

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>ASAT</b>	Aspartate Amino Transférase
<b>BH4</b>	Tetrahydrobiopterin
<b>CK</b>	Créatine Kinase
<b>DAG</b>	Dystrophin Associated Glycoprotein
<b>DAP</b>	Dystrophin Associated Protein
<b>DMD</b>	Duchenne Muscular Dystrophy
<b>FAD</b>	Flavin Adenine Dinucleotide
<b>FMN</b>	Flavin Mononucleotid
<b>FXMD</b>	Feline-X-Linked Muscular Dystrophy
<b>GRMD</b>	Golden Retriever Muscular Dystrophy
<b>Mdx</b>	X-chromosome-linked Muscular Dystrophy
<b>NADPH</b>	Nicotamide Adenine Dinucleotide Phosphate
<b>NMDAR</b>	N-Méthyl-D-Aspartate Receptor
<b>NO</b>	Monoxyde d'azote
<b>NOS</b>	Monoxyde d'azote synthétase
<b>NOS mu</b>	Monoxyde d'azote synthétase musculaire
<b>NOS n</b>	Monoxyde d'azote synthétase neuronale
<b>SDH</b>	Sorbitol Déshydrogénase
<b>SGPT</b>	Alanine Amino Transférase
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	Transforming Growth Factor $\beta$ 1
<b>UETM</b>	Unité d'Etude et de Thérapie sur la Myopathie



# **SOMMAIRE**

<b>SOMMAIRE</b>	<b>p1</b>
<b>QUELQUES RAPPELS SUR LE MUSCLE ET SES AFFECTIONS</b>	<b>p5</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>p7</b>
<b>I- ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>p9</b>
<b>1. Dystrophine et myopathie de Duchenne</b>	<b>p11</b>
1.1. Origine de cette maladie	<b>p11</b>
1.2. Modèles animaux de la myopathie de Duchenne	<b>p12</b>
1.3. La dystrophine	<b>p13</b>
1.3.1. Présentation du gène	<b>p13</b>
1.3.2. Les différentes isoformes de dystrophine	<b>p13</b>
1.3.3. Présentation de la protéine	<b>p14</b>
1.3.4. Localisation de la dystrophine	<b>p14</b>
<b>2. L'utrophine</b>	<b>p15</b>
2.1. Présentation du gène	<b>p15</b>
2.2. Localisation de l'utrophine	<b>p16</b>
2.3. Fonction de l'utrophine	<b>p16</b>
2.4. Intérêt de l'utrophine pour compenser l'absence de dystrophine	<b>p16</b>
<b>3. Approche pharmacologique des myopathies dystrophiques : la L-arginine, un donneur de NO</b>	<b>p18</b>
3.1. La L-arginine	<b>p18</b>
3.2. Quelques considérations sur le métabolisme cellulaire	<b>p18</b>
3.3. La L-Arginine substrat de la monoxyde d'azote synthétase	<b>p19</b>
3.4. Les monoxyde d'azote synthétases	<b>p19</b>
3.4.1. Les différentes isoformes	<b>p19</b>
3.4.2. Monoxyde d'azote synthétase musculaire et myopathie de Duchenne	<b>p20</b>

3.4.3. Résultats expérimentaux obtenus sur la souris mdx in vitro et in vivo	p20
3.5. La L-Arginine et le monoxyde d'azote pour surexprimer l'utrophine	p21
<b>II- MATERIELS ET METHODE</b>	<b>p23</b>
1. Chiens et traitement	p25
2. Analyse clinique	p26
2.1. Examen clinique	p26
2.2. Mesure des pressions artérielles	p27
3. Analyse biologique	p27
3.1. Diagnostic génétique	p27
3.2. Analyse biochimique	p27
3.3. Radiographies	p28
4. Biopsie musculaire	p28
4.1. Immunocytochimie de l'utrophine	p28
4.2. Immunocytochimie des sarcoglycanes	p29
<b>III- RESULTATS ET DISCUSSION</b>	<b>p31</b>
1. Examens cliniques	p33
2. Mesures de pression artérielle	p33
3. Dosages biochimiques	p34
3.1. Urée/ créatinine	p34
3.2. Créatine Kinase	p34
3.3. CO2	p34
3.4. Na+	p34
3.5. K+	p34
3.6. PAL	p35
3.7. SGPT	p35
4. Histologie musculaire	p35

<b>5. Immunocytochimie</b>	<b>p36</b>
5.1. Utrophine	p36
5.2. Sarcoglycanes	p36
<b>6. Devenir de ces chiens</b>	<b>p37</b>
<b>7. Bilan et critiques</b>	<b>p37</b>
<b>CONCLUSION</b>	<b>p39</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>p41</b>
<b>Annexe 1 : Figures</b>	<b>p55</b>
<b>Figure 1</b> : Schéma de la dystrophine	<b>p57</b>
<b>Figure 2</b> : Les domaines de la dysrophine et de l'utrophine	<b>p58</b>
<b>Figure 3</b> : Métabolisme de la L-arginine	<b>p59</b>
<b>Figure 4</b> : Traitement à la L-arginine	<b>p60</b>
<b>Figure 5</b> : Evolution de l'état clinique des chiens malades qu'ils soient traités ou non	<b>p61</b>
<b>Figure 6</b> : Pressions Artérielles Moyennes dans les trois groupes de chiens	<b>p62</b>
<b>Figure 7</b> : Pressions systoliques dans les trois groupes de chiens	<b>p63</b>
<b>Figure 8</b> : Pressions diastoliques dans les trois groupes de chiens	<b>p64</b>
<b>Figure 9</b> : Evolution du taux d'urée au cours du traitement	<b>p65</b>
<b>Figure 10</b> : Evolution du taux de créatinine au cours du traitement	<b>p66</b>
<b>Figure 11</b> : Evolution du taux de créatine kinase au cours du traitement	<b>p67</b>
<b>Figure 12</b> : Evolution du taux de CO <sub>2</sub> au cours du traitement	<b>p68</b>
<b>Figure 13</b> : Evolution du taux de Na <sup>+</sup> au cours du traitement	<b>p69</b>
<b>Figure 14</b> : Evolution du taux de K <sup>+</sup> au cours du traitement	<b>p70</b>
<b>Figure 15</b> : Evolution du taux de PAL au cours du traitement	<b>p71</b>
<b>Figure 16</b> : Evolution du taux de SGPT au cours du traitement	<b>p72</b>
<b>Figure 17</b> : Index histopathologique à l'âge de 5 mois	<b>p73</b>
<b>Figure 18</b> : Index histopathologique à l'âge de 8 mois	<b>p74</b>
<b>Figure 19</b> : Evolution de l'index histopathologique	<b>p74</b>
<b>Annexe 2 : Tableaux</b>	<b>p75</b>
<b>Tableau 1</b> : Isoformes de la dystrophine	<b>p77</b>
<b>Tableau 2</b> : Protocole et traitement	<b>p78</b>
<b>Tableau 3</b> : Paramètres cliniques à évaluer chez les chiens malades. Modèle de tableau.	<b>p79</b>
<b>Tableau 4</b> : Stade de myopathie des différents chiens en fonction de leur âge	<b>p79</b>
<b>Tableau 5</b> : Mesures des différentes pressions artérielles chez les chiens sains	<b>p80</b>

