives soit à une fibrose installée, soit à un phénomène inflammatoire en cours. [40]

### *Encéphale*

Les chiens de moins de 6 mois peuvent présenter une légère dilatation des ventricules latéraux. Entre 6 et 12 mois, la dilatation des ventricules s'aggrave. La structure même de l'encéphale semble aussi atteinte. En effet, on note des travées hypodenses correspondant à un élargissement des sillons corticaux, visibles chez tous les chiens myopathes examinés. Il existe également une hétérogénéité du parenchyme cérébral qui, associée aux zones hypodenses précitées, peut faire penser à des lésions de dégénérescence de l'encéphale. [40]

Pour l'étude des muscles, l'imagerie par résonance magnétique est de plus en plus utilisée (du moins dans le domaine de la recherche) car elle permet d'obtenir une résolution supérieure au scanner (surtout avec les machines de forte puissance) et une meilleure discrimination entre les différentes densités tissulaires, et d'avoir donc une meilleure représentation de la structure et des remaniements subis par le muscle atteint (fibrose, infiltration graisseuse...).

## **IV. B. 6) Étude nécropsique**

### *Etat général*

La plupart des chiens montre un état de déshydratation avancée souvent accompagnée d'une cachexie. [40]

### *Appareil circulatoire*

Les lésions visibles à l'échocardiographie sont retrouvées : dilatation du ventricule gauche et parfois du ventricule droit, zones de calcification, fibrose. (Cf. figure 21)  
De plus, une endocardite bilatérale a été retrouvée à différents âges. [40]

### *Appareil musculo-squelettique*

On note une prééminence des reliefs osseux soulignant une amyotrophie marquée, notamment au niveau du thorax, de la tête et de la partie proximale des membres. Les muscles apparaissent pâles. A la palpation, ceux-ci ont une consistance plutôt dure signant une fibrose ou une calcification.

Les chiens présentent également une ankylose des articulations hautes des membres et de l'articulation temporo-mandibulaire avec un degré de flexion et d'extension très limité. [40]

### *Appareil digestif*

On peut constater, dans le sens oral-aboral :

- un épaississement de la base de la langue, parfois une hypertrophie des muscles crico-aryténoïdiens (pouvant en partie être responsable des troubles de la déglutition) ;

- un méga-œsophage, fréquent, avec parfois une akinésie complète ;
- des hernies hiatales (cf. figure 22), parfois totales avec un engagement complet de l'estomac dans le thorax ;
- une hépatomégalie constante, pouvant être expliquée par une stase veineuse liée à la compression de la veine cave caudale par le diaphragme épaissi.

L'atteinte digestive, souvent grave et parfois imprévisible (notamment dans le cas de hernie hiatale), limite grandement l'espérance de vie des chiens et donc aggrave le pronostic vital. [40]

#### *Appareil respiratoire*

Des foyers de bronchopneumonie plus ou moins étendus peuvent être notés, parfois accompagnés d'épanchement pleural. Dans certains cas, il existe une hépatisation d'un lobe pulmonaire et un œdème pulmonaire.

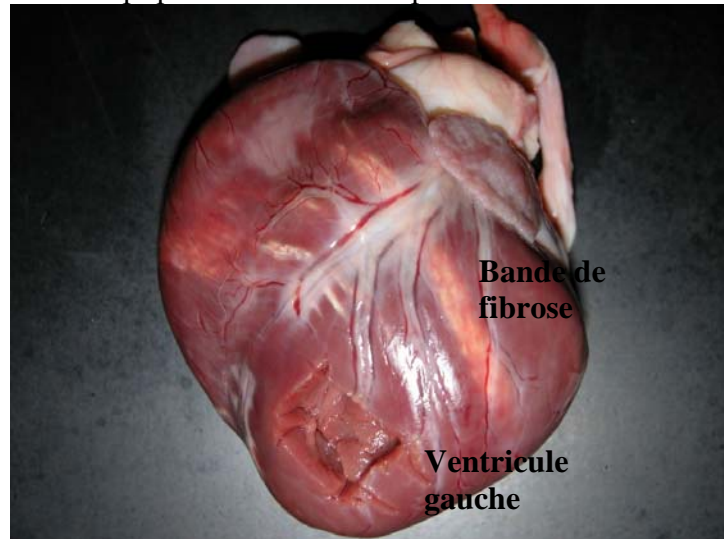
Le diaphragme est épaissi surtout au niveau des piliers et en région du hiatus [40]. (cf. figure 23)

#### *Encéphale*

Aucune lésion macroscopique n'est visible extérieurement. [40]

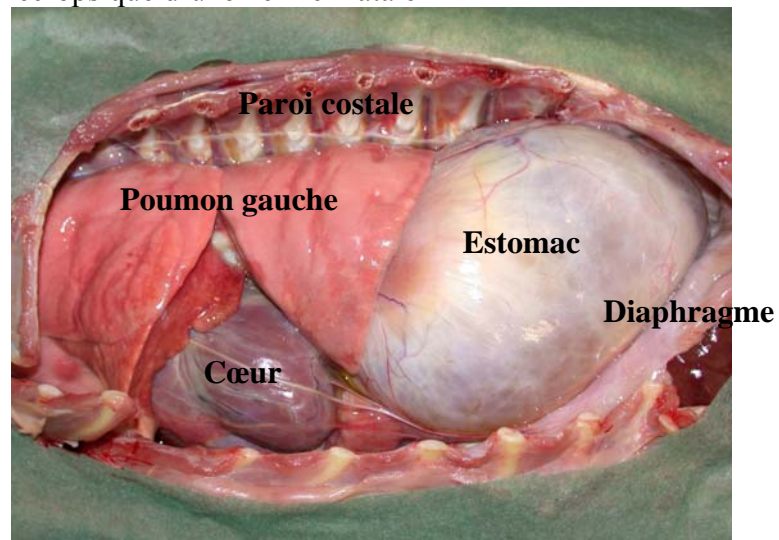


Figure 21 : Aspect macroscopique du cœur à l'autopsie



*Cliché S. Blot, Laboratoire de Neurobiologie*

Figure 22 : Aspect nécropsique d'une hernie hiatale



*Cliché S. Blot, Laboratoire de Neurobiologie*

Figure 23 : Aspect nécropsique du diaphragme épaissi



*Cliché S. Blot, Laboratoire de Neurobiologie*

## IV. B. 7) Étude histologique

### IV. B. 7) a. Forme néonatale

Cinq types de lésions histologiques élémentaires ont été observés dans les muscles de chiots GRMD nouveaux-nés :

- nécrose groupée sévère des fibres musculaires,
- hyalinisation des fibres musculaires,
- hypertrophie des fibres musculaires,
- accumulation anormale de calcium dans le sarcoplasme (fibres positives à la coloration de Von Kossa\*),
- régénération\* en périphérie des zones de nécrose. [36, 37]

La langue et le diaphragme sont systématiquement et le plus sévèrement affectés [29, 36, 47], la langue présentant simultanément les 5 types de lésions élémentaires [37].

Ces lésions dites de « Phase I » ont été retrouvées chez toutes les espèces atteintes de dystrophinopathies (humain, souris, chien et chat). Elles désignent les effets directs du défaut de dystrophine. [37]

Deux autres types de lésions apparaissent chez les chiots à partir de 2 mois : discrète fibrose endomysiale et atrophie marquée des fibres. Ces lésions de phase II ne sont présentes que chez les enfants DMD, les chiens GRMD et le diaphragme des souris mdx. [37]

Dans cette forme clinique, les muscles sont parcourus de bandes pâles disséminées.

La **nécrose musculaire** touche de façon constante la **langue**, le **diaphragme**, les **muscles intercostaux**, le **trapèze**, le **muscle brachiocéphalique**, le **deltoïde**, l'**extenseur radial du carpe** et le **sartorius**. Ce sont les muscles les plus sollicités fonctionnellement chez le chiot nouveau-né (muscles intervenant dans la succion, la respiration et le déplacement par reptation). Les lésions cardiaques sont cependant absentes, la mort survenant par insuffisance respiratoire aiguë, due à la nécrose massive des muscles respiratoires. [27, 29, 36, 47, 50].

Quatre grades ont été utilisés pour classifier l'intensité de l'atteinte musculaire, dans chaque groupe de muscles, jusqu'à l'âge de 2 mois :

- grade III (plus de 50% de fibres musculaires touchées) : muscles les plus sévèrement affectés (langue, muscles respiratoires, muscles proximaux des membres, muscles du tronc et du cou) ;
- grade II (atteinte modérée, nécrose groupée multifocale, 10 à 50% de fibres touchées) et grade I (atteinte légère, moins de 10% de fibres nécrosées) : autres muscles des membres, du tronc et du cou ;
- grade 0 : muscles épargnés chez le chiot (en particulier myocarde, œsophage, muscle orbiculaire des paupières). [37]

La proportion et la distribution des différents types de fibres dans le muscle dystrophique de chien nouveau-né sont identiques à celles observées chez les chiens témoins de même âge : majorité de fibres de type IIc, immatures, et plus rares fibres de type I disséminées [47].

#### IV. B. 7) b. Forme classique

##### *IV. B. 7) b. α. Lésions du muscle strié squelettique*

\* Examen macroscopique : amyotrophie.

Les muscles peuvent être de couleur et consistance normales, ou être pâles et fermes. Les variations de taille dominant : **la plupart des muscles sont atrophiés**, surtout les muscles temporaux et ceux du tronc. Certains muscles au contraire sont **hypertrophiés : langue, musculature œsophagienne et piliers du diaphragme**. L'hypertrophie œsophagienne peut s'accompagner de dilatation luminale modérée [31, 36, 38, 49].

\* Examen en microscopie optique : lésions identiques à celles de la DMD

Les lésions du muscle strié squelettique du chien Golden Retriever dystrophique sont remarquablement similaires à celles observées chez l'homme au cours de la myopathie de Duchenne (figure 15), mais leur évolution est très rapide, en quelques semaines seulement. [36] Les muscles atteints les plus sévèrement et les plus précocément (avant 4 semaines) sont le **sartorius**, l'**extenseur radial du carpe**, le **deltoïde** et le **tibial crânial**, la **langue**, le **diaphragme** et le **trapèze** ainsi que le supra-épineux et les muscles temporaux [9, 36, 49, 52]. Les muscles oculomoteurs sont épargnés, comme chez la souris mdx et l'enfant [47, 49].

Les **lésions précoces**, hors forme néonatale, sont comparables à celles observées chez l'enfant : seules des **fibres hyalines**, hyperéosinophiles, de grande taille et arrondies, dispersées dans le muscle, sont présentes [27].

**En phase d'état**, à partir de quelques semaines, les lésions chez le chien sont comparables à celles de l'enfant dystrophique âgé de 2 à 5 ans : **taille des fibres hétérogène**, nécrose et invasion macrophagique au sein du muscle ; des fibres en cours de **régénération** sont présentes en petits groupes ou isolées ; des fibres dégénératives\* sont présentes. Les autres lésions cellulaires incluent la présence de fibres segmentées (fissurées transversalement) et de fibres matures aux noyaux centraux [27, 36, 48, 49].

Avec l'âge apparaissent de rares **fibres minéralisées** ; le nombre de fibres en cours de phagocytose augmente, ainsi que la quantité de tissu conjonctif endo- et périnysial et le nombre de fibres à noyaux centraux ; une infiltration du muscle par du tissu adipeux peut également survenir, notamment dans les muscles temporaux, le diaphragme et le biceps fémoral. Les nerfs périphériques présentent un aspect histologique normal [31, 36, 48, 49, 52].

Les colorations de von Kossa et par le rouge d'Alizarine\* montrent une **augmentation** marquée, le plus souvent sous-sarcolemmale, **de la quantité de calcium dans les fibres musculaires dystrophiques**, qu'elles soient hyalines, nécrotiques ou parfois d'apparence histologique normale. A l'opposé, les fibres régénératives et les fibres aux noyaux centraux sont systématiquement négatives. L'accumulation calcique intracellulaire est beaucoup plus importante lors de dystrophinopathie qu'au cours des autres affections musculaires canines (myosite des muscles masticateurs, polymyosite, dermatomyosite) [36, 39, 49, 52].

\* Examen en microscopie électronique à transmission.

L'examen en microscopie électronique à transmission [31, 48, 49] indique que **l'hypercontraction** est un phénomène précoce, suivi de la lyse des myofibrilles et de la nécrose totale de la fibre musculaire. [36]

Les fibres hypercontractées, caractérisées par un grand diamètre, une lyse des myofibrilles sous-sarcolemmales, un reticulum endoplasmique dilaté mais des mitochondries intactes, sont abondantes dans le muscle de chien de trois mois. [36]

Le nombre de fibres dégénératives augmente avec l'âge, elles présentent des vacuoles d'autophagie cytoplasmiques, une perte de l'architecture myofibrillaire et des zones multifocales d'interruption du sarcolemme appelées "delta-lesions" [36, 49]. L'invasion macrophagique, tardive, est visible dans les fibres totalement nécrotiques. [36]

Les cellules satellites, au noyau hypertrophié clair et aux nombreux organites cytoplasmiques, sont activées (régénération). Les fibres aux noyaux centraux, de grand diamètre, les fibres minéralisées et la densification du tissu conjonctif endomysial, envahi de macrophages, sont évidentes chez les chiens plus âgés. [36]

Les fibres nerveuses intramusculaires, myélinisées ou non, présentent un aspect ultrastructural normal [31, 48, 49, 52].

\* Enzymohistochimie : absence d'atteinte préférentielle d'un type de fibre musculaire.

La proportion de fibres de type I et II, différenciées par une réaction utilisant l'ATPase à différents pH, est préservée ; par contre au sein des fibres de type II, les fibres IIc, de petit diamètre, considérées comme en cours de régénération, sont groupées et en nombre légèrement augmenté [36]. Il n'est pas mis en évidence d'atteinte préférentielle d'un type de fibre particulier [31, 47, 48, 49]. Par contre, un phénomène appelé "regroupement des fibres par type" peut être observé (amas de fibres de type I ou de type II). Seuls certains muscles comme le diaphragme, le biceps fémoral, l'extenseur radial du carpe et le trapèze, montrent en fin d'évolution une prédominance anormale des fibres de type I [36, 49].

\* Immunohistochimie : expression de dystrophine, d'utrophine et des protéines associées dans le muscle dystrophique.

Les fibres musculaires striées des chiens dystrophiques (mâles et femelles homozygotes) sont **négatives pour les anticorps monoclonaux** dirigés contre la dystrophine. Par contre, des « fibres révertantes\* » sont observées dès l'âge de quinze jours en faible nombre [28, 36].

L'expression sarcolemmale d'**utrophine** persiste jusqu'à 60 jours chez le chiot dystrophique (âge auquel les fibres deviennent matures chez le chien) [36] ; par la suite, on note une **expression anormale**, étendue au sarcolemme extra-synaptique, d'utrophine dans de rares fibres matures. Les fibres en cours de régénération expriment également l'utrophine tout au long de leur membrane [36].

L'expression d'autres protéines musculaires, comme la bêta-spectrine et la myosine, est normale dans le muscle dystrophique [19]. Par contre le taux d'alpha-dystroglycane est inférieur à 30 % du taux normal (déterminé par immunoblot) et l'expression des sarcoglycanes et syntrophines est significativement diminuée par rapport aux témoins [36].

#### *IV. B. 7) b. $\beta$ . Lésions du muscle strié cardiaque.*

Les **lésions macroscopiques** du muscle cardiaque sont rares. Il peut s'agir de **bandes pâles et fermes** sous-épicaudiques, particulièrement à l'apex, accompagnées d'amincissement de la paroi ventriculaire gauche, ou de petits foyers blanchâtres de **minéralisation** localisés dans les muscles papillaires, le septum et la paroi libre du ventricule gauche chez des chiens âgés de plus de six mois. La taille du cœur est normale [36].

Les lésions myocardiques **histologiques** sont observées après six mois, dans les muscles papillaires et la région sous-épicaudique postéro-basale de la paroi ventriculaire gauche et la portion ventriculaire droite du septum interventriculaire [39, 41, 52]. Elles associent des images d'**hypercontraction**, une **nécrose** des fibres musculaires, une **fibrose** marquée et une infiltration interstitielle par du tissu adipeux. Les foyers de **minéralisation** myocardique

dominant en début d'évolution, éventuellement associés à une réaction macrophagique et giganticellulaire à corps étranger ; par la suite, la fibrose interstitielle représente la lésion élémentaire myocardique prédominante. [36]

À l'examen ultrastructural du myocarde, les figures dégénératives sont nombreuses (figures myéliniques, vacuoles d'autophagie sarcoplasmiques, perte des myofilaments, fibres hypercontractées) [36, 41].

#### IV. B. 7) c. Lésions observées chez les femelles hétérozygotes

Les femelles porteuses montrent à quatre semaines des lésions qualitativement similaires à celles des mâles dystrophiques et des femelles homozygotes, mais d'intensité moindre. Les lésions sont modérées à douze semaines et minimales à vingt-quatre semaines. Elles sont dominées par la présence de fibres dégénératives hyalinisées et nécrotiques disséminées dans le muscle, l'observation de fibres régénératives et l'absence de fibrose [36].

Chez les chiennes hétérozygotes jeunes (avant quatre semaines), la distribution de la dystrophine dans les fibres musculaires est hétérogène, dite « **en mosaïque** » : sur une coupe transversale, certaines fibres expriment la dystrophine aussi intensément que les fibres normales, certaines en sont dépourvues et d'autres, les plus nombreuses, expriment la dystrophine en quantité réduite. [36]

Ces résultats sont similaires à ceux observés chez les femmes conductrices de la myopathie de Duchenne [36].

Le pourcentage de fibres déficientes en dystrophine est d'environ 30% de deux jours à 60 jours, mais diminue ensuite rapidement : à vingt-quatre semaines presque toutes les fibres sont positives pour la dystrophine, avec la même intensité que dans un muscle normal [36].

En coupe transversale du myocarde, l'expression mosaïque de la dystrophine est également observée, mais la moitié des fibres est totalement négative, l'autre moitié totalement positive pour la dystrophine, et l'expression n'est pas affectée par l'âge, contrairement à ce qui survient dans les muscles squelettiques. [35, 36].



## CONCLUSION DE L'ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Les similitudes entre les dystrophies musculaires humaine et canine sont évidentes, tant sur le plan clinique que lésionnel et génétique.

On retrouve une variabilité phénotypique, une atrophie musculaire précoce très marquée, des atteintes cardiaque, respiratoire et digestive. Même si quelques différences persistent (maladie moins invalidante chez le chien, absence de hernie hiatale ou de méga-œsophage chez l'homme), le chien GRMD représente ainsi un des meilleurs modèles d'étude pour la DMD. [36, 40]

Le modèle canin est de plus intéressant dans au moins deux perspectives.

La première est la compréhension de la pathogénie des dystrophinopathies. La constatation d'une variabilité phénotypique importante chez des chiens dystrophiques présentant tous le même génotype, suggère que des facteurs autres que la seule mutation génétique interviennent dans l'expression clinique de la maladie [36, 52] : par exemple la nature de l'exercice musculaire (comparaison entre la quadrupédie et la bipédie), ou intervention de gènes modulateurs...

La deuxième perspective est la mise au point d'une thérapie génique, consistant à rétablir l'expression musculaire de dystrophine. L'objectif est de faire disparaître le phénotype dystrophique ; l'idée a donc d'abord été de faire produire la dystrophine de façon artificielle par l'organisme malade. Pour cela, différents vecteurs sont utilisés, notamment viraux, qui véhiculent tout ou partie du gène DMD (mais la production de dystrophine est peut-être insuffisante pour supprimer les symptômes).

Le modèle canin permet d'évaluer la faisabilité de ces différentes techniques dans des muscles qui possèdent une taille comparable à ceux des enfants souffrant de myopathie de Duchenne. De plus, les lésions étant similaires dans les deux espèces, le modèle canin permet de prédire quelle sera l'efficacité de la thérapie génique dans un muscle où la fibrose est importante et la régénération faible.

Enfin, la dystrophinopathie du chien s'accompagnant de signes cliniques marqués, facilement mesurables, elle autorise une évaluation clinique de l'efficacité du traitement testé. [36]

Le chien GRMD présente l'atteinte myocardique la plus proche de celle observée chez l'enfant au cours de la dystrophie musculaire de Duchenne : il est un des rares modèles animaux à offrir la possibilité d'étudier les différentes thérapies à visée cardiaque [35, 36, 41].

L'étude des lésions cardiaques chez les femelles hétérozygotes est également prometteuse : comprendre comment l'absence de dystrophine dans la moitié des cardiomyocytes est compensée devrait conduire au développement de nouvelles approches thérapeutiques contre la cardiomyopathie associée aux dystrophinopathies humaines [36, 52].

Les avantages du modèle GRMD sont donc : (1) l'existence de colonies de chiens bien établies, aux Etats-Unis, en Australie et en France, (2) la très grande analogie avec la dystrophie musculaire de Duchenne, et (3) le format des animaux, comparable avec celui des enfants dystrophiques susceptibles d'être l'objet d'une thérapeutique.

Les inconvénients du modèle GRMD résident dans : (1) le prix des animaux, (2) le faible nombre de portées par chienne et par an, associée à la mortalité néonatale élevée et (3) la difficulté d'entretien d'animaux faibles, dysphagiques, insuffisants respiratoires et cardiaques. En effet, le chien GRMD est un animal extrêmement fragile qu'il faut surveiller et tenter de conserver le plus longtemps possible. [36, 40]

De grands efforts sont réalisés sur la recherche de nouvelles thérapies pour les dystrophies musculaires et les autres maladies musculaires dégénératives aussi bien pour l'homme que l'animal.

Divers essais thérapeutiques ont été entrepris :

- isolement, culture et injection de cellules souches (myoblastes, mésoangioblastes) ;
- thérapie génique utilisant de l'ADN nu (plasmide), des vecteurs viraux pour délivrer les gènes désirés directement dans le muscle, ou utilisant des cellules qui peuvent être transplantées dans le muscle ;
- exon skipping\* (en français : saut d'exon thérapeutique) ;
- agents pharmacologiques visant à prévenir la dégénérescence musculaire, à favoriser la régénération et à limiter la fibrose.

De nombreux obstacles doivent être surmontés avant que ces techniques puissent devenir disponibles en routine. [1]

Etant donné la fragilité de ce modèle et les variations cliniques existantes, nous nous proposons donc de développer des critères fiables pour suivre la progression clinique et quantifier cette évolution. Cela nous permettra également d'évaluer de façon objective l'efficacité des protocoles thérapeutiques testés.



# ETUDE EXPERIMENTALE



# INTRODUCTION

La description clinique de la dystrophie musculaire du Golden Retriever est désormais bien connue ; il fallait maintenant développer des outils d'évaluation objective de l'état clinique des chiens atteints et de leur évolution.

A côté des examens complémentaires habituels (biochimie sanguine, imagerie, électrophysiologie...), il manquait un examen permettant de caractériser l'état global d'un chien.

En effet, lors d'essai thérapeutique, il ne suffit pas de dire que « l'état du chien s'est amélioré », et les examens complémentaires ne reflètent pas toujours l'état général, d'autant plus que l'affection revêt une grande variabilité clinique chez le chien. De plus, l'évaluation de l'efficacité d'un médicament lors d'un essai clinique reste une tâche difficile car de nombreuses variables tirées de l'examen clinique sont qualitatives ou semi-quantitatives. Les résultats peuvent donc être fortement dépendants du niveau d'expérience de l'observateur.

Diverses échelles de mesure de la fonction motrice ont déjà été mises à l'épreuve en médecine humaine (Functional motor scale, Hammersmith Motor Ability Score...), une seule d'entre elles a été validée : the Motor Function Measure [5], mais aucune n'a été développée pour tenter de qualifier quantitativement l'état général d'un malade, humain ou animal.

Nous avons donc choisi de mettre au point :

- d'une part une grille de scores cliniques basée sur la notation de l'intensité des symptômes les plus fréquents chez le chien GRMD, en vue d'une utilisation ultérieure pour tester l'efficacité de nouveaux traitements, et surtout d'effectuer la validation statistique de cet outil,

- et d'autre part une cotation de l'activité des chiens par analyse vidéo.



# I. MATERIELS ET METHODES

## I. A. ANIMAUX ETUDIES

Etant donné la difficulté d'obtenir des animaux atteints, la totalité des chiens GRMD présents dans l'unité ont été évalués, soit 24 chiens GRMD mâles âgés d'un mois à 3 ans au début de l'étude (Rouble, Sam, Scoubidou, T-fal, T-fou, Tintin, Titeuf, Tsar, Ucal, Usky, Uzel, Vrille, Vulcano, Virgule, Vicryl, Virage, Virbac, Varus, Valgus, Vaccin, Valium, Vampire, Viking, Viko).

Sept chiens témoins étaient disponibles au moment de l'étude : 4 adultes (Techno, Spot, Spirou, Roupie) et 3 chiots, qui ont été adoptés par la suite (Vyoupi, Venom, Vetrap).

Sont morts au cours de l'étude :

- Scoubidou, Usky et Uzel (euthanasie pour les besoins des protocoles),
- Sam (décès spontané suite à une bronchopneumonie),
- Tsar (euthanasie pour motif clinique),
- Ucal (décès spontané à l'âge de 9 mois),
- Vrille (euthanasie pour motif clinique),
- Vulcano (euthanasie pour motif clinique),
- Virage (euthanasie pour motif clinique),
- Vampire (euthanasie pour motif clinique).

Confère les caractéristiques des chiens GRMD utilisés pour l'étude en annexe 6.

Pour information, la sélection des chiens myopathes est effectuée selon deux méthodes (la production des chiens GRMD n'a plus lieu au sein du laboratoire, mais dans un centre d'élevage spécialisé qui réalise lui-même le dépistage à la naissance) :

- dosage des créatines kinases sériques,
- détermination génotypique sur prélèvement sanguin ou musculaire.

## I. B. PROTOCOLE D'ETUDE

Il a débuté en septembre 2003 et s'est achevé en février 2005.

Certains chiens étaient déjà présents au début de l'étude, d'autres sont arrivés au cours du protocole.

Les observations et investigations ont été effectuées sur des animaux de tout âge (jeunes de quelques semaines et adultes jusqu'à 4 ans).

Cependant, étant donné la difficulté d'obtenir des chiens témoins parents avec les chiens myopathes, il n'a pas toujours été possible d'apparier les animaux. Les témoins utilisés ont été choisis parmi les chiens sains présents au sein de l'unité.

Pour l'évaluation des animaux par score clinique, les opérateurs ont réalisé un score hebdomadaire sur les 24 chiens présents dans l'unité.

Pour l'analyse vidéo, nous avons d'emblée exclu les animaux sous perfusion avant ou pendant les séances (la tubulure peut gêner voire empêcher les mouvements) et les enregistrements ont été réalisés pour 18 chiens, mais faute de temps il n'a pas été possible d'analyser l'ensemble des données de la colonie, 8 chiens ont donc ensuite été tirés au sort (cf. partie correspondante).

## I. C. INTERVENANTS

L'intervention de plusieurs opérateurs a parfois été nécessaire, notamment pour la réalisation des scores cliniques et des analyses statistiques.

Les divers intervenants ont des niveaux d'expérience différents dans la connaissance des chiens et de la maladie :

- Stéphane Blot, maître de conférences en Neurologie et dirigeant de l'unité (nommé SB dans l'étude statistique),
- Jean-Laurent Thibaud, résident en Neurologie (JLT),
- Nicolas Granger, résident en Neurologie (NG),
- Inès Barthélémy, vétérinaire, ingénieur de recherche contractuelle, et actuellement en préparation d'une thèse d'université sur l'étude des chiens LRMD (IB),
- moi-même (MC),
- et bien sûr l'ensemble des animaliers pour les soins quotidiens.

Les observateurs SB, JLT et NG ont entre plusieurs mois et plusieurs années d'expérience dans le laboratoire de l'UETM ; IB et MC ont commencé à manipuler les chiens en août 2003.

Tous les observateurs ont été formés et entraînés par l'observateur SB.

## I. D. GRILLE DE SCORES CLINIQUES

Le principe est de caractériser de façon quantitative et reproductible l'état d'un animal myopathe grâce à un outil impartial et facile à utiliser.

La grille n'a pas pour objectif d'être utilisée dans un but pronostique mais pour quantifier l'état clinique à un moment donné.

### I. D. 1) Elaboration d'un système de cotation

(cf. annexe 7 : mode de conception d'une grille de score clinique)

\* Choix des variables évaluées : recueil de symptômes par observation clinique

Les signes recueillis sont ensuite regroupés en différentes catégories ou items. Il faut alors choisir le nombre d'items détaillés. Un nombre trop faible conduit à une chute de la sensibilité du système de cotation, alors qu'un nombre trop élevé ne permet plus de différencier les items entre eux. [3]

La grille, conçue en mai 2003 par Stéphane Blot, comprend 2 sous-parties : une sous-partie portant sur les appareils digestif et respiratoire, et une sous-partie décrivant l'appareil locomoteur.

Les différents critères constituant les 2 sous-parties ont été choisis parmi les symptômes fréquents observés lors de myopathie dystrophique chez le chien.

Au total 17 critères sont pris en compte. (cf. tableau 6).

\* Au sein de chaque item, plusieurs propositions sont ensuite élaborées. Elles témoignent de l'intensité des manifestations observées. C'est la phase de présentation sémantique du questionnaire [3]. Il faut élaborer les différentes propositions en gardant à l'esprit qu'une

échelle doit être compréhensible. La proposition notée 0 correspond à un état normal du critère envisagé ; la proposition associée à la note la plus élevée, à l'état le plus grave.

L'observateur attribue une note à chaque item, ces notes sont ensuite additionnées pour obtenir un score total.

Selon la gravité des symptômes observés, une note de 0 à 2 est attribuée à chaque critère, 0 correspondant à l'absence du symptôme et 2 à la gravité maximale.

Un animal sain doit donc obtenir la note 0, et un chien myopathe peut théoriquement évoluer jusqu'à la note de 34 points (mais pour des raisons éthiques, les animaux sont euthanasiés avant d'atteindre ce stade).

Diverses versions ont été élaborées, les modifications successives ont porté sur la faisabilité de certains critères :

- précision de certains critères et de la procédure ;
- mise en place d'un ordre pour la réalisation des items relatifs à la locomotion, afin d'améliorer la répétabilité ;
- introduction des notes intermédiaires 0,5 et 1,5.

Afin de faciliter la notation des critères visuels (par exemple l'écartement des doigts), un poster a été réalisé au moyen de photographies représentant des degrés cliniques caractéristiques.

Cf. tableau 6 : dernière version de la grille de scores cliniques

Cf. tableaux 7 et 8 : Posters décisionnels pour la grille de scores cliniques.

## **I. D. 2) Protocole d'utilisation**

### **I. D. 2) a. Matériel spécifique**

Seul un marteau-réflexe est nécessaire, ainsi qu'un obstacle pouvant être réalisé au moyen du rebord des cages ou d'une barre placée à hauteur fixe.

### **I. D. 2) b. Formation des opérateurs**

La formation comprend d'abord un entraînement individuel pour que chacun puisse se familiariser avec la grille. Cette phase peut durer plusieurs semaines.

Ensuite l'ensemble des intervenants réalise des scores en groupe pour obtenir une harmonisation des notations.

Enfin, des confrontations régulières sont organisées pour vérifier la concordance du niveau de notation.

Cette phase de préparation des observateurs s'est étalée de septembre à décembre 2003 (soit 4 mois).

En pratique, après la phase d'entraînement :

- il a été programmé la réalisation individuelle, sans concertation préalable, de scores chaque semaine sur l'ensemble des chiens GRMD présents au sein de l'unité, pendant 13 mois (de janvier 2004 à février 2005) ;
- en fin de protocole, l'ensemble des opérateurs a réalisé des scores itératifs quotidiens sur 3 jours consécutifs.

Pour l'analyse statistique, nous avons retenu les notes récoltées entre juin 2004 et février 2005.

#### I. D. 2) c. Mode opératoire

Le chien à noter est choisi au hasard parmi les chiens à étudier ; l'observateur et l'animal se placent dans une pièce isolée et calme.

L'observateur effectue la notation dans l'ordre indiqué par la grille.

L'animal étant replacé dans son box, le notateur peut effectuer le scoring suivant.

Si possible, il n'est pas effectué plus de 10 scoring à la suite, pour éviter la lassitude.

En fin de séance, l'observateur archive les fiches de notation dans les dossiers des animaux et reporte les 2 sous-totaux et la note finale dans le logiciel de gestion clinique Clovis.

Les chiens sont divisés en 2 groupes :

- groupe « chiens adultes stables » (chiens dont le nom commence par R, S, T ou U) : la notation est effectuée par au minimum 2 opérateurs, une fois par semaine pendant 4 mois environ (soit une quinzaine de notes par animal).
- chiens jeunes en évolution clinique (chiens de la naissance à moins d'un an au début du protocole) : la notation est effectuée par au minimum 2 opérateurs, une fois par semaine, jusqu'à stabilisation de l'état clinique ou décès.

#### I. D. 2) d. Réalisation de la notation pour chaque critère

- critère « Dysphagie (1) » = vitesse d'alimentation

L'observateur doit consulter la fiche d'alimentation de l'animal ou interroger les animaliers pour connaître la nature de la ration et la facilité d'ingestion, et vérifier le contenu de la gamelle (s'il reste des croquettes dans la gamelle plusieurs heures après la distribution, la vitesse d'ingestion est diminuée).

- critère « Dysphagie (2) : Ptyalisme »

Il s'évalue par l'observation de l'animal (filets de bave autour de la gueule, poitrail et pattes mouillés) et par l'interrogation des animaliers, mais aussi par la présence possible de salive dans les gamelles.

- critère « « Dysphagie (3) : Langue »

Il s'évalue par palpation de la base de la langue entre les deux mandibules.

Pour un chien sain, la base de la langue n'est pas palpable.

On apprécie la largeur de l'organe et sa fermeté.

- critère « Ouverture buccale »

On l'estime en ouvrant la gueule du chien, en écartant doucement le maxillaire et la mandibule, puis on mesure l'angle d'ouverture.



- critère « Activité générale »

Il décrit l'activité du chien dans sa cage : reste-t-il couché ou vient-il à la rencontre de l'opérateur, et également en liberté : le chien est-il apathique, ou répond-il aux stimuli ? (appel au jeu, caresses, lancer de balle...)

- critère « Respiration »

Il s'évalue au repos : la fréquence respiratoire peut-être normale (20-30 mouvements/minute), ou augmentée, ou on peut observer des efforts abdominaux.

- critère « Position des doigts »

Il est noté sur un chien en station debout sur 4 membres, on mesure l'écartement des doigts sur les 4 membres. On peut également s'aider du poster.

Si l'écartement des doigts est différent sur les membres antérieurs et postérieurs, la note sera une moyenne des 2 valeurs.

- critère « Palmigradie »

Il s'agit de la position du carpe par rapport à la verticale.

Chez un chien sain, le carpe est vertical, l'angle qu'il forme avec le sol est de 90° (note 0).

Chez un chien myopathe, le carpe peut atteindre une position quasi-horizontale (angle de 0°, note 2).

On peut utiliser le poster décisionnel.

- critère « Plantigradie »

Ce critère concerne cette fois la position du tarse.

Il s'évalue de la même façon que la palmigradie.

- critère « Démarche »

L'opérateur place le chien à un bout de la pièce, puis se poste à l'autre bout et il l'appelle pour que le chien parcoure quelques mètres. Il peut également l'attirer avec des croquettes ou un jouet.

Il est également intéressant d'observer le déplacement par l'arrière.

Si la démarche est chaloupée ou que le chien réalise des sauts de lapin, on inscrit la note 1.

Si la démarche est raide, saccadée, la note obtenue est 2.

- critère « Transfert de poids »

On évalue, sur le chien de profil, la position des membres rapport à la verticale.

Si les membres postérieurs sont ramenés sous l'abdomen et le corps penché sur l'avant, la note sera de 2.

- critère « Sautillement »

La manipulation du chien s'effectue de la même façon que le test neurologique de même nom : on soulève l'arrière-train du chien en passant un bras sous l'abdomen, on soulève un membre antérieur avec l'autre bras, et on fait déplacer le chien sur un membre.

Si le chien peut faire plus d'une dizaine de pas sans tomber, il obtient la note 0.

Si aucun déplacement n'est possible, la note sera de 2.

L'examen doit être réalisé pour les 2 membres antérieurs ; si les notes diffèrent entre le membre gauche et le droit, on inscrira la note moyenne.

La myopathie dystrophique du Golden Retriever ne s'accompagnant pas de troubles neurologiques, ce test, qui explore la proprioception inconsciente, révèle ici surtout la faiblesse musculaire.

- critère « Fermeté des muscles proximaux »

Il est évalué sur le chien en décubitus latéral, pour obtenir un relâchement musculaire optimal. On palpe les muscles du bras (en particulier le triceps brachial et le biceps brachial) et de la cuisse (notamment le sartorius et le biceps fémoral). On note la fermeté générale, le volume du muscle, les contractures, les éventuelles zones fibrosées.

- critère « Rétractions musculo-tendineuses »

Le chien étant toujours en décubitus latéral, on mobilise ses membres, de la racine jusqu'aux doigts, en alternant flexion et extension.

On note la résistance des articulations.