<b>Tableau 6</b> : Mesures des différentes pressions artérielles chez les chiens malades traités	<b>p81</b>
<b>Tableau 7</b> : Mesures des différentes pressions artérielles chez les chiens malades non traités	<b>p82</b>
<b>Tableau 8</b> : Analyse de variance pour le facteur pression artérielle moyenne entre les chiens GRMD traités ou non	<b>p83</b>
<b>Tableau 9</b> : Analyse de variance pour le facteur pression systolique entre les chiens GRMD traités ou non	<b>p83</b>
<b>Tableau 10</b> : Analyse de variance pour le facteur pression diastolique entre les chiens GRMD traités ou non	<b>p84</b>
<b>Tableau 11</b> : Dosages d'urée dans les trois groupes de chiens	<b>p85</b>
<b>Tableau 12</b> : Dosages de créatinine dans les trois groupes de chiens	<b>p86</b>
<b>Tableau 13</b> : Dosages de créatine kinase dans les trois groupes de chiens	<b>p87</b>
<b>Tableau 14</b> : Dosages de CO <sub>2</sub> dans les trois groupes de chiens	<b>p88</b>
<b>Tableau 15</b> : Dosages de Na <sup>+</sup> dans les trois groupes de chiens	<b>p89</b>
<b>Tableau 16</b> : Dosages de K <sup>+</sup> dans les trois groupes de chiens	<b>p90</b>
<b>Tableau 17</b> : Dosages de PAL dans les trois groupes de chiens	<b>p91</b>
<b>Tableau 18</b> : Dosages de SGPT dans les trois groupes de chiens	<b>p92</b>
<b>Tableau 19</b> : Index pathologiques	<b>p93</b>
<b>Tableau 20</b> : Immunocytochimie des $\beta$ -sarcoglycanes chez les chiens sains et dystrophiques	<b>p94</b>
<b>Tableau 21</b> : Immunocytochimie des $\gamma$ -sarcoglycanes chez les chiens sains et dystrophiques	<b>p95</b>
<b>Annexe 3 : Planches</b>	<b>p97</b>
<b>Planche 1</b> : Aspect de deux chiens atteints de myopathie dystrophique	<b>p99</b>
<b>Planche 2</b> : Aspect histologique et immunocytochimique du biceps fémoral avant traitement chez des chiens sains et des chiens GRMD	<b>p101</b>
<b>Planche 3</b> : Aspect histologique et immunocytochimique du biceps fémoral après 4 mois de traitement à la L-arginine ou avec un placebo chez des chiens GRMD	<b>p103</b>
<b>Planche 4</b> : Aspect immunocytochimique du biceps fémoral avant et après traitement chez des chiens sains	<b>p105</b>
<b>Planche 5</b> : Immunomarquage des $\beta$ -sarcoglycanes chez des chiens sains avant et après traitement à la L-arginine. Immunomarquage des $\gamma$ -sarcoglycanes chez des chiens sains avant et après traitement à la L-arginine.	<b>p107</b>
<b>Planche 6</b> : Immunomarquage des $\beta$ -sarcoglycanes chez un chien malade avant et après traitement à la L-arginine. Immunomarquage des $\beta$ -sarcoglycanes chez deux chiens malades après traitement à la L-arginine ou au sérum physiologique.	<b>p109</b>
<b>Planche 7</b> : Immunomarquage des $\gamma$ -sarcoglycanes chez un chien malade avant et après traitement à la L-arginine. Immunomarquage des $\gamma$ -sarcoglycanes chez deux chiens malades après traitement à la L-arginine ou au sérum physiologique.	<b>p111</b>

## QUELQUES RAPPELS SUR LE MUSCLE ET SES AFFECTIONS

La cellule musculaire squelettique est la structure fondamentale des muscles responsables des mouvements volontaires et du maintien de la posture sous l'influence du système nerveux. Au cours de l'embryogénèse, chaque cellule musculaire squelettique se forme par la fusion de plusieurs centaines de cellules précurseurs (myoblastes), de sorte, que, chez l'adulte, chaque cellule musculaire constitue un syncytium contenant des centaines de noyaux, situés immédiatement sous la membrane plasmique.

On différencie des fibres à contraction lente de type I à métabolisme oxydatif, tandis que les fibres de type II à contraction plus rapide utilisent la glycolyse. La plupart des muscles squelettiques sont constitués d'un mélange de ces types de fibres. Dans le muscle adulte, on trouve une population de cellules précurseurs (cellules satellites) qui peuvent se diviser pour former de nouvelles cellules musculaires à la suite d'une lésion tissulaire.

Les myopathies désignent une atteinte pathologique de ces muscles. On a pris l'habitude de regrouper ces affections en deux grands groupes : les myopathies inflammatoires et les myopathies dégénératives. Voici la classification que l'on utilise pour désigner ces myopathies (101):

- I. Inflammatoire
  - A. Infectieuse
    - 1. Bactérienne
    - 2. Leptospirose
    - 3. Toxoplasmose/ néosporose
    - 4. Parasitaire
  - B. A médiation immune
    - 1. Myosite des muscles masticateurs
    - 2. Polymyosite
    - 3. Dermatomyosite

## II. Dégénérative

### A. Acquise

1. Endocrinienne
  - a. Hyperadrénocorticisme
  - b. Hypothyroïdie
  - c. Polymyopathie hypokaliémique féline
2. Myopathie fibrosante/ ossifiante
3. Ischémique
4. Nutritionnelle
5. Néoplasique
6. Toxique

### B. Héritaire

1. **Dystrophie musculaire**
  - a. **Dystrophie musculaire liée au chromosome sexuel X (défiance en dystrophine)**
  - b. Autres dystrophies musculaires (présence de dystrophine)
2. Myotonie
3. Métabolique
4. Myopathie centronucléaire (Labrador Retriever)



## INTRODUCTION

Depuis 1960, le développement de nombreuses techniques de recherche telles que l'histochimie, la microscopie électronique, des techniques de biologie moléculaire ont permis de réaliser de grands progrès dans la connaissance des affections musculaires. Les modèles animaux utilisés à l'occasion de ces recherches y ont fortement contribué.

Le terme de dystrophie musculaire canine fait référence à un groupe de myopathies primitives héréditaires caractérisées sur le plan histologique par une dégénérescence progressive des muscles squelettiques (61). La dystrophie musculaire de Duchenne est caractérisée par une alternance de phénomènes de dégénérescence/nécrose suivis de régénération du muscle squelettique qui conduisent à son remplacement progressif par du tissu fibreux et de la graisse.

La dystrophie musculaire de Duchenne est, parmi le très grand nombre de dystrophies musculaires existant chez l'Homme, sans conteste la plus importante de par sa fréquence (un garçon affecté sur 3300 naissances) et de par la gravité de ses répercussions cliniques. Les enfants présentent une croissance ralentie, des difficultés à se lever ou pour marcher. Malgré le développement de l'assistance médicale et la prise en charge de ces malades, la mort survient vers l'âge de 30 ans par insuffisance respiratoire ou cardiaque.

Il a été démontré chez la souris l'intérêt d'une surexpression de l'utrophine, protéine homologue de la dystrophine absente lors de dystrophie musculaire. Cette étude, menée à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, doit nous permettre de répondre à la question suivante : est ce que la surexpression d'utrophine peut entraîner un bénéfice thérapeutique chez les chiens malades ?

Notre thèse comprendra trois parties distinctes : une partie bibliographie, une partie matériels et méthode et une dernière partie où on discutera des résultats obtenus.



# **I- ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**



# 1. Dystrophine et myopathie de Duchenne

## 1.1. Origine de cette maladie

Cette maladie est liée à la synthèse de formes tronquées de dystrophine ou l'absence totale ou quasi-totale de cette protéine dans les fibres musculaires (8,50). La dystrophine est en effet au centre de mécanismes qui maintiennent la structure morphologique et fonctionnelle de la fibre musculaire striée. Malgré tout, la fonction de la dystrophine est encore assez imprécise.

Deux hypothèses tentent d'expliquer la pathogénie de cette maladie.

Tout d'abord, l'hypothèse structurale suggère que cette absence de dystrophine, protéine qui lie les protéines de la matrice extracellulaire à celles du cytosquelette, aboutit à la perte de l'intégrité de la membrane plasmique des cellules musculaires (108). Des molécules d'habitude en interaction avec la dystrophine telles que les sarcoglycane, le complexe dystroglycane ou les syntrophines (Cf Figure 1) sont désorganisées. La membrane cellulaire est ainsi fragilisée et l'activation de canaux membranaires perméables au calcium entraîne une élévation de la concentration intracellulaire de cet ion (33). Ceci 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 (113,80). 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 (78). De même il pourrait se produire un épuisement des cellules satellites au bout d'un certain nombre de cycles nécrose/ régénération.

Enfin, l'hypothèse de l'agrégation des canaux ioniques suggère 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 (17).

Toutefois, ces deux hypothèses ne s'excluent pas mutuellement et apportent des arguments recevables pour expliquer les conséquences de l'absence de dystrophine dans les fibres musculaires squelettiques.