Chez un chien sain, on réussit à étendre le membre antérieur jusqu'à la hanche vers l'arrière et aussi loin que possible vers l'avant, parallèlement à l'axe du corps ; le membre postérieur peut être ramené jusqu'à l'oreille vers l'avant (par contre un chien myopathe est incapable de se gratter l'oreille), et dans le prolongement du tronc vers l'arrière.

- critère « Réflexe patellaire »

Toujours en décubitus latéral, après avoir réalisé quelques mouvements de flexion-extension du membre postérieur pour détendre les muscles, on teste l'amplitude du réflexe patellaire à l'aide d'un marteau, sur les 2 genoux, en soutenant le membre.

De même que le test du sautiller, le réflexe patellaire permet de témoigner de la fibrose musculaire (il permet habituellement d'explorer le nerf fémoral et une partie de la moëlle lombaire).

- critère « Relevé »

Le chien étant couché, on se met à distance et on l'appelle pour qu'il se lève.

On apprécie la facilité et la vitesse de redressement du chien.

- critère « Franchissement d'obstacle »

On attire le chien de l'autre côté d'un obstacle (barre horizontale dont la hauteur est proportionnelle à la taille du chien : environ 10 cm pour les jeunes et 20 cm pour les adultes).

On peut également observer la facilité du chien à rentrer dans son box (bordure surélevée).

Tableau 6 : Grille de scores cliniques utilisée au laboratoire de l'UETM















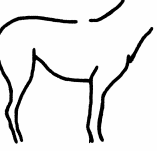

<b>Laboratoire de Neurobiologie / UETM (version 1.f. Juin 2004)</b>				
<b>Quantification des signes cliniques sur chiens dystrophiques (GRMD, LRMD)</b>				
Chien ID :		Date de l'examen :		
Protocole :		Opérateur :		
CRITERES	Valeurs des signes cliniques			
	0	1	2	note
Dysphagie (1)	Aucune difficulté pour s'alimenter Repas rapide (croquettes)	Allongement du temps (plusieurs heures) (ou a/d ND , Fortol ND)	Incapacité à avaler aliment qui reste au fond de la gueule (sonde de gastrostomie)	
Dysphagie (2) Ptyalisme	Absent	Ptyalisme possible/intermittent	Ptyalisme prononcé/permanent	
Dysphagie (3) Langue	Normale	Base légèrement élargie	Base très élargie	
Ouverture buccale	Pas d'ankylose	Ankylose débutante Ouverture > 45°	Ouverture buccale réduite Ou Ouverture < 45°	
Activité générale	Animal joueur, vient vers les gens	Activité diminuée, reste dans son coin, déplacement lent	Animal en décubitus latéral	
Respiration	Normale	Polypnée	Abdominale/discordance	
<b>Ss-total /12</b>				
1. Position des doigts (appui)	Serrés en appui = normale	Faiblement écartés	Fortement écartés en appui	
2. Palmigradie	Absence	Modérée	Prononcée	
3. Plantigradie	Absence	Modérée	Prononcée	
4. Démarche	Normale	Raideur généralisée débutante Bunny hopping possible	Raideur généralisée prononcée (Abduction des coudes, Adduction des genoux)	
5. Transfert de poids	Absent		Poids placé sur l'avant	
6. Sautillement	Normal	Réduit (chute au bout de 4-5 foulées)	Impossible	
7. Fermeté des muscles proximaux	Normale à la palpation	Fermeté, rigidité musculaire généralisée Débutante	Fermeté, rigidité musculaire généralisée prononcée	
8. Rétractions musculotendineuses	Absentes	Ankylose débutante	Ankylose articulaire prononcée (vicieuse)	
9. Réflexes patellaires	Présents vifs	Présents diminués	Absents	
10. Relevé (déc. Latéral)	Normal	Ralenti	Impossible	
11. Franchisst. Obstacle	Normal	Réduit/limité/ralenti	Impossible	
<b>Ss-total /22</b>				
<b>Total /34</b>				

Remarques : Pour certains critères, on pourra utiliser les notations 0,5 et 1,5 (cf. posters décisionnels)

Tableau 7 : Poster décisionnel pour la sous-partie « digestif et respiratoire »

<b>CRITERES</b>	<b>0</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>	<b>1,5</b>	<b>2</b>
<b>Dysphagie : vitesse d'ingestion</b>	Aucune difficulté pour s'alimenter ; Repas rapide ; croquettes	Croquettes + pâtée	Allongement du temps (plusieurs heures) (ou a/d, fortol)	Difficulté à avaler aliment	Incapacité à avaler aliment ; sonde de gastrostomie
<b>Dysphagie : Ptyalisme</b>	Absent		Ptyalisme possible/intermittent		Ptyalisme prononcé /permanent
<b>Dysphagie : palpation de la base de la langue</b>	Base normale		Base légèrement élargie		Base très élargie
<b>Ouverture buccale</b>	Pas d'ankylose		Ankylose débutante Ouverture > 45°	Ouverture = 45°	Ouverture buccale réduite Ou Ouverture < 45°
<b>Activité générale</b>	Animal joueur, vient vers les gens		Activité diminuée, reste dans son coin, déplacement lent		Animal en décubitus latéral
<b>Respiration</b>	Normale		Polypnée	Alternance polypnée- discordance	Abdominale / discordance

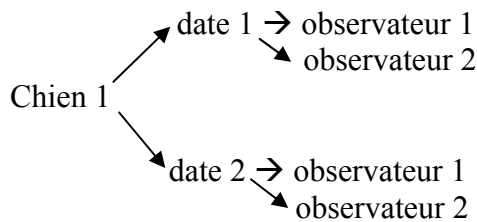
Tableau 8 : Poster décisionnel pour la sous-partie « locomoteur »

SCORES	0	0,5	1	1,5	2
Ouverture buccale				Ouverture = 45°	
Position des doigts (en appui)	Serrés 		Faiblement écartés 		Fortement écartés en appui 
Palmigradie	Absence (angle =90°) 	90°<Angle<45°	Modérée (angle=45°) 	Angle < 45°	Prononcée (angle=0°) 
Plantigradie	Absence (angle =90°) 	90°<Angle<45° 	Modérée (angle=45°) 	Angle < 45° 	Prononcée (angle=0°) 
Démarche	Normale	Raideur cervicale	Raideur généralisée débutante		Raideur généralisée prononcée
Transfert de poids	Absent 		Début de transfert de poids		Poids placé sur l'avant 

### I. D. 3) Traitement des données

#### I. D. 3) a. Saisie des données

En fin de protocole, l'ensemble des notes est regroupé dans un fichier Excel selon la dichotomie suivante :



etc.

#### I. D. 3) b. Tri des notes

Les notes ont été classées selon 3 regroupements :

- groupe « chiens adultes stables » : les notes permettent d'étudier la part de la variabilité inter-chien et l'effet de l'observateur ;
- groupe « chiens jeunes en évolution clinique » : ce groupe permet d'évaluer la sensibilité de la notation ;
- ensemble des chiens notés sur 3 jours consécutifs par l'ensemble des opérateurs : les notes servent de support à l'étude de la reproductibilité.

#### I. D. 3) c. Simplification des données

Afin de faciliter le traitement des données, on regroupe les dates par « semaine » (délai de X jours pendant lequel on considère que les notes appartiennent à la même épreuve).

D'après l'expérience acquise grâce à l'observation des chiens, on considère que sur un délai maximum de 7 jours, l'état clinique d'un chien est stable (sauf événement important).

On choisit la date de la première note comme étant le début de l'épreuve ( $S_n$ ).

Si la note est effectuée pendant ce délai de 7 jours par plusieurs opérateurs → les notes appartiennent à la même semaine ( $S_n$ ).

Si un événement survient pendant ce délai (intervention, protocole ou maladie) → les notes suivantes appartiennent à une épreuve différente (semaine  $S_{n+1}$ ).

Pour les calculs statistiques, on retiendra au final :

- les notes de 2 observateurs (IB et MC), les autres intervenants n'ayant pu réaliser la notation chaque semaine, pendant un maximum de 17 semaines,
- dans un premier temps, on ne traitera que les données obtenues sur les 11 chiens adultes disponibles (Rouble, Sam, Scoubidou, T-fal, T-fou, Tintin, Titeuf, Tsar, Ucal, Usky, Uzel),  
soit 129 notes par observateur.

### I. D. 4) Validation statistique de l'échelle (Cf. tableau 9)

Cette étape sera détaillée dans le chapitre « résultats et discussion »

Tous les critères cités dans le tableau sont interdépendants. Par exemple, sensibilité et reproductibilité sont inversement corrélées : si on augmente le nombre d'items d'une grille d'évaluation afin de la rendre plus sensible, on aboutit à une perte de la reproductibilité (ce qui est le cas pour la méthode des scores cliniques, cf. infra).

Quant à la spécificité, elle est liée aux critères pratiques et économiques.

Tableau 9 : Critères d’appréciation d’une méthode d’évaluation (d’après [3] et [33])

Type de Critère	Composantes		Méthode de calcul	Application à la grille de scores
<b>CRITERES METROLOGIQUES</b>	<b>Validité *</b> . Un manque de validité se traduit par des erreurs systématiques ou biais (le résultat est toujours différent de la vraie valeur, et la différence est toujours dans le même sens).	<b>Spécificité</b> = capacité de l’échelle à ne mesurer qu’un seul phénomène.	-	→ Gravité de l’état clinique d’un chien myopathe. Les animaux évalués sont tous myopathes ; un animal sain obtient la note 0.
		<b>Consistance interne</b> = permet d’apprécier l’homogénéité de la méthode par l’homogénéité des items entre eux et leur appartenance à un même domaine.	-	Evaluée par le degré de corrélation d’un item par rapport à l’ensemble des autres items et la place relative de chacun (→ pondération kappa)
	<b>Sensibilité*</b> . L’augmentation de la sensibilité est généralement obtenue en augmentant le nombre d’échelons dans l’échelle.		-	Les scores attribués à tous les animaux, à différents moments doivent donc couvrir l’ensemble de l’échelle. (→ courbes)
	<b>Reproductibilité*</b> . A une grande reproductibilité correspond une faible variabilité inter-observateur. A une bonne reproductibilité correspondent une bonne fiabilité et une bonne répétabilité.	<b>Répétabilité</b> : une échelle est répétable lorsque le jugement d’un même observateur est stable au cours du temps. A une bonne répétabilité, correspond une variabilité intra-observateur faible. <b>Fiabilité* (ou précision)</b> . Un manque de fiabilité de l’instrument de mesure se traduit par des erreurs aléatoires et donc des mesures imprécises. En recherche, un manque de fiabilité augmente la variabilité instrumentale de l’observation, ce qui rend les données plus difficiles à analyser et à interpréter ; on risque aussi de ne pas détecter des phénomènes de faible intensité qui sont « couverts » par le bruit de l’erreur de mesure.	1) Calcul du coefficient de variation pour la variabilité intra-observateur. 2) Calcul du coefficient de concordance entre les différentes mesures (score global mais aussi des différents items). Si les items ont une réponse nominale ou ordinale ("pas du tout"/"un peu"/"beaucoup"), on doit utiliser le coefficient Kappa. 3) Calcul du coefficient de corrélation intraclass.	1) Etude des coefficients de variation pour les chiens adultes, en fonction de l’observateur. 2) Calcul de l’accord entre juges par le coefficient Kappa (comparaison des scores attribués par 2 observateurs évaluant un même animal, au même moment, en l’absence de toute concertation. Les scores doivent être similaires). 3) Modèle linéaire analysé par le logiciel SAS.
<b>CRITERES PRATIQUES</b>	<b>Facilité de mise en œuvre</b> : Elle renvoie au type de matériel nécessaire pour l’évaluation ainsi qu’aux besoins en personnel et en temps. La méthode d’évaluation idéale ne requiert que peu de matériel, peu de temps et une seule personne.		Le seul instrument spécifique nécessaire est un marteau-réflexe, et la notation peut être réalisée en 15 minutes par un seul observateur.	
	<b>Robustesse</b> : capacité de l’échelle à s’adapter à des conditions de terrain variables.			
<b>Critères économiques</b> : Toute méthode d’évaluation a un coût et le critère économique est loin d’être un aspect mineur lors du choix de la méthode.				

## I. E. ANALYSE D'ENREGISTREMENTS VIDEO

Le principe est d'enregistrer l'activité des chiens en cage en vue d'obtenir des durées d'activité comparables entre chien sain et chien malade d'une part, et chien malade avant et après traitement d'autre part.

Les résultats alors obtenus étant des valeurs numériques, il est plus facile de comparer objectivement les animaux.

### I. E. 1) Les caméras Axis

#### I. E. 1) a. Descriptif et mode de fonctionnement

Les caméras « Axis 2130 et 2130R PTZ » sont des caméras IP pilotables (PTZ pour « Pan, Tilt, Zoom, cf. caractéristiques techniques en annexe 8), commandées par un logiciel comprenant un mode Administrateur (utilisé pour la configuration du système) et un mode Moniteur (qui permet de contrôler les enregistrements).

Les caméras peuvent être programmées pour une semaine grâce à un calendrier.

Pour chaque journée, il est possible de choisir l'heure de début et de fin d'enregistrement, autant de fois que nécessaire.

Les caméras sont déclenchables par détection de mouvement ou selon un horaire fixé.

Nous avons choisi ce second mode d'enregistrement, afin de pouvoir prendre en compte tous les comportements, y compris les périodes d'inactivité des animaux.

Les caméras peuvent être fixes ou motorisées (l'orientation peut être commandée depuis un ordinateur) et peuvent être fixées au plafond au dessus des cages grâce à un aimant.

Le logiciel d'enregistrement fournit des images qu'il faut ensuite convertir en fichier AVI grâce à un encodeur vidéo (le codec choisi ici est IndeoVideo 5.10).

Cf. manuel d'utilisation du logiciel Axis Camera Recorder en annexe 9.

#### I. E. 1) b. Contraintes techniques

##### *\* Anomalie de flux d'images*

La mémoire interne des caméras étant de faible capacité (caméras conçues pour la surveillance de locaux), nous avons été confrontés à des pertes d'images, et donc une distorsion entre la durée effective des fichiers AVI et la durée réelle des séquences (parfois jusqu'à une perte de 50%).

Après de nombreux tests, nous avons donc décidé :

- de réduire la qualité des vidéos à 20 images par secondes, au lieu de 25 pour une qualité parfaite, ce qui permet de limiter les pertes d'images tout en conservant une qualité acceptable ;
- d'utiliser le codec Indeo Video ;
- d'utiliser une compression du volume des fichiers AVI de 85% grâce à ce codec.

##### *\* Problème de la longueur des câbles Ethernet*

La distance maximale réglementaire d'un câble Ethernet (sans relais) est de 90 à 100 mètres.

Les câbles Ethernet de l'UETM dépendent d'un concentrateur éloigné ; le câblage fait de nombreux détours entre les différents services desservis, ce qui aboutit à une longueur de câble d'environ 115m entre le concentrateur et le matériel de l'UETM (caméras et ordinateurs).



Cette anomalie pourrait être à l'origine des pertes d'images lors de l'enregistrement des séquences vidéo (l'information part des caméras IP jusqu'au concentrateur, puis revient à l'ordinateur de l'UETM, ce qui double la distance parcourue).

Diverses solutions ont été proposées (changement de concentrateur, installation de fibres optiques, installation de disques durs supplémentaires...), il a finalement été décidé l'installation d'une connexion directe entre les caméras et le PC grâce à un switch. Ce dispositif a fortement amélioré la disparition des images, mais n'a pas totalement résolu le problème, ce qui nous a amenés à nous interroger sur la qualité des caméras.

#### *\* Problème d'assistance technique*

La société Axis, pourtant basée à quelques kilomètres du laboratoire de l'UETM, a difficilement accepté d'intervenir sur place pour déterminer la source du problème.

Le technicien du service après-vente n'a pas pu résoudre le défaut du flux d'images et n'a pas pu nous orienter vers un autre logiciel de traitement d'images ; la perte d'image conséquente nous a interdit de réaliser un fichier AVI transposable en vidéo analogique et il a donc été impossible d'effectuer une analyse d'actimétrie ou même le calcul automatisé d'un pourcentage d'activité.

Nous avons donc décidé d'investir dans l'achat d'un piano éthologique, proposé par la société View Point.

### I. E. 1) c. Paramétrage des caméras et échantillonnage des séquences

Les caméras peuvent être paramétrées grâce au logiciel Axis Camera Recorder (Axis Communications AB, Axis Camera Recorder version 1.01, Lund, 2003)

#### *\* Positionnement des caméras*

Le réglage des caméras « PTZ » pilotables est effectué à partir du mode « Administrateur », grâce aux flèches de positionnement.

Les caméras doivent être réglées de telle façon que le centrage soit au centre de la cage, et le cadrage concerne toute la surface de la cage, y compris les angles, et jusqu'à un mètre de hauteur.

#### *\* Vitesse d'enregistrement*

La vitesse d'enregistrement sélectionnée est de 20 images/s, pour avoir une fluidité d'images suffisante tout en économisant la mémoire des caméras.

#### *\* Mode d'enregistrement*

Pour sauvegarder les images dans la mémoire interne des caméras, nous avons dû choisir un enregistrement en continu (« Toujours ») pendant les périodes sélectionnées, car le mode de déclenchement « sur événement » ne fonctionne pas sur notre installation.

De plus si les caméras ne se déclenchaient qu'avec le mouvement des animaux, les périodes d'inactivité ne seraient pas comptabilisées et on n'obtiendrait pas le reflet réel de l'activité des animaux sur une période donnée.

Le logiciel indique toutefois lorsque les animaux sont en mouvement (l'indicateur devient rouge quand le seuil de détection est dépassé).

Le nombre maximum d'images sauvegardées dans la base de données est de 600 000, ce qui permet de conserver 8h d'enregistrement (calcul :  $(600000/20)/3600 = 8,33$  h). Au-delà, il faut utiliser un autre support pour la sauvegarde des données.

### *\* Programmation du calendrier*

Nous avons été contraint d'enregistrer en mode continu ; par contre, nous pouvons déterminer les périodes d'enregistrement afin d'obtenir un **échantillonnage** des enregistrements.

Les contraintes qui nous sont imposées sont les suivantes : la durée d'éclairage dans le laboratoire et la durée minimale d'enregistrement programmable par le calendrier des caméras.

Dans la salle où sont placées les caméras et les chiens, un éclairage automatique est programmé selon un rythme nyctéméral (12h de jour, 12h de nuit).

Les caméras n'étant pas équipées de système infrarouge, les enregistrements sont réalisables uniquement pendant la période d'éclairage, entre 7h et 19h.

Pour être représentatif, l'échantillonnage des enregistrements doit couvrir toute la période d'éclairage, mais pour des raisons évidentes de faisabilité, il n'est pas possible d'enregistrer 12h d'affilée chaque jour.

Concernant l'étude d'activité d'animaux, le principe est d'avoir recours à des enregistrements de courte durée, mais réalisés à une fréquence suffisante pour pouvoir recenser tous les comportements.

La durée minimum d'enregistrement est fixée par le constructeur à 5 minutes.

Nous avons donc choisi de programmer le calendrier des caméras pour des enregistrements par périodes de 5 minutes toutes les 30 minutes, de 8h à 18h30, ce qui aboutit à 22 séquences quotidiennes, pendant 4 jours consécutifs (22 barres violettes apparaissent chaque jour sur le calendrier).

### I. E. 1) d. Mise en place du système

Les enregistrements sont réalisés par groupe de 2 animaux.

Les animaux sont placés dans des cages individuelles du secteur P2, de dimensions suffisantes pour permettre un coin couchage et un coin élimination (les cages mesurent 105 cm de profondeur sur 160 cm de largeur).

La cage est divisée en 2 dans la largeur : la moitié de la cage est équipé d'un bac (environ 10 cm de hauteur) rempli de litière où les animaux peuvent faire leurs besoins ; l'autre moitié est équipé d'un caillebotis en plastique.

Les chiens (adultes et jeunes) peuvent s'allonger dans le coin couchage sans être gênés (dans le sens de la largeur, de la longueur et sur la diagonale).

Aucun jouet n'est placé dans la cage, pour ne pas augmenter l'activité de façon artificielle.

Les 2 caméras PTZ sont fixées au plafond grâce à un aimant, au dessus des cages.

Une période d'adaptation est prévue : les chiots sont placés 2 jours avant et les adultes une semaine avant le premier jour d'enregistrement (les adultes ont une moindre capacité d'adaptation, on prévoit donc une période plus longue).

L'activité du personnel n'est pas modifiée pendant les enregistrements, pour maintenir un niveau de stimulation de base ; cependant une fiche d'intervention est placée à l'entrée du secteur P2. Chaque personne pénétrant dans le P2 doit y apposer son nom, l'heure d'entrée et de sortie et le motif d'intervention. La fiche est renouvelée quotidiennement et archivée afin de s'y référer pour pouvoir expliquer d'éventuelles modifications importantes d'activité des animaux (affinité particulière avec certains animaliers, périodes de curage et d'alimentation, soins et administration des traitements, réalisation des scores, etc.).

### I. E. 1) e. Sauvegarde des données

La base de données des caméras est paramétrée pour sauvegarder le maximum d'informations, soit 600 000 images, à raison de 25 images/seconde (la caméra peut donc garder environ 24h d'enregistrement avant que les images les plus anciennes soient effacées).

Le menu « Avancé » du mode « Moniteur » permet de sauvegarder les images sous forme de fichier AVI et de libérer ainsi de la mémoire de la base de données des caméras.

On choisit l'heure de début et l'heure de fin de la séquence à exporter, on donne un nom au fichier AVI à créer, et on sélectionne un codec de compression.

Ici, les fichiers seront nommés sous la forme « Nom du chien Jour Séquence.AVI, par exemple Spirou J2 06 correspond à enregistrement de Spirou, Jour 2, séquence 6 (10h30-10h35).

Les fichiers AVI sont ensuite stockés sur des DVD.

Au total, un peu plus de 1600 fichiers AVI ont été sauvegardés sur 34 DVD.

### I. E. 1) f. Echantillonnage des animaux

Etant donné la perte de temps liée aux soucis techniques causés par les caméras, il n'a pas été possible d'analyser toutes les séquences enregistrées.

Après avoir éliminé les animaux qui ne pouvaient être inclus dans l'analyse pour des raisons techniques (absence de déclenchement des caméras, apparition d'une affection nécessitant la mise sous perfusion pendant les enregistrements...), nous avons donc procédé à un **tirage au sort** de « lots » de deux chiens (c'est-à-dire le binôme de chiens enregistrés en même temps) dans chaque catégorie :

- chiens adultes sains : Roupie et Spirou,
- chiens adultes myopathes : Rouble et Sam,
- chiots sains : Venom et Vetrapp (frères),
- chiots myopathes : Valgus et Varus (frères).

Les chiens ont pu être appariés en fonction de leur âge (Roupie et Rouble ont le même âge) pour pouvoir ensuite comparer leur niveau d'activité.

Il reste, à ce moment de l'étude, un peu plus de 700 séquences à analyser.

### I. E. 1) g. Tri des fichiers AVI

Avant d'analyser l'activité des animaux, il faut vérifier la concordance entre les films et les séquences réelles, en raison de la distorsion observée lors du paramétrage.

La totalité des fichiers AVI est visionnée à vitesse rapide pour vérifier la durée effective des séquences, la vitesse de déroulement et l'absence de saut d'images.

De nombreux fichiers présentent des pertes d'images ; pour garder une quantité de données suffisante pour l'analyse, on tolérera une distorsion minimale : on ne garde que les fichiers dont la durée est comprise entre 4 minutes 50 et 5 minutes 10.

Au final, 634 fichiers AVI exactement ont été retenus pour analyse (soit environ 10% de données inutilisables).

## I. E. 2) Le logiciel Labwatcher

Ce logiciel (View Point, Labwatcher version 1.1.0, Champagne au Mont d'Or, 2002) est commercialisé par la société View Point, spécialisée dans l'étude vidéo des animaux de laboratoire (souris, primates...).

Le logiciel est en fait un piano éthologique qui permet d'obtenir un fichier Excel à partir de la visualisation d'un fichier numérique AVI ou d'une cassette vidéo.

L'opérateur sélectionne divers comportements dignes d'intérêt et leur affecte une touche du clavier informatique.

Cf. annexe 10 : Guide d'utilisation du logiciel Labwatcher, et figure 24 : Fenêtre active du logiciel.

La chose à bien définir avant toute cotation est le type de comportement qui peut être analysé par le logiciel :

- les événements : actes ponctuels, comptabilisés sous formes d'occurrences sans notion de durée (par exemple : sauter) ;
- et les états, qui fournissent la durée d'un comportement (par exemple : manger).

Les événements sont comptabilisés par une simple pression sur la touche associée (système push on-hold).

Quant aux états, le début et la fin du comportement sont obtenus en appuyant une première fois sur la touche pour le début une seconde fois à la fin de l'action (système start/stop).

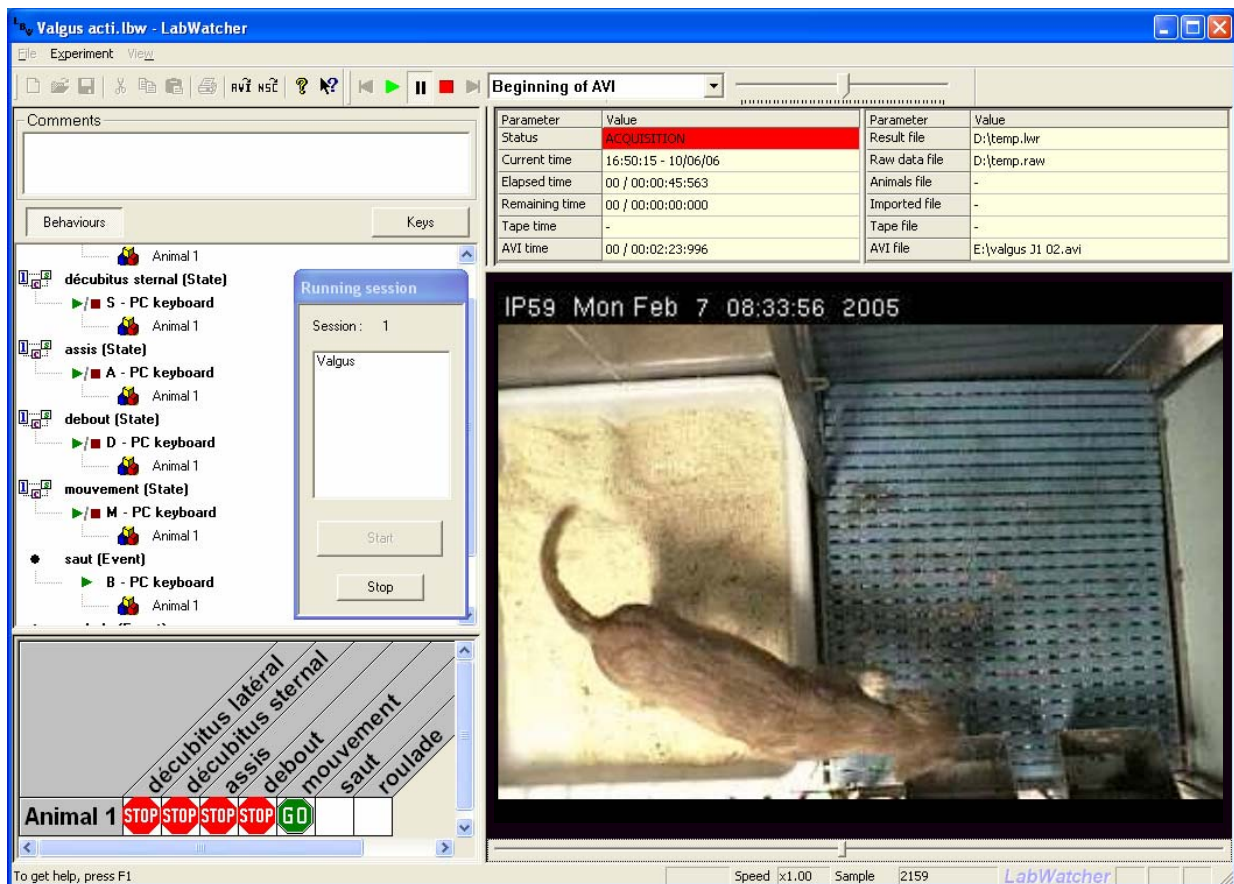
L'opérateur visualise le film et appuie sur les touches désirées. Le traitement des fichiers AVI par ce biais nécessite concentration, réflexes et dextérité qui doivent faire l'objet d'un entraînement préalable. Pour faciliter l'apprentissage, il est possible de coller des vignettes avec le nom du comportement sur les touches du clavier correspondantes.

Le logiciel convertit ensuite ces données en feuille de calcul Excel.

Une ligne correspond soit à une occurrence d'un événement, soit au début ou à la fin d'un état.

Il faut ensuite calculer les durées pour chaque comportement et totaliser les occurrences de chaque état.

Figure 24 : Fenêtre du logiciel Labwatcher en cours d'analyse



L'ensemble des comportements analysés est listé sur la gauche, avec le rappel des touches correspondantes.

La fenêtre en bas à gauche indique quel comportement est réalisé par l'animal.

### I. E. 3) Choix des comportements étudiés

Les cotations de l'activité physique et de l'activité alimentaire ont été réalisées séparément, car les comportements pouvaient se superposer : le chien peut être assis et manger en même temps.

Ceci permet de plus d'appuyer le principe et les observations tirés de la grille de scores :

- l'analyse de la durée d'alimentation permet de confirmer la dysphagie,
- l'analyse de l'activité permet de corroborer le dysfonctionnement musculaire.

#### I. E. 3) a. Comportements relatifs à l'activité motrice

Les comportements sélectionnés pour cette étude sont classés en fonction de l'activité musculaire mise en jeu, c'est-à-dire le nombre de muscles sollicités ou l'intensité de l'effort musculaire (en rapport avec la description clinique de la maladie) :

→ Evénements :

- saut : le chien se surélève sur ses membres postérieurs ou saute par-dessus un obstacle.
- roulade : en position couchée, le chien roule sur lui-même.

→ Etats :

- décubitus latéral : le chien est couché, les 4 membres étendus latéralement (tonus musculaire proche de zéro).
- décubitus sternal : position couchée autre que le décubitus sternal (position en sphinx, ou en rond).
- assis.
- debout : chien debout sur 2 ou 4 membres, en position statique d'une durée supérieure à une seconde.
- mouvement : chien en déplacement d'au minimum 2 pas successifs.

### I. E. 3) b. Comportements relatifs à l'activité alimentaire

Deux états sont choisis en relation avec la capacité de déglutition :

- mange : durée de préhension et de mastication des aliments (hors coprophagie), c'est-à-dire à partir du moment où l'animal prend les aliments dans la gamelle, les mastique, et jusqu'à ce qu'il les déglutisse.
- boit : durée d'abreuvement.

NB : Ici, la notion de prise alimentaire n'inclut pas le comportement de fourragement puisque les aliments sont fournis par l'homme.

## II. RESULTATS ET DISCUSSION

### II. A. GRILLE DE SCORES CLINIQUES

#### II. A. 1) Analyse statistique

Le but de cette analyse est d'effectuer la validation\* de la grille afin qu'elle puisse être utilisée lors d'essais cliniques, par n'importe quel observateur.

Nous nous limiterons ici à l'étude de la reproductibilité de la grille, nous n'utiliserons donc que les cotations réalisées sur des animaux non évolutifs (chiens adultes).

Il faut d'abord vérifier si les critères choisis sont bien adaptés et si les observateurs sont d'accord sur leur évaluation, puis on évaluera l'influence de l'opérateur, du jour et du chien sur la note globale.

##### II. A. 1) a. Etude de la spécificité

La grille ne doit mesurer qu'un seul phénomène : la gravité de l'état clinique d'un chien myopathe.

Or on sait que tous les animaux évalués sont myopathes, puisque le dépistage est effectué avant l'arrivée des animaux et que le diagnostic est connu dès le début des séances de scoring ; d'autre part un animal sain obtient la note 0.

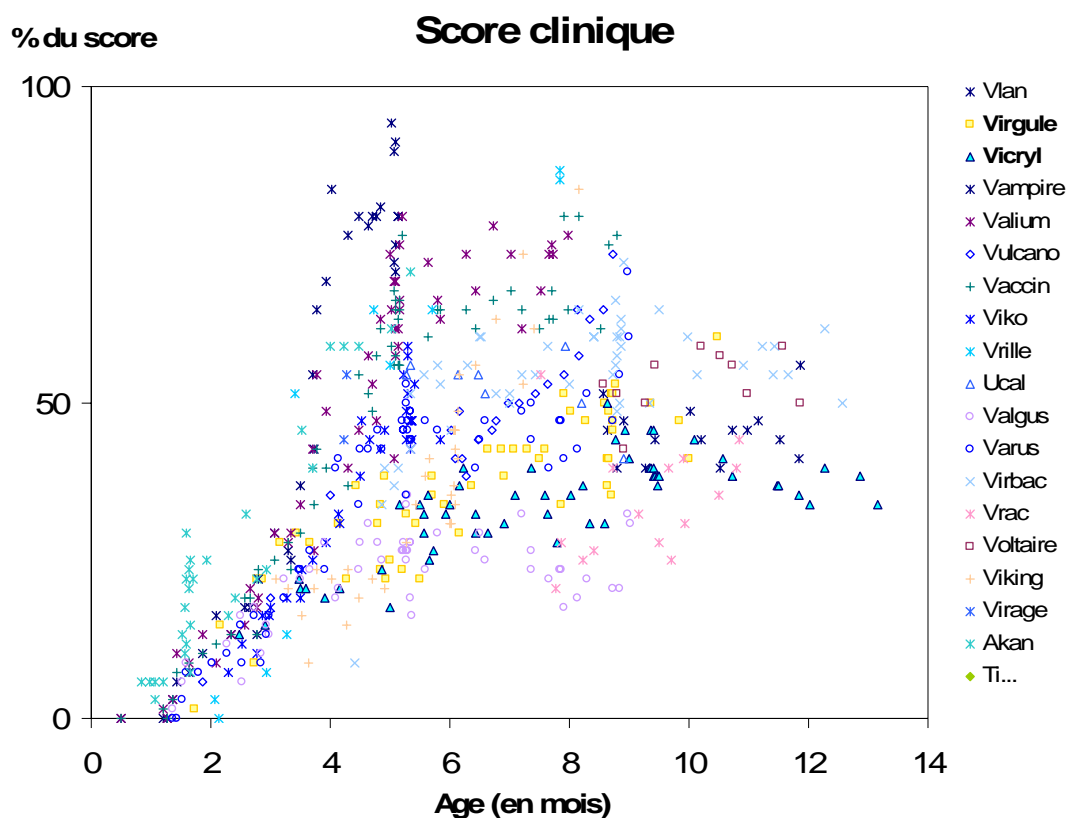
La grille est donc spécifique de l'objet de la mesure.

##### II. A. 1) b. Etude de la sensibilité

La grille doit être capable de refléter tous les stades cliniques de la maladie et les notations doivent couvrir toute l'échelle.

La courbe ci-dessous (figure 25) représente les notations effectuées sur 18 chiens pendant leur croissance, par les 5 observateurs sur une période d'un an, regroupées sur le même nuage de points.

Figure 25 : Scores cliniques effectués sur des chiens de 15 jours à 13 mois



En abscisse figure l'âge des animaux en mois et en ordonnées les notes obtenues par les opérateurs, ramenées à un pourcentage du score total. Chaque point de couleur représente l'évolution d'un chien myopathe au cours du temps.

L'allure générale du nuage de points reflète le développement clinique de l'affection : les jeunes chiens expriment peu de symptômes (notes faibles et regroupées), alors qu'après 4 mois, 2 évolutions sont possibles : soit les notes se stabilisent (chiens qui peuvent survivre plusieurs années avec un handicap modéré), soit elles croissent de façon exponentielle jusqu'à la note maximale (chiens dont la survie ne dépassent pas un an, avec des symptômes très marqués).

La grille de notation reproduit donc bien l'histoire naturelle de la maladie. Ceci doit faire l'objet d'une analyse statistique complète qui ne sera pas traitée ici.

## II. A. 1) c. Etude de la reproductibilité

Pour cette partie, nous n'avons pu utiliser que les notes de 2 observateurs (IB et MC), les résultats des autres observateurs étant en nombre insuffisant pour pouvoir être traités.

### II. A. 1) c. $\alpha$ . Étude de la répétabilité : variabilité intra-observateur

Avant d'effectuer une analyse informatique complète, on peut juger de la répétabilité du scoring en observant la notation d'un même observateur au cours du temps, à partir des scores listés sur les chiens myopathes adultes.



Voyons ce qu'il en est pour les observateurs IB et MC avec la notation de 11 chiens adultes (cf. figures 26 et 26bis).