D'un point de vue histologique, les conséquences de l'absence de dystrophine sont visibles après biopsie. Ces biopsies prélevées sur des patients DMD montrent une variabilité importante dans le diamètre des fibres musculaires squelettiques. Des fibres sont hypercontractées. Les muscles présentent des zones de fibrose et d'inflammation, signes de dégénérescence tandis que d'autres fibres présentent des noyaux centronucléés ce qui reflète une activité de régénération.

Les conséquences de l'absence de la dystrophine sont donc très graves pour les muscles squelettiques, surtout pour le diaphragme. Ceci est également préjudiciable pour les fibres cardiaques et donc pour l'activité du myocarde. Les patients développent une cardiomyopathie dilatée.

## 1.2. Modèles animaux de la myopathie de Duchenne

Il existe trois modèles animaux spontanés de la myopathie de Duchenne qui ne sont pas des modèles parfaits : modèles murins (souris mdx), modèle canin (chien GRMD) et modèle félin (chat FXMD). Malgré les différences importantes entre la symptomatologie de ces modèles animaux et la symptomatologie humaine, ils sont extrêmement utiles pour les études physiopathologiques et la mise au point de traitements.

Dans notre étude, nous avons utilisé des chiens GRMD. Les chiens atteints par une dystrophie musculaire ont été décrits en 1986 et 1988 dans la race Golden Retriever (109, 61). Ces chiens GRMD ont une mutation ponctuelle au niveau d'un site d'épissage dans l'intron six du gène qui code pour la dystrophine sur le chromosome X. Cette mutation entraîne un changement dans le cadre de lecture à l'origine de la formation prématurée d'un codon stop dans l'exon huit, ce qui se traduit par la présence d'un ARNm codant pour la dystrophine dont la longueur est estimée à 5% de la longueur normale (100). Ces chiens ne présentent pas d'atteinte clinique au niveau des systèmes nerveux central et périphérique.

Dès les premières semaines, on peut observer une élévation des créatines kinases et un retard de croissance. Les premiers signes cliniques majeurs apparaissent vers l'âge de 2 mois. Les chiens sont incapables d'ouvrir complètement la bouche. Ils se déplacent avec une certaine raideur en mobilisant simultanément les deux postérieurs (« bunny hopping »). Les troubles locomoteurs deviennent plus marqués vers 3 mois. Il existe alors une abduction des coudes, une adduction des genoux, une hyperextension des carpes, une hyperflexion des tarses. L'animal est amyotrophié au niveau des muscles du tronc et des temporaux (cf Planche1). L'ouverture buccale devient très réduite. Dans le 4<sup>ème</sup> mois, on note une aggravation des symptômes qui vont se stabiliser vers l'âge de 6 mois avec une amyotrophie marquée des muscles du tronc, des temporaux et des muscles des membres ; des contractures dues à la fibrose des muscles proximaux qui paraissent très fermes à la palpation, une macroglossie, des troubles de la déglutition pharyngée et oesophagienne avec ptyalisme et régurgitation ; fréquemment des hernies hiatales ou un mégaoesophage compliqué très souvent de bronchopneumonie par fausse déglutition ; une polypnée avec respiration abdominale et dyspnée à l'effort. De 3 à 6 ans, les signes cliniques précédemment décrits restent stables ou s'aggravent progressivement. Une cardiomyopathie dilatée peut alors s'installer.

La présence d'une dystrophine de 390 kDa a été mise en évidence en faible quantité dans les muscles de chiens GRMD (97). La découverte de cette isoforme pourrait expliquer la grande variabilité de sévérité entre des animaux de portées différentes : certains animaux ne survivent pas après la naissance, d'autres présentent de graves altérations de l'état général à l'âge d'un an, tandis que d'autres souffrent de cardiomyopathie dilatée vers l'âge de six ans. Cette grande variabilité clinique porte également sur le degré d'ankylose articulaire liée à la contracture musculaire.

Les signes cliniques et pathologiques des chiens GRMD sont similaires à ceux observés chez les patients atteints de myopathie de Duchenne. Le chien apparaît ainsi comme le modèle animal le plus propice pour des essais thérapeutiques.

### 1.3. La dystrophine

La dystrophine est, comme nous l'avons vu précédemment, la protéine déficiente dans la myopathie de Duchenne.

#### 1.3.1. Présentation du gène

Le gène de la dystrophine a été identifié et cloné en 1986 (82). On l'a appelé DMD (Duchenne Muscular Dystrophy) (1). Ce gène est composé de 2400 kb soit 1% du chromosome X, c'est-à-dire 0,05 % du génôme humain. La séquence codante représente seulement 0,5 % de la longueur totale soit 11kb. Elle est répartie en 79 exons séparés par des introns allant jusqu'à 200 kb.

Le gène de la dystrophine est à l'origine de la transcription d'une grande quantité d'ARNm différents qui aboutissent à une variété de formes de dystrophine de longueur différente (71). Plusieurs mécanismes semblent intervenir : l'initiation de la transcription à partir d'une série de promoteurs, de multiples sites d'épissage alternatif et l'existence de différentes longueurs de queues polyA. Ces isoformes de dystrophine s'expriment selon les tissus et selon le stade de développement de l'individu (71). Leurs fonctions sont encore inconnues (26).

#### 1.3.2. Les différentes isoformes de dystrophine (Cf Tableau 1)

Huit promoteurs ont été identifiés à ce jour. Ces promoteurs aboutissent à la synthèse de dystrophine de taille différente.

Un premier groupe de promoteurs comprend :

- un promoteur cortical (9) actif dans les neurones du cortex et de l'hippocampe ainsi que dans le muscle cardiaque et squelettique
- un promoteur de cellules musculaires différenciées (squelettique, cardiaque et lisse) (4, 38)
- un promoteur des cellules de Purkinje (39) actif également dans le cortex fœtal, les muscles cardiaque et squelettique
- un promoteur des cellules lymphocytaires (86)

Ce premier groupe induit la formation de dystrophine de 427 kDa (Dp427).

Il existe un promoteur dans les cellules de la rétine (92), également retrouvé dans le cerveau et le muscle cardiaque. Il permet la synthèse de dystrophine de 260 kDa (Dp260).

On trouve un autre promoteur dans de nombreuses cellules du cerveau comme les neurones du cortex, du cervelet, de l'hippocampe, du bulbe olfactif et de la moelle épinière (69). Ce promoteur induit la synthèse d'une isoforme de dystrophine de 140 kDa.

Le promoteur des cellules de Schwann (14) qui donne une dystrophine de 116 kDa (Dp116) est aussi actif dans le cerveau des nouveaux-nés (98).

Une autre isoforme de dystrophine de 71 Kda (Dp71) est, elle, ubiquitaire. Son promoteur est retrouvé actif dans le foie, le poumon, le rein et les testicules (65) mais aussi dans les fibres musculaires squelettiques fœtales et les myoblastes en prolifération.

Ainsi, cinq isoformes différentes de dystrophine sont retrouvées exprimées dans différents tissus.

### 1.3.3. Présentation de la protéine (Cf Figure 2)

La protéine traduite majoritairement dans les fibres musculaires, la Dp427, contient 3685 acides aminés et a une longueur de 175 nm. Elle est constituée de quatre domaines fonctionnels (59, 117, 118):

- le domaine N terminal d'environ 250 acides aminés possède une analogie de séquence et de fonction avec des protéines du cytosquelette : la  $\beta$ -spectrine et l' $\alpha$ -actinine (44). Ce domaine permet de lier la dystrophine avec l'actine, elle-même reliée au cytosquelette sous-jacent.

- le domaine central d'environ 2710 acides aminés est constitué de la répétition en vingt-quatre (1) ou vingt-cinq ou vingt-six exemplaires de 109 acides aminés. Chaque répétition forme une hélice élémentaire  $\alpha$  qui comprend deux tours riches en proline ce qui permet à la moitié C terminale d'une répétition de se lier à la moitié N terminale de la suivante, créant ainsi un repliement en triple hélice (59).