Figures 26 et 26bis : Notation des observateurs en pourcentage du score total pour chaque semaine d'observation (étude de la répétabilité intra-observateur)

Figure 26 : Notation de l'observateur IB

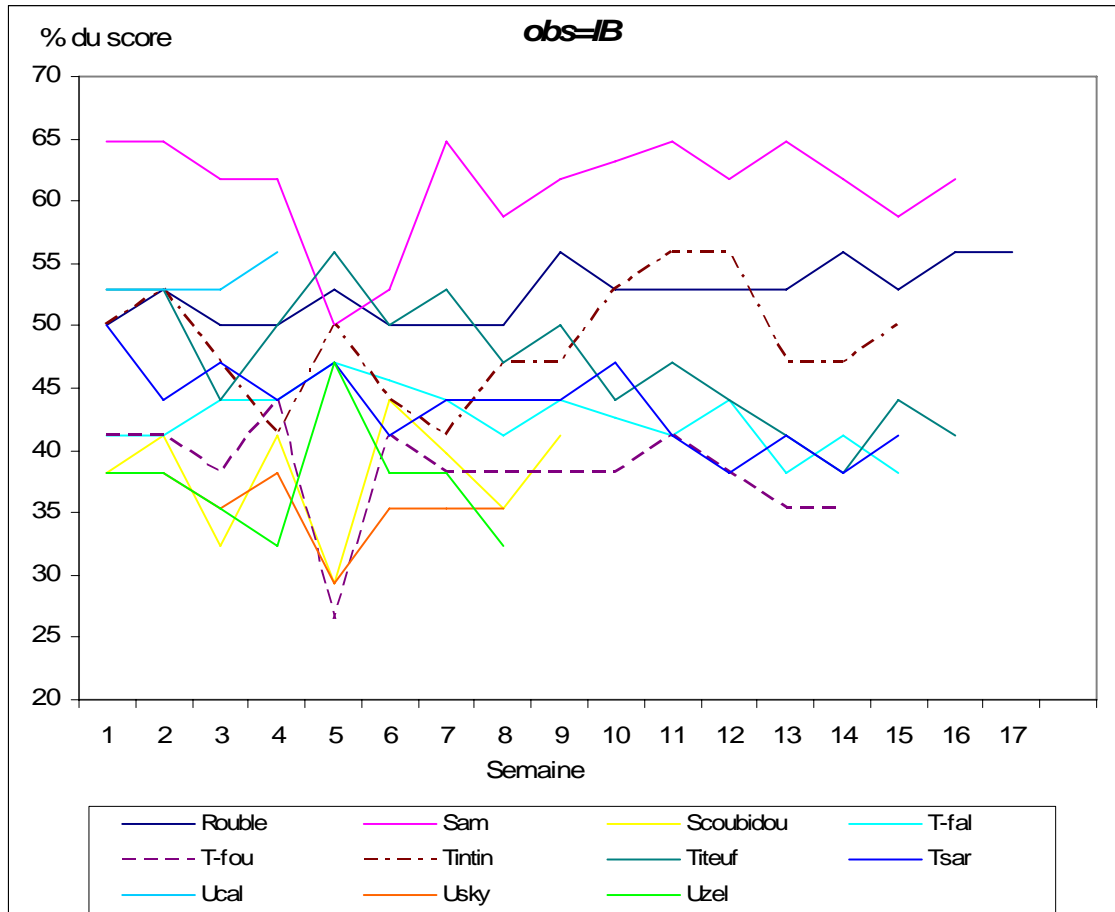
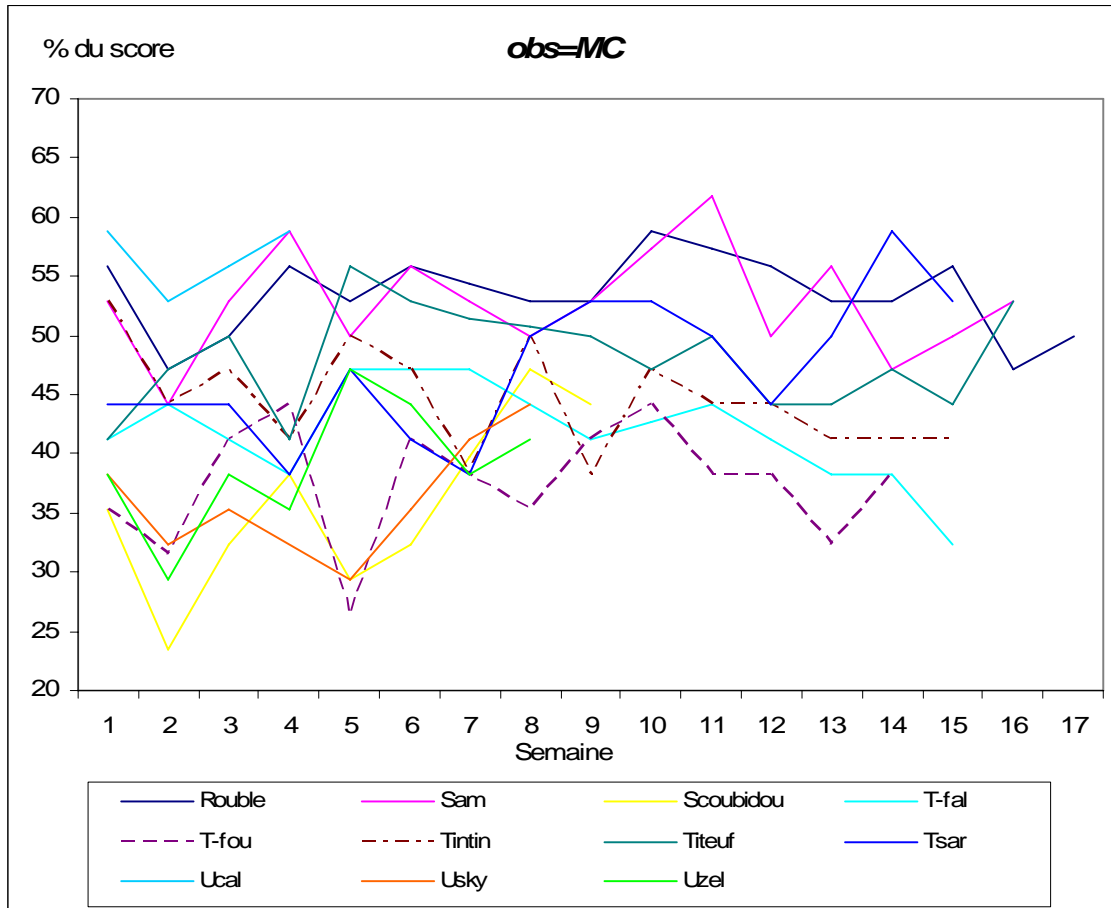


Figure 26bis : notation de l'observateur MC



Chaque courbe représente l'état d'un chien pendant 17 semaines.

En abscisse figure le temps en semaine et en ordonnées les notes obtenues par les opérateurs, ramenées à un pourcentage du score total.

Les notations des 2 observateurs sont plus ou moins stables dans le temps (cf. analyse statistique), sauf pour la semaine 5 (semaine du 15 juillet 2005), où on observe une forte variation de la notation.

Après recherche dans l'historique des animaux, aucun événement ne permet d'expliquer ce phénomène, sauf éventuellement le fait que cette semaine se situe pendant la période de vacances du laboratoire et que les observateurs étaient moins concentrés.

D'autre part, les 2 opérateurs ont réalisé des scores en commun pendant cette semaine, leur jugement a donc pu être influencé. En effet, pour les 2 opérateurs, la variation des notations évolue dans le même sens pour cette semaine 5, puis les notes reviennent à leur valeur antérieure.

La notation de l'observateur IB est plus stable sur les chiens adultes que celle de l'observateur MC : les courbes IB ont moins l'aspect « en dents de scie » que les courbes MC.

En fait, ces graphiques sont insuffisants pour démontrer une bonne répétabilité.

Pour pouvoir analyser la répétabilité il faut répéter l'examen clinique sur une période courte. Or on sait que c'est impossible car l'examen lui-même peut modifier le comportement de l'animal. Pour les courbes présentées, on ne sait donc pas si les différences d'une semaine à une autre sont dues à une évolution ou fluctuation de l'état clinique de l'animal ou aux défauts de l'examen et du scoring. En réalité on sous-estime ici la répétabilité.

Pour chaque chien, on peut alors calculer un coefficient de variation (CV) :

$$CV = \text{écart-type/moyenne}$$

Si les CV obtenus sont inférieurs à 30% on pourra dire que malgré l'espacement entre les examens le CV est faible et ainsi la vraie répétabilité est très bonne [25bis].

Cf. Tableaux 10 et 11 : résultats des CV pour chaque observateur et pour chaque chien. (Voir également en annexe 11 l'ensemble des notations des 2 observateurs pour chaque chien pendant les 17 semaines d'observation).

Tableau 10 : Résultats de l'observateur IB : moyenne, écart-type et coefficient de variation pour chaque chien adulte observé pendant 17 semaines.

Donnée \ Chien	Rouble	Sam	Scoubidou	T-fal	T-fou	Tintin	Titeuf	Tsar	Ucal	Usky	Uzel
Moyenne	52,60	57,17	33,66	36,67	38,24	48,63	40,99	43,53	53,68	35,66	37,50
Ecart-type	2,30	4,37	5,08	2,56	4,16	4,57	5,22	3,37	1,47	2,91	4,65
Coefficient de variation	4,37	7,65	15,09	6,98	10,88	9,39	12,73	7,75	2,74	8,17	12,40

Tableau 11 : Résultats de l'observateur MC : moyenne, écart-type et coefficient de variation pour chaque chien adulte observé pendant 17 semaines.

Donnée \ Chien	Rouble	Sam	Scoubidou	T-fal	T-fou	Tintin	Titeuf	Tsar	Ucal	Usky	Uzel
Moyenne	53,14	52,55	35,29	41,40	37,54	44,51	47,69	47,25	56,62	36,03	38,97
Ecart-type	3,42	4,43	7,70	4,07	4,99	4,43	4,49	5,93	2,82	4,91	5,39
Coefficient de variation	6,44	8,43	21,82	9,82	13,30	9,95	9,42	12,55	4,97	13,62	13,83

Ces tableaux reprennent et synthétisent les valeurs utilisées pour les courbes des figures 26 et 26bis.

Les coefficients de variation calculés à partir des notes des 2 observateurs IB et MC sont tous inférieurs à 30% (et même toujours inférieurs à 15% sauf pour le chien Scoubidou), on a donc ici une très bonne répétabilité malgré le nombre de notes parfois élevé et l'espacement variable entre les séances de scoring.

D'autre part, nous verrons plus loin si l'effet de l'observateur est réellement significatif.

*II. A. 1) c. β. Étude de la fiabilité : calcul de la concordance inter-observateur critère par critère*

Pour évaluer la fiabilité de la grille de notation, on effectue un calcul de l'accord entre juges grâce au coefficient Kappa.  
Il se calcule de la façon suivante :

$$\mathbf{Kappa} = \frac{\mathbf{Po-Pe}}{\mathbf{1-Pe}}$$

où Po correspond au pourcentage de mesures concordantes observées,  
et Pe est le pourcentage de mesures concordantes que l'on observerait si le résultat du score était le fruit du hasard seul (calculé à partir d'un tableau croisé théorique où aucune liaison entre les notations successives ne serait observée).  
La valeur du coefficient Kappa est comprise entre +1 (accord parfait) et 0 (accord nul) voire même -1 (désaccord complet). On dispose de valeurs seuils pour connaître la signification du coefficient calculé (cf. tableau 12).  
En pratique, la reproductibilité est jugée acceptable lorsqu'elle possède une valeur supérieure à 0,6.

Tableau 12 : Signification de la valeur du coefficient Kappa.

Valeur de Kappa	Force de l'accord
0	même fiabilité que accord lié au hasard
0,01-0,20	accord léger
0,21-0,40	accord moyen
0,41- 0,60	accord modéré
0,61- 0,80	accord substantiel
0,81- 0,99	accord presque parfait
1	accord parfait

Pour chaque critère de la grille de scores, on construit un tableau qui croise les résultats des deux observateurs (tableau croisé dynamique), chien par chien, ce qui permet de calculer le coefficient Kappa de chaque critère ; puis on calcule le coefficient Kappa moyen pour un critère donné.

Le principe est le suivant : on construit 2 tableaux de ce type, l'un pour les valeurs observées, l'autre pour les valeurs théoriques.

		Observateur 1		
		Note x	Note y	
Observateur 2	Note x	Nombre d'accords	Nombre d'accords	Nombre de notes
	Note y	Nombre d'accords	Nombre d'accords	Nombre de notes
		Nombre de notes	Nombre de notes	Nombre total de notes

Le coefficient Kappa vaut :

$$\text{Kappa} = \frac{\text{Nombre d'accords observés} - \text{nombre d'accords théoriques}}{\text{Nombre total de notes} - \text{nombre d'accords théoriques}}$$

Pour mieux comprendre la méthode, voir en annexe 12 un exemple de calcul de coefficient Kappa pour le critère Dysphagie.

Les résultats obtenus pour les notes brutes (c'est-à-dire les notes initiales récoltées après les séances de scoring, utilisant la notation 0-0,5-1-1,5-2) ne sont pas satisfaisants, presque toutes les valeurs de Kappa étant inférieures à 0,6.

Or on se souvient que les notes 0,5 et 1,5 n'ont été introduites que secondairement dans le but d'augmenter la précision et la sensibilité de la notation quand l'observateur hésitait entre 2 propositions, et l'on sait que lorsqu'on augmente la précision, on diminue la reproductibilité puisqu'on augmente la variabilité inter-opérateur.

Il faut donc recalculer les coefficients Kappa en ne tenant compte que des notations 0, 1 et 2 pour chaque critère. Pour cela on arrondit les notes au point entier supérieur (il faut que toutes les notes soient modifiées dans le même sens).

Puis on compare les résultats des valeurs de Kappa dans 2 situations :

- en considérant la notation par demi-point
- en considérant la notation par point entier.

Cf. tableau 13.

Tableau 13 : Résultats des calculs de coefficients Kappa pour chaque critère de la grille.

	<b>kappa moyen</b>	
	Notation par demi-point	Notation par point entier
<b>Critère</b>		
Dysphagie	0,11	0,64
Ptyalisme	0,12	0,16
Largeur de la base de la langue	0,10	0,09
Ouverture buccale	0,15	0,35
Activité	0,78	0,89
Respiration	0,04	0,04
Ecartement des doigts	0,14	0,38
Palmigradie	0,04	0,19
Plantigradie	0,05	0,35
Démarche	0,03	0,54
Transfert de poids	0,62	0,62
Sautillement	0,16	0,15
Fermeté des muscles proximaux	0,13	0,08
Rétractions musculo-tendineuses	0,14	0,28
Réflexe patellaire	0,29	0,38
Relevé	0,09	0,16
Franchissement d'obstacle	0,01	0,20

D'une part, on constate que les coefficients Kappa pour la notation par point entier sont bien meilleurs, il faut donc supprimer la notation par demi-point.

On remarque également que pour certains critères, les valeurs du coefficient Kappa sont faibles même avec le second calcul (en particulier pour les critères langue, respiration et fermeté musculaire).

Il faut donc se poser la question de la justification de ce critère : puisque les observateurs ne sont pas d'accord sur la notation du critère, est-il fiable ? Quel crédit peut-on lui donner ? Ce critère peut-il diminuer la reproductibilité de la grille ?

On calcule alors de nouvelles notes globales : on affecte à chaque critère le coefficient Kappa correspondant, pour donner un poids relatif à ce critère. On diminue ainsi le poids des critères peu fiables et on augmente celui des critères facilement reproductibles.

Ceci permet de plus de valider la **consistance interne** de cette méthode de mesure.

D'autre part, on peut trier les critères étudiés en 3 catégories :

- critères peu fiables ( $Kappa < 0,20$ ) : ptyalisme, largeur de la base de la langue, respiration, palmigradie, sauttillement, fermeté des muscles proximaux, relevé ;
- critères fiables ( $0,2 \leq Kappa < 0,60$ ) : degré d'ouverture buccale, écartement des doigts, plantigradie, démarche, rétractions musculo-tendineuses, réflexe patellaire, franchissement d'obstacle ;
- critères très fiables ( $Kappa \geq 0,60$ ) : dysphagie, activité générale, transfert de poids.

Cette classification indique sur quels critères il faudra être plus rigoureux lors des réalisations ultérieures de scores.

On modifie donc la méthode de calcul du score : au lieu de simplement additionner les valeurs obtenues pour chaque critère, on effectue une pondération par les coefficients Kappa correspondants pour obtenir une formule du type **Score =  $\Sigma$  (note x coefficient)**.

Cf. tableau 14.

Tableau 14 : Nouveau calcul du score clinique.

Note dysphagie x 0,64
Note ptyalisme x 0,16
Note langue x 0,09
Note ouverture buccale x 0,35
Note activité x 0,89
Note respiration x 0,04
Note écartement des doigts x 0,38
Note palmigradie x 0,19
Note plantigradie x 0,35
Note démarche x 0,54
Note transfert de poids x 0,62
Note sauttillement x 0,15
Note fermeté des muscles proximaux x 0,08
Note rétractions musculo-tendineuses x 0,28
Note réflexe patellaire x 0,38
Note relevé x 0,16
Note franchissement d'obstacle x 0,20
<b>Score = <math>\Sigma</math> (note x coefficient)</b>

La note obtenue étant difficile à manier, on la ramène ensuite à un pourcentage du score maximal.

Le score varie donc entre 0 (note 0) et 100 % (note 34 de départ)

On peut d'ailleurs vérifier que la pondération améliore la concordance entre les opérateurs en comparant les courbes de régression réalisées avec les notes initiales et les notes pondérées.

Cf. annexe 13. Les notes sont exprimées en pourcentages. Les courbes roses correspondent aux courbes réalisées avec les notes initiales, et les courbes bleues se rapportent aux notes pondérées.

L'objectif est d'obtenir une droite de régression du type  $y = ax + b$  où  $a$  tend vers 1 et  $b$  tend vers 0, c'est-à-dire  $y = x$  (les notes des 2 observateurs seraient égales). La valeur  $b$  correspond au décalage entre la notation des 2 observateurs.

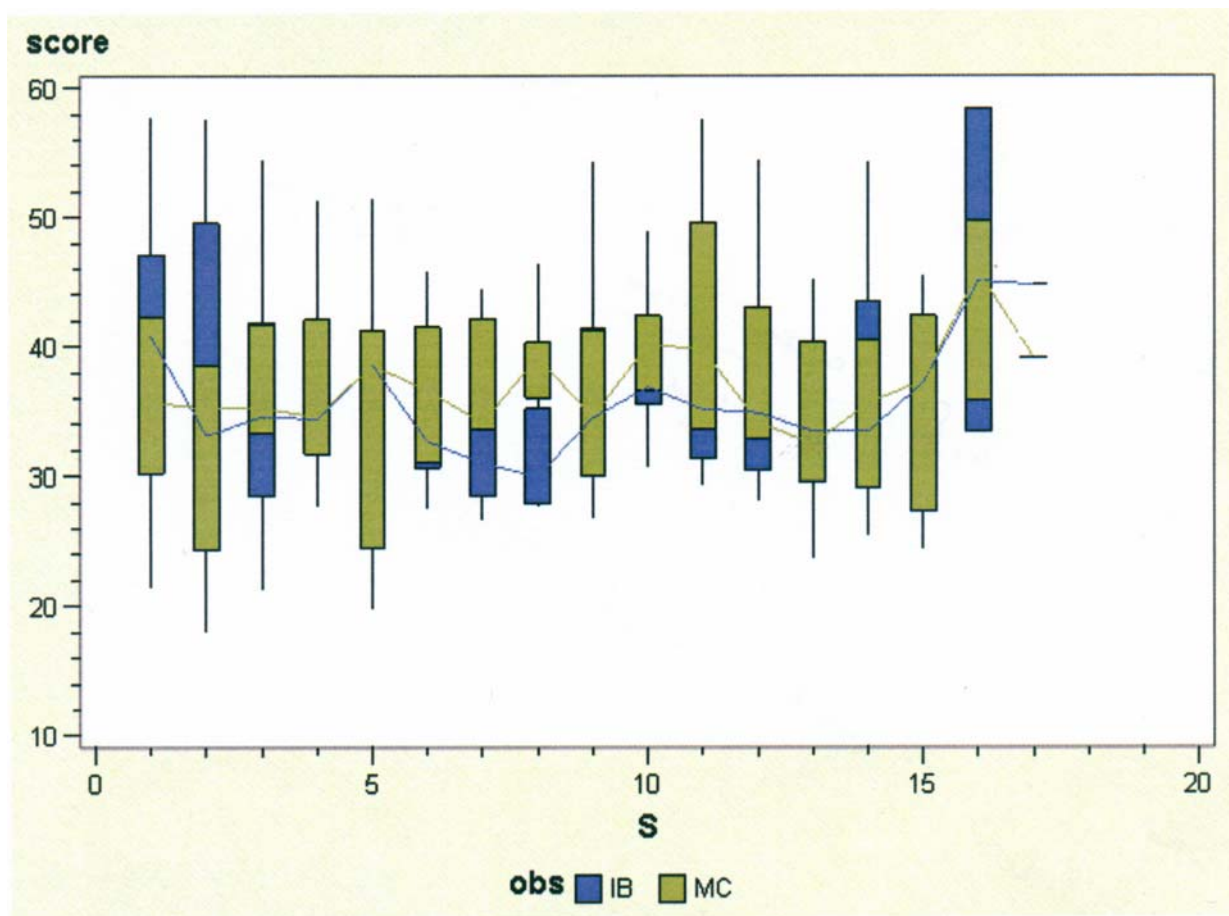
Parmi les 11 chiens considérés :

- dans 4 cas, la concordance est fortement améliorée (augmentation de  $a$  et diminution de  $b$ ) ;
- dans 4 cas, la pondération ne modifie pas la corrélation ;
- enfin, dans 3 cas la corrélation est légèrement dégradée.

La pondération est donc globalement positive pour la reproductibilité de la notation.

On peut d'ailleurs le vérifier avec l'étude du graphique suivant dit en « Box Plot » (cf. figure 27).

Figure 27 : Représentation de la notation après pondération, par observateur et par semaine.



Ce graphe représente l'ensemble des notes réalisées sur les 11 chiens adultes en fonction de la semaine (soit 22 notes par semaine).

Chaque « boîte » représente les notes relevées par un observateur pendant la semaine S sur les 11 chiens (boîtes bleues pour l'observateur IB, boîtes vertes pour l'observateur MC).

Les courbes bleue (observateur IB) et verte (observateur MC) relient les points correspondant à la médiane de chaque boîte.

Les barres verticales représentent la distance médiane  $\pm 1,5 \sigma$  (intervalle de confiance à 95%).

On peut constater que les boîtes se recouvrent presque entièrement chaque semaine, sauf pour la semaine 8 où il n'y a aucun recouvrement des notations.

Après vérification du planning et des examens subis par les chiens utilisés dans le protocole, rien ne permet d'expliquer ce manque de concordance pour la semaine considérée.

On peut alors tester la reproductibilité de la grille après ces modifications.



*II. A. 1) c.  $\gamma$ . Etude globale de la reproductibilité par calcul de variabilité à partir des notes pondérées par les coefficients kappa*

On utilise les notes des 11 chiens adultes dont l'état est stable dans le temps, pour minimiser l'effet de la maladie et n'étudier que l'effet de l'observateur et du jour d'observation.

On cherche à estimer la variance de la notation en fonction des différentes origines de fluctuations des mesures : variabilité inter-opérateur, variabilité inter-chien et variabilité inter-séance.

Le score peut être ramené à une mesure  $Y_{ijk}$  qui dépend de l'observateur  $i$ , du chien  $j$  et de la semaine  $k$ .

Comme l'ont déjà proposé Chetboul et al. lors d'évaluations de la fiabilité inter-observateurs des mesures en cardiologie par une analyse statistique [14], on a décrit le score par un modèle linéaire mixte qui permet d'expliquer la variabilité de la mesure, et qui peut s'écrire sous la forme d'une équation du type :

$$Y_{ijk} = \mu + O_i + C_j + S_k + OS_{ik} + \varepsilon_{ijk}$$

où  $Y_{ijk}$  est le score obtenu pour le chien  $j$  pendant la semaine  $k$  par l'observateur  $i$ ,

$\mu$  est la moyenne générale,

$O_i$  est l'effet fixe lié à l'observateur  $i$ ,

$C_j$  est l'effet aléatoire lié au chien  $j$ ,

$S_k$  est l'effet fixe de la semaine  $k$ ,

$OS_{ik}$  est le terme d'interaction entre la semaine et l'observateur,

et  $\varepsilon_{ijk}$  est le terme d'erreur aléatoire du modèle.

Ce modèle linéaire a été appliqué à notre jeu de données pour chaque observateur et chaque scoring, grâce au logiciel SAS (SAS Institute Inc. SAS version 9.1.3. Cary, NC, USA, 2006).

Ce logiciel permet de calculer l'effet de chaque variable.

Voyons tout d'abord quelle est l'importance des effets fixes  $O_i$  (observateur),  $S_k$  (semaine) et  $OS_{ik}$  (interaction semaine-observateur)

Le logiciel donne les valeurs suivantes :

Tableau 15 : Tests des effets fixes

Effet	Nombre de degrés de liberté 1	Nombre de degrés de liberté 2	Valeur de F (= valeur du test)	Conclusion
Observateur	1	112	1,04	NS
Semaine	16	112	0,39	NS
Observateur*semaine	16	112	1,37	NS

NB : Le logiciel réalise en fait un test F de Fischer.

Ce test est un test de significativité qui peut être employé pour tester la significativité d'un modèle de régression linéaire.

La valeur observée calculée est comparée aux valeurs contenues dans la table du F de Fischer.

Le test est significatif si la valeur calculée est supérieure à la valeur seuil pour un risque inférieur à 5%.

D'après les tables, la valeur limite de F à 5% est de 3,94 pour des degrés de liberté n1=1 et n2=112, de 1,77 pour les degrés de liberté 16 et 112.

Ici, **les 3 effets testés n'ont donc pas de rôle significatif** car dans les 3 cas, la valeur de F est inférieure à la valeur limite pour un seuil de signification à 5 % (3<sup>ème</sup> colonne).

Ces effets étant non significatifs d'après les résultats du tableau, on peut donc simplifier l'équation de la façon suivante :

$$Y_{ijk} = \mu + C_j + \varepsilon_{ijk}$$

où l'effet chien  $C_j$  suit une loi normale centrée sur 0, de variance  $\sigma^2_C$

et le terme d'erreur du modèle  $\varepsilon_{ijk}$  suit une loi normale centrée sur 0, de variance  $\sigma^2$ .

La variance de l'effet Chien et la variance de l'erreur du modèle sont alors estimées par le modèle linéaire.

On obtient les valeurs suivantes :

$$\sigma^2_{CH} = 47,57$$

Ce paramètre mesure l'effet chien (variabilité du score liée au chien).

$$\sigma^2_{\varepsilon} = 23,95$$

Ce second paramètre la variabilité du score réalisé sur un même chien, entre deux séances, ajustée sur les éventuels effets de l'observateur et de la semaine.

Ces 2 valeurs permettent de comparer les 2 effets par le calcul du coefficient de corrélation intraclasse :

$$\rho_{\text{intraclasse}} = \sigma^2_{CH} / (\sigma^2_{CH} + \sigma^2_{\varepsilon})$$

La valeur de ce coefficient s'étale de 0 à 100 %.

Plus le coefficient est élevé, plus la part de variation dans la notation est due uniquement au chien, son état, sa maladie, etc., donc plus la part liée à l'erreur et à l'environnement est diminuée.

Le coefficient permet de discriminer un chien particulier parmi un groupe.

On obtient ici la valeur :  **$\rho_{\text{intraclasse}} = 66,51 \%$**

Ceci signifie que pratiquement 67% de la notation est liée uniquement à l'effet du chien, alors que pour certains moyens de mesure de routine comme la mesure de pression artérielle avec un brassard [4bis], le coefficient de corrélation atteint au mieux 25%.

Si on multiplie les mesures, on peut encore améliorer ce coefficient.

## II. A. 2) Discussion

La difficulté principale dans la validation statistique de cette grille de scores cliniques réside dans le fait qu'il n'existe aucune méthode de référence disponible.

Sources d'erreur et de diminution de fiabilité.

Tout d'abord, nous n'avons pu nous baser que sur les résultats de 2 observateurs, en raison de la surcharge de travail des autres intervenants qui n'ont pu réaliser régulièrement les séances de scoring.

D'autre part, certains facteurs de variation de la notation ne peuvent être évités :

- la subjectivité individuelle des opérateurs,
- le niveau d'expérience et de connaissances sur les chiens GRMD (qui peut cependant être surmonté avec l'entraînement et l'apprentissage),
- la relation affective avec les chiens : si les chiens ne sont confrontés à l'opérateur que lors des séances de scoring sans autre contact positif, leurs réactions risquent d'être inhibées et peuvent fausser certains critères comme l'activité générale, le franchissement d'obstacle ou tout autre critère mettant en jeu la motivation et le stress de l'animal.

Enfin, la répétabilité réelle est difficile à évaluer car elle ne met pas en jeu que la variabilité intra-observateur, mais aussi la variation de l'état du chien, même minime.

Par exemple, dans le cas du chien Scoubidou, on a vu précédemment que les coefficients de variation obtenus pour les 2 observateurs étaient élevés. On peut expliquer le mauvais coefficient de variation obtenu par le nombre élevé de notes et leur espacement dans le temps, et par le fait que cet animal était atteint d'une cardiopathie décompensée ; on peut donc s'attendre à des fluctuations plus importantes de son état.

Points à améliorer

La mesure d'un paramètre est objective si les différences entre les résultats obtenus dans les mêmes conditions par les différents investigateurs ne sont pas significatives. Il est préférable pour cela de disposer de paramètres mesurables objectivement. [11]

Dans un essai pré-clinique (puisque c'est l'objectif d'utilisation de la grille), il importe de connaître les sources de variation susceptibles d'agir sur les paramètres mesurés afin de les maîtriser. Il devient alors possible d'imputer la variation des paramètres au traitement que l'on teste. [11]

Certaines sources de variations sont facilement identifiables : ce sont les conditions du déroulement de l'expérimentation telles que l'investigateur, l'environnement, l'heure à laquelle ont lieu les manipulations, ou la chronologie des observations. [11]

D'autre part, si la variation d'un paramètre est connue et maîtrisée pour des conditions expérimentales parfaitement définies, il devient alors possible de déterminer une variation qui sera cliniquement significative dans le cas où une modification de ces conditions intervient (ex : administration d'un traitement). [11]

De plus, avant toute chose, il aurait fallu définir :

- le nombre d'observateurs nécessaires (ici, en raison de l'indisponibilité de certains observateurs liée au surcroît de travail dans le laboratoire, nous n'avons pu utiliser que les données fournies par 2 opérateurs) ;

- le nombre de répétitions pour chaque mesure et le délai précis entre chaque mesure ;
- le nombre d'animaux requis pour les notations (mais à cause du faible nombre d'animaux disponibles, le nombre calculé aurait peut-être été supérieur au nombre de chiens présents).

Ensuite, certains facteurs peuvent et doivent être améliorés.

En effet, lorsqu'un investigateur procède de manière répétitive à la mesure d'un paramètre, il peut constater une certaine variation dans les résultats qu'il obtient. Plus cette variation est importante, moins l'interprétation du résultat est aisée. Si la procédure utilisée pour réaliser cette mesure est toujours la même, l'investigateur peut espérer diminuer sa variabilité dans l'appréciation des paramètres mesurés.

La **standardisation** des procédures est donc un caractère essentiel qui augmente la fiabilité et la reproductibilité des résultats.

Pour éviter les biais et améliorer la reproductibilité, il faut donc que les conditions de réalisation du score soient elles-mêmes précisées :

- le jour de la notation : il serait préférable d'éviter les jours de curage des différents secteurs du laboratoire, car les chiens sont déplacés et risquent d'être fatigués pour l'examen.
- l'horaire de la notation : il convient d'éviter la période post-prandiale qui pourrait modifier le ptyalisme. Les chiens étant alimentés le matin et le soir, on peut par exemple programmer les séances en début d'après-midi.
- le mode de notation : si on veut motiver le chien pour réaliser certains critères (relevé, franchissement d'obstacle) en l'attirant avec de la nourriture par exemple, il faut procéder de la même façon à chaque notation et pour tous les chiens.
- le lieu : mieux vaut se placer dans une pièce au calme sans stimulus (chien, personnes, bruits...) pour ne pas déconcentrer le chien et l'opérateur.

La réduction de la variabilité des mesures est aussi conditionnée par l'**entraînement** de l'investigateur.

Concernant le libellé proprement dit de la grille, le mode de notation peut aussi être amélioré :

- il faudra d'une part prendre soin de n'utiliser les notes intermédiaires (0,5 et 1,5) que si elles sont bien définies (cf. les posters décisionnels),
- et d'autre part ne plus utiliser une notation par demi-point difficile à manipuler, mais une notation par point entier de 1 à 5 pour chaque critère.

Ceci a pour but de limiter les hésitations et notations ambiguës qui détériorent la reproductibilité inter-observateurs.

Il faut d'ailleurs être prudent avec l'utilisation de notes intermédiaires imprécises : quand nous avons recalculé les coefficients Kappa en supprimant tous les demi-points, on a arrondi toutes les notes au demi-point supérieur. Mais dans certains cas, c'est peut-être avec la note inférieure que l'opérateur hésitait (a posteriori, on ne peut pas se souvenir des intentions de l'opérateur : en notant 1,5, il pouvait pencher plutôt vers 1 ou plutôt vers 2) : les coefficients Kappa sont donc peut-être meilleurs en réalité que ceux qu'on a calculés.

Enfin, pour améliorer la fiabilité, une seule notation par semaine par observateur est trop insuffisante : il est conseillé d'effectuer plusieurs notations sur un même chien dans une journée et utiliser la moyenne de ces notations (l'inconvénient étant qu'on peut se souvenir des notes antérieures attribuées).

De nombreux auteurs recommandent en effet d'effectuer au moins 5 mesures par détermination pour chaque chien un jour donné, et de considérer la moyenne de ces valeurs comme résultat final [4bis, 25bis] : la valeur moyenne doit avoir un écart-type maximum de 20%.

Habituellement, afin d'améliorer la capacité d'un test à différencier les sujets observés, on cherche à augmenter ce coefficient de reproductibilité.

Au lieu d'utiliser une valeur par séance de mesure, on réalise donc k mesures et la moyenne des mesures est utilisée.

Le coefficient de corrélation intraclasse devient alors :

$$\rho \text{ intraclasse} = \sigma^2_{CH} / (\sigma^2_{CH} + (1/k) \sigma^2_{\epsilon})$$

On voit bien grâce à cette formule qu'on diminue la part de la variabilité liée à l'erreur du modèle.

Cependant, tout en multipliant les mesures par chien, il faudra limiter le nombre de chiens à coter quotidiennement pour éviter la lassitude qui entraîne un manque d'attention et donc des erreurs de jugement.

L'étude de la sensibilité au changement, non traitée ici mais indispensable à la validation statistique complète de la grille, fera l'objet d'une étude ultérieure.

Conclusion :

L'utilisation de la grille de scores demande peu de moyens techniques et financiers, mais l'entraînement et l'accord des opérateurs sont cruciaux.

Pour que cette méthode d'évaluation semi-quantitative puisse prendre tout son sens et que l'interprétation des résultats soit possible et reconnue, il faut donc disposer d'une méthode standardisée et d'un investigateur entraîné.

## II. B. ANALYSE DE L'ACTIVITE PAR ENREGISTREMENTS VIDEO

### II. B. 1) Traitement et interprétation des résultats

#### II. B. 1) a. Traitement des résultats fournis par le logiciel

Le logiciel fournit des tableaux Excel qu'il faut ensuite traiter pour calculer et totaliser les durées et les occurrences de chaque comportement étudié.

Pour faciliter le travail, une macro est programmée :

- remplacement du point par une virgule et modification du format de cellule dans les 2 premières colonnes (format standard → format nombre avec 2 décimales) ;
- inscription de l'intitulé de chaque colonne (durée ou occurrence de chaque comportement et durée totale).

Les colonnes inutiles (colonnes B, C, D, E du tableau 16) sont ensuite supprimées pour faciliter la lecture du fichier.

Il faut ensuite calculer la durée de chaque séquence de comportement en se repérant avec les cases « Start » et « End » et inscrire la formule dans la case correspondante (par exemple au croisement de la ligne « End » et de la colonne « debout »).

Cette étape ne peut pas être automatisée grâce à une macro car l'emplacement des cellules concernées n'est pas fixe d'un fichier à l'autre.

Enfin, on totalise en bas de tableau la durée ou l'occurrence de chaque comportement pour la séquence vidéo considérée.

Cf. tableaux 16 et 17 avant et après analyse.

On répète ces manipulations pour l'ensemble des fichiers vidéo, une première fois pour l'analyse du comportement alimentaire et une seconde fois pour l'activité locomotrice.

Au total, 634 fichiers AVI d'une durée de 5 minutes ± 10 secondes (soit 53 heures) puis 634 fichiers Excel ont été analysés et traités deux fois.

Les dernières lignes de chaque fichier correspondant à l'analyse d'une séquence vidéo sont ensuite reportées dans un fichier regroupant toutes les séquences, pour chaque chien (soit 8 fichiers pour le comportement alimentaire et 8 pour l'activité locomotrice).

Cf. en annexes 14 et 15 la présentation des résultats pour le chien Spirou.

Les fichiers AVI n'ont pas tous la même durée en raison des pertes d'image, les durées brutes ont donc été rapportées au temps global d'enregistrement représenté par un indice 100, ce qui revient à exprimer les résultats globaux par des pourcentages. Il sera ainsi plus facile de comparer les degrés d'activité en fonction de l'âge et du statut pathologique du chien.