- on trouve ensuite une région d'environ 300 acides aminés, riche en cystéine, homologue d'un domaine de l' $\alpha$ -actinine et de la  $\beta$ -spectrine, qui contient un motif à deux tryptophanes (WW) (95) très conservés notamment dans l'utrophine.

- enfin, la région C terminale composée d'environ 325 acides aminés qui a pour seul homologue la séquence C terminale du gène qui code pour l'utrophine. Dans cette région, la séquence codée par les exons 73 à 75 permet la formation d'une structure en deux hélices  $\alpha$  séparées par une séquence linéaire (7). La première hélice située entre les acides aminés 3447 et 3481 lie la syntrophine- $\alpha$  qui elle-même lie les autres syntrophines (52).

### 1.3.4. Localisation de la dystrophine (Cf Figure 1)

Dans les fibres musculaires squelettiques du fœtus humain, l'apparition de la dystrophine sous le sarcolemme est progressive (93). Elle a tout d'abord été détectée dans le cytoplasme des régions proches des jonctions myotendineuses entre la huitième et la onzième semaine de gestation (24). A un stade fœtal plus avancé, elle est localisée à travers tout le cytoplasme (114). Un marquage éparse est visible par immunohistochimie sous la membrane de certaines fibres à la dixième semaine (93). Puis la dystrophine apparaît nettement localisée à la membrane entre la dix-huitième semaine (20) et la vingt-deuxième se ento1parse est



charnière importante puisqu'elle relie le cytosquelette sous-jacent à la matrice extracellulaire par l'intermédiaire du complexe de DAPs et de DAGs (16) et de la laminine.

La myopathie de Duchenne est une maladie toujours létale. Aucun traitement n'est actuellement disponible. Plusieurs voies de recherche sont explorées pour trouver un traitement efficace contre la myopathie de Duchenne. Ce traitement devra réduire ou inhiber la nécrose des fibres musculaires et empêcher ainsi, la dégénérescence du tissu musculaire. Des thérapies cellulaires ou géniques sont ainsi envisagées. Des méthodes plus conventionnelles basées sur des molécules chimiques de remplacement font l'objet de recherche. La surexpression de l'utrophine pour compenser l'absence de dystrophine en est un bon exemple.

## 2. L'utrophine

### 2.1. Présentation du gène (Cf Figure 2)

Le gène codant pour cette protéine se trouve sur le bras long du chromosome 6 chez l'Homme (72) et sur le chromosome 10 chez la souris (12). Il comporte 900 kb. Le gène humain de l'utrophine présente 84% d'homologie avec le gène murin. Actuellement, aucune mutation l'affectant n'a été mise en évidence. Il présente de nombreuses similitudes structurales avec le gène de la dystrophine (91). Ces deux gènes ont 65% d'homologie et pourraient dériver d'un gène ancestral commun (74).

L'utrophine, exprimée de façon ubiquitaire, présente 73% d'homologie avec la dystrophine. Elle a un poids moléculaire de 395 kDa et est constituée de 3434 acides aminés. Elle est, comme la dystrophine, composée de quatre domaines:

- un domaine N terminal de 250 acides aminés contient trois séquences en position 33-42, 107-131 et 147-163 qui lient l'actine de type F (119). La liaison avec l'actine est régulée par la calcium/calmoduline (120) contrairement à celle de la dystrophine.
- un domaine en bâtonnet est formé par la répétition de vingt-deux triples hélices.
- une région riche en cystéine comprend notamment un motif à deux tryptophanes.
- un domaine C terminal (106) possède près de 97% d'homologie avec l'utrophine de souris et lie les syntrophines (62) par une structure en hélice  $\alpha$  (7)

Quatre isoformes ont été décrites jusqu'à présent : une utrophine de 113 kDa (7), deux utrophines de 71 et 140 kDa présentes dans de nombreux tissus dont le muscle squelettique (114) et enfin une utrophine de 62 kDa (124).

## **2.2. Localisation de l'utrophine**

L'utrophine est très exprimée dans les muscles fœtaux sains et dans de nombreuses lignées cellulaires (85). Chez la souris, au cours du développement de la fibre musculaire, l'utrophine apparaît vers le douzième jour embryonnaire et atteint un pic d'expression vers le treizième jour, lors du premier contact neurone-muscle, puis son expression décroît.

Dans la fibre musculaire adulte saine, l'utrophine est ancrée au complexe des DAPs et des DAGs situé au sommet des plis sous-neuraux à la jonction neuromusculaire (31, 56, 73) où elle est colocalisée avec les récepteurs à l'acétylcholine. Elle est également localisée à la jonction myotendineuse (56).

Contrairement à la dystrophine, l'utrophine est exprimée dans de nombreux tissus. Sa répartition est ubiquitaire, elle est présente principalement dans les poumons (77), mais également le muscle cardiaque, les muscles lisses, le foie, la rate, l'estomac, les reins, les testicules, les veinules et artérioles (96), le système nerveux central (57) et la terminaison nerveuse des motoneurons (56).

## **2.3. Fonction de l'utrophine**

Sa fonction est encore inconnue. La création d'une inactivation génique pour l'utrophine chez la souris a permis d'estimer sa faible importance physiologique. Bien qu'exprimée de façon ubiquitaire, son absence n'entraîne pas de déficience comportementale, mais seulement au niveau cellulaire, une modeste désorganisation de la jonction neuromusculaire (27, 28, 29).

Chez les patients DMD adultes (31) comme chez la souris mdx, le chien GRMD et le chat FXMD, l'utrophine est exprimée et détectée à la jonction neuromusculaire, comme dans les muscles sains, mais aussi sur toute la longueur des fibres musculaires en régénération (102). Elle est présente en plus grande quantité que dans des muscles sains (54) alors que le taux d'ARNm reste constant (40, 41). L'augmentation de l'utrophine dans ces conditions serait due à l'activation d'un programme fœtal dans les fibres en régénération (47, 48) ou à un phénomène de compétition. La dystrophine qui a une affinité plus grande vis-à-vis des protéines du cytosquelette que l'utrophine mais qui n'est plus présente serait remplacée par l'utrophine.

Plusieurs voies de recherche sont explorées pour trouver un traitement efficace contre la myopathie de Duchenne. Ce traitement devra réduire ou inhiber la nécrose des fibres musculaires et empêcher ainsi la dégénérescence du tissu musculaire. Dans ce cadre, la L-arginine, en tant que donneur de NO permettant la surexpression de l'utrophine, trouve son intérêt.

## **2.4. Intérêt de l'utrophine pour compenser l'absence de dystrophine**

Une des voies de recherche thérapeutique sur la myopathie de Duchenne consiste à compenser la déficience en dystrophine par l'utrophine (15) car nous avons vu précédemment qu'elle possédait une forte homologie de séquence. Par ailleurs, l'utrophine est capable de remplir les mêmes fonctions cellulaires que la dystrophine (6).

Plusieurs arguments, notamment rapportés dans la thèse de doctorat du Dr Emmanuel Chaubourg sur l'axe neuromusculaire (2000), justifient cela. :

- l'utrophine est surexprimée par les malades DMD et par la souris mdx. Chez cette dernière, l'utrophine est présente dans les mêmes tissus que chez la souris saine (55) et il a été démontré que son ARNm est exprimé de façon ubiquitaire mais à des taux variables. Il est abondant dans les poumons, faiblement exprimé dans le cerveau et présent à de quantités équivalentes dans les muscles, le cœur, le foie, les reins et la rate (73).

- on retrouve l'utrophine au niveau des jonctions neuromusculaires DMD et mdx comme dans les muscles sains (87). Il a été montré qu'elle est associée avec l'actine et le complexe des DAPs et DAGs (76).

- l'utrophine est également présente sous le sarcolemme en dehors de la jonction neuromusculaire chez les DMD et la souris mdx (56). Des quantifications par western blot qui mettent en évidence l'utrophine extraite de biopsies musculaires de patients DMD montrent une augmentation de l'expression allant jusqu'à dix-sept fois par rapport au taux normal (54). Des résultats similaires ont été obtenus par immunocytochimie (81). Il est possible que cette augmentation ait comme origine la régénération des fibres musculaires qui suit les vagues de dégénérescence du tissu musculaire (84).