Enfin, les totaux des occurrences et des durées de comportement, ainsi que les pourcentages correspondants, sont listés dans un fichier résumant les résultats pour les 8 chiens étudiés.

Nous verrons d'abord les résultats globaux pour les 4 jours d'étude, puis nous étudierons les données quotidiennes grâce à une analyse statistique. Les durées brutes comportementales et posturales sont rapportées au temps global d'enregistrement.

Toutes ces données sont transformées par la transformation "Arcsinus" (d transformée =  $\arcsin(\sqrt{d})$ ).

Les données ont été analysées soit par des ANOVAs pour les données comportementales concernant l'alimentation, soit par une MANOVA modèle linéaire généralisé d'analyse de variance, pour les données posturales (locomotion).

Les données comportementales peuvent être considérées comme indépendantes. Il n'en va pas de même pour les postures. Dans tous les cas, les facteurs considérés dans le modèle sont le statut génétique des individus et l'âge. L'interaction entre ces deux facteurs a également été introduite dans le modèle.

Le seuil de signification est fixé à 0,05 pour tous ces tests bilatéraux.

Tableau 16 : Exemple de tableau de résultats avant analyse (Spirou J2 06)

	A	B	C	D	E	F	G
1	0	0	0	71	0		
2	0.04	0.04	0	23	0	START	Décubitus latéral
3	77.8	77.8	0	23	0	STOP	Décubitus latéral
4	78.11	78.11	0	23	0	START	Assis
5	130.49	130.49	0	23	0	STOP	Assis
6	130.59	130.59	0	23	0	START	Debout
7	133.93	133.93	0	23	0	STOP	Debout
8	134.06	134.06	0	23	0	START	Mouvement
9	136.46	136.46	0	23	0	STOP	Mouvement
10	136.59	136.59	0	23	0	START	Debout
11	138.28	138.28	0	23	0	EVENT	Saut
12	150.74	150.74	0	23	0	STOP	Debout
13	150.84	150.84	0	23	0	START	Mouvement
14	159.87	159.87	0	23	0	STOP	Mouvement
15	159.96	159.96	0	23	0	START	Debout
16	206.09	206.09	0	23	0	STOP	Debout
17	206.18	206.18	0	23	0	START	Mouvement
18	207.75	207.75	0	23	0	STOP	Mouvement
19	207.87	207.87	0	23	0	START	Debout
20	274.12	274.12	0	23	0	STOP	Debout
21	274.18	274.18	0	23	0	START	Mouvement
22	281.9	281.9	0	23	0	STOP	Mouvement
23	282.03	282.03	0	23	0	START	Décubitus sternal
24	310	310	0	23	0	STOP	Décubitus sternal
25	310	310	0	72	0		

Les colonnes A et B donnent le début et la fin du comportement (lignes START et STOP), la colonne F donne le type de comportement (start/stop pour les états ou event pour les évènements) et la colonne G le nom du comportement.



Tableau 17 : Exemple de tableau de résultats après analyse (Spirou J2 06)

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1				Durée Déc. Latéral	Durée Déc. sternal	Durée Assis	Durée Debout	Durée Mouve- ment	Durée Totale	Nombre de roulades	Nombre de sauts
2	0,04	START	Déc. latéral								
3	77,8	STOP	Déc. latéral	77,8							
4	78,11	START	Assis								
5	130,49	STOP	Assis			52,69					
6	130,59	START	Debout								
7	133,93	STOP	Debout				3,44				
8	134,06	START	Mouvement								
9	136,46	STOP	Mouvement					2,53			
10	136,59	START	Debout								
11	138,28	EVENT	Saut								1
12	150,74	STOP	Debout				14,28				
13	150,84	START	Mouvement								
14	159,87	STOP	Mouvement					9,13			
15	159,96	START	Debout								
16	206,09	STOP	Debout				46,22				
17	206,18	START	Mouvement								
18	207,75	STOP	Mouvement					1,66			
19	207,87	START	Debout								
20	274,12	STOP	Debout				66,37				
21	274,18	START	Mouvement								
22	281,9	STOP	Mouvement					7,78			
23	282,03	START	Déc. sternal								
24	310	STOP	Déc. sternal		28,1						
25	310										
26			Total	77,8	28,1	52,69	130,31	21,1	310	0	1

La dernière ligne du tableau fournit le total des durées pour chaque comportement pendant une séquence d'enregistrement.

## II. B. 1) b. Résultats et interprétation de l'activité alimentaire

Le tableau 18 regroupe les durées totales d'alimentation et d'abreuvement pour chaque chien pendant les 4 jours d'enregistrement, ramenées à un pourcentage par rapport à la durée totale d'enregistrement.

Les données obtenues pour chaque jour d'enregistrement chien par chien sont disponibles en annexes 16 et 17.

Tableau 18 : Synthèse de l'analyse de la durée de prise alimentaire

	Chiens	durée mange (%)	durée boit (%)
Adultes Sains	Roupie	1,61	0,41
	Spirou	0,48	0,32
Adultes malades	Rouble	9,08	2,82
	Sam	5,64	4,84

Jeunes Sains	Venom	0,00	0,24
	Vetrap	0,05	0,49
Jeunes Malades	Valgus	4,37	2,36
	Varus	5,46	3,63

Ce tableau permet de constater que :

- les chiens adultes sains passent 5 à 10 fois moins de temps à manger que les chiens malades de même âge ;
- les chiots sains mangent si rapidement que les séquences d'alimentation n'apparaissent pas dans les enregistrements ;
- le temps passé à manger augmente avec l'âge du chien malade ;
- la durée d'abreuvement chez les animaux malades est environ 10 fois plus élevée que chez les animaux sains.

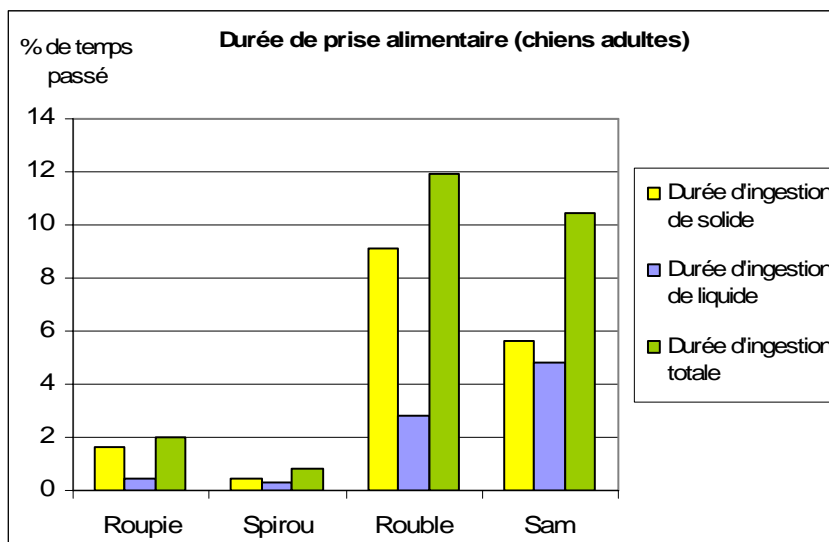
### *II. B. 1) b. α. Analyse graphique de l'activité alimentaire*

Pour tous les graphiques suivants, en ordonnées figure la durée de temps passé pour chaque comportement exprimé en pourcentage de temps passé par rapport à la durée totale de vidéo, et en abscisse figurent les noms des chiens.

- Activité alimentaire des chiens adultes

Les données relatives aux durées d'alimentation, d'abreuvement et la durée totale d'ingestion sont reportées dans l'histogramme ci-dessous pour les 4 chiens adultes étudiés. (cf. figure 28)

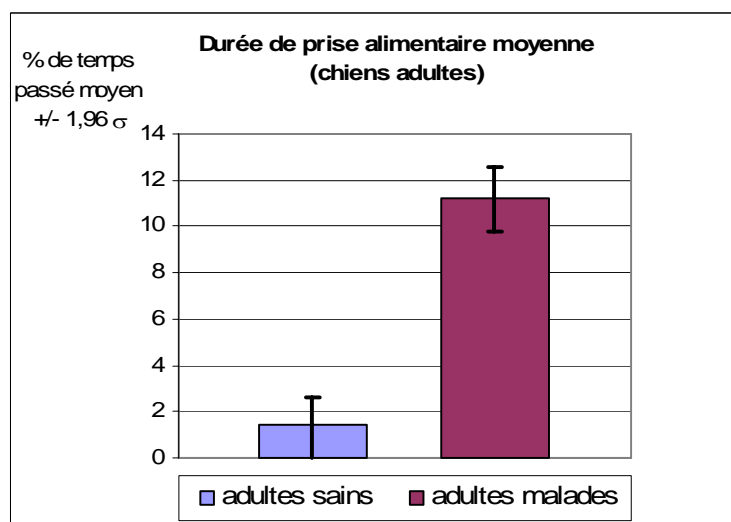
Figure 28 : Durée de prise alimentaire chez les chiens adultes exprimée en pourcentage du temps total.



On remarque clairement que les adultes sains passent nettement moins de temps que les adultes myopathes à manger aussi bien qu'à boire, ce qui reflète bien la difficulté de déglutition des chiens myopathes.

Si on réalise un graphique représentant la durée moyenne d'ingestion totale, les intervalles de confiance ne se recouvrent pas : la différence est donc significative. (cf. figure 29)

Figure 29 : Durée de prise alimentaire moyenne en fonction du statut des chiens, et intervalles de confiance associés.



Le pourcentage moyen de temps passé à s'alimenter est au moins 5 fois plus élevé chez les chiens myopathes testés par rapport aux animaux sains de même âge.

- **Activité alimentaire des jeunes**

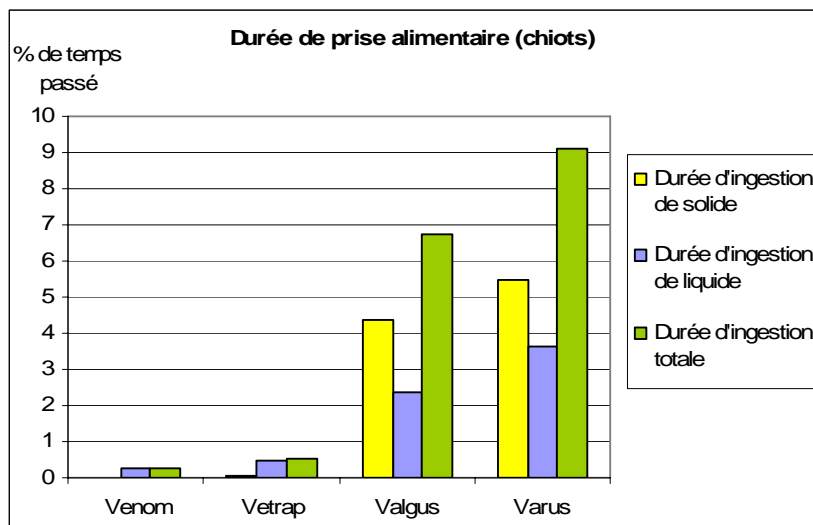
Les données sont regroupées dans les 2 graphiques suivants (cf. figures 30 et 31).

On peut apporter les mêmes remarques que pour les adultes : la durée d'alimentation est significativement différente, et la différence est même encore plus marquée.

En effet, chez les chiots l'évolution de la maladie peut être rapide et la dysphagie devient rapidement importante, alors que les adultes ont atteint un état stable.

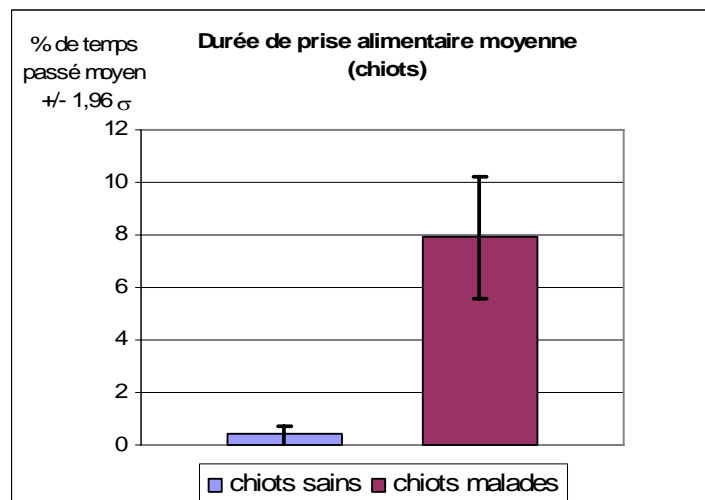
Varus et Valgus ont d'ailleurs dû subir une intervention pour pose d'une sonde de gastrostomie avant l'âge d'un an.

**Figure 30** : Durée de prise alimentaire chez les chiots exprimée en pourcentage du temps total.



Chez les jeunes chiens sains, le temps consacré à l'alimentation et la boisson est très réduit. Pour Venom, la période de prise d'aliments solides est si courte qu'elle ne peut être recensée dans les enregistrements vidéo.

**Figure 31** : Durée de prise alimentaire moyenne en fonction du statut des chiots, et intervalles de confiance associés.



Grâce aux valeurs moyennes, on peut constater que les chiots malades passent environ 15 fois plus de temps à s'alimenter que les chiots sains.

Ces observations doivent être confirmées par un calcul statistique.

### *II. B. 1) b. $\beta$ . Analyse statistique de l'activité alimentaire*

On effectue un test F de Fischer grâce à un logiciel statistique équivalent à celui utilisé pour la validation de la grille de scores cliniques.

(cf. annexes 16 et 17 pour les valeurs utilisées dans l'analyse de variance)

La valeur limite de F à 5% pour les degrés de liberté correspondants (1 et 28) est égale à 4,20.

En ce qui concerne l'alimentation, les chiens non porteurs de la mutation et les chiens les plus jeunes quel que soit leur statut génétique, passent moins de temps à manger que les chiens porteurs de la mutation ou les plus âgés (Effet de la mutation,  $F_{1/28} = 43,66$ ,  $p < 0,0001$ ; Effet de l'âge,  $F_{1/28} = 4,89$ ,  $p < 0,035$ ). La mutation influence plus la durée d'alimentation que l'âge.

En ce qui concerne la prise de boisson, l'ensemble des chiens sains, quel que soit leur âge, passent significativement moins de temps à boire que ceux porteurs de la mutation, (Effet de la mutation,  $F_{1/28} = 97,53$ ,  $p < 0,0001$ ).

Conclusion : l'analyse de l'activité alimentaire permet clairement de mettre en évidence les différences de vitesse d'ingestion entre les animaux malades et les animaux sains.

Cette donnée peut permettre de confirmer de façon quantitative les observations faites avec la grille de score (critère « Dysphagie (1) »).

Cette méthode quantitative donne donc une mesure objective de la difficulté de déglutition et le dépouillement des données nécessite un temps raisonnable.

Ceci permet d'éviter une méthode plus simple et plus rapide, mais beaucoup plus coûteuse (la vidéodéglutition par radioscopie).

### *II. B. 1) c. Résultats et interprétation de l'activité locomotrice*

Les données obtenues pour chaque jour d'enregistrement chien par chien sont disponibles en annexes 18 et 19.

Les résultats par chien et par type d'activité sont regroupés dans le tableau 19.

Tableau 19 : Synthèse de l'analyse d'activité

Chien		Durée Déc. latéral(%)	Durée Déc.sternal(%)	Durée assis(%)	Durée debout(%)	Durée mouvement(%)	Nombre roulades	Nombre sauts
		Durée inactivité (%)			Durée activité (%)			
Adultes sains	Roupie	16,74	46,79	6,88	24,30	5,29	0	172
		63,53			29,59			
Adultes sains	Spirou	9,45	33,73	7,76	45,44	4,98	0	144
		43,18			50,42			
Adultes malades	Rouble	24,36	15,02	40,91	17,25	2,47	0	261
		39,37			19,72			
Adultes malades	Sam	5,57	36,43	27,78	28,76	1,47	0	0
		42,00			30,22			
Jeunes sains	Venom	26,85	31,62	23,45	12,68	5,40	10	125
		58,47			18,08			
Jeunes sains	Vetrap	21,80	34,77	25,97	11,64	5,82	6	171
		56,57			17,46			
Jeunes malades	Varus	28,30	47,19	12,01	9,86	2,64	0	57
		75,49			12,50			
Jeunes malades	Valgus	36,41	33,20	15,05	11,60	3,74	4	18
		69,61			15,34			

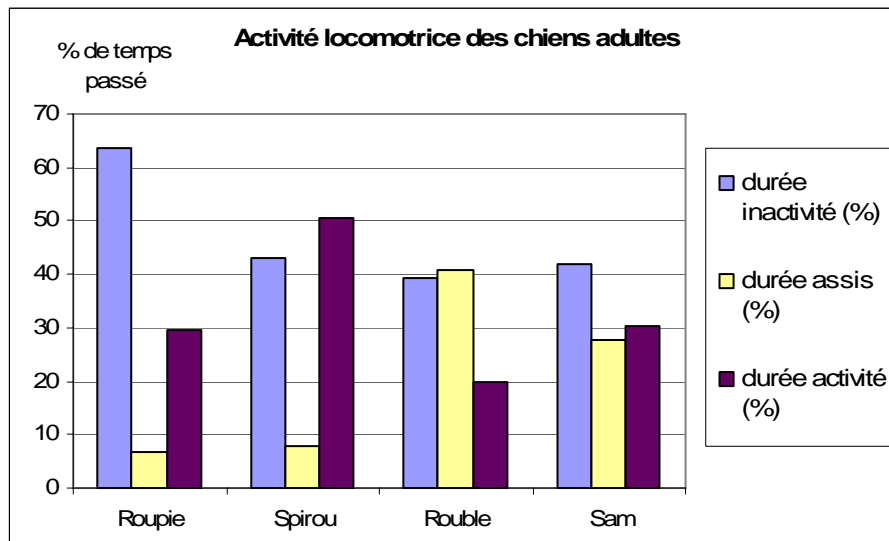
## II. B. 1) c. $\alpha$ . Analyse graphique de l'activité locomotrice

On a regroupé les statuts décubitus latéral et sternal sous l'appellation « inactivité » (puisque aucun mouvement n'est recensé), et les statuts debout et mouvement sous l'appellation « activité » puisque l'activité musculaire est la plus développée pour ces comportements.

- **Activité locomotrice des chiens adultes**

Les différentes postures et leurs durées sont illustrées par les figures 32 à 33ter.

**Figure 32** : Durée des différentes postures chez les chiens adultes exprimée en pourcentage du temps total.



Une première observation apparaît : les différences sont beaucoup moins flagrantes entre chiens sains et malades que pour l'analyse de la vitesse d'alimentation.

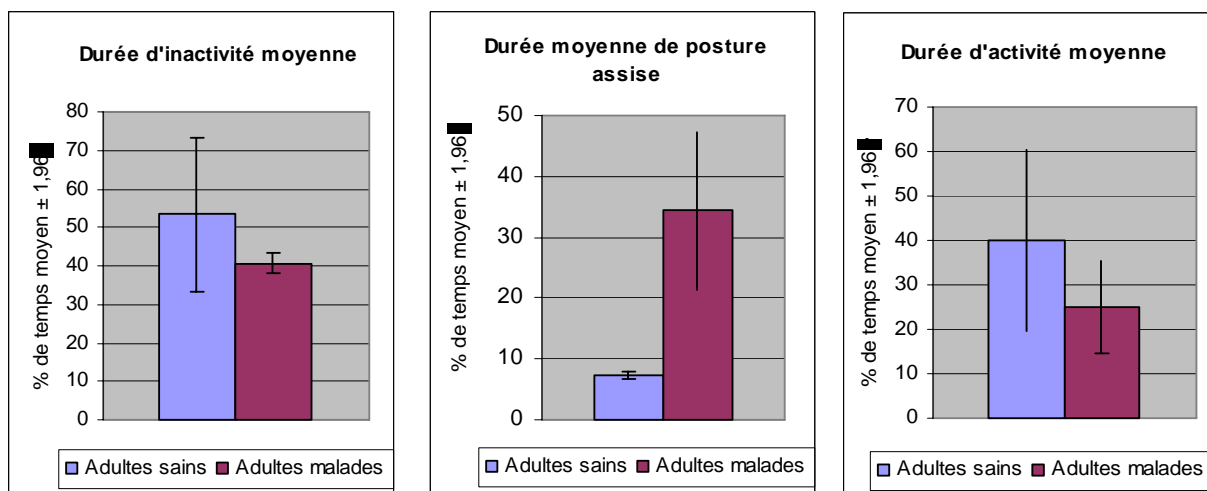
La durée d'activité est la plus intéressante à décrire, car les essais thérapeutiques visent au final à accroître l'activité physique chez des patients souvent invalides dès leur jeune âge.

Ici, il est difficile de différencier graphiquement sujet sain et sujet malade : Sam (chien myopathe) est en activité pendant autant de temps que Roupie (chien sain).

La durée d'inactivité est semblable entre les 4 chiens ; Roupie semble même être l'animal le moins actif.

Seul le temps passé en posture assise apparaît bien inférieur chez les chiens sains.

Figures 33, 33bis et 33ter : Durée moyenne des postures « inactivité », « assis » et « activité » en fonction du statut des chiens adultes, et intervalles de confiance associés.



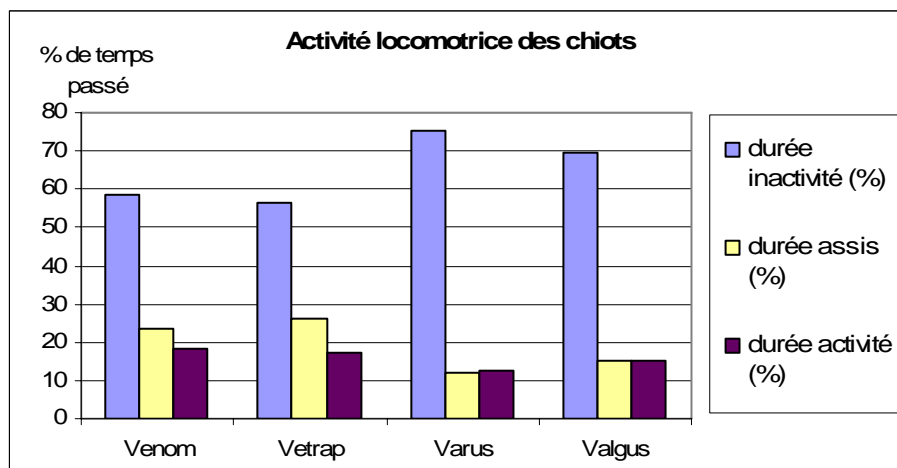
Les durées moyennes confirment les données individuelles : seule la durée moyenne en posture assise permet de distinguer les animaux selon leur statut.

- Activité locomotrice des chiots

Les chiots ont entre 4 mois et 4 mois et demi au moment de la réalisation des enregistrements vidéo, ceci veut dire que, d'une part leur locomotion est bien développée à cet âge, et que d'autre part, les symptômes moteurs des chiots malades sont déjà bien installés.

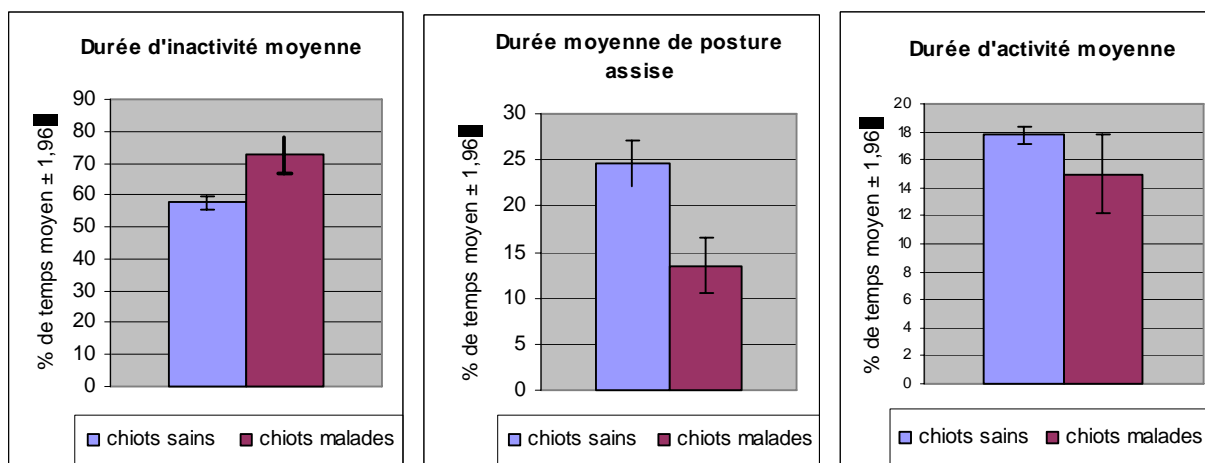
Les histogrammes suivants regroupent les durées moyennes d'activité des chiots. Les durées des différentes postures sont plus difficiles à classer, le profil « inactivité-assis-activité » est analogue pour les 4 chiots, avec les deux tiers du temps passé en position couchée et le reste du temps partagé entre la position assise et les périodes d'activité.

Figure 34 : Durée des différentes postures chez les chiots exprimée en pourcentage du temps total.





Figures 35, 35bis et 35ter : Durée moyenne des postures « inactivité », « assis » et « activité » en fonction du statut des chiots, et intervalles de confiance associés.



Comme pour les chiens adultes, une différence significative apparaît seulement pour la posture assise d'après les graphiques.

Il faut donc effectuer les tests statistiques pour vérifier si les différences sont bien réelles.

### II. B. 1) c. $\beta$ . Analyse statistique de l'activité locomotrice

Les chiens sains, quel que soit leur âge, passent plus de temps en posture quadrupède, statique ou en mouvement, et moins de temps assis que les chiens porteurs de la mutation (Tableaux 20 et 21).

Les chiens adultes passent plus de temps en posture quadrupède statique et moins de temps en posture de décubitus ou mouvement que les chiots (Tableaux 20 et 21).

De manière générale, les chiots, quels que soient leur race ou leur état de santé, passent une grande partie de leur temps à dormir, jusque l'âge de 5 à 6 mois.

Il faut remarquer que, en ce qui concerne les postures assise et couchée, il existe une interaction entre l'âge et la présence de la mutation (Tableau 20) : les animaux jeunes et malades passent plus de temps en posture statique assise ou couchée.

Tableau 20 : Influence de la présence de la mutation et de l'âge des chiens sur les durées passées en posture assise, quadrupède ou couchée : Valeurs F de la MANOVA.

Facteur	POSTURES			
	Assis	Debout	Mouvement	Décubitus
Mutation	18,07 ***	4,41 *	62,96 ***	0,13 ns
Age	0,00 NS	36,11 ***	6,74 **	24,24 ***
Mutation*Age	105,35 ***	2,23 ns	2,56 ns	13,66 **

Les astérisques correspondent au seuil de signification pour  $F_{1/28}$ , ns :  $p > 0,05$  (valeur limite=4,20)

Plus le nombre d'astérisques est élevé, plus la différence est significative.

Les effets qui ont donc un rôle significatif capable d'influencer l'activité des chiens sont les suivants :

- l'effet de la mutation sur la posture assise et la durée d'activité ;
- l'effet de l'âge sur les postures debout et couchée ;
- l'effet de l'interaction entre l'âge et la maladie sur la posture assise.

Tableau 21 : Influence de la présence de la mutation et de l'âge des chiens sur les durées passées en posture assise, quadrupède ou couchée : Comparaisons des durées en fonction des sous-échantillons.

Facteur	Mutation (sain=S, malade=M)	Age (adulte=A, Immature=I)
Assis	S<M	A=I
Debout	S>M	A>I
Mouvement	S>M	A<I
Décubitus	S=M	A<I

L'activité des chiens dépend donc non seulement de leur statut pathologique, et par conséquent de l'intégrité de leur système musculo-squelettique, mais aussi de nombreuses autres variables, plus ou moins maîtrisables, comme l'âge, le caractère, l'adaptabilité...

Il faut tenir compte de ces facteurs de variation lors de l'interprétation des mesures d'actimétrie avant et après traitement, dans le cadre d'un essai thérapeutique.

## II. B. 2) Discussion

### \* Qualité des caméras AXIS

Etant donné le prix de chaque caméra (1500 €), l'investissement apparaît très décevant, et pour s'assurer de la fiabilité du matériel, il vaut mieux s'adresser directement à une société spécialisée dans la fourniture des laboratoires d'expérimentation animale, en particulier en éthologie ; nous avons appris (trop tard) que la société Viewpoint commercialise elle aussi des caméras plus adaptées.

### \* Utilisation du logiciel Labwatcher

#### Inconvénients :

Comme l'analyse se déroule simultanément au film, si une erreur est commise durant l'analyse (l'opérateur frappe sur la mauvaise touche, ou est trop lent...), il faut recommencer l'analyse du film au début, d'où l'intérêt de n'utiliser que des séquences vidéo de courte durée. Si on se trompe pendant l'analyse d'une séquence de 5 minutes, on peut facilement recommencer la cotation, mais si la séquence dure 30 minutes, cela peut représenter une perte de temps pour l'obtention des résultats lors d'un essai clinique par exemple.

Un entraînement est nécessaire, mais il peut être facilité par l'utilisation des vignettes collées sur les touches, et la durée d'entraînement reste somme toute assez courte : il faut compter 2 à 3 semaines pour maîtriser l'utilisation du piano éthologique.

Le traitement des fichiers AVI puis des fichiers Excel est particulièrement chronophage, surtout lorsque le nombre de comportements étudiés augmente.

#### Avantages :

Le logiciel permet une obtention facile des résultats par visualisation du film.

Si l'activité de l'animal est trop rapide, il est possible de faire varier la vitesse de déroulement du film, sans conséquence pour les durées réelles des comportements.

L'obtention des résultats est indépendante du jugement de l'observateur et aboutit à des valeurs objectives.

### \* Signification des résultats

Si on n'observe pas de différence significative, on peut expliquer le manque de discrimination par diverses raisons :

- l'activité locomotrice est fortement dépendante du caractère du chien : un chien sain mais inhibé aura une activité physique restreinte.

- la variabilité phénotypique de la maladie : l'expression clinique de la myopathie dystrophique chez le chien est très variable, il est donc difficile de comparer les chiens malades entre eux et avec les chiens sains.

- les chiens handicapés peuvent développer une stratégie d'adaptation par rapport à leur maladie pour conserver un niveau de locomotion adéquat.

- les chiens malades comme les chiens sains peuvent présenter un défaut d'adaptation à leur nouvel environnement, même après la période d'acclimatation, en particulier les chiens adultes. Ils sont déjà habitués à la présence de sciure dans leur cage habituelle, mais la texture du caillebotis peut être déroutante.

- la taille de la cage elle-même peut limiter l'amplitude et la fréquence des mouvements surtout chez les adultes, ce qui pourrait masquer une différence liée à la maladie.

- on peut également incriminer une anomalie d'échantillonnage : les chiens ont été tirés au sort, l'échantillon est donc représentatif, mais le nombre d'animaux étudiés est peut-être insuffisant, ce qui aboutit à des résultats peu précis.

\* Limites de la méthode :

L'utilisation du piano éthologique ne permet pas d'obtenir de mesure de vitesse du déplacement, ni de mesure d'intensité des mouvements.

Il n'est pas possible d'effectuer de distinction sommeil « actif »/sommeil passif, à moins d'ajouter un comportement, ce qui augmente la difficulté de la cotation.

Le traitement des vidéos nécessite l'emploi d'une personne à temps plein surtout pour l'analyse des comportements locomoteurs, par contre pour l'analyse de la dysphagie cela reste tout à fait abordable.

Conclusion :

Pour l'actimétrie, il faudrait donc envisager un procédé plus simple, moins coûteux, qui permet une obtention rapide des informations, par exemple le port d'un podomètre par les chiens.

Pour la mesure de la dysphagie, la vidéo peut confirmer et quantifier la difficulté de déglutition et peut donc être utilisée. De plus les caméras peuvent être placées directement au dessus de la cage des animaux à étudier, sans déplacer les animaux eux-mêmes, puisque la dimension des cages n'a pas d'incidence.

## CONCLUSION DE L'ETUDE EXPERIMENTALE

Le développement de ces deux outils d'étude des chiens myopathes ouvre une voie intéressante pour de nouvelles méthodes d'investigation clinique plus objectives et accessibles.

L'étude de la grille de scores cliniques appliquée aux chiens myopathes adultes fournit des résultats satisfaisants.

La répétabilité des notations est très bonne, puisqu'on obtient un coefficient de variation moyen de 10% pour les 2 principaux observateurs.

La fiabilité des items est acceptable, avec 10 critères fiables à très fiables (coefficient Kappa compris entre 0,2 et 1) et 7 critères peu fiables qui devront être précisés pour la suite de l'étude (analyse de la sensibilité).

On constate que la pondération par les coefficients Kappa permet d'améliorer la fiabilité de la notation ; la formule de calcul du score est facilement utilisable sur une feuille de calcul Excel.

De plus, l'analyse statistique révèle que l'effet de l'observateur, l'effet de la semaine et l'effet de l'interaction entre l'observateur et la semaine sont négligeables.

Ceci signifie que la grille peut être utilisée à tout moment par n'importe quel observateur entraîné.

Enfin, le coefficient de corrélation intraclasse élevé (67%) prouve que la grille permet une bonne discrimination des individus notés.

Un bon entraînement des observateurs reste donc indispensable, mais avec une bonne expérience, la grille devient un outil fiable et reproductible.

L'analyse d'activité par actimétrie confirme de façon chiffrée les différences de mobilité et de capacité de déglutition entre les chiens sains et les chiens myopathes, observée de façon intuitive.

Concernant l'alimentation, on a pu mettre en évidence une influence significative de la maladie mais aussi de l'âge sur l'allongement de la durée de préhension et de mastication des aliments.

Par contre, la durée de prise de boisson n'est modifiée que par la maladie.

Concernant l'activité locomotrice, les résultats sont dominés par trois observations :

- la présence de la maladie diminue la durée d'activité et augmente la durée en position assise ;
- la durée d'inactivité est plus importante chez les chiots que chez les chiens adultes ;
- les chiots malades passent la plus grande partie du temps en position assise ;

Ces conclusions sont à nuancer en fonction du caractère de chaque chien et de la capacité d'adaptation individuelle des animaux face à un nouvel environnement.

Ces données peuvent être utiles pour comparer l'évolution de l'activité d'un animal avant et après traitement, d'autant plus que l'obtention des résultats est totalement indépendante de la subjectivité de l'opérateur.

Cependant, les inconvénients majeurs de cette méthode d'analyse d'activité sont la nécessité d'un matériel très spécifique et coûteux, et le temps nécessaire au dépouillement et au traitement des données, et la dépendance vis-à-vis de nombreuses variables parfois imprévisibles.

Entre ces deux outils d'évaluation clinique des chiens GRMD, la grille de scores cliniques est donc à privilégier pour sa facilité d'utilisation.



## BIBLIOGRAPHIE

- 1 - Association Française contre les Myopathies. *AFM* [en ligne], mise à jour le 11 mai 2006 [<http://www.afm-france.org>], consulté le 13 septembre 2005.
- 2 - AHN A.H., KUNKEL L.M. The structural and functional diversity of dystrophin. *Nature Genet.*, 1993, 3 (4), 283-291.
- 3 - AMAT-ALEXANDRE B. *Les méthodes d'évaluation expérimentale et clinique de la douleur chez les carnivores domestiques*. Thèse Méd. Vét., Nantes, 2000, n° 73.
- 4 - BARTLETT R.J., WINAND N.J. et al. : Mutation segregation and rapid carrier detection of X-linked muscular dystrophy in dogs. *Am. J. Vet. Res.*, 1996, 57(5), 650-654.
- 4bis - BEDOSSA T. *Mesure de la pression artérielle chez le chien en pratique quotidienne par la méthode oscillométrique*. Thèse Méd. Vét., Alfort, 1994, n° 69.
- 5 - BERARD C., PAYAN C., HODGKINSON I., FERMANIAN J. et al. A motor function measure scale for neuromuscular diseases. Construction and validation. *Neuromuscul. Disord.*, 2005, 15, 463-470.
- 6 - BIARD E., RIVIERE H. Principales maladies neuromusculaires. *In* : Association Française contre les Myopathies : Vaincre les Myopathies, 2003 (Supplément au n° 107), 27p.
- 7 - BLOT S. Les myopathies des carnivores domestiques. Première partie : le muscle strié squelettique : structure, fonction et sémiologie. *Prat. Méd. Chir. Anim. Comp.*, 1995, 30, 11-25.
- 8 - BLOT S. *Appareil locomoteur des carnivores domestiques : myopathies, polyarthrites, ostéopathies métaboliques*. Polycopié. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité pédagogique de Médecine. 2002, 78p.
- 9 - BLOT S., FUHRER L. Les myopathies des carnivores domestiques. Deuxième partie: étude spéciale. *Prat. Méd. Chir. Anim. Comp.*, 1995, 30 (1), 27-43.
- 10 - BONILLA E., SCHMIDT B., SAMITT C.E., MIRANDA A.F., HAYS A.P., de OLIVEIRA A.B.S., CHANG H.W., SERVIDEI S., RICCI E., YOUNGER D.S., DIMAURO S. Normal and dystrophin-deficient muscle fibers in carriers of the gene for Duchenne muscular dystrophy. *Am. J. Pathol.*, 1988, 133 (3), 440-445.
- 11 - BOTREL M.A. *Mise au point d'une méthode préclinique d'évaluation de l'efficacité d'un anti-inflammatoire chez le chien*. Thèse Méd. Vét. Toulouse, 1993, n°33.
- 12 - BRAUND K.G. Myopathies in dogs and cats. *Vet. Med.*, 1997, 7, 607-634.
- 13 - CHAMBERLAIN J.S., CORRADO K., RAFAEL J.A., COX G.A., HAUSER M., LUMENG C. Interactions between dystrophin and the sarcolemma membrane. *Soc. Gen. Physiol. Ser.*, 1997, 52, 19-29.

- 14 - CHETBOUL V., ATHANASSIADIS N., CONCORDET D et al. Observer-dependent variability of quantitative clinical endpoints : the example of canine echocardiography. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, 2004, 27, 49-56.
- 15 - COOPER B.J. : Animal models of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Br. Med. Bull.*, 1989, 45, 703-718.
- 16 - COOPER B.J. and VALENTINE B.A. : X-linked muscular dystrophy in the dog. *Trends Genet.*, 1988, 4, 2.
- 17 - COOPER B.J., VALENTINE B.A., WILSON S., PATTERSON D.F. and CONCANNON P.W. : Canine muscular dystrophy : confirmation of X-linked inheritance. *J. Hered.*, 1988, 79 (6), 405-408.
- 18 - COOPER B.J., WINAND N.J., STEDMAN H., VALENTINE B.A. *et al.* : The homologue of the Duchenne locus is defective in X-linked muscular dystrophy of dog. *Nature*, 1988, 334 (6178), 154-156.
- 19 - COOPER B.J., GALLAGHER E.A., SMITH C.A., VALENTINE B.A., WINAND N.J. : Mosaic expression of dystrophin in carriers of canine X-linked muscular dystrophy. *Lab. Invest.*, 1990, 62(2), 171-178.
- 20 - CRESPEAU F., FONTAINE J.J. *Cours d'Histologie générale. Les tissus musculaires. Le système nerveux.* Polycopié. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité pédagogique d'Histologie-Anatomie Pathologique. 1997, 44p.
- 20bis - CUDDON P.A. Electrophysiology in neuromuscular disease. *Vet. Clin. North Am. : Small Anim. Pract.* 2002, 32 (1), 31-62.
- 21 - DECHERCHI P. *Conséquences musculaires de la suractivité : la fatigue musculaire*, [en-ligne], Version du 5 décembre 2002, [[http://www.physiologie.staps.univ-mrs.fr/ImagesIcones/Fatigue\\_O24.pdf](http://www.physiologie.staps.univ-mrs.fr/ImagesIcones/Fatigue_O24.pdf)], (consulté le 8 août 2003).
- 22 - DESNUELLE C. Les enseignements de la dystrophine. *Presse Med.*, 1994, 23 (19), 896-900.
- 23 - DEVAUX J.Y., CABANE C.H.U., ESLER M. *et al.* : Non-invasive evaluation of the cardiac function in Golden Retriever dogs by radionuclide angiography. *Neuromusc. Disord.*, 1993, 3, (5-6) 429-432.
- 24 - DUBOWITZ V. The muscular dystrophies. *Postgrad. Med. J.*, 1992, 68, 500-506.
- 25 - GARDNER-MEDWIN D. Clinical features and classification of the muscular dystrophies. *Br. Med. Bull.*, 1980, 36 (2), 109-115.
- 25bis - Guidance for Industry : Bioanalytical Method Validation. *In : Guidance document* [en ligne], Mai 2001, Rockville : US Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research [<http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.htm>] (consulté le 17 novembre 2006)
- 26 - HOFFMAN E.P. La myopathie de Duchenne. *Recherche*, 1993, 24 (250), 36-44.



- 27 - HOFFMAN E.P., GOROSPE J.R.M. The animal models of Duchenne muscular dystrophy: windows on the pathophysiological consequences of dystrophin deficiency. *Curr. Topics Memb.*, 1991, 38, 113-154.
- 28 - HOWELL J. McC., FLETCHER S., KAKULAS B.A., O'HARA M., LOCHMULLER H., KARPATI G. Use of the dog model for Duchenne muscular dystrophy in gene therapy trials. *Neuromuscul. Disord.*, 1997, 7 (5), 325-328.
- 29 - HOWELL J.M., KAKULAS B.A., PASS D.A., GEVONESE L., JOHNSON R., LLOYD F., HOBLEY W.E. The fulminating neonatal form of expression in the Golden Retriever dog model of Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve*, 1994, Suppl. 1, S182.
- 30 - KERHOAS J.M. *Approche thérapeutique de la myopathie de Duchenne par la surexpression pharmacologique de l'utrophine chez le chien*. Thèse Méd. Vét., Alfort, 2003, n° 58.
- 31 - KORNEGAY J.N., TULER S.M., MILLER D.M. and LEVESQUE D.C. : Muscular dystrophy in a litter of golden retriever dogs. *Muscle Nerve*, 1988, 11(10), 1056-1064.
- 32 - LEGER J.J., AUGIER N., LEGER J., MORNET D., PONS F. La ou les dystrophine(s), trois années après leur découverte. *Méd. Sci.*, 1991, 7 (8), 805-819.
- 33 - LEPLEGE A., COSTE J. *Mesure de la santé perceptuelle et de la qualité de vie : méthodes et applications*. Paris : Ed. ESTEM, 2002, 336p.
- 34 - MIENVILLE J.M. Physiologie musculaire. In : *Université de Nice Sophia-Antipolis*. [en-ligne], 2005, [<http://www.unice.fr/JMM/Cours/PhyMus.pdf>] (consulté le 12 janvier 2006).
- 35 - MOISE N.S., VALENTINE B.A., BROWN C.A., ERB H.N., BECK K.A. and COOPER B.J. : Duchenne's cardiomyopathy in a canine model : electrocardiographic and echocardiographic studies. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1991, 17(3), 812-820.
- 36 - NGUYEN F. *La dystrophie musculaire du chien Golden Retriever (GRMD) : Etude histologique de la forme néonatale fulminante et contribution à l'étude de la pathogénie des lésions*. Thèse Méd. Vét., Nantes, 2001, n° 008.
- 37 - NGUYEN F., CHEREL Y., GUIGAND L., GOUBAULT-LEROUX I. and WYERS M. Muscle lesions associated with dystrophin deficiency in neonatal Golden Retriever Puppies. *J. Comp. Pathol.*, 2002, 126, 100-108.
- 38 - PARTRIDGE T. : Animal models of muscular dystrophy. What can they teach us ? *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 1991, 17, 353-363.
- 39 - PARTRIDGE T. : Pathophysiology of muscular dystrophy. *Br.J. Hosp. Med.*, 1993, 49 (1), 26-36.
- 40 - PAWLOWIEZ S. *Contribution à l'étude clinique de la myopathie dystrophique du Golden Retriever*. Thèse Méd. Vét., Alfort, 2000, n° 49.

- 41 - PERLOFF J.K., SYDNEY MOISE N., STEVENSON W.G., GILMOUR R.F. Cardiac electrophysiology in Duchenne muscular dystrophy : from basic science to clinical expression. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.*, 1992, 3 (4), 394-409.
- 42 - PINCON-RAYMOND M. Modèles animaux pour l'étude des myopathies. *Sci. Tech. Anim. Lab.*, 1992, 17, 21-26.
- 43 - PINCON-RAYMOND M. Myopathies. In : ouvrage collectif. *Livre blanc sur l'expérimentation animale*. Paris : Les éditions INSERM-CNRS éditions, 1995, 28, 235-242.
- 44 - SADOULET-PUCCIO H.M., KUNKEL L.M. Dystrophin and its isoforms. *Brain Pathol.*, 1996, 6 (1), 25-35.
- 45 - SHARP N.J.H., KORNEGAY J.N., VAN CAMP S.D. *et al.* : An error in dystrophin mRNA processing in golden retriever muscular dystrophy, an animal homologue of Duchenne muscular dystrophy. *Genomics*, 1992, 13 (1), 115-121.
- 46 - SHELTON G.D., ENGVALL E. Muscular dystrophies and other inherited myopathies. *Vet. Clin. North Am : Small Anim. Pract.*, 2002, 32(1), 103-121.
- 47 - VALENTINE B.A., COOPER B.J. Canine X-linked muscular dystrophy : selective involvement of muscles in neonatal dogs. *Neuromuscul. Disord.*, 1991, 1 (1), 31-38.
- 48 - VALENTINE B.A., COOPER B.J., CUMMINGS J.F., de LAHUNTA A. Progressive muscular dystrophy in a golden retriever dog : light microscope and ultrastructural features at 4 and 8 months. *Acta Neuropathol.*, 1986, 71, 301-310.
- 49 - VALENTINE B.A., COOPER B.J., CUMMINGS J.F., de LAHUNTA A. () Canine X-linked muscular dystrophy : morphologic lesions. *J. Neurol. Sci.*, 1990, 97, 1-23.
- 50 - VALENTINE B.A., COOPER B.J., DE LAHUNTA A., O'QUINN R. And BLUE J.T. : Canine X- linked muscular dystrophy. An animal model of Duchenne muscular dystrophy : clinical studies. *J. Neurol. Sci.*, 1988, 88 (1-3), 69-81.
- 51 - VALENTINE B.A., KORNEGAY J.N. and COOPER B.J. : Clinical electromyographic studies of canine X-linked muscular dystrophy. *Am. J. Vet. Res.*, 1989, 50 (12), 2145-2147.
- 52 - VALENTINE B.A., WINAND N.J. *et al.* : Canine X-linked muscular dystrophy as an animal model of Duchenne muscular dystrophy : a review. *Am. J. Med. Genet.*, 1992, 42, 352- 356.
- 53 - YTTERBERG S.R. : Animal models of myopathy. *Curr. Opin. Rheumatol.*, 1991, 3, 934- 940.

# **ANNEXES**



## **LISTE DES ANNEXES**

Annexe 1 : Classification des myopathies

Annexe 2 : La créatine-kinase et l'intérêt de son dosage dans le diagnostic clinique des dystrophies musculaires

Annexe 3 : Plan des locaux de l'UETM

Annexe 4 : Personnel du laboratoire de Neurobiologie

Annexe 5 : Fonctionnement de l'UETM

Annexe 6 : Caractéristiques des chiens GRMD utilisés pour l'étude

Annexe 7 : Mode de conception d'une grille de score clinique

Annexe 8 : Spécifications techniques des caméras Axis 2130

Annexe 9 : Manuel d'utilisation de Axis Camera Recorder (extraits)

Annexe 10 : Guide d'utilisation du logiciel Labwatcher

Annexe 11 : Notations des 2 observateurs pour chaque chien adulte, pendant les 17 semaines d'observation

Annexe 12 : Exemple de calcul du coefficient Kappa pour le critère « Dysphagie »

Annexe 13 : Comparaison de la concordance entre opérateurs avant et après pondération des notes

Annexe 14 : Résultats de l'activité alimentaire de Spirou

Annexe 15 : Résultats de l'activité locomotrice de Spirou

Annexe 16 : Durées quotidiennes des comportements alimentaires chez les chiens adultes

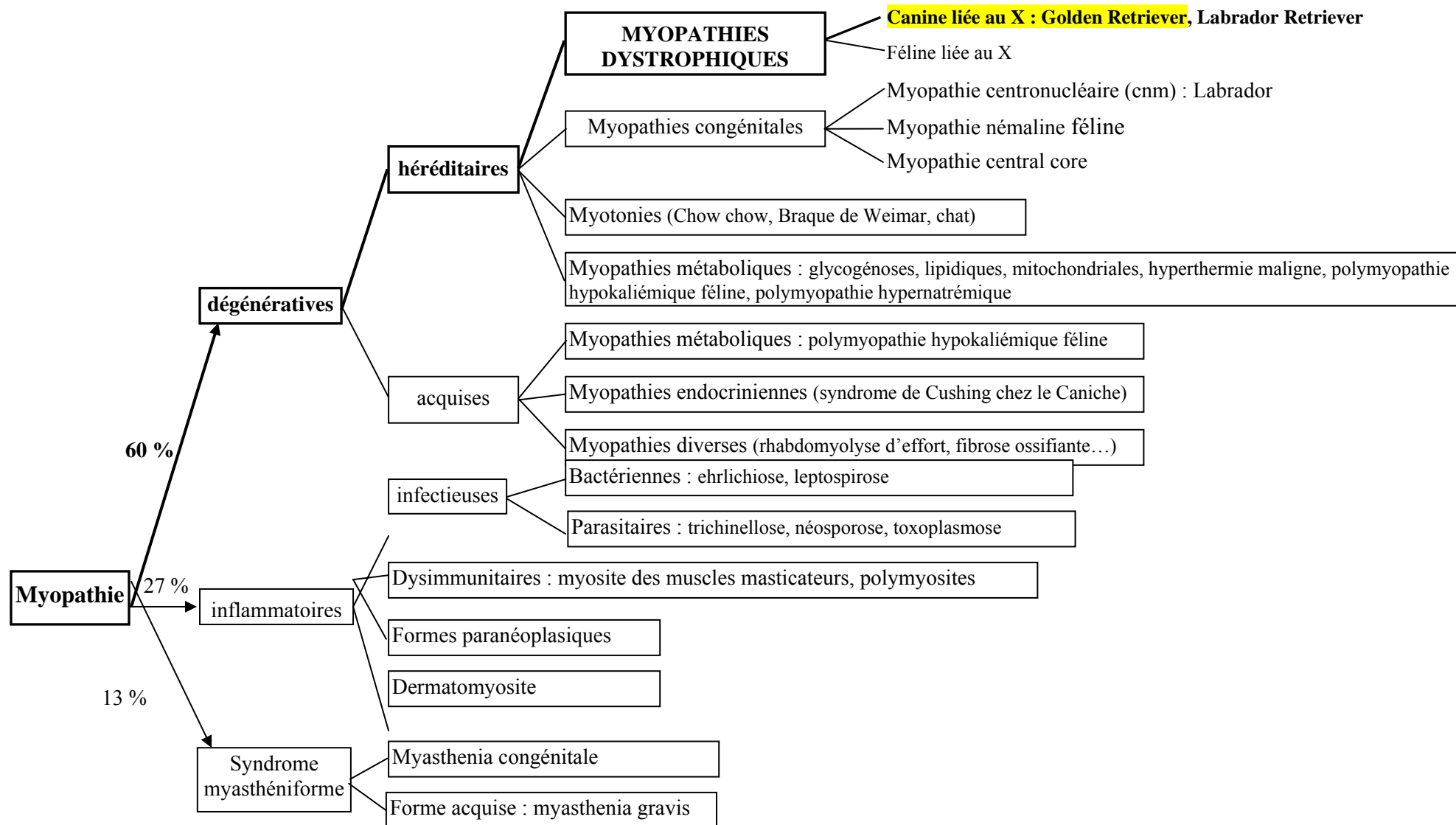
Annexe 17 : Durées quotidiennes des comportements alimentaires chez les chiots

Annexe 18 : Durées quotidiennes des comportements locomoteurs chez les chiens adultes

Annexe 19 : Durées quotidiennes des comportements locomoteurs chez les chiots



**Annexe 1 : Classification des myopathies** (d'après [8], [46])



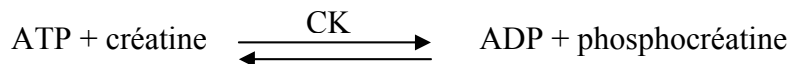




## **Annexe 2 : La créatine-kinase (CK) et l'intérêt de son dosage dans le diagnostic clinique des dystrophies musculaires.** (d'après [7], [36])

### **1. Les créatine-kinases.**

La créatine-kinase (aussi appelée créatine-phosphokinase) a pour nom systématique « ATP:créatine N-phosphotransférase ». Elle catalyse la réaction réversible :



La créatine-kinase (CK) existe sous quatre formes monomériques codées par des gènes différents. Deux formes sont cytoplasmiques : B et M, et forment des dimères (MM, BM et BB). Deux formes sont mitochondriales : mi-CKu ou mi-CKa, forme ubiquitaire, et mi-CKs ou mi-CKb, forme musculaire.

Dans le muscle strié squelettique, l'isoforme CK-MM représente 95 à 98 % de la créatine-kinase présente, le reste étant une CK mitochondriale. Le muscle strié squelettique est dépourvu des isoformes BB et MB, mais ces isoformes sont présentes dans le muscle strié cardiaque et l'encéphale.

Dans le muscle strié squelettique, l'isoforme CK-MM est liée à l'ATPase de la myosine, dont elle favorise l'activité en contrôlant localement le pH. Elle est également présente sur la membrane du réticulum sarcoplasmique, où elle favorise localement le flux entrant de calcium.

### **2. Valeurs de référence de la CK sérique.**

Il n'existe pas à proprement parler de valeurs de référence « universelles » en ce qui concerne le taux sérique de créatine-kinase, car celui-ci dépend de la méthode de dosage employée. Chaque laboratoire possède donc ses valeurs de référence propres. Cependant, dans tous les cas, les valeurs normales sont inférieures à 100 UI/L (CK totale) dans le sérum.

Certains facteurs physiologiques sont susceptibles de modifier légèrement le taux sérique de créatine-kinase :

- l'âge : les valeurs sont plus élevées chez les jeunes
- la race : plus le chien est de petite taille, plus les valeurs sont élevées
- le sexe : les valeurs sont plus élevées chez les mâles
- l'exercice physique : il augmente le taux sérique de CK
- la gestation : les taux sériques de CK sont diminués pendant la gestation.

Le taux de créatine-kinase sérique doit donc être interprété en tenant compte de ces données et si possible en se référant toujours à des témoins adaptés.

Les modalités de prélèvement modifient également le résultat : le taux est plus élevé lors d'un dosage sérique par rapport à un dosage plasmatique.

### **3. L'augmentation du taux sérique de créatine-kinase indique l'existence d'une pathologie musculaire active.**

La CK est libérée dans le sérum à la faveur d'une rupture de l'intégrité et/ou d'un trouble de la perméabilité membranaire des fibres musculaires. Le dosage dans le sérum est possible, soit de la CK totale, soit d'une de ses isoformes.

Les taux de créatine-kinase MM sérique sont significativement augmentés dans de nombreuses affections musculaires, au premier rang desquelles la dystrophie musculaire de Duchenne.

L'isoenzyme BB est significativement augmentée dans les cardiomyopathies et l'infarctus du myocarde. L'isoenzyme MB (cardiaque) est détectable dans le sérum des patients atteints de DMD.

La demi-vie de la CK est très courte (6 heures) et une élévation persistante (4 à 5 fois le taux normal sur 2 dosages espacés de 24-48 heures), en dehors d'une cardiomyopathie, témoigne d'une lésion musculaire récente et active.

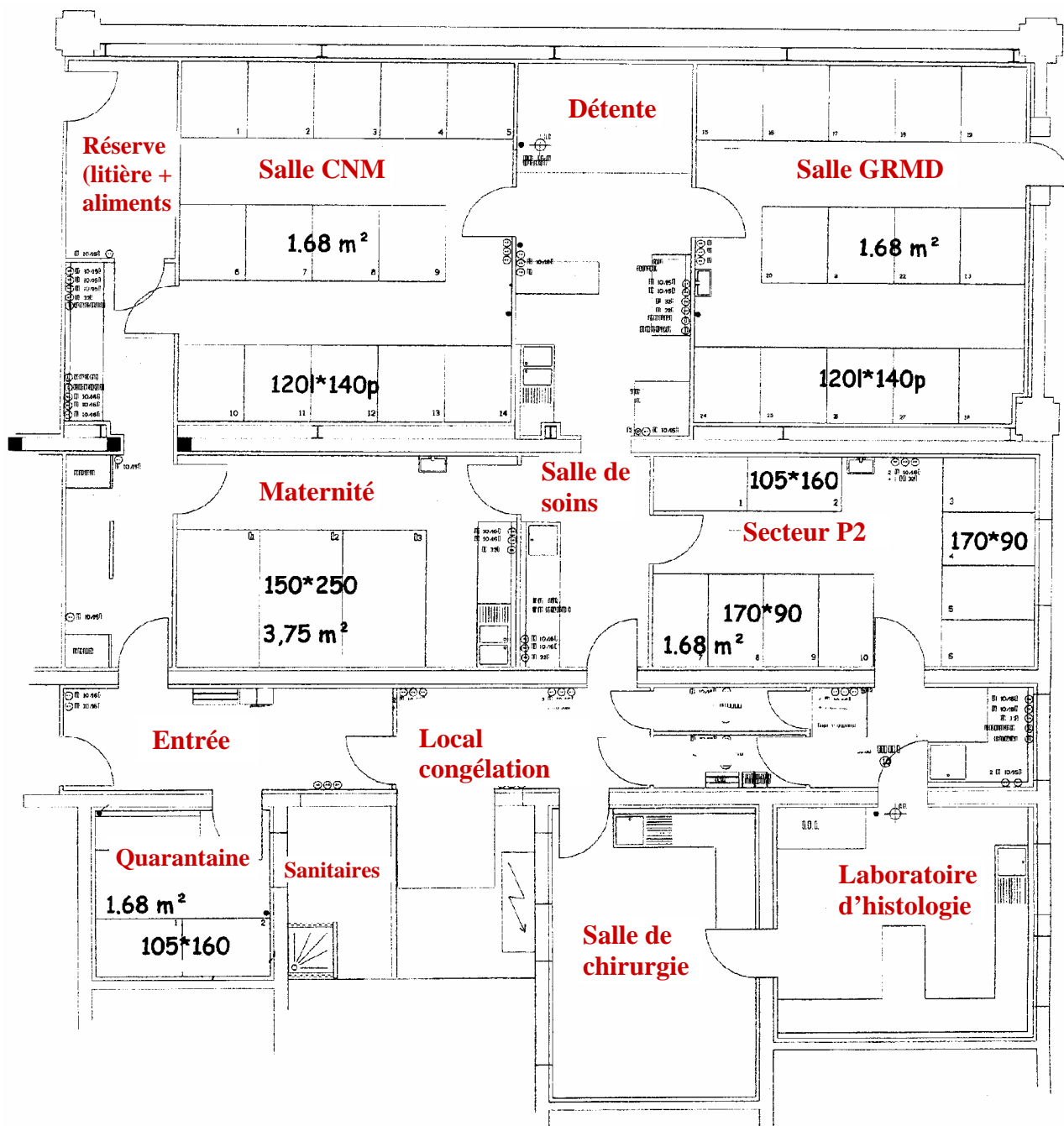
Ainsi on observe de fortes augmentations des CK lors de décubitus prolongé, de traumatisme, d'intervention chirurgicale (variations également en fonction du type d'anesthésie et de sa durée), mais aussi lors d'injection intramusculaire douloureuse ou de ponction veineuse ratée !

Dans le diagnostic d'une affection neuromusculaire et en l'absence des cas de figures précédemment cités, le dosage des CK possède une sensibilité faible mais une spécificité élevée lorsque le seuil considéré est supérieur à 100 UI/L.

En revanche un taux de CK normal ne permet pas d'écarter une myopathie, particulièrement chronique.



### Annexe 3 : Plan des locaux de l'UETM



Plan de distribution de salles  
Echelle 1/100



#### **Annexe 4 : Personnel du laboratoire de Neurobiologie**

<b>Nom-Prénom</b>	<b>Fonction</b>	<b>Niveau de formation et diplômes</b>
Stéphane Blot	Chef de service	PhD – Collège Européen de Neurologie
Jean-Laurent Thibaud	Vétérinaire	DEFV
Nicolas Granger	Vétérinaire	PhD, Collège Européen de Neurologie
Inès Barthélémy	Vétérinaire	DEFV, Master Biothérapie Paris XII
Ane Uriarte	Vétérinaire	DEFV
Racquel Cooper	Chercheur, rédactrice médicale	PhD
Isabelle Valchéra	Secrétaire	CAP sténodactylo option comptabilité
Xavier Cauchois	Technicien animalier	Maîtrise de Biologie – Niveau II expérimentation animale
Carole Drougard	Technicienne laboratoire	Ingénieur agronome CNAM
Isabelle Raoult	Ingénieur d'étude	BTS biochimie
Aurore Brindejont	Animalière	BEP carrière sanitaire et sociale Niveau II expérimentation animale
Angélique Gouffier	Animalière	BEPA animalerie de laboratoire
Ingrid Grüyer	Animalière	Niveau II expérimentation animale
Serge Kouamé	Animalier	Bac pro MSMA (Maintenance des Systèmes Mécaniques Automatisés) Niveau II expérimentation animale
Sébastien Lefebvre	Animalier	Niveau CAP métallerie – ERP1 (agent de sécurité) Niveau II expérimentation animale
Ernest Wembé	Animalier	Bac+8 Niveau I expérimentation animale



## **Annexe 5 : Fonctionnement de l'Unité d'Etudes et de Thérapies des Myopathies canines**

Faisant partie du laboratoire de Neurobiologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, cette unité existe depuis 1996 grâce à l'initiative de Pierre Moissonnier (professeur, UP de Chirurgie), Stéphane Blot (maître de conférences, UP de Médecine) et Thierry Lefrançois (maître de conférences, UP de Physiologie). Elle a pour but d'accroître les connaissances sur les modèles spontanés de myopathies canines et de mettre en place différents essais thérapeutiques pré-cliniques.

Ses nouveaux locaux, inaugurés en 1999, occupent une place importante sur le site de l'ENVA (350 m<sup>2</sup>) et permettent de réaliser un travail de qualité dans des conditions matérielles adéquates. (cf. plan en annexe 3)

L'Unité est dirigée par le Docteur Stéphane Blot, assisté sur le plan technique par 2 résidents en Neurologie (Jean-Laurent Thibaud et Nicolas Granger) et une étudiante en master, Inès Barthélémy.

En outre, elle emploie actuellement une équipe de 12 personnes qualifiées (voir en annexe 4 la liste du personnel et leur niveau de formation).

L'unité accueille également des étudiants en année de thèse.

Les subventions nécessaires au fonctionnement de base de l'unité et à l'avancée des recherches proviennent majoritairement de l'Association Française contre les Myopathies.

De nombreux protocoles d'essais thérapeutiques sont actuellement en cours, entre autres : perfusions intra-artérielles de plasmide dystrophine canine, programme potentiel myogénique des mésoangioblastes, programme électrotransfert de plasmide dystrophine, programme 'exon skipping' chez le chien GRMD, etc.

L'UETM est en relation étroite et permanente avec

- les autres services de l'ENVA, en particulier les unités pédagogiques de Chirurgie et de Médecine et le service des Animaleries,
- de nombreuses structures de recherche en France : le Généthon, la société Transgène, l'institut Mutualiste Montsouris, l'institut Cochin, l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière, l'Inserm, mais aussi à l'étranger (les équipes des Pr Giulio Cossu en Italie, Jacques Tremblay au Canada, etc.).

L'unité héberge actuellement une centaine d'animaux représentatifs de 4 myopathies héréditaires, dont une quarantaine de Labradors porteurs ou atteints de myopathie centronucléaire (cnm), une quinzaine de Labradors porteurs ou atteints de myopathie dystrophique (LRMD), une trentaine de Golden Retrievers atteints de myopathie dystrophique (GRMD), et quelques chiens témoins, ainsi qu'une colonie de 10 chats atteints de myopathie dystrophique héréditaire (Hypertrophic Feline Muscular Dystrophy, HFMD). Une partie des chiens porteurs ou peu affectés est placée dans un autre chenil du site, pour des raisons de manque de place.

Après l'achèvement de la construction de l'hôpital pour petits animaux prévu en 2008, l'unité projette de s'étendre dans le service actuel des hospitalisations.

La gestion d'une telle structure pose de nombreux problèmes, tant au niveau financier qu'au niveau des ressources humaines.





**Annexe 6 : Caractéristiques des chiens utilisés pour l'étude**

Chien	Date de naissance	Date et cause du décès	Protocole	Type d'intervention/événement	Date des interventions
Rouble	26/04/2000		greffe de moelle	irradiation puis injection moelle d'un donneur	02/10/2000
				biopsie TB	02/08/2002
			Injection de myoblastes	injection IM dans les membres antérieurs (UL+ST)	24/06/2004
				biopsie T+ 1 mois	27/07/2004
				biopsie T+ 7 mois	19/01/2005
greffe de moelle	biopsie BF + TB G				
Sam	27/05/2001	17/01/2005 (décès spontané)		Déshydratation	03/06/2004
				Bronchite	28/10/2004
				Bronchopneumonie	03/01/2005
Scoubidou	25/03/2001	25/08/2004 (euthanasie)	greffe de moelle	irradiation puis injection moelle d'un donneur	2001-2002
				Dysorexie	11/08/2004
T-fal	25/08/2002		Myostatine	hyperthermie, IRA + bronchopneumonie	15/02 au 08/03/04
				scanner sous AG	08/06/2004
				injection IM dans muscles temporaux sous AG	09/06/2004
				scanner (m.temporaux) sous AG T+ 5j	14/06/2004
				scanner sous AG T + 15j	23/06/2004
				scanner sous AG T + 1 mois	08/07/2004
				scanner sous AG T + 2 mois	12/08/2004
				scanner sous AG T + 3 mois	17/09/2004
				scanner sous AG T + 4 mois	21/10/2004
T-fou	25/08/2002		Exon skipping	injection IM membre postérieur gauche sous AG (BF)	20/03/2004
				biopsie T + 15j	06/04/2004
				hyperthermie, abattement (bronchopneumonie ?)	28/04/2004
Tintin	27/01/2002		-		
Titeuf	27/01/2002	06/08/05 (autopsie)	Injection de myoblastes	Déshydratation, anorexie	19/08/2003
				Hématurie	23/09/2003
				bronchopneumonie subclinique	07/04/2004
				Lavage broncho-alvéolaire sous AG	18/06/2004
				injection IM dans les membres antérieurs (UL+ST)	25/06/2004
				biopsie T + 1 mois	28/07/2004
				rechute bronchopneumonie	05/01/2005
				biopsie T + 7 mois	20/01/2005
Lavage broncho-alvéolaire sous AG	02/02/2005				
biopsie BF+TB G	22/03/2005				

Tsar	21/09/2002	18/11/2004 (euthanasie pour motif clinique)	Scintigraphie	mauvais état général	16/02/2004
				IRM sous AG	03/03/2004
				biopsie membre postérieur G	18/03/2004
				IRM sous AG	24/03/2004
				scanner tête sous AG	18/10/2004
				déshydratation, difficultés respiratoires	16/11/2004
Ucal	09/10/2003	11/07/2004 (décès spontané suite à des complications de hernie diaphragmatique et ulcère gastrique)	Mésoangioblastes 1	biopsie BF + ponction de moelle	23/10/2003
				injection dans artère fémorale D sous AG	18/03/2004
				injection dans artère fémorale D sous AG	27/04/2004
				hématémèse, pose sonde de gastrostomie sous AG	19/05/2004
				injection dans artère fémorale D sous AG	15/06/2004
				biopsie T + 1 mois membres postérieurs	06/07/2004
Usky	06/04/2003	10/08/2004 (autopsie pour protocole)	Perfusion IV n°7	injection 1 Mb antérieur G	03/02/2004
				injection 2	11/02/2004
				injection 3	18/02/2004
				biopsie T + 7 jours Mb antérieur G	25/02/2004
				scanner sous AG	20/04/2004
				biopsie T + 3 mois	02/06/2004
Uzel	09/10/2003	10/08/2004 (autopsie pour protocole)	Perfusion IV n°7	injection unique mb antérieur G	02/02/2004
				biopsie T + 7 jours Mb antérieur G	10/02/2004
				biopsie T + 4 mois	02/06/2004
Virgule	04/06/2004	18/04/05 (euthanasie pneumothorax + abcès pulmonaire)	Perfusion IV n°8	injection 1 mb ant G	26/07/2004
				injection 2	28/07/2004
				injection 3	30/07/2004
				injection 4	02/08/2004
				injection 5	04/08/2004
				injection 6	09/08/2004
				injection 7	11/08/2004
				injection (échec)	13/08/2004
				injection 8	16/08/2004
				injection 9	18/08/2004
				injection 10	20/08/2004
				biopsie T + 6j	26/08/2004
				boiterie membres antérieurs	14/09/2004
				biopsie T + 3 mois	25/11/2004
				IRM Ant D et G sous AG	15 et 16/03/2005
IRM Ant D et G sous AG	13 et 14/04/2005				

Vrille	15/01/2004	10/09/2004 (euthanasie mauvais état général)	Mésoangioblastes 1	injection dans artère fémorale D sous AG	18/03/2004
				injection dans artère fémorale D sous AG	27/04/2004
				IRM sous AG	28/04/2004
				injection dans artère fémorale D sous AG + IM sartorius G	15/06/2004
				boiterie Antérieur Droit	17/06/2004
				biopsie T + 1 mois membres postérieurs	06/07/2004
Vulcano	26/04/2004	18/01/05 (euthanasie mauvais état général)	dosage CK	Anesthésie	28/06/2004
			Perfusion IV n°9	injection placebo	26/07/2004
Vicryl	12/05/2004	15/02/06 (autopsie pour protocole)	Perfusion IV n°8	injection 1 mb ant G	26/07/2004
				injection (échec)	28/07/2004
				injection 2	30/07/2004
				injection 3	02/08/2004
				injection 4	04/08/2004
				injection 5	06/08/2004
				injection 6	09/08/2004
				injection 7	11/08/2004
				injection 8	13/08/2004
				injection 9	16/08/2004
				injection 10	18/08/2004
				biopsie T + 8j	26/08/2004
				biopsie T + 3 mois	25/11/2004
				pose sonde de gastrostomie	02/02/2005
				IRM ant G sous AG	16/03/2005
				IRM ant D sous AG	18/03/2005
				biopsie T+ 8 mois	26/04/2005
				Hyperthermie, bronchopneumonie ?	23/08/2005
				injection 1	24/01/2006
				injection 2	27/01/2006
injection 3	31/01/2006				
injection 4	03/02/2006				
Perf IV injection 5	08/02/2006				
Virbac	30/05/2004		Exon Skipping	injection IM dans membres postérieurs (BF)	26/10/2004
				biopsie BFg T + 15j	12/11/2004
				biopsie BF d et g T + 30j	24/11/2004
				biopsie BF g T+ 7 semaines	16/12/2004
				biopsie TB g	10/03/2005
Virage	04/06/2004	12/10/04 (euthanasie mauvais état général)		Boiterie mb ant	16/09/2004

Vaccin	21/09/2004	17/08/05 (autopsie)	mésoangioblastes 2 (greffe autologue)	biopsie BF g	06/10/2004
				injection 1 dans artère fémorale droite	14/01/2005
				injection 2 dans artère fémorale droite	16/02/2005
				injection 3 dans artère fémorale droite	16/03/2005
Valium	21/09/2004	26/05/05 (hyperthermie, autopsie)	mésoangioblastes 2 (greffe autologue)	biopsie BF g	06/10/2004
				injection 1 dans artère fémorale G et artère brachiale D	14/01/2005
				injection 2 dans artère fémorale G et artère brachiale D	16/02/2005
				pose sonde de gastrostomie	21/02/2005
Vampire	21/09/2004	25/02/05 (MEG)	mésoangioblastes 2 (greffe autologue)	biopsie BF g	06/10/2004
				injection 1 dans artère fémorale gauche	14/01/2005
				pose sonde de gastrostomie	21/01/2005
				EMG sous AG	27/01/2005
Valgus	16/09/2004	03/11/05 (euthanasie et autopsie)	mésoangioblastes 2 (greffe hétérologue)	injection 1 dans artère fémorale G et artère brachiale G	02/12/2004
				injection 2 dans artère fémorale G et artère brachiale G	20/01/2005
				injection 3 dans artère fémorale G et artère brachiale G	04/03/2005
Varus	16/09/2004	30/10/05 (décès spontané)	mésoangioblastes 2 (greffe hétérologue)	injection 1 dans artère fémorale droite	02/12/2004
				plaie Postérieur Gauche	5 au 23/12/04
				injection 2 dans artère fémorale droite	20/01/2005
Viko	15/09/2004	21/03/2005 (décès spontané)	mésoangioblastes 2 (greffe hétérologue)	injection 3 dans artère fémorale droite	04/03/2005
				injection 1 dans artère fémorale droite	02/12/2004
				injection 2 dans artère fémorale droite	20/01/2005
Viking	22/08/2004	28/04/05 (autopsie pour protocole)	Exon Skipping	injection 3 dans artère fémorale droite	04/03/2005
				boiterie des membres antérieurs	14/12/2004
				injection IM dans membre postérieur gauche (BF)	25/02/2005
Akan	06/01/2005	11/08/05 (euthanasie pour motif clinique, autopsie)	Exon Skipping	pose sonde de gastrostomie	05/03/2005
				injection IV rétrograde mb ant G sous AG	08/02/2005

## **Annexe 7 : Mode de conception d'une grille de score clinique** (d'après [33])

### A) Etape conceptuelle

Elle a pour but de clarifier les objectifs de l'évaluation et d'identifier la population cible, grâce à l'état des connaissances sur le sujet (littérature, instruments disponibles, experts).