- les muscles de petit calibre comme les muscles extra-oculaires ne subissent pas de dégénérescence chez la souris mdx et chez les patients atteints de DMD (2). Il en est de même pour le muscle cardiaque chez la souris mdx (107). Or, chez cette dernière, il a été démontré que ces muscles surexpriment spontanément l'utrophine (quatre fois dans le cas des fibres cardiaques), qu'elle est localisée sur toute la longueur du sarcolemme des fibres où elle est associée au complexe des DAPs et DAGs qui persiste grâce à sa présence (76).

- la transfection de fibres musculaires de souris mdx à l'aide d'un vecteur adénoviral contenant une séquence codant pour une mini-utrophine rétablit les DAPs et les DAGs sous leur sarcolemme (36,37). Ces fibres sont alors plus résistantes aux stress mécaniques.

- la surexpression d'utrophine chez la souris mdx par l'utilisation d'un transgène tronqué d'utrophine associé au promoteur humain de l'actine  $\alpha$  squelettique (104) permet de rétablir la présence des éléments du complexe des DAPs et DAGs au niveau du sarcolemme. Les performances mécaniques des muscles sont améliorées (29), en particulier celles du diaphragme, le muscle le plus atteint chez la souris mdx, qui retrouve une apparence histologique semblable à celui d'une souris saine.

- l'utrophine peut être considérée comme l'homologue de la forme fœtale de la dystrophine dans les fibres musculaires puisque, au cours du développement de l'embryon sain, elle est d'abord exprimée sur toute la longueur des fibres musculaires pour atteindre un maximum d'expression à la dix-huitième semaine de gestation chez l'Homme et au vingtième jour de gestation chez la souris avant que son expression ne se restreigne progressivement à la jonction neuromusculaire peu de temps avant la naissance (56, 70).

Tous ces arguments nous amènent à nous intéresser à une surexpression de l'utrophine dans un environnement fœtal comme moyen de compenser un déficit en dystrophine. La L-arginine est intéressante dans cette perspective.

### **3. Approche pharmacologique des myopathies dystrophiques : l'arginine, un donneur de NO**

#### **3.1. La L-arginine**

La L-arginine est nécessaire pour la synthèse des protéines. Elle joue un rôle pivot (121) dans la biosynthèse des autres acides aminés. Elle constitue une molécule essentielle du processus d'élimination des ions ammonium. Elle permet ainsi par son importance dans le cycle de l'urée d'éliminer les déchets azotés de l'organisme sous forme d'urée. Elle est fournie par la ration alimentaire, par la dégradation des protéines et par une synthèse endogène. Elle est en effet synthétisée à partir de la L-citrulline qui est synthétisée dans l'intestin à partir du glutamate. Cette L-citrulline est transformée en arginosuccinate qui, grâce à une arginosuccinate lyase, forme de la L-arginine. La très forte teneur du foie en arginase interdit toute libération d'arginine d'origine hépatique. L'arginine peut aussi être synthétisée dans le cerveau et surtout dans les reins (60% de la synthèse). Les reins qui possèdent une faible activité arginase ont été identifiés comme les principaux fournisseurs d'arginine endogène pour les synthèses protéiques musculaires.

Dans le muscle, la L-arginine est essentielle dans la synthèse de la créatine.

La L-arginine est classée parmi les substances à très faible toxicité. Ainsi, chez le Rat, la dose létale 50 est de 18 mM/kg soit 3,8g/kg en injection intrapéritonéale après vingt-quatre heures de jeûne (43).

#### **3.2. Quelques considérations sur le métabolisme cellulaire (Cf Figure 3)**

Dans les cellules hépatiques et dans les myotubes en culture (90), le cycle de Krebs et le cycle de l'urée sont étroitement liés.

Chez l'embryon, certaines cellules présentent un métabolisme préférentiellement glycolytique. Il a été montré que les muscles fœtaux humains ont exclusivement des fibres à métabolisme glycolytique (IIC) jusqu'à la dix-neuvième semaine de gestation (32). Cette période est corrélée avec une présence intense d'utrophine dans les fibres musculaires (23). A partir de la dix-neuvième semaine, le nombre de fibres de type I augmente (32). Parallèlement à cela, le marquage de l'utrophine s'estompe pour pratiquement disparaître à la vingt-sixième semaine (23). Quant aux fibres IIC, elles se différencient plus tardivement que celles du type I. Le groupe IIB apparaît vers trente-trois semaines et le groupe IIA au cours du dernier mois de la grossesse (32).

Chez le fœtus, les cycles de Krebs et de l'urée sont faiblement actifs (89). Tant que le cycle de l'urée n'est pas fonctionnel, l'excrétion de l'azote se fait sous forme d'ammoniaque. Cette excrétion d'ammoniaque reflète l'absence de fonctionnalité du cycle de l'urée hépatique. Le glucose est métabolisé par la glycolyse et transformé en acide lactique.

L'acétyl-CoA qui provient de la  $\beta$ -oxydation des acides gras peut alimenter la cétogénèse qui permet la synthèse de corps cétoniques comme le  $\beta$ -hydroxybutyrate dans les mitochondries hépatiques. La L-arginine, un acide aminé semi-essentiel qui chez l'adulte est dégradé en ornithine et en urée par l'arginase dans le cycle de l'urée (hépatique ou musculaire (90)), est ici disponible en plus grande quantité pour la NOS qui peut la convertir en citrulline et en NO. Il semble donc que les conditions métaboliques conduisent à la synthèse de

molécules (NO, corps cétoniques) qui pourraient induire et renforcer l'expression de gènes fœtaux. Dans la période précédant la naissance, la L-arginine devient un substrat essentiel du cycle de l'urée. On constate par ailleurs que l'expression des gènes fœtaux diminue jusqu'à disparaître.

L'expression de gènes fœtaux pourrait être un reflet du métabolisme glycolytique. L'activité de la chaîne respiratoire et donc du métabolisme oxydatif est sensiblement diminuée chez les souris mdx et les patients DMD (64). Ce retour à un métabolisme plutôt glycolytique pourrait permettre aux fibres musculaires d'exprimer plus d'utrophine de manière à compenser naturellement l'absence de dystrophine.

### **3.3. La L-arginine substrat de la monoxyde d'azote synthétase**

La L-arginine est le substrat de la monoxyde d'azote synthétase. Cette enzyme permet la production de citrulline et de monoxyde d'azote. Le NO, un radical libre lipophile dont la durée de vie est très courte ( $t_{1/2} = 4s$ ), est impliqué dans de nombreux processus physiologiques (11, 67, 123) dont la vasodilatation, la neuromodulation (34), la fusion des myoblastes (66), l'addition de sarcomères (60), la modulation de la contraction musculaire (75) et le rejet de l'innervation polyneuronal du muscle (112). Il est également impliqué dans les chocs septiques, l'ischémie cérébrale, les processus de neurodégénérescence, l'inflammation, la migraine ou le diabète insulino-dépendant (49).

### **3.4. Les monoxyde d'azote synthétases**

#### **3.4.1. Les différentes isoformes**

Les NOS sont actives sous forme de dimère et leur activité est dépendante d'un hème et de cofacteurs comme le NADPH, la BH<sub>4</sub>, le FAD et le FMN. C'est une des rares protéines à posséder une activité enzymatique au niveau de la jonction neuromusculaire.

Une des isoformes, la NOS<sub>mu</sub>, est associée au complexe des DAPs et DAGs sous le sarcolemme par l'intermédiaire de la syntrophine  $\alpha 1$  (111). Elle est accumulée aux jonctions myotendineuses (18) et neuromusculaires (63). Elle y est stimulée par l'acétylcholine grâce à des récepteurs nicotiques et surtout au glutamate par l'intermédiaire des récepteurs canaux NMDAR-1 colocalisés avec elle (42). A la jonction neuromusculaire, elle est décelée en présence de l'hème oxygénase-2 (63), enzyme qui catalyse la formation de monoxyde de carbone. Toutes ces zones sont particulièrement riches en dystrophine et en utrophine.