On aboutit alors au développement d'un nouvel instrument ou à la traduction et à l'adaptation d'un instrument existant dans une autre langue.

### B) Etape qualitative

Les phases principales de l'étape qualitative sont : la mise au point de la procédure, l'identification et recrutement des sujets de l'échantillon, la réalisation des notations et l'analyse du contenu, l'élaboration d'une liste de verbatims d'intérêt (questions candidates) et enfin la rédaction d'un ensemble de questions candidates à partir de ces verbatims.

### C) Etape quantitative

Lors du développement d'un nouvel instrument, l'étape quantitative comporte 2 phases : la première phase vise principalement à la sélection des questions parmi celles proposées à l'issue de l'étape qualitative, la seconde phase l'évaluation des propriétés métrologiques de l'instrument résultant.

#### C) 1. Phase de construction

L'ensemble des questions candidates est administré à un ou des groupes de sujets appartenant à la population cible. Les résultats sont analysés (analyses factorielles, analyses de corrélation, etc.) et le nombre de questions est réduit pour établir une version préliminaire de la grille de notation dont on pourra évaluer les propriétés et obtenir une première version de la méthode de calcul des scores.

Durant cette phase, on cherche à sélectionner les meilleurs items au sein du pool de questions candidates. Les analyses porteront donc surtout sur les items, dont la répartition des réponses et la fiabilité « test-retest » (intra-observateur et inter) sont étudiés

##### Niveau de mesure

##### Nombre de modalités de réponse

On choisit ici un format de réponse ordinal, la note 0 correspondant à la réponse « non, pas du tout », 1 à « oui un peu » et 2 à « oui beaucoup ».

##### Difficulté des items et de leurs modalités

Il est nécessaire que les items aient des seuils de réponse bien répartis sur toute l'étendue de l'attribut mesuré pour assurer au score de l'échelle (constitué par une somme simple des réponses) un niveau de mesure intervalle.

Dans le cas où certains items seraient plus difficiles à mettre en place que d'autres, une pondération peut corriger le problème.

Pour des items ordinaux, les distances sur une échelle de difficulté ou de sévérité entre 2 modalités de réponses successives d'un item doivent être égales : la distance entre la note 0 et la note 1 doit être égale à la distance entre la note 1 et la note 2.

##### Fiabilité des items : le coefficient Kappa

L'estimation de la fiabilité consiste ici à soumettre la grille à 2 opérateurs différents pour tester les mêmes animaux et à étudier la concordance des mesures successives : c'est le test-retest.

Le coefficient kappa permet de juger l'accord entre 2 juges.

Si le format de réponse est ordinal, un coefficient Kappa « pondéré » (suivant la gravité des discordances) peut aussi être calculé.

##### Validité de construction longitudinale

L'étude de la validité de construction longitudinale des items est une étape indispensable du développement d'une échelle de mesure.

On peut construire des indicateurs de changement calibrés, appelés mesures d'effect size (ES). Il en existe plusieurs types. Le premier est calculé à partir des différences de scores observés de la variable X (il faut en prendre la moyenne DX), divisée par l'écart-type du score au temps initial (baseline) SD(X).

### C) 2. Phase de validation

La première version de la grille doit être testée sur un échantillon de la population cible de taille suffisante dans un cadre expérimental.

On évalue alors la fiabilité (reproductibilité), la validité et la sensibilité au changement de l'échelle. Des méthodes statistiques adaptées doivent être utilisées pour chacune de ses évaluations.

#### Acceptabilité de l'échelle

L'évaluation de la version finale de l'instrument doit bien sûr comprendre l'acceptabilité en situation réelle de cet instrument, avec son format, sa présentation, son nombre total d'items...

#### Fiabilité

L'évaluation de la fiabilité doit s'effectuer à l'aide du coefficient de corrélation intraclasse, mais surtout avec la méthode graphique de Bland et Altman.

## Annexe 8 : Spécifications techniques des caméras Axis 2130

### Spécifications techniques - Caméra réseau AXIS 2130 PTZ



#### Généralités

- Contrôle PTZ intégré et zoom 16x de haute qualité
- Serveur Web et interface réseau intégrés. Fonctionne sans PC
- Système d'exploitation issu de Linux

#### Configuration nécessaire

- Windows 98, Windows 2000, Windows XP, Windows NT, Windows ME, Linux, Mac OS ou Mac OS X
- Internet Explorer 4.x, 5.x ou Netscape Navigator 4.x

#### Installation

- Installation facile et rapide : branchez la caméra sur le réseau et affectez-lui une adresse IP

#### Gestion

- Configuration à distance et état via les outils de gestion Web

#### Sécurité

- Protection par identifiant utilisateur et mot de passe. Accès limité pour utilisateurs isolés ou groupes de travail, ou accès libre aux utilisateurs Internet connectés

#### Protocoles supportés

- TCP/IP, HTTP, FTP, SMTP, ARP, BOOTP, PPP, CHAP, PAP, DHCP (liste non exhaustive)

#### Caractéristiques de la caméra

##### Capteur

- CCD 1/4" Sony ExView HAD entrelacées
- H x V : 768 x 494
- Définition image (pixels): 704(H) x 480(V)

##### Exposition

- Compensation des contre-jours
- Contrôle automatique du gain (AGC)
- Balance automatique des blancs (AWB)

##### Sensibilité

- Sensibilité minimum 6 lux

#### Images

- Puce de compression à hauts débits, générant des images fixes JPEG de haute qualité et des vidéos Motion-JPEG en couleur
- Jusqu'à 30 images/seconde en résolution 352x240
- Jusqu'à 10 images/seconde en résolution 704x480
- 5 niveaux de compression disponibles. La taille fichier d'une image compressée JPEG dépend du contenu de l'image.

\*Configuration renversée pour positionnement au plafond



- La fonction de contrôle de la bande passante élimine les risques de saturation du flux de données sur le réseau. Généralement, 30 images par seconde nécessitent environ 1,5 Mbps.

- Les images contenant de nombreux détails génèrent des fichiers plus volumineux. La qualité des images est contrôlée par le niveau de compression. Une forte compression produit de petits fichiers, alors qu'une faible compression maintient une meilleure qualité d'images au détriment d'un fichier plus volumineux. Le tableau ci-dessous présente les tailles moyennes de fichiers, à partir de tests réels.

AXIS 2130		
Résolution	Taille de fichier (Ko)	Nb image/sec
704 x 480*	7-150	10
352 x 240	1,4-40	30
176 x 112	0,3-10	30

#### Matériel

- Puce de compression ARTPEC
- Processeur RISC 32 bits hautes performances, ETRAX 100LX, 100 MIPS
- RAM : 16 Mo
- FLASH PROM : 4 Mo

#### Connecteurs et gestion des Entrées/Sorties

- Connexion réseau RJ-45 pour 100baseTX Fast Ethernet et 10baseT Ethernet
- Connecteurs d'Entrée/Sortie (I/O) comportant un contact sec en entrée et un contact sec en sortie pour gestion d'incidents et de périphériques extérieurs
- Alimentation électrique : 13V AC, 9,6 VA
- Enregistrement et remontée automatique des images par email (SMTP) ou FTP en cas de déclenchement d'incidents

#### Compression

- Séquences animées Motion-JPEG et images fixes JPEG. Contrôle de la compression par l'utilisateur

#### Fonctions vidéo

- Ajout de l'heure en vignette et d'un texte en superposition sur l'image. Contrôle des couleurs (N/B ou couleur)

#### Réseaux supportés

- 10baseT Ethernet ou 100baseTX Fast Ethernet, TCP/IP, HTTP, FTP, SMTP, NTP, ARP, DHCP, BOOTP

#### Buffer pré/post alarme

- Jusqu'à 4 Mo de mémoire disponibles pour enregistrer les séquences vidéo précédent et suivant le déclenchement d'une alarme

#### Contrôle Pan/Tilt/Zoom

- Angle de couverture horizontale (Pan) :
  - AXIS 2130 : 200°
  - AXIS 2130R\* : 340°
- Angle de couverture verticale (Tilt):
  - AXIS 2130 : 60°
  - AXIS 2130R\* : 100°
- Zoom jusqu'à 16x
- 40 positions pré-définies
- Fonction de retour à la position d'origine

#### Alimentation

- Alimentation : 13V DC,
- Consommation maximum : 25W

#### Logiciels complémentaires fournis

- AXIS IP Installer - pour installer rapidement plusieurs unités
- Modules ActiveX nécessaires pour le développement d'applications et l'intégration à des systèmes extérieurs

#### Applications clients

- Applications clients pré-définies facilement paramétrables
- L'AXIS 2130 est prête à embarquer des scripts personnalisés et rédigés sur mesure.

#### Conditions d'exploitation

- Température d'utilisation : 5 à 40°C (40 à 125°F)
- Humidité ambiante : 20 à 80% RHG

#### Dimensions et poids

##### AXIS 2130

- Hauteur : 10,7 cm (4,2")
- Largeur : 11,2 cm (4,4")
- Profondeur : 14,3 cm (5,6")
- Poids : 0,64 kg (1,41lb)

##### AXIS 2130R\*

- Hauteur : 13,7 cm (5,4")
- Largeur : 11,2 cm (4,4")
- Profondeur : 14,3 cm (5,6")
- Poids : 0,64 kg (1,41lb)

#### Certifications

- EMC : FCC Class B (DoC), VCCI ClassB, AS/NZS3548 ClassB (C-tick) EN55022/1994, EN50024/1998, EN61000-3-2/1998, EN61000-3-3/1995
- Sécurité : EN 60950, UL, CSA, 電気用品安全法 (JAPON), AS, SISIR, GS, FIMKO (Bloc d'alimentation)

#### Accessoires fournis

- Alimentation électrique 13V DC, 25 W
- Connecteurs Entrée/Sortie (I/O)

Pour plus d'informations, consultez notre site : [www.axis.com/fr](http://www.axis.com/fr)





## Annexe 9 : Manuel d'utilisation de Axis Camera Recorder (extraits)

Manuel complet disponible sur [www.axis.com](http://www.axis.com)

### 1. Introduction (cf. manuel complet)

### 2. Guide d'installation (cf. manuel complet)

### 3. Périphériques - Configuration rapide (cf. manuel complet)

### 4. Application - Mode Administrateur

Le mode Administrateur est utilisé lors de la configuration initiale du système, lorsque de nouvelles caméras sont installées et chaque fois que la configuration doit être modifiée. Il contrôle aussi la configuration de l'affichage du Moniteur, les conditions d'enregistrement, le paramétrage du calendrier...

#### 4. 1. Périphériques - Configuration détaillée

#### 4. 2. Modifications de la configuration des périphériques

#### 4. 3. Configuration du mode Moniteur et de l'affichage

} cf. manuel complet

#### 4. 4. La qualité d'image et des conditions d'enregistrements

##### Paramètres de l'enregistrement

**Vitesse d'enregistrement désirée** - Elle correspond au nombre d'images enregistrées par seconde, par heure ou par jour. Le laps de temps attendu entre chaque image est aussi calculé et affiché.

**Images sauvegardées** - Sélectionne quelles images seront conservées. Quand l'option *Images en mouvement* est choisie, seules les images dont le mouvement dépasse la limite de sensibilité paramétrée seront sauvegardées.

**Sauvegarde les...** - Si l'option *Images en mouvement* est sélectionnée comme condition d'enregistrement, il est alors possible d'enregistrer des images « pré » et « post » alarme (quand, par exemple, le mouvement dépasse la limite de sensibilité paramétrée). Ces images sont stockées en permanence (5 images avant et après par exemple) et sont donc prêtes à être enregistrées en cas d'alarme.

##### Configuration de l'affichage caméra

**Afficher mouvement** - Sélectionnez cette option si vous voulez que les mouvements apparaissent à l'écran. Les zones de mouvement seront alors apparentes dans une couleur pré-sélectionnée. Cette couleur est choisie en cliquant sur le bouton **Couleur mouvement**.

**Afficher zones** - Sélectionnez cette option afin de faire apparaître à l'écran les zones exclues de la détection de mouvements. Les zones d'exclusion seront alors apparentes dans une couleur pré-sélectionnée. Cette couleur est choisie en cliquant sur le bouton **Couleur zone** dans les **Réglages zones exclusion**.

##### Paramètres de la base de données

C'est ici que l'on spécifie le nombre d'images à stocker dans la base de données ainsi que son emplacement sur le disque dur du PC. Une base de données distincte est utilisée pour chaque caméra.

**Maximum d'images dans la base** - Sélectionnez cette option afin de limiter la base de données de la caméra à un nombre d'images maximum. Quand le nombre d'images maximum a été atteint, l'image la plus ancienne est automatiquement effacée par toute nouvelle image enregistrée. Le nombre d'images maximum qui peut être sauvegardé pour chaque caméra est de 600 000. Quelques exemples de périodes pouvant être couvertes dans la base de données d'une caméra sont présentés ci-dessous :

- Enregistrement de toutes les images à la fréquence de 6 images/s = au maximum, 28 h d'enregistrement

- Enregistrement des seules images en mouvement à la fréquence de 30 images/s, celles-ci représentant moins de 23% de la période couverte = au maximum, 24 heures d'enregistrement

Pour l'ensemble des caméras, un total maximum de 160 Go (Gigaoctets) peut être sauvegardé.

**Supprime images antérieures à** - (en minutes, heures ou jours). Sélectionnez cette option afin de limiter dans le temps la conservation des enregistrements dans la base de données. Les images seront automatiquement effacées quand elles seront plus anciennes que le temps spécifié. Notez qu'il n'est pas possible d'enregistrer plus de 600 000 images même si la limite de temps est très élevée.

**Effacer base de données...** - Cliquez sur ce bouton afin de supprimer toutes les images enregistrées la caméra. Attention: tous les enregistrements de cette caméra seront définitivement perdus.

**En cas d'erreur base de données...** - En cas d'erreur dans la base de données images, 2 options sont disponibles. La base de données peut être réparée ou elle peut être supprimée au démarrage du Moniteur. Notez que la réparation d'une base de données prend beaucoup de temps.

Si les enregistrements sont plus longs que prévus ou si l'espace disque est soudainement réduit pour une raison quelconque (par exemple une erreur de taille disque), un re-dimensionnement automatique de la base de données est appliqué. Les tailles des bases de données existantes seront réduites, effaçant un certain pourcentage des enregistrements présents et chaque base de données sera temporairement limitée à cette nouvelle taille. Vous en serez informé à l'écran via les fichiers de «log» et par E-mail si cette option est activée. Lors de la prochaine utilisation du Moniteur, les anciennes tailles de base de données seront utilisées. Il appartient alors à l'utilisateur d'adopter les nouvelles tailles ou de remédier au problème du disque dur.

#### 4. 5. Paramètres de la détection de mouvements

Le système de détection de mouvements peut contrôler (a) l'enregistrement d'images sur le disque dur et (b) l'activation d'alarmes. Il constitue donc un élément essentiel de l'installation.

Les réglages de la détection de mouvements demandent une attention particulière afin que celle-ci fonctionne correctement.

Il est recommandé d'exclure par avance les zones qui ne doivent pas être soumises à la détection de mouvements.

**Indicateur de niveau de mouvement** - Indique le niveau actuel de mouvement détecté à l'image. L'indicateur est vert quand ce niveau est en dessous du seuil et rouge quand le seuil est dépassé.

**Indicateur de seuil d'alarme** - Indique le seuil de l'alarme sélectionnée. Une alarme est générée quand le niveau de mouvement dépasse ce seuil.

**Curseur de sensibilité au bruit** - Ajuste le niveau de sensibilité au bruit de chaque élément de l'image (pixel). Le niveau de sensibilité au bruit détermine si un changement de luminosité et de couleur (changement de lumière) d'un pixel doit être considéré comme un bruit (changement insignifiant) ou comme un mouvement (changement significatif). En mode « mise à jour » en temps réel de l'image de la caméra, les pixels dans lesquels le mouvement est détecté apparaissent dans la couleur de détection de mouvements (verte par défaut).

**Curseur de sensibilité au mouvement** - Ajuste la sensibilité au mouvement.

Ceci contrôle le seuil d'alarme et détermine donc la taille minimum d'un objet qui générera une alarme. Faites glisser le curseur jusqu'à ce que le seuil d'alarme soit à sa position optimale.

**Remarque:** Certaines caméras génèrent des bruits vidéo indésirables quand elles sont utilisées dans des conditions de faible luminosité. Afin d'éviter des remontées d'alarme non justifiées, il peut être nécessaire de réduire la sensibilité au bruit ou d'augmenter la lumière dans la zone surveillée.

#### 4. 6. Exclusion de zones de la détection de mouvements

#### 4. 7. Configuration et utilisation de pré-positions PTZ

#### 4. 8. Paramètres généraux

#### 4. 9. Configuration d'E-mail

} cf. manuel  
complet

#### 4. 10. Programmation de l'activité des caméras et des alarmes

Utilisant un agenda hebdomadaire, le calendrier intégré permet un contrôle de fonctions importantes du système. Le principe de base de la programmation consiste à « cliquer/glisser » dans la fenêtre afin de créer (ou supprimer) une période pendant laquelle différentes fonctions seront activées :

- Contrôle des horaires de démarrage et d'arrêt de la caméra sélectionnée (En ligne)
- Contrôle du démarrage et de l'arrêt de l'événement (via capteur extérieur) de la caméra sélectionnée (En ligne)
- Alarmes par E-mail sur détection de mouvements
- Alarmes sonores sur détection de mouvements

Le calendrier est accessible depuis l'écran principal de l'Administrateur en cliquant sur le bouton

**Calendrier.** L'écran suivant apparaît :

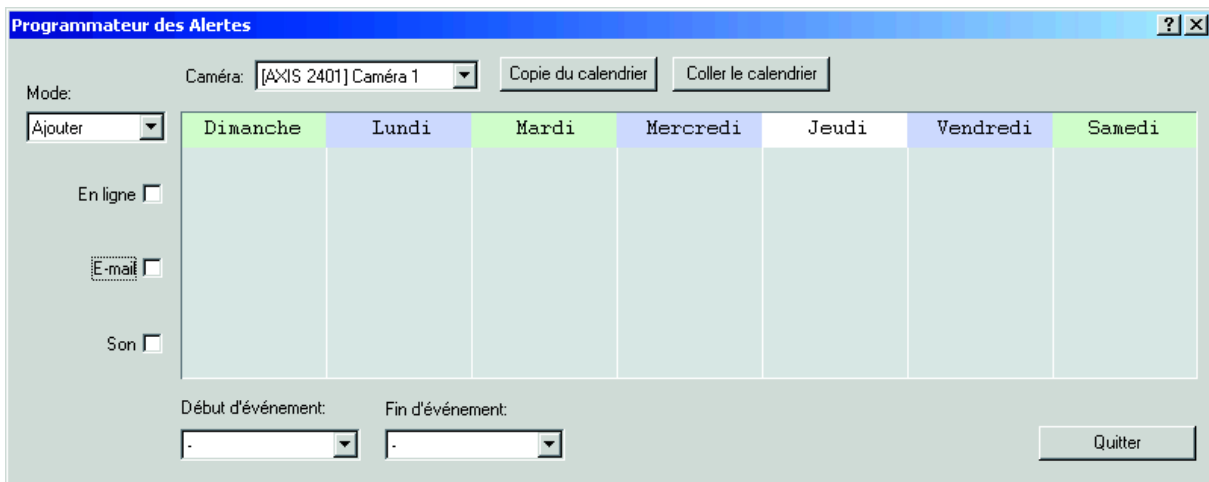


Figure 9 - L'écran du calendrier.

Les fonctions suivantes sont disponibles:

**Mode** - Le mode sélectionné détermine si les périodes seront ajoutées ou effacées en cliquant/glisant dans la fenêtre. Seules les fonctions sélectionnées (En ligne, E-mail, Son) seront affectées par l'opération.

**En ligne** - Cochez cette case pour créer (ou supprimer) les périodes d'activité de la caméra sélectionnée, par exemple: quand la caméra enregistrera. Une caméra peut être contrôlée dans le temps ou sur événement. Une barre jaune indique que la caméra est active sur événement et une barre violette que la caméra est active pendant toute la période définie.

**Caméra** - Sélectionnez une caméra dans la liste. Toutes les opérations définies dans le calendrier s'appliqueront à la caméra sélectionnée.

### Configuration du calendrier - un exemple

Suivez les instructions suivantes afin de programmer l'activation de caméras sur une période donnée ou sur événements et l'envoi d'alarmes via E-mail sur toute autre période.

1. A partir de la liste de **Mode**, sélectionnez Ajouter
  2. Cochez la case **En ligne** afin d'ajouter les périodes de temps pendant lesquelles la caméra sera active.
  3. Pour entrer dans le détail des heures d'une journée, placez le curseur sur le nom de la journée jusqu'à ce que le curseur se transforme en loupe et cliquez.
  4. Faites glisser le curseur depuis Lundi 08:00 jusqu'à Vendredi 18:00 et relâchez le bouton de la souris.
  5. Une petite boîte de dialogue apparaît. Choisissez quand activer les caméras pendant la période spécifiée, soit **Toujours** ou seulement **Sur événement** c'est à dire quand une alarme est déclenchée (toujours dans la période spécifiée uniquement). Choisissez **Toujours**.
  6. Cliquez à nouveau sur le nom du jour afin de sortir.
  7. Vous devriez voir désormais une barre violette représentant la période spécifiée. Cette barre indique que la caméra sélectionnée sera active pendant cette période.
- Nous devons maintenant couvrir le reste de la semaine mais nous ne voulons un déclenchement des caméras que sur événement, lorsque que quelque chose d'inhabituel survient en dehors des heures de travail.
8. Répétez les étapes 1 et 2 comme décrit ci-dessus.
  9. Faites glisser le curseur afin de couvrir la période de Dimanche 00:00 à Lundi 08:00.
  10. À l'écran qui apparaît, sélectionnez **Sur événement** afin d'activer la caméra uniquement lorsqu'il y a une alarme. Choisissez les événements qui démarreront ou arrêteront la caméra à partir des listes **Début d'évènement** et **Fin d'évènement**.
  11. Le calendrier affiche désormais une barre jaune correspondant à une période contrôlée sur événements.
  12. Répétez les étapes ci-dessus pour la période allant de Vendredi 18:01 à Samedi 23:59.

Afin de compléter l'exemple, ajoutez la remontée d'alarme via E-mail pour les deux périodes contrôlées sur événements.

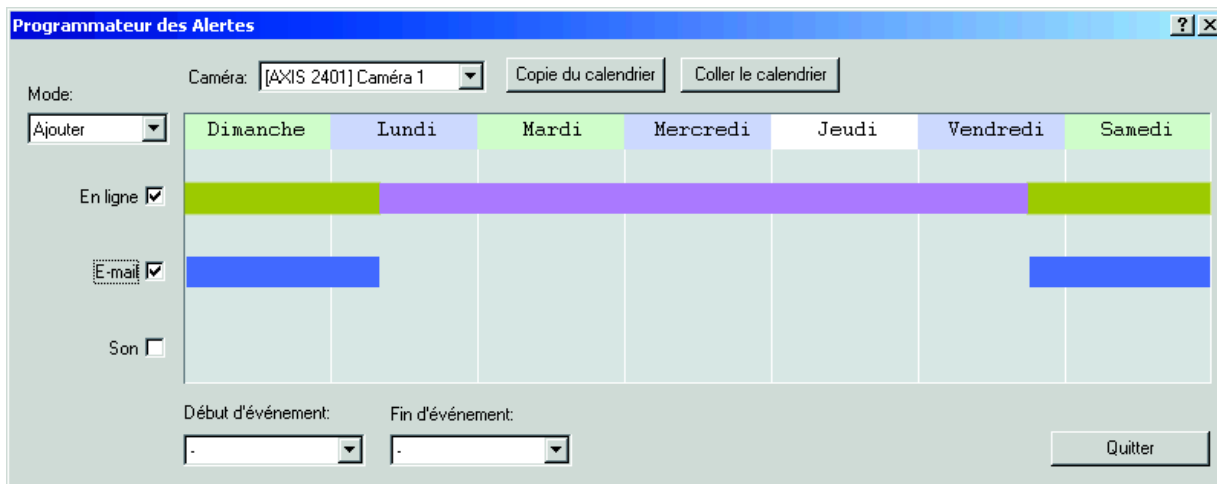


Figure 10 - L'écran du calendrier affichant notre exemple.

## 5. Application - Mode Moniteur

L'application Moniteur est le coeur du système d'Axis Caméra Recorder et est utilisée pour toutes les opérations quotidiennes. En plus d'être l'interface utilisateur principale, le Moniteur démarre et arrête les caméras, contrôle les caméras PTZ, récupère et affiche des images en temps réel, détecte les mouvements, enregistre les images dans la base de données, crée des fichiers vidéo (de type AVI), exporte et imprime des images, envoie des alarmes, etc.

**Important !** Le système de surveillance ne fonctionnera que lorsque le mode Moniteur est actif. Si l'application est arrêtée, les images ne seront pas enregistrées et les messages d'alarme ne seront pas envoyés.

Démarrez le Moniteur à partir du menu Démarrer ou depuis le raccourci sur le Bureau de Windows.

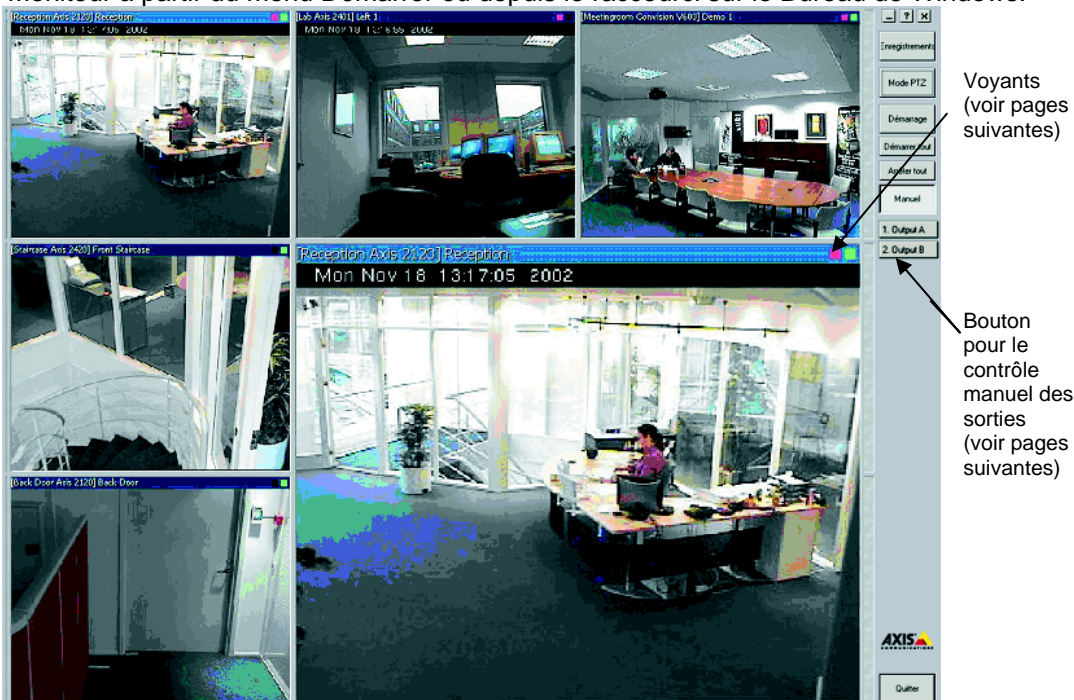


Figure 11 - L'écran principal du Moniteur. Montré ici avec cinq fenêtres de contrôle (chacune affichant l'image de la caméra qui lui est associée) et une fenêtre dynamique.

Quand l'application Moniteur est lancée, elle démarre automatiquement les caméras qui ont été configurées comme étant **En ligne** dans le calendrier pendant la période en cours. Le calendrier peut être désactivé en cliquant sur le bouton **Manuel** qui permet de démarrer les caméras manuellement ; une par une en cliquant sur **Démarrage** ou toutes simultanément en cliquant sur **Démarrer tout**.

La fenêtre dynamique affiche une vue agrandie de la vignette sélectionnée.

Pour en afficher une autre, sélectionnez la en cliquant dessus à l'aide de la souris.

## 5. 1. Voyants

Chaque fenêtre du Moniteur est affublée de voyants, un vert et un rouge. Le voyant vert clignote pour indiquer que la caméra reçoit des images. Un voyant rouge fixe indique qu'il y a eu une détection de mouvements par une caméra.

## 5. 2. Outils et options disponibles pour le Moniteur

L'écran principal fournit les outils suivants:

**Enregistrements** - Visualisez vos enregistrements dans le gestionnaire d'enregistrements.

**Mode PTZ** - Cliquez sur ce bouton pour activer le panneau de contrôle PTZ (le bouton reste enfoncé).

**Démarrage/Arrêt** - Appuyez sur ce bouton pour démarrer ou arrêter la caméra de la fenêtre sélectionnée. Disponible uniquement en mode manuel.

**Démarrer tout** - Démarre toutes les caméras simultanément. Disponible uniquement en mode manuel.

**Arrêter tout** - Arrête toutes les caméras simultanément. Disponible uniquement en mode manuel.

**Manuel** - Bascule du mode calendrier vers le mode manuel. En mode calendrier, le calendrier est responsable du démarrage et de l'arrêt des caméras. En mode manuel, les caméras sont contrôlées manuellement. Le système est en mode manuel quand le bouton est enfoncé.

**Navigation rapide (NR)** - Bascule du mode en ligne vers le mode navigation rapide dans la fenêtre dynamique. La fenêtre dynamique est en mode navigation rapide quand le bouton est enfoncé.

**Flèches NR** - Utilisez ces boutons pour naviguer rapidement en avant ou en arrière dans les enregistrements de la caméra affichée dans la fenêtre dynamique.

**Quitter** - Ce bouton arrête le Moniteur et donc tous les enregistrements, les alarmes, etc.

## 5. 3. Utilisation du gestionnaire d'enregistrements

Le gestionnaire d'enregistrements est utilisé pour lire des enregistrements, imprimer ou exporter des images simples, créer des fichiers vidéo de type AVI, etc.

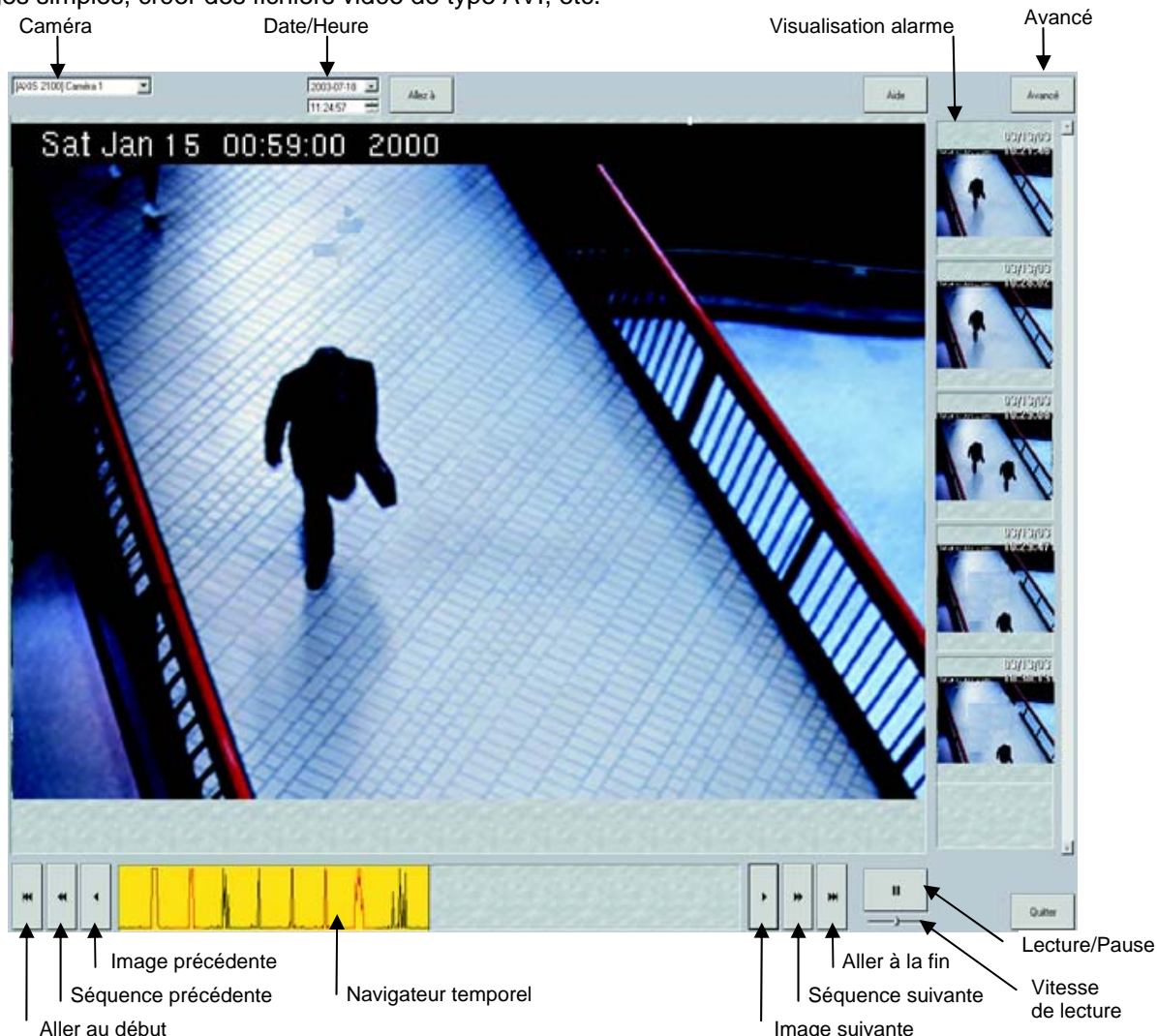


Figure 13 - Le gestionnaire d'enregistrements.

L'écran du gestionnaire d'enregistrements fournit les contrôles et boutons suivants:

**Caméra** - Sélectionnez la caméra pour laquelle vous souhaitez visualiser les enregistrements.

**Date/Heure** - Utilisez ces champs et cliquez sur Aller afin d'aller directement à la date et à l'heure indiquées. Si aucune image n'a été enregistrée à cette période, ce sera la première image enregistrée après l'horaire spécifié qui sera affichée.

**Visualisation alarme** - Cette visualisation montre la première image de chaque séquence enregistrée suite à une détection de mouvements. Il est possible d'utiliser cette visualisation pour trouver une séquence spécifique.

**Navigateur temporel** - Le graphique temporel indique chaque instant où il y a eu détection de mouvements dans les images enregistrées. Vous pouvez utiliser votre souris pour modifier la position du graphique (cliquer/glisser) et accéder à la période correspondant à cette position. Les 3 couleurs apparentes dans le navigateur permettent de distinguer une période d'une autre.

**Aller au début/à la fin** - Cliquez pour aller directement au début ou à la fin de l'enregistrement.

**Séquence précédente/suivante** - Cliquez pour passer à la séquence (contenant du mouvement) précédente ou suivante.

**Image précédente/suivante** - Cliquez pour passer à l'image précédente ou suivante.

**Pause/Lecture** - Cliquez pour mettre en pause ou reprendre la lecture. La lecture s'effectue en temps réel ou avec un minimum de 1 image par seconde. La vitesse de lecture peut être modifiée en bougeant le curseur situé sous le bouton de pause pendant la lecture.

**Curseur de vitesse de lecture** - Pendant la lecture, le curseur apparaît. Faire glisser le curseur vers la gauche ou la droite augmente ou diminue la vitesse de lecture. En relâchant le curseur, la lecture s'effectue en temps réel ou à un minimum de 1 image par seconde.

**Bouton Avancé** - Bascule du mode visualisation des alarmes vers le mode de gestion avancé. Le gestionnaire d'enregistrements est en mode avancé quand le bouton est enfoncé.

## Fonctionnalités du mode avancé

Le mode avancé vous permet d'imprimer ou d'exporter des images simples, de créer des fichiers vidéo AVI et de zoomer dans les images. Vous accéderez aux informations suivantes quand le bouton Avancé est enfoncé:

- **Enregistrements** - Indique le nombre d'images enregistrées pour la caméra sélectionnée.

- **Limite d'enregistrement** - Indique le nombre maximum d'images dans la base de données pour la caméra sélectionnée. Si le dimensionnement automatique de la base de données est actif, la taille temporaire de la base de données est indiquée.

- **Début: Fixer** - Trouvez la première image de la séquence à exporter en images JPEG ou en fichier AVI et cliquez sur ce bouton pour fixer l'heure de cette image comme heure de début.

- **Fin: Fixer** - Trouvez la dernière image de la séquence à exporter en images JPEG ou en fichier AVI et cliquez sur ce bouton pour fixer l'heure de cette image comme heure de fin.

- **Export** - Appuyez sur ce bouton pour exporter de simples images JPEG issues de la caméra sélectionnée. Les images comprises entre l'heure de début et de fin sont exportées.

Avancé

Enregistrements:  
2461

Limite d'enregistrement:  
10000 Images

Début:  
06/23/03 17:08:44 Définir

Fin:  
06/23/03 17:08:41 Définir

Export

Création d'AVI

Imprimer

Images lisses

Échelle 1:1

Figure 14 - La barre de la fonction Avancé.

### • Création d'AVI -

Appuyez sur ce bouton pour créer un fichier vidéo AVI de la séquence comprise entre l'heure de début et de fin.

Indiquez le nom du fichier AVI à créer dans la boîte de dialogue du menu Créer AVI. Le codec de compression peut aussi y être sélectionné. Notez que Axis Camera Recorder ne fournit pas de codecs. Seuls les codecs déjà installés sur l'ordinateur seront disponibles.

Le codec utilisé pour créer le fichier AVI doit aussi être installé sur l'ordinateur où le fichier sera lu.

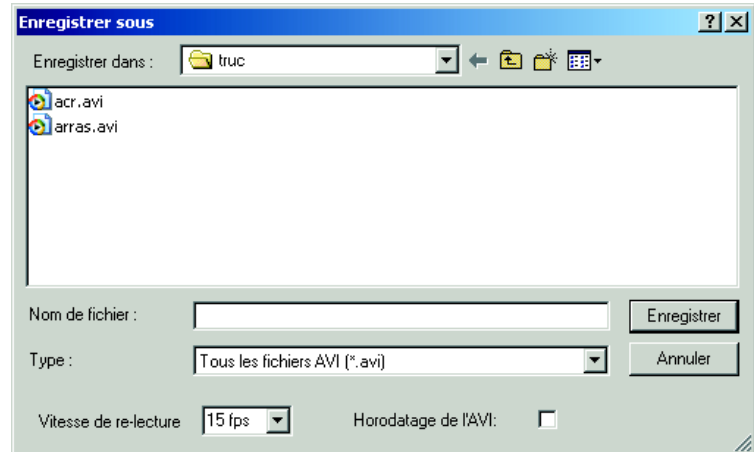


Figure 15 - La fenêtre Créer AVI.

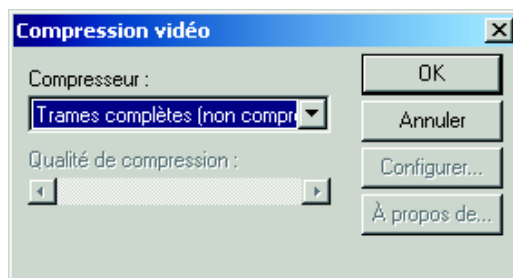


Figure 16 - Exemples de codecs

- **Zoom numérique (+/-)** Appuyez sur ces boutons (loupes +/-) pour zoomer dans l'image. Après un zoom dans l'image, vous pouvez utiliser la souris pour faire glisser l'image afin d'afficher la partie voulue à l'écran.
- **Images lisses** - Cochez cette case afin d'améliorer l'image électroniquement. Cette option est particulièrement efficace après un zoom digital dans l'image
- **Echelle 1:1** - Affiche les images à leur taille originale; celle générée par le périphérique. Notez que si l'image est plus grande que la résolution de la fenêtre de navigation, il ne sera pas possible d'afficher l'image à l'échelle 1:1
- **Imprimer** - Cliquez pour imprimer l'image sélectionnée sur l'imprimante par défaut. Afin d'utiliser une autre imprimante, définissez la préalablement en tant qu'imprimante par défaut. Après avoir cliqué, il sera possible d'ajouter le nom de l'opérateur, le nom de la société ainsi que des notes, au document imprimé. La date et l'heure seront automatiquement ajoutées.





## Annexe 10 : Guide d'utilisation du logiciel Labwatcher



# LabWatcher®

## MANUEL D'UTILISATION

*Piano Ethologique pour l'enregistrement des événements et des états pendant les expériences en laboratoire.*

[VIEWPOINT LIFE SCIENCES Inc.](http://www.viewpointlifesciences.com)  
[410 Elm Av.](http://www.viewpointlifesciences.com)  
[Otterburn Park, QC J3H 4B5](http://www.viewpointlifesciences.com)  
[Canada](http://www.viewpointlifesciences.com)

[☎: \(450\) 464 9632](tel:+14504649632)  
[Fax \(450\) 464 0837](tel:+14504640837)  
[contact@viewpointlifesciences.com](mailto:contact@viewpointlifesciences.com)  
[www.viewpointlifesciences.com](http://www.viewpointlifesciences.com)

[VIEW POINT](http://www.viewpoint.fr)  
[7 bis rue des Aulnes](http://www.viewpoint.fr)  
[F-69410 CHAMPAGNE AU MONT D'OR](http://www.viewpoint.fr)  
[France](http://www.viewpoint.fr)

[☎ : +33 \(0\)4 721 791 92](tel:+330472179192)  
[Fax: + 33 \(0\)4 721 791 99](tel:+330472179199)  
[contact@viewpoint.fr](mailto:contact@viewpoint.fr)

[www.viewpoint.fr](http://www.viewpoint.fr)

V 1.1 Revision B - December 2004

Copyright © 1990-2004 All right reserved.

### **1. INTRODUCTION**

Ce piano éthologique permet de coter le comportement de sujets.

Au cours d'étude en sciences cognitives, il est nécessaire de générer des statistiques sur le comportement de sujets ; dans ce but on observe le plus généralement un enregistrement vidéo d'animaux (souris, singes...) et on veut alors prendre note de certains types de comportements.

Ces comportements sont nommés « **Etat** » ou « **Evènement** » peuvent être enregistrés avec LabWatcher.

Le système permet de coter :

- pour les états : le nombre **d'occurrences et le temps passé** (ex : manger)
- pour les événements : le nombre **d'occurrences** uniquement (ex : sauter)

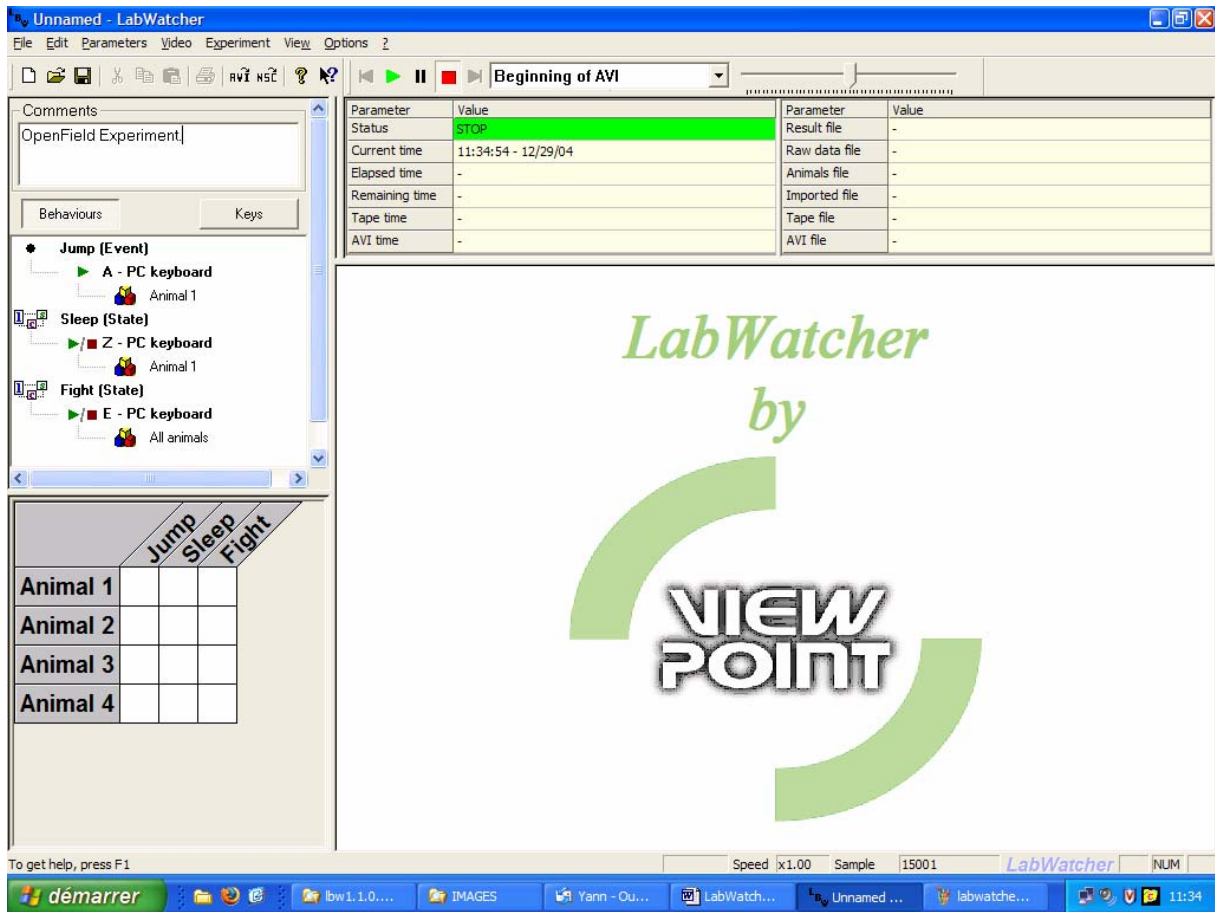
Ces enregistrements vidéo sont réalisés par une autre application Numériscope qui permet entre autre l'enregistrement intelligent de séquences.

LabWatcher s'inscrit donc dans un processus de traitement des données.

L'application fournit finalement un fichier de type tableau, récapitulant les données saisies. Ce fichier pourra servir à des analyses complémentaires : extraction de données dans un logiciel statistique.

## 2. VUE D'ENSEMBLE DU LOGICIEL

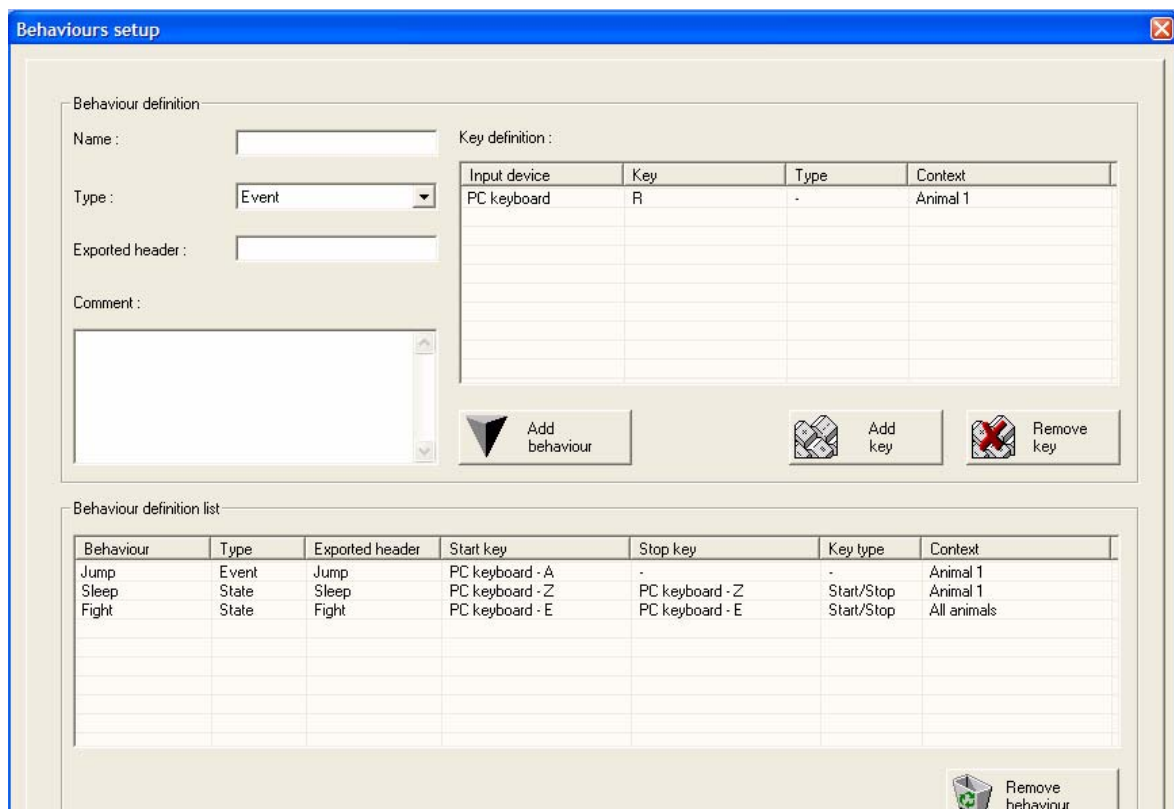
Nous allons expliquer les fonctions du programme au travers de l'interface utilisateur.



L'interface se divise en trois parties (cf. image) :

- La fenêtre « *Configuration* » à gauche récapitule la configuration de la manipulation.
- La fenêtre située en bas à gauche, le « *Log* », permet de visualiser les actions en cours de manipulation.
- La fenêtre « *Status* » en haut à droite permet de connaître les informations essentielles à la manipulation (temps/ fichier...).
- La fenêtre en bas à droite affiche la **vidéo en cours** ou l'image de la caméra en cours d'analyse.





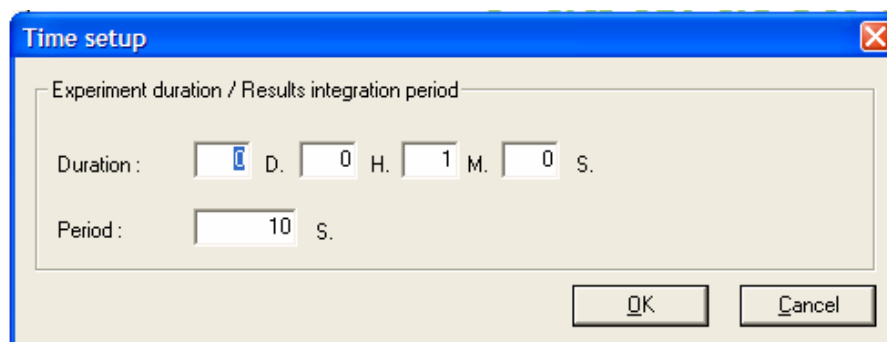
Pour définir un comportement :

- Le nommer dans champ « Name »
- Définir son type : état (« State ») pour une cotation de durée (sommeil, assis, couché, debout, mouvement, jeu, mange, boit...) ou évènement (« Event ») pour coter les occurrences (saut, roulade...).
- Associer une touche dans la fenêtre « Key definition »
- Associer l'animal concerné. Ex : « animal 1 » ou « All Animals »
- Presser le bouton « Add Behaviour »

Répéter la procédure pour chaque comportement.

### 3.3 Configuration du temps : Fenêtre « Time »

Indiquer ici la durée de votre expérience (durée du fichier AVI) et la période d'intégration (elle correspond au nombre de lignes créées dans le tableau Excel). Cette dernière définit le pas de temps dans les résultats. La plage de choix s'étale de 10 à 60 s. Par exemple, si on choisit une période de 10 s, on aura une ligne de tableau pour 10 s. Plus la période choisie est courte, plus les données sont précises, mais plus il y a de lignes à analyser.



## 4. UTILISATION

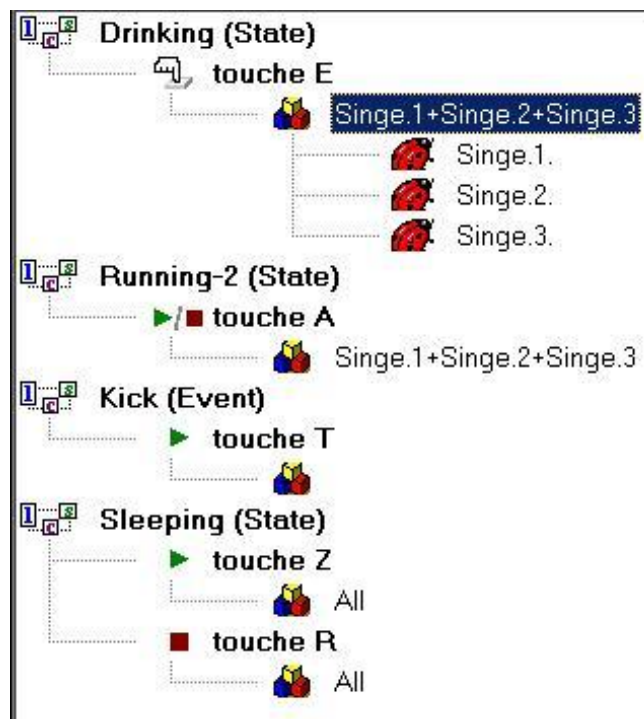
Une fois la configuration effectuée, l'utilisateur procède à la sauvegarde de son protocole par le menu « **File** → **Save** ».

L'expérience peut alors commencer, il suffit alors de lire le fichier de protocole puis il faut :

- Importer les animaux à partir d'un fichier texte : les noms génériques sont alors remplacés par les noms réels des animaux. Cette phase n'est pas obligatoire, les noms génériques apparaissant alors dans les fichiers résultat.
- Ouvrir le fichier vidéo à analyser : « **File** → **open an AVI** ».
- Puis commencer la première session en sélectionnant « **Experiment** → **execute** »
- Le fichier résultat de l'expérience est alors demandé, sous la forme « **session.lwr** ».


Vous êtes alors en mode expérience : la fenêtre « **Running session** » apparaît et la cotation commence lorsque vous poussez « **Start** ».

La fenêtre récapitulative « Configuration » permet à tout moment de se remémorer les touches.



*Exemple :*

- Si l'utilisateur appuie sur la touche A, l'état Running sera activé sur les singes 1,2 et 3. Lorsqu'il appuiera à nouveau l'état sera stoppé.
- Si l'utilisateur presse T, le compteur « Kick » sera incrémenté de 1.

En fin d'analyse d'une séquence, on choisit « **Stop** » dans la fenêtre « **Running session** », on arrête le film (bouton ) et on ferme la session (**Experiment** → **stop**).

Il faut enfin exporter les données sous forme de fichier Excel : **Experiment** → **export raw data** et on choisit le fichier analysé session.raw.

## 5. LES RESULTATS

Les résultats de type tableau fournissent des informations exploitables directement ou ultérieurement après traitement spécifique.

Voici un exemple de fichier résultat :

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Name	start	end	Drinking_ct	Drinking_dur	Running-2_ct	Running-2_dur	Kick_ct	Sleeping_ct	Sleeping_dur
2	Tortue.1	0	10	0	0	0	0	0	0	0
3	Tortue.2	0	10	0	0	0	0	0	0	0
4	Tortue.3	0	10	0	0	0	0	0	0	0
5	Tortue.4	0	10	0	0	0	0	0	0	0
6	Singe.1	0	10	0	0	2	3	0	0	0
7	Singe.2	0	10	0	0	2	3	0	0	0
8	Singe.3	0	10	0	0	2	3	0	0	0
9	Chat.1	0	10	0	0	0	0	0	0	0
10	Chat.2	0	10	0	0	0	0	0	0	0
11	Chat.3	0	10	0	0	0	0	0	0	0
12	Tortue.1	10	20	0	0	0	0	0	1	10
13	Tortue.2	10	20	0	0	0	0	0	1	10
14	Tortue.3	10	20	0	0	0	0	0	1	10
15	Tortue.4	10	20	0	0	0	0	0	1	10
16	Singe.1	10	20	0	0	1	3	0	1	10
17	Singe.2	10	20	0	0	1	3	0	1	10
18	Singe.3	10	20	0	0	1	3	0	1	10
19	Chat.1	10	20	0	0	0	0	0	1	10
20	Chat.2	10	20	0	0	0	0	0	1	10
21	Chat.3	10	20	0	0	0	0	0	1	10
22	Tortue.1	20	30	0	0	0	0	0	0	10
23	Tortue.2	20	30	0	0	0	0	0	0	10
24	Tortue.3	20	30	0	0	0	0	0	0	10
25	Tortue.4	20	30	0	0	0	0	0	0	10
26	Singe.1	20	30	2	0	1	0	0	0	10
27	Singe.2	20	30	2	0	1	0	0	0	10
28	Singe.3	20	30	2	0	1	0	0	0	10
29	Chat.1	20	30	0	0	0	0	0	0	10
30	Chat.2	20	30	0	0	0	0	0	0	10
31	Chat.3	20	30	0	0	0	0	0	0	10
32	Tortue.1	30	40	0	0	0	0	2	0	3
33	Tortue.2	30	40	0	0	0	0	0	0	3
34	Tortue.3	30	40	0	0	0	0	1	0	3

Les résultats sont divisés en tranches de temps indiquées dans les deux premières colonnes « start » et « end ».

**Les Etats** ont deux colonnes associées :

- la colonne NomComportement\_ct correspond au nombre d'occurrences du comportement (count).
- la colonne NomComportement\_dur correspond au temps passé dans ce comportement.

**Les Evènements** ont une colonne associée : la colonne NomComportement\_ct correspond au nombre d'occurrences du comportement (count).

*Ici par exemple :*

- *durant la période 10-20 secondes, tous les animaux dormaient. Ils se sont réveillés en période 30-40 secondes.*
- *durant la période 20-30 secondes, les singes 1, 2, 3 ont bu une fois.*

**Annexe 11 : Notations des 2 observateurs pour chaque chien adulte, pendant les 17 semaines d'observation**

Résultats de l'observateur IB, pour chaque chien observé pendant 17 semaines.

Semaine	Rouble	Sam	Scoubidou	T-fal	T-fou	Tintin	Titeuf	Tsar	Ucal	Usky	Uzel
1	50,00	64,71	38,24	41,18	41,18	50,00	52,94	50,00	52,94	38,24	38,24
2	52,94	64,71	41,18	41,18	41,18	52,94	52,94	44,12	52,94	38,24	38,24
3	50,00	61,76	32,35	44,12	38,24	47,06	44,12	47,06	52,94	35,29	35,29
4	50,00	61,76	41,18	44,12	44,12	41,18	50,00	44,12	55,88	38,24	32,35
5	52,94	50,00	29,41	47,06	26,47	50,00	55,88	47,06		29,41	47,06
6	50,00	52,94	44,12	-	41,18	44,12	50,00	41,18		35,29	38,24
7	50,00	64,71	-	44,12	38,24	41,18	-	44,12		35,29	38,24
8	50,00	58,82	35,29	41,18	38,24	47,06	-	44,12		35,29	32,35
9	55,88	61,76	41,18	44,12	38,24	47,06	50,00	44,12			
10	52,94	-		-	38,24	52,94	44,12	47,06			
11	52,94	64,71		41,18	41,18	55,88	47,06	41,18			
12	52,94	61,76		44,12	38,24	55,88	44,12	38,24			
13	52,94	64,71		38,24	35,29	47,06	41,18	41,18			
14	55,88	61,76		41,18	35,29	47,06	38,24	38,24			
15	52,94	58,82		38,24		50,00	44,12	41,18			
16	55,88	61,76					41,18				
17	55,88										
Moyenne	52,60	57,17	33,66	36,67	38,24	48,63	40,99	43,53	53,68	35,66	37,50
Ecart-type	2,30	4,37	5,08	2,56	4,16	4,57	5,22	3,37	1,47	2,91	4,65
Coefficient de variation	4,37	7,65	15,09	6,98	10,88	9,39	12,73	7,75	2,74	8,17	12,40

Résultats de l'observateur MC, pour chaque chien observé pendant 17 semaines.

Semaine	Rouble	Sam	Scoubidou	T-fal	T-fou	Tintin	Titeuf	Tsar	Ucal	Usky	Uzel
1	55,88	52,94	35,29	41,18	35,29	52,94	41,18	44,12	58,82	38,24	38,24
2	47,06	44,12	23,53	44,12	31,50	44,12	47,06	44,12	52,94	32,35	29,41
3	50,00	52,94	32,35	41,18	41,18	47,06	50,00	44,12	55,88	35,29	38,24
4	55,88	58,82	38,24	38,24	44,12	41,18	41,18	38,24	58,82	32,35	35,29
5	52,94	50,00	29,41	47,06	26,47	50,00	55,88	47,06		29,41	47,06
6	55,88	55,88	32,35	-	41,18	47,06	52,94	41,18		35,29	44,12
7	-	52,94	-	47,06	38,24	38,24	-	38,24		41,18	38,24
8	52,94	50,00	47,06	44,12	35,29	50,00	-	50,00		44,12	41,18
9	52,94	52,94	44,12	41,18	41,18	38,24	50,00	52,94			
10	58,82	-		-	44,12	47,06	47,06	52,94			
11	-	61,76		44,12	38,24	44,12	50,00	50,00			
12	55,88	50,00		41,18	38,24	44,12	44,12	44,12			
13	52,94	55,88		38,24	32,35	41,18	44,12	50,00			
14	52,94	47,06		38,24	38,24	41,18	47,06	58,82			
15	55,88	50,00		32,35		41,18	44,12	52,94			
16	47,06	52,94					52,94				
17	50,00	-									
Moyenne	53,14	52,55	35,29	41,40	37,54	44,51	47,69	47,25	56,62	36,03	38,97
Ecart-type	3,42	4,43	7,70	4,07	4,99	4,43	4,49	5,93	2,82	4,91	5,39
Coefficient de variation	6,44	8,43	21,82	9,82	13,30	9,95	9,42	12,55	4,97	13,62	13,83





## Annexe 12 : Exemple de calcul du coefficient Kappa pour le critère « Dysphagie »

Calculs en considérant les notes par point entier

Calculs en considérant les notes par demi-point

ROUBLE

effectifs observés

	DysIB	Total
DysMC	1	15
1	15	15
Total	15	15

Po= 1

K= 1

effectifs théoriques

		notes IB			Total
		0	0,5+1	1,5+2	
notes MC	0	0	0	0	0
	0,5+1	0	15	0	15
	1,5+2	0	0	0	0
	total	0	15	0	15

Pe= 1

ROUBLE

effectifs observés

	DysIB	Total
DysMC	1	7
0,5	7	7
1	8	8
Total	15	15

Po= 0,53

K= 0

effectifs théoriques

		notes IB					total
		0	0,5	1	1,5	2	
notes MC	0	0	0	0	0	0	0
	0,5	0	0	7	7	0	7
	1	0	0	8	8	0	8
	1,5	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0
total	0	0	15	15	0	15	

Pe= 0,5

SAM

effectifs observés

	DysIB	Total
DysMC	1	1
0	14	14
Total	15	15

Po= 0,93

K= 0

effectifs théoriques

		notes IB			Total
		0	0,5+1	1,5+2	
notes MC	0	0	1	0	1
	0,5+1	0	14	0	14
	1,5+2	0	0	0	0
	total	0	15	0	15

Pe= 0,9

SAM

effectifs observés

	DysIB	Total
DysMC	1	1
0	5	5
0,5	9	9
Total	15	15

Po= 0,6

K= 0

effectifs théoriques

		notes IB					total
		0	0,5	1	1,5	2	
notes MC	0	0	0	1	0	0	1
	0,5	0	0	5	0	0	5
	1	0	0	9	0	0	9
	1,5	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0
total	0	0	15	0	0	15	

Pe= 0,6

SCOUBIDOU

effectifs observés

	DysIB	Total
DysMC	0	3
1	5	5
Total	8	8

Po= 1

K= 1

effectifs théoriques

		notes IB			Total
		0	0,5+1	1,5+2	
notes MC	0	1,1	1,875	0	3
	0,5+1	1,9	3,125	0	5
	1,5+2	0	0	0	0
	total	3	5	0	8

Pe= 0,5

SCOUBIDOU

effectifs observés

	DysIB	Total
DysMC	0	2
0,5	3	3
1	3	3
Total	6	8

Po= 0,38

K= 0,2

effectifs théoriques

		notes IB					total
		0	0,5	1	1,5	2	
notes MC	0	0	0	0	0	0	0
	0,5	1,9	0	3,1	0	0	5
	1	1,1	0	1,9	0	0	3
	1,5	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0
total	3	0	5	0	0	8	

Pe= 0,2

**T-FAL**

effectifs observés

	DysIB	Total
DysMC	1	13
Total	13	13

Po= 1

K= 1

effectifs théoriques

		notes IB			Total
		0	0,5+1	1,5+2	
notes MC	0	0	0	0	0
	0,5+1	0	13	0	13
	1,5+2	0	0	0	0
	total	0	13	0	13

Pe= 1

**T-FAL**

effectifs observés

	DysIB	Total
DysMC	1	5
Total	8	13

Po= 0,62

K= 0

effectifs théoriques

		notes IB					total
		0	0,5	1	1,5	2	
notes MC	0	0	0	0	0	0	0
	0,5	0	0	5	0	0	5
	1	0	0	8	0	0	8
	1,5	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0
	total	0	0	13	0	0	13

Pe= 0,6

**T-FOU**

effectifs observés

	DysIB	Total
DysMC	1	14
Total	14	14

Po= 1

K= 1

effectifs théoriques

		notes IB			Total
		0	0,5+1	1,5+2	
notes MC	0	0	0	0	0
	0,5+1	0	14	0	14
	1,5+2	0	0	0	0
	total	0	14	0	14

Pe= 1

**T-FOU**

effectifs observés

	DysIB	Total
DysMC	1	5
Total	9	14

Po= 0,64

K= 0

effectifs théoriques

		notes IB					total
		0	0,5	1	1,5	2	
notes MC	0	0	0	0	0	0	0
	0,5	0	0	5	0	0	5
	1	0	0	9	0	0	9
	1,5	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0
	total	0	0	14	0	0	14

Pe= 0,6

**TINTIN**

effectifs observés

	DysIB	Total
DysMC	1	1
Total	14	15

Po= 0,93

K= 0

effectifs théoriques

		notes IB			Total
		0	0,5+1	1,5+2	
notes MC	0	0	1	0	1
	0,5+1	0	14	0	14
	1,5+2	0	0	0	0
	total	0	15	0	15

Pe= 0,9

**TINTIN**

effectifs observés

	DysIB	Total
DysMC	1	1
Total	8	15

Po= 0,4

K= 0

effectifs théoriques

		notes IB					total
		0	0,5	1	1,5	2	
notes MC	0	0	0	1	0	0	1
	0,5	0	0	8	0	0	8
	1	0	0	6	0	0	6
	1,5	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0
	total	0	0	15	0	0	15

Pe= 0,4

**TITEUF**

effectifs observés

	DysIB	Total
DysMC	1	14
1	14	14
Total	14	14

Po= 1

K= 1

effectifs théoriques

		notes IB			Total
		0	0,5+1	1,5+2	
notes MC	0	0	0	0	0
	0,5+1	0	14	0	14
	1,5+2	0	0	0	0
	total	0	14	0	14

Pe= 1

**TITEUF**

effectifs observés

	DysIB	Total
DysMC	1	14
1	14	14
Total	14	14

Po= 1

K= 1

effectifs théoriques

		notes IB					total
		0	0,5	1	1,5	2	
notes MC	0	0	0	0	0	0	0
	0,5	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	14	0	0	14
	1,5	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0
total	0	0	14	0	0	14	

Pe= 1

**TSAR**

effectifs observés

	DysIB	Total
DysMC	1	2
0	2	2
1	13	13
Total	15	15

Po= 0,87

K= 0

effectifs théoriques

		notes IB			Total
		0	0,5+1	1,5+2	
notes MC	0	0	2	0	2
	0,5+1	0	13	0	13
	1,5+2	0	0	0	0
	total	0	15	0	15

Pe= 0,9

**TSAR**

effectifs observés

	DysIB	Total
DysMC	1	6
0	2	2
0,5	6	6
1	7	7
Total	15	15

Po= 0,47

K= 0

effectifs théoriques

		notes IB					total
		0	0,5	1	1,5	2	
notes MC	0	0	0	2	0	0	2
	0,5	0	0	6	0	0	6
	1	0	0	7	0	0	7
	1,5	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0
total	0	0	15	0	0	15	

Pe= 0,5

**UCAL**

effectifs observés

	DysIB	Total
DysMC	2	4
2	4	4
Total	4	4

Po= 1

K= 1

effectifs théoriques

		notes IB			Total
		0	0,5+1	1,5+2	
notes MC	0	0	0	0	0
	0,5+1	0	0	0	0
	1,5+2	0	0	4	4
	total	0	0	4	4

Pe= 1

**UCAL**

effectifs observés

	DysIB	Total
DysMC	2	1
1,5	1	1
2	3	3
Total	4	4

Po= 0,75

K= 0

effectifs théoriques

		notes IB					total
		0	0,5	1	1,5	2	
notes MC	0	0	0	0	0	0	0
	0,5	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0
	1,5	0	0	0	0	1	1
	2	0	0	0	0	3	3
total	0	0	0	0	4	4	

Pe= 0,8

**USKY**

effectifs observés

	DysIB	Total
DysMC	1	8
1	8	8
Total	8	8

Po= 1

effectifs théoriques

		notes IB			
		0	0,5+1	1,5+2	total
notes MC	0	0	0	0	0
	0,5+1	0	8	0	8
	1,5+2	0	0	0	0
	total	0	8	0	8

Pe= 1

**K= 1****USKY**

effectifs observés

	DysIB	Total
DysMC	1	3
0,5	3	3
1	5	5
Total	8	8

Po= 0,63

effectifs théoriques

		notes IB					
		0	0,5	1	1,5	2	total
notes MC	0	0	0	0	0	0	0
	0,5	0	0	3	0	0	3
	1	0	0	5	0	0	5
	1,5	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0
total	0	0	8	0	0	8	

Pe= 0,6

**K= 0****UZEL**

effectifs observés

	DysIB	Total
DysMC	1	2
0	2	2
1	6	6
Total	8	8

Po= 0,75

effectifs théoriques

		notes IB			
		0	0,5+1	1,5+2	total
notes MC	0	0	2	0	2
	0,5+1	0	6	0	6
	1,5+2	0	0	0	0
	total	0	8	0	8

Pe= 0,8

**K= 0****UZEL**

effectifs observés

	DysIB	Total
DysMC	1	2
0	2	2
0,5	2	2
1	4	4
Total	8	8

Po= 0,5

effectifs théoriques

		notes IB					
		0	0,5	1	1,5	2	total
notes MC	0	0	0	2	0	0	2
	0,5	0	0	2	0	0	2
	1	0	0	4	0	0	4
	1,5	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0
total	0	0	8	0	0	8	

Pe= 0,5

**K= 0****Kappa moyen = 0,636**

(notation par point entier)

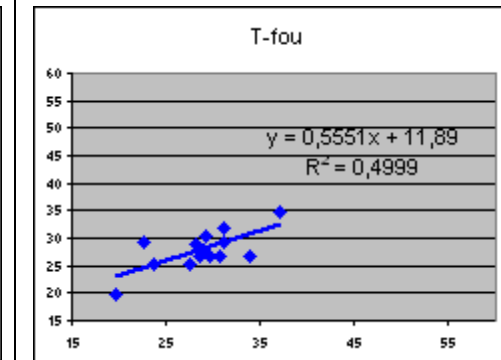
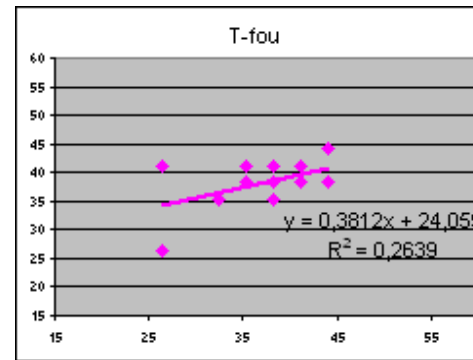
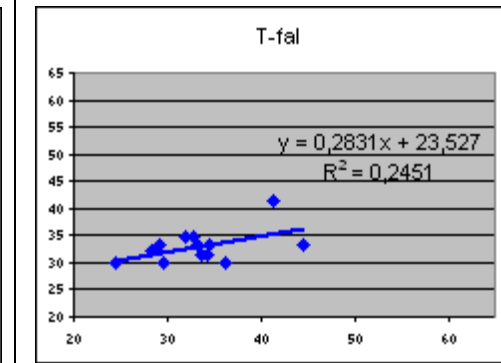
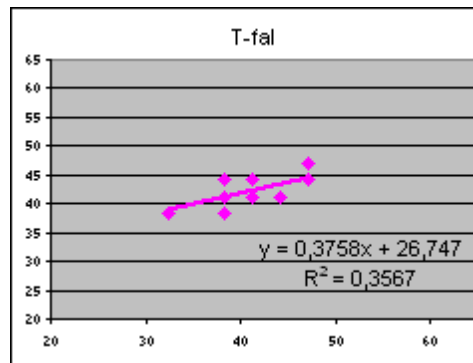
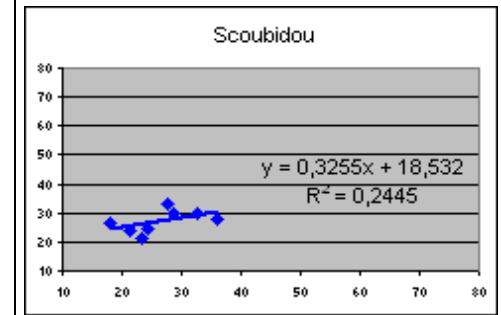
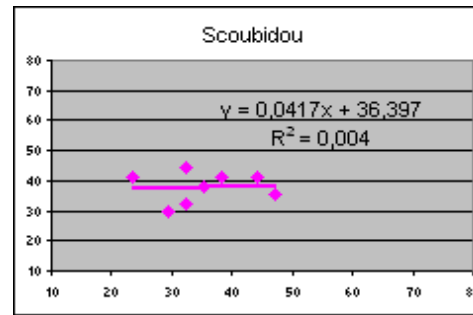
**Kappa moyen = 0,108**