L'expression d'une autre isoforme, la NOS<sub>n</sub>, semble être activée par l'activité mécanique (102), par l'entraînement (3) et par des stimulations électriques chroniques (94). Chez l'Homme, l'ARNm de 10 kb codant pour la NOS<sub>n</sub> a été trouvé en plus grande quantité dans le muscle que dans le cerveau (83). L'activité de la NOS y est très élevée. La NOS<sub>n</sub> est localisée sous le sarcolemme et le cytoplasme de toutes les fibres avec un marquage plus fort dans les fibres de type I (35). Elle est aussi présente à la jonction neuromusculaire (122).

### 3.4.2. Monoxyde d'azote synthétase musculaire et myopathie de Duchenne

La jonction neuromusculaire est la seule zone de la fibre musculaire avec la jonction myotendineuse où l'utrophine reste exprimée chez le mammifère adulte sain. Cette corrélation entre la présence de la NOS et l'utrophine dans la jonction neuromusculaire est renforcée par d'autres observations. Les cellules satellites, les cellules endothéliales (54) et les cellules hépatiques qui expriment fortement la NOS expriment aussi l'utrophine.

Selon les auteurs, les patients atteints de myopathie de Duchenne présentent une absence totale d'activité de la NOS<sub>mu</sub> (18) ou seulement une absence d'activité au niveau du sarcolemme (10). Par contre selon une autre équipe, la NOS<sub>mu</sub> persiste à la jonction neuromusculaire des patients DMD (122).

Les changements dans la distribution intracellulaire et la diminution de l'activité de la NOS<sub>mu</sub> sous le sarcolemme ont jeté des soupçons sur sa contribution dans la physiopathologie de la myopathie de Duchenne. La diminution de l'activité NOS dans les fibres DMD entraîne-t-elle une perte de la protection des biomolécules face à l'oxydation (45, 46)? Par ses propriétés anti-oxydatives, le NO pourrait protéger les biomolécules de l'oxydation par les ions superoxydes dans les fibres saines (116).

Chez un sujet sain, la contraction musculaire induit la production de NO par les NOS et particulièrement par la NOS<sub>mu</sub> située sous le sarcolemme. Le NO provoquerait la vasodilatation nécessaire à un apport efficace de métabolites et d'oxygène pour le muscle en contraction, en contrebalançant l'effet vasoconstricteur du système sympathique adrénérgique (103). La diminution voire l'absence de NOS<sub>mu</sub> sous le sarcolemme des fibres mdx et DMD ne permettrait plus de moduler la vasoconstriction. Ces fibres subirait une ischémie et une hypoxie qui pourraient contribuer à la diminution du seuil de tolérance à l'exercice et à la destruction préférentielle des fibres de type IIb (113) normalement plus riches en NOS<sub>mu</sub> (53).

### 3.4.3. Résultats expérimentaux obtenus sur la souris mdx in vitro et in vivo

Des études in vitro ont d'abord été réalisées par Emmanuel Chaubourt lors de son travail de recherche. Des myotubes de souris saines, de souris mdx et d'hommes ont été mis en présence de :

- D-Arginine qui n'est pas le substrat de la NOS à une concentration de  $10^{-3}$ M chez la souris et  $1,5 \cdot 10^{-2}$ M chez l'homme.
- L-Arginine et d'un antagoniste spécifique de la guanylate cyclase normalement activée par le NO à des concentrations respectivement chez la souris de  $10^{-3}$  M et  $10^{-5}$ M et chez l'homme de  $10^{-2}$ M et  $0,5 \cdot 10^{-4}$ M.
- L-Arginine et d'un inhibiteur large spectre des NOS à des concentrations respectivement chez la souris de  $10^{-3}$ M et  $10^{-3}$ M et chez l'homme de  $10^{-2}$ M et de  $2,5 \cdot 10^{-2}$ M.

Dans ces trois conditions, aucune accumulation d'utrophine sous le sarcolemme des myotubes n'a été retrouvée ce qui tend bien à prouver que le NO produit par l'action des NOS sur la L-arginine induit l'accumulation de l'utrophine sous le sarcolemme des myotubes de souris saines, mdx et humains en culture et que la voie de transduction semble impliquer une guanylate cyclase.

La L-arginine augmente la quantité d'utrophine dans les myotubes de souris saines et mdx à une concentration de  $2.10^{-3}$  M ainsi que dans ceux d'humains sains et DMD à une concentration de  $10^{-2}$  M.

In vivo, on a injecté à des souris pendant 20 jours de la L-Arginine à une concentration de 200mg/kg par voie intrapéritonéale. La L-arginine a permis d'induire l'apparition de l'utrophine sous la membrane plasmique des fibres musculaires squelettiques chez les souris C57BL/6 et mdx et a augmenté sa quantité (X3). L'augmentation d'utrophine est visible dès le quinzième jour après le début des injections (X1,5) et persiste au moins douze jours après la fin des injections. L'effet maximum est obtenu après un mois de traitement. L'apparition de l'utrophine sous le sarcolemme est plus forte chez les souris âgées que chez les souris jeunes, chez les femelles que chez les mâles et chez les souris mdx que chez les souris saines.

La réponse des muscles est d'autant plus importante que ces muscles contiennent des fibres lentes. Enfin, le tissu musculaire des souris mdx injectées avec de la L-arginine a toujours un aspect homogène. Le tissu adipeux est en effet peu présent dans les muscles des souris traitées et il est réparti en périphérie des muscles.

### **3.5. La L-arginine et le monoxyde d'azote pour surexprimer l'utrophine**

L'utrophine reste exprimée dans les fibres musculaires adultes saines mais seulement au niveau des jonctions neuromusculaires (63, 122) et myotendineuses (18). Or, la NOS est une des seules protéines du complexe sous-membranaire qui possède une activité enzymatique élevée au niveau de ces jonctions. De plus, l'utrophine reste exprimée dans les cellules musculaires lisses qui bordent les vaisseaux sanguins. Ces cellules musculaires sont au contact des cellules endothéliales qui expriment la NOS et qui produisent du NO. Tout ceci est évocateur d'un rôle du NO dans l'expression de l'utrophine.

Après injection de L-arginine, la concentration plasmatique de L-arginine augmente. Cette bio-disponibilité accrue de L-arginine augmente la production de NO dans les fibres à métabolisme oxydatif et détourne celles-ci vers un métabolisme plutôt glycolytique. En effet, il a été démontré que le NO inhibe certaines enzymes du cycle de Krebs comme l'aconitase ainsi que les enzymes des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale comme la NADH-ubiquinone oxydoréductase, la succinate-coenzymeQ oxydoréductase et les cytochromes oxydases (22, 30).

De ce fait, le cycle de Krebs est ralenti et les fibres se retrouvent alors avec un métabolisme glycolytique similaire à celui rencontré dans la période fœtale. Ces conditions favorisent l'apparition d'utrophine sous le sarcolemme. Il reste bien sûr à déterminer si cette apparition de l'utrophine est due à une activation de l'expression du gène ou s'il s'agit d'une stabilisation de l'ARNm.

La production locale de NO est accrue après injections de L-arginine par voie intrapéritonéale. Cette production est d'autant plus forte que les fibres rapides sont particulièrement enrichies en NOS (58). Ces fibres rapides qui sont déjà tournées vers un métabolisme glycolytique donc proche du métabolisme des fibres fœtales avec expression d'utrophine, pourraient subir un rétro-contrôle négatif qui va aboutir à une diminution de l'utrophine sous le sarcolemme.

A l'issue de cette présentation, il est clairement mis en évidence l'intérêt de la L-arginine comme donneur de NO dans le cadre des myopathies dystrophiques.

Notre travail a donc consisté à réactiver l'expression du gène homologue fœtal de la dystrophine chez des chiens GRMD pour compenser la déficience d'une protéine adulte homologue (la dystrophine) et ralentir ainsi la dégénérescence des fibres.



## **II- MATERIELS ET METHODES**



Au cours de l'étude bibliographique, il a été clairement mis en évidence l'intérêt de surexprimer l'utrophine dans le cadre de la myopathie. En prenant l'exemple d'un donneur de NO capable d'induire une surexpression d'utrophine, en l'occurrence la L-arginine, on souhaite répondre à la question suivante : est ce que la surexpression d'utrophine peut entraîner un bénéfice thérapeutique chez les chiens GRMD ?