(notation par demi-point)

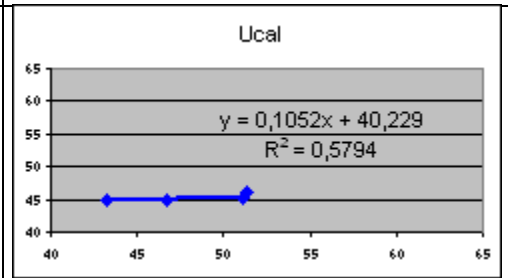
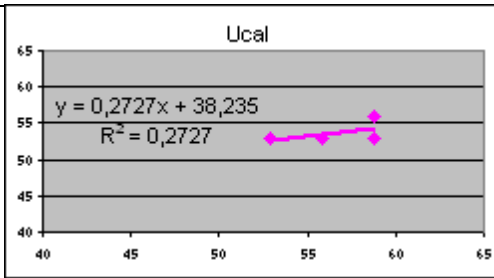
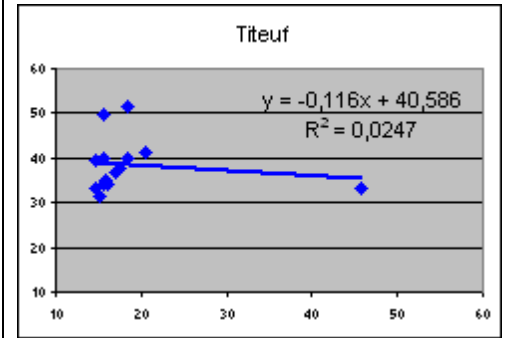
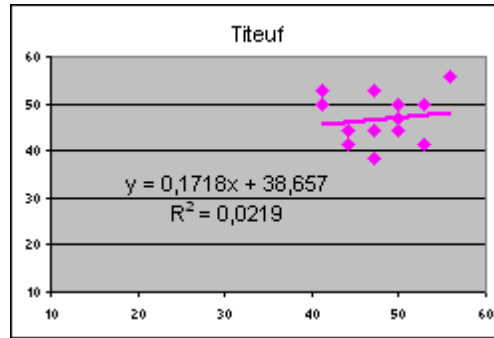
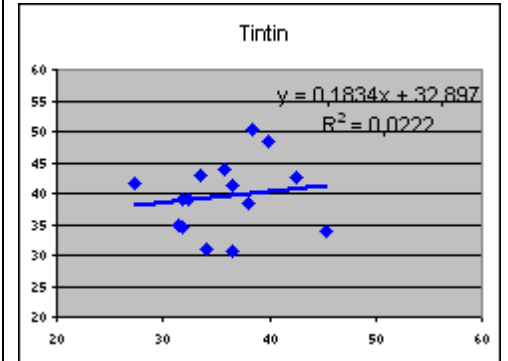
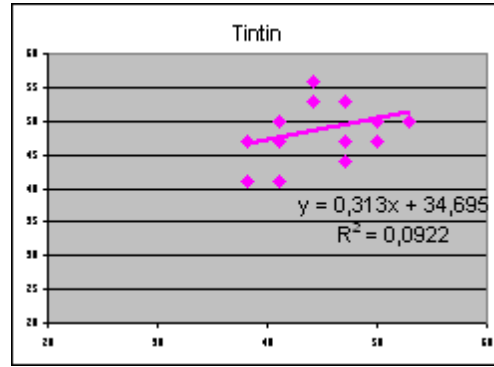
### Annexe 13 : Comparaison de la concordance entre opérateurs avant et après pondération des notes

CHIEN	Semaine	total IB	% score IB	total MC	% score MC	score pondéré IB	% score pondéré IB	score pondéré MC	% score pondéré MC	Scores bruts exprimés en % du total (en abscisses : notes MC, en ordonnées : notes IB)	Scores pondérés exprimés en % du total (en abscisses : notes MC, en ordonnées : notes IB)			
<b>Rouble</b>	S1	17	50,00	19	55,88	0,82	40,81	0,80	39,89					
	S2	18	52,94	16	47,06	0,86	43,25	0,73	36,63					
	S3	17	50,00	17	50,00	0,84	41,86	0,83	41,71					
	S4	17	50,00	19	55,88	0,75	37,67	0,84	42,07					
	S5	18	52,94	18	52,94	0,77	38,45	0,77	38,45					
	S6	17	50,00	19	55,88	0,75	37,67	0,83	41,61					
	S8	17	50,00	18	52,94	0,77	38,41	0,78	39,25					
	S9	19	55,88	18	52,94	0,87	43,42	0,80	40,19					
	S10	18	52,94	20	58,82	0,83	41,64	0,85	42,42					
	S12	18	52,94	19	55,88	0,80	40,19	0,86	43,05					
	S13	18	52,94	18	52,94	0,80	40,19	0,81	40,33					
	S14	19	55,88	18	52,94	0,87	43,42	0,81	40,52					
	S15	18	52,94	19	55,88	0,80	40,19	0,85	42,41					
	S16	19	55,88	16	47,06	0,90	45,10	0,72	35,93					
	S17	19	55,88	17	50,00	0,90	44,80	0,78	39,16					
	<b>Sam</b>	S1	22	64,71	18	52,94	1,16	57,83	0,88			44,15		
		S2	22	64,71	15	44,12	1,15	57,56	0,83			41,73		
S3		21	61,76	18	52,94	1,09	54,38	0,90	44,82					
S4		21	61,76	20	58,82	1,12	55,82	0,97	48,70					
S5		17	50,00	17	50,00	0,80	39,89	0,80	39,89					
S6		18	52,94	19	55,88	0,98	48,94	0,92	45,80					
S7		22	64,71	18	52,94	1,15	57,54	0,84	42,16					
S8		20	58,82	17	50,00	1,07	53,65	0,78	39,19					
S9		21	61,76	18	52,94	1,09	54,38	0,85	42,40					
S11		22	64,71	21	61,76	1,15	57,54	1,02	50,76					
S12		21	61,76	17	50,00	1,09	54,38	0,88	44,18					
S13		22	64,71	19	55,88	1,15	57,54	0,90	45,17					
S14		21	61,76	16	47,06	1,09	54,38	0,72	36,11					
S15		20	58,82	17	50,00	1,11	55,33	0,78	39,19					
S16		21	61,76	18	52,94	1,17	58,46	0,99	49,68					

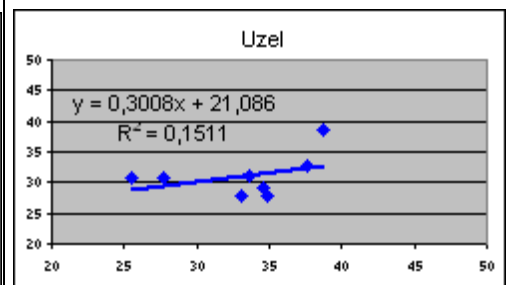
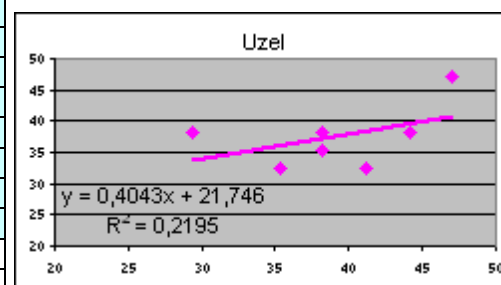
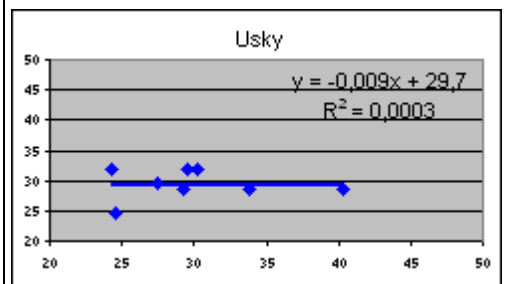
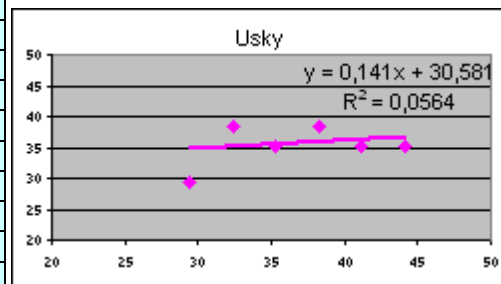
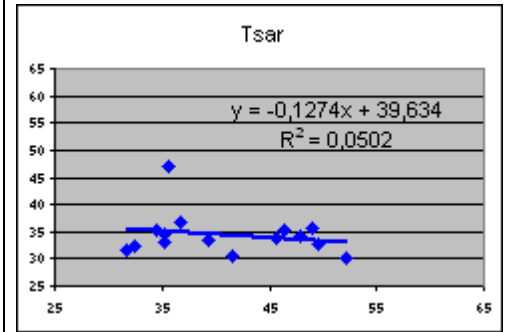
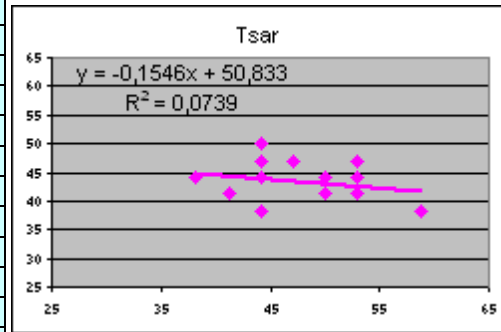
Scoubidou	S1	13	38,24	12	35,29	0,48	24,10	0,43	21,46	
	S2	14	41,18	8	23,53	0,53	26,59	0,36	18,05	
	S3	11	32,35	11	32,35	0,42	21,24	0,46	23,23	
	S4	14	41,18	13	38,24	0,60	29,90	0,57	28,65	
	S5	10	29,41	10	29,41	0,49	24,36	0,49	24,36	
	S6	15	44,12	11	32,35	0,67	33,39	0,55	27,55	
	S8	12	35,29	16	47,06	0,55	27,73	0,72	36,08	
	S9	14	41,18	15	44,12	0,60	29,93	0,65	32,57	
T-fal	S1	14	41,18	14	41,18	0,70	34,84	0,64	31,88	
	S2	14	41,18	15	44,12	0,63	31,39	0,69	34,26	
	S3	15	44,12	14	41,18	0,66	33,18	0,67	33,27	
	S4	15	44,12	13	38,24	0,66	33,18	0,69	34,53	
	S5	16	47,06	16	47,06	0,83	41,30	0,83	41,30	
	S7	15	44,12	16	47,06	0,66	33,18	0,89	44,43	
	S8	14	41,18	15	44,12	0,60	29,95	0,73	36,31	
	S9	15	44,12	14	41,18	0,64	32,13	0,56	28,24	
	S11	14	41,18	15	44,12	0,63	31,39	0,67	33,65	
	S12	15	44,12	14	41,18	0,70	34,88	0,66	32,83	
	S13	13	38,24	13	38,24	0,60	29,92	0,59	29,55	
	S14	14	41,18	13	38,24	0,67	33,40	0,58	29,17	
	S15	13	38,24	11	32,35	0,60	29,92	0,49	24,41	
	T-fou	S1	14	41,18	12	35,29	0,63	31,74	0,62	31,17
		S2	14	41,18	9	26,47	0,59	29,32	0,45	22,63
S3		13	38,24	14	41,18	0,53	26,74	0,68	33,85	
S4		15	44,12	15	44,12	0,70	34,90	0,74	37,01	
S5		9	26,47	9	26,47	0,40	19,77	0,40	19,77	
S6		14	41,18	14	41,18	0,59	29,27	0,62	31,13	
S7		13	38,24	13	38,24	0,53	26,74	0,59	29,58	
S8		13	38,24	12	35,29	0,56	27,92	0,58	28,99	
S9		13	38,24	14	41,18	0,53	26,74	0,57	28,68	
S10		13	38,24	15	44,12	0,53	26,74	0,61	30,67	
S11		14	41,18	13	38,24	0,60	30,23	0,59	29,28	
S12		13	38,24	13	38,24	0,58	28,84	0,56	28,20	
S13		12	35,29	11	32,35	0,51	25,36	0,47	23,61	
S14		12	35,29	13	38,24	0,51	25,36	0,55	27,54	



Tintin	S1	17	50,00	18	52,94	0,97	48,49	0,80	39,88	
	S2	18	52,94	15	44,12	1,00	50,23	0,77	38,49	
	S3	16	47,06	16	47,06	0,77	38,26	0,76	38,00	
	S4	14	41,18	14	41,18	0,69	34,37	0,63	31,74	
	S5	17	50,00	17	50,00	0,85	42,49	0,85	42,49	
	S6	15	44,12	16	47,06	0,61	30,71	0,73	36,61	
	S7	14	41,18	13	38,24	0,62	30,92	0,68	34,09	
	S8	16	47,06	17	50,00	0,68	33,88	0,91	45,44	
	S9	16	47,06	13	38,24	0,70	34,77	0,63	31,39	
	S10	18	52,94	16	47,06	0,83	41,32	0,73	36,61	
	S11	19	55,88	15	44,12	0,87	43,71	0,72	35,83	
	S12	19	55,88	15	44,12	0,86	42,76	0,67	33,43	
	S13	16	47,06	14	41,18	0,78	39,11	0,63	31,74	
	S14	16	47,06	14	41,18	0,78	39,11	0,65	32,34	
	S15	17	50,00	14	41,18	0,83	41,55	0,55	27,33	
Titeuf	S1	18	52,94	14	41,18	0,82	41,17	0,84	20,51	
	S2	18	52,94	16	47,06	0,99	49,54	0,73	15,57	
	S3	15	44,12	17	50,00	0,70	35,16	0,80	15,93	
	S4	17	50,00	14	41,18	0,80	40,00	0,75	18,31	
	S5	19	55,88	19	55,88	1,03	51,47	1,03	18,42	
	S6	17	50,00	18	52,94	0,80	40,09	0,83	15,68	
	S9	17	50,00	17	50,00	0,79	39,35	0,73	14,58	
	S10	15	44,12	16	47,06	0,74	36,86	0,80	17,07	
	S11	16	47,06	17	50,00	0,75	37,56	0,88	17,50	
	S12	15	44,12	15	44,12	0,68	34,16	0,68	15,51	
	S13	14	41,18	15	44,12	0,67	33,37	0,65	14,69	
	S14	13	38,24	16	47,06	0,63	31,64	0,71	15,13	
	S15	15	44,12	15	44,12	0,68	34,16	0,71	16,09	
	S16	14	41,18	18	52,94	0,67	33,43	0,92	45,84	
	Ucal	S1	18	52,94	20	58,82	0,91	45,27	1,02	51,08
		S2	18	52,94	18	52,94	0,90	44,92	0,87	43,29
S3		18	52,94	19	55,88	0,90	44,92	0,93	46,75	
S4		19	55,88	20	58,82	0,92	46,04	1,03	51,31	



Tsar	S1	17	50,00	15	44,12	0,94	47,11	0,71	35,67
	S2	15	44,12	15	44,12	0,66	33,09	0,70	35,23
	S3	16	47,06	15	44,12	0,69	34,56	0,70	35,23
	S4	15	44,12	13	38,24	0,65	32,36	0,65	32,48
	S5	16	47,06	16	47,06	0,73	36,66	0,73	36,66
	S6	14	41,18	14	41,18	0,63	31,74	0,63	31,74
	S7	15	44,12	13	38,24	0,70	35,23	0,69	34,53
	S8	15	44,12	17	50,00	0,70	35,23	0,93	46,46
	S9	15	44,12	18	52,94	0,68	34,18	0,96	47,89
	S10	16	47,06	18	52,94	0,71	35,56	0,98	48,94
	S11	14	41,18	17	50,00	0,65	32,70	0,99	49,65
	S12	13	38,24	15	44,12	0,61	30,52	0,83	41,54
	S13	14	41,18	17	50,00	0,67	33,44	0,79	39,40
	S14	13	38,24	20	58,82	0,61	30,27	1,04	52,11
	S15	14	41,18	18	52,94	0,68	33,75	0,91	45,58
Usky	S1	13	38,24	13	38,24	0,64	31,94	0,60	30,23
	S2	13	38,24	11	32,35	0,64	31,94	0,49	24,31
	S3	12	35,29	12	35,29	0,57	28,48	0,59	29,30
	S4	13	38,24	11	32,35	0,64	31,94	0,59	29,50
	S5	10	29,41	10	29,41	0,49	24,57	0,49	24,57
	S6	12	35,29	12	35,29	0,59	29,61	0,55	27,48
	S7	12	35,29	14	41,18	0,57	28,48	0,68	33,80
	S8	12	35,29	15	44,12	0,57	28,48	0,81	40,31
Uzel	S1	13	38,24	13	38,24	0,62	30,86	0,55	27,65
	S2	13	38,24	10	29,41	0,62	30,86	0,51	25,47
	S3	12	35,29	13	38,24	0,58	29,17	0,69	34,53
	S4	11	32,35	12	35,29	0,55	27,69	0,66	33,05
	S5	16	47,06	16	47,06	0,77	38,67	0,77	38,67
	S6	13	38,24	15	44,12	0,65	32,66	0,75	37,63
	S7	13	38,24	13	38,24	0,62	30,96	0,67	33,62
	S8	11	32,35	14	41,18	0,55	27,69	0,70	34,88









### **Annexe 15 : Résultats de l'activité locomotrice de Spirou**

nom du fichier AVI	durée en décubitus latéral	durée en décubitus sternal	durée en position assise	durée en position debout	durée en mouvement	durée totale	nombre de roulades	nombre de sauts
Spirou J1 01	0	0	64,41	206,22	36,9	307,53	0	7
Spirou J1 02	0	0	111,55	184,94	11,44	307,93	0	0
Spirou J1 03	0	0	0	291,59	19,87	311,46	0	1
Spirou J1 04	0	0	1,25	278,89	29,66	309,8	0	7
Spirou J1 05	0	220,22	85,68	0	3,23	309,13	0	0
Spirou J1 06								
Spirou J1 07	0	109,35	27,77	164,46	6,22	307,8	0	0
Spirou J1 08	0	0	28,49	270,22	8,69	307,4	0	0
Spirou J1 09	0	310,6	0	0	0	310,6	0	0
Spirou J1 10	0	0	0	278,12	21,74	299,86	0	4
Spirou J1 11	0	0	0	296,1	9,5	305,6	0	4
Spirou J1 12	0	0	0	275,44	24,76	300,2	0	6
Spirou J1 13								
Spirou J1 14	0	300,73	0	0	0	300,73	0	0
Spirou J1 15	0	306,66	0	0	0	306,66	0	0
Spirou J1 16	0	112,27	30,16	143,01	21,82	307,26	0	1
Spirou J1 17	0	295,06	0	0	0	295,06	0	0
Spirou J1 18								
Spirou J1 19	0	27,76	0,78	258,47	16,85	303,86	0	1
Spirou J1 20	0	0	0	262,83	47,5	310,33	0	1
Spirou J1 21								
Spirou J1 22								
Spirou J2 01	0	0	0	287,43	21,43	308,86	0	6
Spirou J2 02	0	144,39	0	141,37	22,1	307,86	0	0
Spirou J2 03	0	309,8	0	0	0	309,8	0	0
Spirou J2 04	0	0	0	278,05	30,75	308,8	0	11
Spirou J2 05	0	152,71	0	143,6	10,95	307,26	0	3
Spirou J2 06	77,8	28,1	52,69	130,31	21,1	310	0	1
Spirou J2 07	0	0	2,69	286,77	20,54	310	0	4
Spirou J2 08	36,53	152,47	93,43	17,82	2,81	303,06	0	0
Spirou J2 09	0	54,33	0	238,46	15,21	308	0	2
Spirou J2 10	0	291,08	0	14,78	0	305,86	0	0
Spirou J2 11	309,46	0	0	0	0	309,46	0	0
Spirou J2 12	0	309,73	0	0	0	309,73	0	0
Spirou J2 13	0	0	0	290,63	17,43	308,06	0	1
Spirou J2 14	0	84,58	0	205,05	19,37	309	0	2
Spirou J2 15	310,06	0	0	0	0	310,06	0	0
Spirou J2 16	310,2	0	0	0	0	310,2	0	0
Spirou J2 17	0	121,79	0	146,66	40,35	308,8	0	0
Spirou J2 18	0	273,67	19,44	4,3	8,92	306,33	0	0
Spirou J2 19	0	0	34,56	233,92	41,05	309,53	0	1
Spirou J2 20	0	0	148,93	126,28	30,72	305,93	0	11
Spirou J2 21	0	309,26	0	0	0	309,26	0	0
Spirou J2 22	0	307,13	0	0	0	307,13	0	0

Spirou J3 01	0	82,11	44,58	147,49	35,68	309,86	0	0
Spirou J3 02	0	0	0	277,38	31,28	0	0	5
Spirou J3 03	0	18,35	0	244,62	45,63	308,6	0	12
Spirou J3 04	0	148,14	0	152,77	6,35	307,26	0	3
Spirou J3 05	0	239,08	0	65,7	5,22	310	0	1
Spirou J3 06	0	155,85	0	140,69	13,26	309,8	0	2
Spirou J3 07	0	0	32,78	256,86	18,82	308,46	0	7
Spirou J3 08	0	196,5	51,51	57,29	3,43	308,73	0	0
Spirou J3 09	0	195,88	73,11	30,85	8,49	308,33	0	0
Spirou J3 10	0	108,53	28,19	163,63	6,91	307,26	0	0
Spirou J3 11	0	0	0	277,77	32,23	310	0	4
Spirou J3 12	0	0	58,72	240,21	10,93	309,86	0	1
Spirou J3 13	0	70,24	99,29	116,57	23,96	310,06	0	1
Spirou J3 14	0	50,28	0	239,92	15,33	305,53	0	0
Spirou J3 15	0	0	0	298,05	12,35	310,4	0	0
Spirou J3 16	0	193,55	49,39	61,65	4,94	309,53	0	0
Spirou J3 17	0	17,67	0	260,53	26,66	304,86	0	2
Spirou J3 18								
Spirou J3 19								
Spirou J3 20								
Spirou J3 21								
Spirou J3 22								
Spirou J4 01	0	0	50,86	216,17	40,7	307,73	0	0
Spirou J4 02	0	0	39,81	236,89	32,76	309,46	0	2
Spirou J4 03	0	0	0	286,5	22,3	308,8	0	1
Spirou J4 04	0	309,66	0	0	0	309,66	0	0
Spirou J4 05	0	153,1	106,31	46,3	4,09	309,8	0	0
Spirou J4 06	0	278,22	23,44	0	0	301,66	0	0
Spirou J4 07	309,4	0	0	0	0	309,4	0	0
Spirou J4 08	0	56,03	87,92	118,05	46,66	308,66	0	2
Spirou J4 09								
Spirou J4 10								
Spirou J4 11	0	9,73	66,68	208,61	21,91	306,93	0	2
Spirou J4 12	3,78	227,53	2,37	71,72	4,13	309,53	0	0
Spirou J4 13	0	307,06	0	0	0	307,06	0	0
Spirou J4 14	0	0	0	281,93	27,33	309,26	0	17
Spirou J4 15								
Spirou J4 16	309,26	0	0	0	0	309,26	0	0
Spirou J4 17	0	0	104,23	154,48	51,22	309,93	0	1
Spirou J4 18	216,51	25,39	30,16	34,3	2,44	308,8	0	3
Spirou J4 19	0	43,54	117,64	139,52	11,43	312,13	0	4
Spirou J4 20	0	230,92	0	71	7,68	309,6	0	0
Spirou J4 21	0	305,73	0	0	0	305,73	0	0
Spirou J4 22	269,98	40,42	0	0	0	310,4	0	0
Total (s)	2152,98	7685,2	1768,82	10353,17	1135,03	22786,54	0	144
pourcentage	9,448473	33,72693	7,762565	45,43546	4,9811424	100		
	43,17540092			50,41660559				

**Annexe 16 : Durées quotidiennes des comportements alimentaires chez les chiens adultes**

		durée "mange"	durée "boit"	durée AVI	
<b>Chiens adultes sains</b>	<b>Roupie</b>	total Roupie J1 (s)	0,00	22,53	5621,54
		% Roupie J1	0,00	0,40	
		total Roupie J2 (s)	230,74	68,13	6786,53
		% Roupie J2	3,40	1,00	
		total Roupie J3 (s)	41,88	7,60	5517,29
		% Roupie J3	0,76	0,14	
		total Roupie J4 (s)	109,69	0,00	5872,39
		% Roupie J4	1,87	0,00	
	<b>Spirou</b>	total Spirou J1 (s)	0,00	26,44	5201,21
		% Spirou J1	0,00	0,51	
		total Spirou J2 (s)	0,00	35,56	6782,99
		% Spirou J2	0,00	0,52	
		total Spirou J3 (s)	0,00	0,00	4938,54
		% Spirou J3	0,00	0,00	
total Spirou J4 (s)		109,68	12,00	5863,80	
% Spirou J4		1,87	0,20		

<b>Chiens adultes malades</b>	<b>Rouble</b>	total Rouble J1(s)	571,82	211,34	6112,67
		% Rouble J1	9,35	3,46	
		total Rouble J2 (s)	795,26	162,05	6723,04
		% Rouble J2	11,83	2,41	
		total Rouble J3 (s)	565,07	104,14	5545,67
		% Rouble J3	10,19	1,88	
		total Rouble J4 (s)	342,75	230,13	6678,86
		% Rouble J4	5,13	3,45	
	<b>Sam</b>	total Sam J1 (s)	630,91	229,62	4220,56
		% Sam J1	14,95	5,44	
		total Sam J2 (s)	0,00	172,53	4593,15
		% Sam J2	0,00	3,76	
		total Sam J3 (s)	244,92	334,77	4488,93
		% Sam J3	5,46	7,46	
		total Sam J4 (s)	183,80	172,24	5484,93
		% Sam J4	3,35	3,14	



**Annexe 17 : Durées quotidiennes des comportements alimentaires chez les chiots**

		durée "mange"	durée "boit"	durée AVI	
<b>Chiots sains</b>	<b>Venom</b>	total Venom J1 (s)	0,00	13,59	6450,80
		% Venom J1	0,00	0,21	
		total Venom J2 (s)	0,00	44,35	6766,21
		% Venom J2	0,00	0,66	
		total Venom J3 (s)	0,00	0,00	6717,73
		% Venom J3	0,00	0,00	
		total Venom J4 (s)	0,00	0,00	6454,32
		% Venom J4	0,00	0,00	
	<b>Vetrap</b>	total Vetrap J1 (s)	15,91	7,41	5785,13
		% Vetrap J1	0,28	0,13	
		total Vetrap J2 (s)	0,00	73,91	6746,46
		% Vetrap J2	0,00	1,10	
		total Vetrap J3 (s)	0,00	5,53	6451,98
		% Vetrap J3	0,00	0,09	
total Vetrap J4 (s)		0,00	45,92	6460,65	
% Vetrap J4		0,00	0,71		

<b>Chiots malades</b>	<b>Valgus</b>	total Valgus J1 (s)	178,70	114,98	6368,93
		% Valgus J1	2,81	1,81	
		total Valgus J2 (s)	393,04	136,83	5740,41
		% Valgus J2	6,85	2,38	
		total Valgus J3 (s)	360,52	227,60	6383,81
		% Valgus J3	5,65	3,57	
		total Valgus J4 (s)	132,55	94,45	5867,85
		% Valgus J4	2,26	1,61	
	<b>Varus</b>	total Varus J1 (s)	221,37	309,66	6646,95
		% Varus J1	3,33	4,66	
		total Varus J2 (s)	322,55	132,02	5998,20
		% Varus J2	5,38	2,20	
		total Varus J3 (s)	571,98	280,11	6446,67
		% Varus J3	8,87	4,35	
total Varus J4 (s)		245,82	184,66	5852,84	
% Varus J4		4,20	3,16		





### Annexe 18 : Durées quotidiennes des comportements locomoteurs chez les chiens adultes

		durée "décubitus latéral"	durée "décubitus sternal"	durée "assis"	durée "debout"	durée "mouvement"	durée totale	nombre de roulades	nombre de sauts	
<b>Chiens adultes sains</b>	<b>Roupie</b>	total Roupie J1 (s)	956,6	1986,8	418,9	1795,5	463,8	5621,5	0	58
		% Roupie J1	17,0	35,3	7,5	31,9	8,2			
		total Roupie J2 (s)	1180,2	3235,5	340,8	1727,8	302,4	6786,5	0	46
		% Roupie J2	17,4	47,7	5,0	25,5	4,5			
		total Roupie J3 (s)	705,9	3053,9	300,3	1186,9	270,3	5517,3	0	38
		% Roupie J3	12,8	55,4	5,4	21,5	4,9			
		total Roupie J4 (s)	1140,7	2859,2	577,6	1072,9	222,0	5872,4	0	30
	% Roupie J4	19,4	48,7	9,8	18,3	3,8				
	<b>Spirou</b>	total Spirou J1 (s)	0,0	1682,7	350,1	2910,3	258,2	5201,2	0	32
		% Spirou J1	0,0	32,4	6,7	56,0	5,0			
		total Spirou J2 (s)	1044,1	2539,0	351,7	2545,4	302,7	6783,0	0	42
		% Spirou J2	15,4	37,4	5,2	37,5	4,5			
		total Spirou J3 (s)	0,0	1476,2	437,6	3032,0	301,5	4938,5	0	38
		% Spirou J3	0,0	29,9	8,9	61,4	6,1			
total Spirou J4 (s)		1108,9	1987,3	629,4	1865,5	272,7	5863,8	0	32	
% Spirou J4	18,9	33,9	10,7	31,8	4,6					

<b>Chiens adultes malades</b>	<b>Rouble</b>	total Rouble J1(s)	1566,0	1365,8	2177,8	911,9	91,2	6112,7	0	46
		% Rouble J1	25,6	22,3	35,6	14,9	1,5			
		total Rouble J2 (s)	1075,0	279,6	3814,9	1356,7	196,8	6723,0	0	120
		% Rouble J2	16,0	4,2	56,7	20,2	2,9			
		total Rouble J3 (s)	802,6	944,3	2397,4	1233,3	168,1	5545,7	0	23
		% Rouble J3	14,5	17,0	43,2	22,2	3,0			
		total Rouble J4 (s)	2660,3	1173,8	1861,3	821,6	162,0	6678,9	0	72
	% Rouble J4	39,8	17,6	27,9	12,3	2,4				
	<b>Sam</b>	total Sam J1 (s)	581,5	567,3	1183,8	1828,1	59,9	4220,6	0	0
		% Sam J1	13,8	13,4	28,0	43,3	1,4			
		total Sam J2 (s)	465,8	1616,7	1228,8	1249,2	32,5	4593,2	0	0
		% Sam J2	10,1	35,2	26,8	27,2	0,7			
		total Sam J3 (s)	0,0	1410,5	1484,1	1492,0	102,4	4488,9	0	0
		% Sam J3	0,0	31,4	33,1	33,2	2,3			
total Sam J4 (s)		0,0	3249,2	1321,6	833,2	81,0	5484,9	0	0	
% Sam J4	0,0	59,2	24,1	15,2	1,5					



### Annexe 19 : Durées quotidiennes des comportements locomoteurs chez les chiots

		durée "décubitus latéral"	durée "décubitus sternal"	durée "assis"	durée "debout"	durée "mouvement"	durée totale	nombre de roulades	Nombre de sauts	
<b>Chiots sains</b>	<b>Venom</b>	total Venom J1 (s)	2018,4	1404,9	1949,5	704,5	373,5	6450,8	3	41
		% Venom J1	31,3	21,8	30,2	10,9	5,8			
		total Venom J2 (s)	1441,7	2676,0	1198,0	1030,1	420,4	6766,2	2	47
		% Venom J2	21,3	39,5	17,7	15,2	6,2			
		total Venom J3 (s)	2255,3	1621,1	1447,3	996,2	397,9	6717,7	3	14
		% Venom J3	33,6	24,1	21,5	14,8	5,9			
		total Venom J4 (s)	1369,6	2642,0	1593,6	615,0	234,0	6454,3	2	23
	% Venom J4	21,2	40,9	24,7	9,5	3,6				
	<b>Vetrap</b>	total Vetrap J1 (s)	1803,7	1472,4	1600,5	631,1	277,5	5785,1	0	11
		% Vetrap J1	31,2	25,5	27,7	10,9	4,8			
		total Vetrap J2 (s)	1477,9	2289,7	1764,4	840,2	374,3	6746,5	0	33
		% Vetrap J2	21,9	33,9	26,2	12,5	5,5			
		total Vetrap J3 (s)	1096,1	2598,4	1577,1	771,4	409,0	6452,0	6	82
		% Vetrap J3	17,0	40,3	24,4	12,0	6,3			
total Vetrap J4 (s)		1169,9	2485,9	1667,0	719,0	418,9	6460,7	0	45	
% Vetrap J4	18,1	38,5	25,8	11,1	6,5					

<b>Chiots malades</b>	<b>Valgus</b>	total Valgus J1 (s)	2244,2	2511,9	681,8	669,6	261,3	6368,9	4	3
		% Valgus J1	35,2	39,4	10,7	10,5	4,1			
		total Valgus J2 (s)	2717,7	1298,2	875,1	696,5	153,0	5740,4	0	2
		% Valgus J2	47,3	22,6	15,2	12,1	2,7			
		total Valgus J3 (s)	1918,9	2107,5	1240,2	856,4	260,9	6383,8	0	5
		% Valgus J3	30,1	33,0	19,4	13,4	4,1			
		total Valgus J4 (s)	1988,1	2171,2	870,0	603,9	234,7	5867,9	0	8
	% Valgus J4	33,9	37,0	14,8	10,3	4,0				
	<b>Varus</b>	total Varus J1 (s)	1168,3	3781,0	675,1	799,1	223,5	6647,0	0	10
		% Varus J1	17,6	56,9	10,2	12,0	3,4			
		total Varus J2 (s)	1743,6	2867,3	711,4	521,7	154,2	5998,2	0	15
		% Varus J2	29,1	47,8	11,9	8,7	2,6			
		total Varus J3 (s)	2769,2	1903,4	990,5	653,4	130,3	6446,7	0	26
		% Varus J3	43,0	29,5	15,4	10,1	2,0			
total Varus J4 (s)		1377,5	3220,6	618,7	486,4	149,6	5852,8	0	6	
% Varus J4	23,5	55,0	10,6	8,3	2,6					



# MISE AU POINT D'OUTILS POUR L'ÉVALUATION CLINIQUE DE CHIENS ATTEINTS DE MYOPATHIE DYSTROPHIQUE

**NOM et Prénom :** CORDAZZO Marie-Cécile

## **Résumé**

La myopathie dystrophique du Golden Retriever est une affection dégénérative héréditaire des muscles striés désormais bien connue sur le plan génétique et clinique. Il était devenu nécessaire de pouvoir quantifier facilement les symptômes et leur évolution grâce à des méthodes standardisées, en vue d'évaluer l'efficacité de nouvelles thérapeutiques lors d'essais pré-cliniques. Après une synthèse des données existantes sur cette affection, cette étude propose à travers deux outils (les scores cliniques et l'actimétrie vidéo) de codifier l'état général des animaux malades afin d'effectuer des comparaisons chien malade/chien sain, et chien traité/chien non traité. La notation par score clinique est une méthode simple, fiable, reproductible (CV<30%), et discriminante (coefficient de corrélation de 67%) ; l'actimétrie permet de comparer objectivement le niveau d'activité des animaux selon leur âge et leur statut mais elle reste un procédé trop chronophage pour être utilisée en routine.

## **Mots clés**

myopathie dystrophique – score clinique – actimétrie – validation statistique – reproductibilité – carnivore – chien.

## **Jury :**

Président : M. le Professeur

Directeur : M. le Docteur Stéphane BLOT

Assesseur : M. le Docteur Laurent TIRET

## **Adresse de l'auteur :**

M<sup>elle</sup> Marie-Cécile CORDAZZO

48 rue d'Achicourt

62000 ARRAS

marie\_cordazzo@yahoo.fr

# DEVELOPMENT OF TOOLS FOR THE CLINICAL EVALUATION OF DOGS SUFFERING FROM MUSCULAR DYSTROPHY

**SURNAME and Given name :** CORDAZZO Marie-Cécile

## **Summary**

The Golden Retriever muscular dystrophy is a hereditary degenerative disease of striated muscles now well established from a genetic and clinical viewpoint. Thanks to new standardized methods, easy quantification of the symptoms and their evolution has now become necessary to evaluate the efficiency of new treatments during pre-clinical trials. Following a thorough synthesis of the existing data concerning this disease, the aim of this study is to codify the general state of affected animals using two tools (clinical scores and video actimetry), in order to compare affected dogs and healthy dogs, and then treated dogs and non-treated dogs. The clinical score notation is a simple, reliable, reproducible (VC<30%) and discriminating method (correlation coefficient = 67%). Actimetry allows to objectively compare the animals' activity level, according to their age and their status. However this method is too time-consuming to be used routinely.

## **Keywords**

muscular dystrophy – clinical score – actimetry – statistical validation – reproducibility – carnivore – dog.

## **Jury :**

President : Pr.

Director : Dr Stéphane BLOT

Assessor : Dr Laurent TIRET

## **Author's address:**

Miss Marie-Cécile CORDAZZO

48 rue d'Achicourt

62000 ARRAS

marie\_cordazzo@yahoo.fr