### **1- Chiens et traitement (Cf Tableau 2 et Figure 4)**

Les 9 chiens que nous avons utilisés proviennent d'une colonie appartenant à l'AFM (Association Française contre les Myopathies). Cette colonie est issue de trois femelles porteuses fournies par le Docteur J. Kornegay. Le diagnostic génétique de myopathie est établi dès l'âge de 15 jours pour différencier rapidement les animaux sains des porteurs ou malades (Cf infra). L'hébergement des animaux et les protocoles sont conformes aux recommandations européennes sur l'expérimentation animale.

Les chiens atteints de bronchopneumonie par fausse déglutition ont reçu des antibiotiques.

Les chiens sont âgés de 10 jours à 8 mois au début du traitement. On peut les classer en trois groupes :

- les chiens sains traités à l'arginine: PHOEBUS et RICARD.
- Les chiens malades traités à l'arginine : PHYTON, PHOSPHORE, RADIUM, RIESLING et ROTULE.
- Les chiens malades non traités mais recevant du sérum physiologique (NaCl 0,9%): RADON et REFLEXE qui sont donc des chiens témoins.

L'expérimentation s'est étalée de fin juin 2000 à mai 2001. L'observation des animaux s'est poursuivie jusque juin 2001.

#### ***Protocole et traitement (Cf Figure 4)***

Les chiens traités (PHOEBUS, RICARD, PHYTON, PHOSPHORE, RADIUM, RIESLING, ROTULE) reçoivent des injections de L-Arginine (chlorhydrate de L-Arginine, ARGININE VEYRON ND, 1 g dans 5 ml, ampoule pour administration intraveineuse) en intraveineux une fois par jour pendant au moins trois mois. Les chiens non traités (RADON et REFLEXE) reçoivent, eux, un placebo, du NaCl 0,9% à volume égal.

Les doses et les durées des traitements sont répertoriées en annexe dans le tableau 2. Les doses d'arginine ont été fixées à partir des doses utilisées chez la souris dans des études précédentes.

Remarque : le traitement des chiens REFLEXE et ROTULE a été commencé dès l'âge de dix jours. Jusqu'à l'âge de trois mois, les injections étaient administrées par voie intra péritonéale pour des raisons de pratique. Il est impossible à cet âge de pratiquer des injections par voie intraveineuse tous les jours.

## 2. Analyse clinique

### 2.1. Examen clinique

Un examen clinique (fréquence cardiaque et respiratoire, auscultation, inspection, palpation) est réalisé chaque jour lors de l'injection de L-Arginine. Des examens cliniques plus poussés de l'appareil locomoteur sont réalisés tous les 15 jours sur ces chiens pour déterminer leur stade de myopathie (Cf Tableau 3). Chaque critère est évalué de 0 à +++ (0 : absence d'anomalies ; + : petite gêne ; ++ : gêne majeure ; +++ : stade ultime). Le bilan total de l'examen clinique permet alors de déterminer un stade de la maladie.

L'observation et la notation clinique finale (de 0 à 3) de ces animaux malades nous ont permis de définir 3 stades de myopathie avec un âge statistique d'apparition pour chacun d'entre eux. Un chien au stade 1 ne présente pas forcément tous les symptômes présentés ci-dessous pour son stade. Il en est de même pour les stades 2 et 3.

- Stade 1 (de 0 à 3 mois):
  - incapacité d'ouvrir complètement la mâchoire
  - « bunny hopping » (les chiens courent comme des lapins), démarche raide avec abduction des coudes et adduction des jarrets
  - doigts espacés sur les antérieurs et postérieurs
  - amyotrophie des muscles temporaux et du tronc
  - troubles de la préhension, de la mastication et de la déglutition des aliments essentiellement liés à la macroglossie. Les chiens mettent plus de temps à manger leur gamelle.
  
- Stade 2 (de 3 à 12 mois) :
  - fibrose musculaire : les muscles des membres paraissent fermes à la palpation et une rétraction musculotendineuse empêche l'extension complète des articulations proximales (épaule et hanche)
  - plantigradie, palmigradie
  - fonction ambulatoire réduite
  - respiration abdominale surtout après l'exercice
  - ptyalisme avec dysphagie pharyngée. Les troubles sont ici beaucoup plus prononcés qu'au stade 1.
  - régurgitation avec mégaoesophage et hernie hiatale.
  
- Stade 3 (plus de 12 mois) :
  - aggravation de la fibrose musculaire avec rétractions tendineuses des articulations distales (coude, genou, tarse et carpe) et hypertrophie des muscles proximaux
  - profil caractéristique du chien atteint de myopathie dystrophique avec les quatre membres ramassés sous le corps

## **2.2. Mesure des pressions artérielles**

Les pressions sanguines sont mesurées pendant trois mois pour détecter les effets de l'arginine en tant que donneur de NO. L'effet vasodilatateur de l'arginine peut provoquer une hypotension grave chez l'homme, occasionnant notamment des maux de tête. L'arginine conduit au bout de plusieurs réactions à la production de NO. On pouvait donc s'attendre à une hypotension sur les chiens traités. On a essayé d'évaluer l'influence de ces injections sur la pression artérielle des chiens.

Il a été aussi intéressant de voir si l'arginine aux doses injectées a un effet biologique sur l'organisme.

Tous les 15 jours environ des mesures de pression artérielle ont été réalisées par la méthode oscillométrique. On mesurait les pressions systolique, diastolique et artérielle moyenne. Deux mesures de pression sont réalisées sur chaque chien afin d'obtenir des valeurs significatives et cohérentes. La moyenne de ces mesures est alors réalisée.

## **3. Analyse biologique**

### **3.1. Diagnostic génétique**

La caractérisation de la mutation chez le chien GRMD a permis à Bartlett et col. (1996) de mettre au point un test génétique 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 cliniques, ce qui imposait d'attendre que les chiots aient un minimum de 6 semaines.

Après extraction de l'ADN à partir du sang prélevé dans un tube à EDTA, ils réalisent une amplification par PCR du segment d'ADN contenant l'exon 7 en utilisant comme promoteurs les séquences complémentaires des introns encadrant l'exon 7. On aboutit à un produit PCR de 202 paires de bases.

Le produit PCR de 202 paires de bases est digéré par l'enzyme de restriction SAU 96I. L'allèle GRMD comportant un site de coupure pour cet enzyme du fait de la mutation ponctuelle sera coupé en deux fragments de 135 et 67 paires de bases alors que l'allèle sauvage ne sera pas digéré.

Le diagnostic se fait facilement après migration sur un gel d'agarose. L'allèle sauvage est alors aisément distingué de l'allèle muté.

### **3.2. Analyse biochimique**

Des prises de sang sur tube sec ont été effectuées sur ces chiens tous les 15 jours environ. Différents paramètres biochimiques susceptibles d'être modifiés par les injections de L-arginine ont été suivis : l'urée, la créatinine, les créatines kinases, les enzymes hépatiques SGPT et PAL, les ions Na<sup>+</sup> et K<sup>+</sup> ainsi que la réserve alcaline car les animaux souffrent pour la plupart d'insuffisance respiratoire chronique.

Tous ces dosages sont réalisés en routine par le laboratoire de l'Ecole.

Remarque : les premières prises de sang ont été réalisées juste avant le début du traitement sauf pour REFLEXE et ROTULE dont le traitement avait été commencé avant d'arriver à l'Ecole.

### **3.3. Radiographies**

Des radiographies du thorax sont réalisées sur chaque chien au moins une fois au début mais également lorsque l'examen clinique révèle sur ces chiens des difficultés respiratoires, des régurgitations o.640 0 0 12 395.16192 635.90082 Tm2s 0 es rvomissm

Les anticorps primaires sont appliqués sur les coupes aux cryostats (après 30 minutes de saturation avec une solution tampon phosphatée/ sérum albumine bovine à 3%) et incubée à 4°C toute la nuit. Les coupes sont lavées et le deuxième anticorps approprié (l'anticorps fluorescent anti-immunoglobuline de souris de chez Novocastra et l'anticorps anti-facteur de Von Willebrandt conjugué à la rhodamine) est appliqué pendant une heure à température ambiante.

#### **4.2. Immunocytochimie des sarcoglycanes**

L'immunocytochimie des sarcoglycanes est réalisée sur 6 chiens : PHOEBUS, RICARD, REFLEXE, PHOSPHORE, PHYTON, RIESLING soit 4 chiens dystrophiques et 2 chiens sains témoins, 5 traités à la L-arginine et 1 traité au NaCl 0,9% avant le traitement et à la fin du traitement.

Les sarcoglycanes sont des protéines associées à la dystrophine au niveau de la membrane musculaire. On veut savoir si la distribution de ces protéines associées à la dystrophine est perturbée ou pas et dans quelle mesure le traitement à la L-arginine modifie ou pas cette distribution. Pour cela, on utilise deux types d'anticorps. Tout d'abord, un anticorps spécifique de la sarcoglycane  $\beta$  ou  $\gamma$  (IgG1) associée à la biotine puis un deuxième anticorps anti-espèce qui va se fixer sur le premier anticorps. Ce deuxième anticorps possède une enzyme peroxydase qui au contact d'un réactif va révéler la présence de sarcoglycane par la formation d'un composé coloré.

Après avoir été lavées, les coupes sont montées en Vectashield. Toutes les dilutions et tous les lavements sont réalisés avec une solution au PBS (Phosphat Buffer Saline) à 0,2M (pH 7,2). On utilise un microscope Zeiss Axiophot avec une caméra Cool Snap.





### **III- RESULTATS ET DISCUSSIONS**



## **1. Examens cliniques (Cf Figure 5 et Tableau 4)**

Les chiens présentent une grande variabilité phénotypique dans l'expression de leur maladie. Sur le graphique a été représenté l'évolution du stade de myopathie des différents chiens en fonction de leur âge. Tous les chiens GRMD ont une évolution clinique située entre les deux courbes extrêmes. Ceci traduit bien la grande variabilité dans l'expression de cette maladie.

Par ailleurs, on a représenté l'évolution du stade de myopathie des 9 chiens inclus dans le protocole. On constate que les chiens malades traités à l'arginine ou avec un placebo ont une évolution clinique similaire à celle de chiens malades sans aucun traitement.

Une constatation peut être faite quant à la variabilité phénotypique de la maladie. REFLEXE et ROTULE sont deux chiens d'âge comparable. Ils sont en effet nés à 5 jours d'intervalle. ROTULE reçoit de l'arginine depuis l'âge de 10 jours alors que REFLEXE reçoit un placebo. Ces deux chiens sont malades mais à des stades de myopathie bien différents. C'est ainsi ROTULE qui, lui, reçoit de l'arginine et qui est beaucoup plus atteint ! Ceci montre bien le caractère très variable de la maladie.

## **2. Mesures de pression artérielle (Cf Figures 6, 7 et 8 ; Tableaux 5 à 10)**

On a tenu à comparer les pressions artérielles moyenne, systolique et diastolique de deux populations, les chiens malades traités (PHOSPHORE, PHYTON, RIESLING, ROTULE) et des chiens malades non traités vivant dans les mêmes conditions, de la même gamme d'âge mais qui n'ont pas reçu de placebo.

Remarque : Radium était décédé lorsqu'on a commencé à mesurer les pressions artérielles.

On a calculé pour chacun des chiens la moyenne de ses pressions artérielles moyenne, systolique et diastolique. On a ainsi obtenu deux séries de chiffres qui sont répertoriées en annexe (Tableaux 5, 6 et 7). A partir de ces séries de chiffres, on a effectué une analyse de variance pour voir s'il existait une différence significative entre ces deux groupes de chiens.

Aucune différence significative à 5% n'a été mise en évidence pour les pressions artérielles moyenne, systolique et diastolique (Cf Tableaux 8, 9 et 10).

Une remarque peut cependant être faite. En faisant la moyenne des pressions pour chacun des chiens, on s'affranchit de la variabilité intra-chien qui, elle, est très importante. Cette variabilité est même plus élevée qu'entre les chiens d'un même groupe. Un facteur principal, le stress, est à l'origine de ces résultats. Il est très difficile, voire quasiment impossible, même en prenant des précautions d'usage, de s'affranchir totalement de ce facteur. Dans ce but, on avait réalisé deux mesures de pression à chaque fois de manière à avoir deux valeurs proches et cohérentes.

### **3. Dosages biochimiques**

Compte tenu du faible effectif de chiens qui étaient à notre disposition, l'étude des résultats des dosages biochimiques se limitera à une étude purement descriptive.

#### **3.1. Urée/ créatinine (Cf Figure 9 et 10 ; Tableaux 11 et 12)**

Les résultats dans les trois groupes de chiens sont conformes aux normes : de 0,2 à 0,7 g/l pour l'urée et moins de 15 mg/l pour la créatinine. Les valeurs obtenues au sein de chaque groupe de chien sont peu variables.

#### **3.2. Créatine Kinase (Cf Figure 11 et Tableau 13)**

Les résultats ne sont pas surprenants. Les chiens sains ont des valeurs très basses. Les chiens malades traités et non traités ont des valeurs très élevées (plusieurs milliers à plusieurs dizaines de milliers). On ne constate pas graphiquement de différences entre les chiens traités et ceux non traités. Par ailleurs, il ne semble pas y avoir de modifications au cours du traitement de ce paramètre biochimique. La variabilité intra-chien est très élevée.

#### **3.3. CO<sub>2</sub> (Cf Figure 12 et Tableau 14)**

Il existe une grande disparité au sein de chaque groupe de chiens. Le traitement n'a aucune influence sur les valeurs de CO<sub>2</sub>. Les chiens ont des valeurs de CO<sub>2</sub> normales, sauf PHOSPHORE qui semble souffrir d'une alcalose modérée.

#### **3.4. Na<sup>+</sup> (Cf Figure 13 et Tableau 15)**

Les valeurs de natrémie restent dans les normes dans les trois groupes de chiens, de 140 à 150 mmol/l avec une variabilité peu importante.

#### **3.5. K<sup>+</sup> (Cf Figure 14 et Tableau 16)**

Les chiens sains ont des valeurs normales et leur kaliémie est comprise dans l'intervalle des valeurs physiologiques (de 3,8 à 5 mmol/l). Les chiens malades traités ont des kaliémies un peu plus élevées et même trop élevées pour certains chiens comme RIESLING. Les chiens malades non traités ont eux des kaliémies encore plus élevées que ceux non traités. Cette hyperkaliémie (de 5 à 5,5 mmol/l) est anormale et a une toxicité cardiaque. Les écarts types sont faibles.

### **3.6. PAL (Cf Figure 15 et Tableau 17)**

Tous les chiens ont des valeurs normales de PAL. Du fait de la résorption osseuse, les PAL sont plus élevés chez les jeunes chiens en croissance, comme RICARD. Les écarts types sont faibles.

### **3.7. SGPT (Cf Figure 16 et Tableau 18)**

Les chiens sains traités ont des valeurs normales (<100 UI/L) alors que les chiens malades qu'ils soient traités ou pas ont des SGPT augmentés (de 300 à 400 UI/L). Pour déterminer si les SGPT avaient une origine hépatique, B. Valentine a comparé l'activité de plusieurs enzymes chez des chiens sains et malades. Il a été noté une augmentation significative de l'activité des créatines kinases, des ASAT et des SGPT chez les chiens malades alors qu'au contraire, l'activité de la SDH qui est une enzyme spécifique du foie n'était pas statistiquement augmentée. On a donc pu conclure que l'augmentation des SGPT a une origine musculaire et non hépatique, contrairement à ce qu'on pouvait penser auparavant (110).

## **4. Histologie musculaire (cf Planche 2 et 3, Figures 17 et 18)**

Chez les chiens GRMD, on peut constater une variabilité importante dans le diamètre des fibres musculaires squelettiques. Certaines fibres sont hypercontractées. Les muscles présentent des zones de fibrose et des foyers inflammatoires, signes de dégénérescence tandis que d'autres fibres présentent des noyaux centronucléés, témoin d'une activité de régénération.

Sur les lames colorées des planches 2 et 3, on ne constate pas de différences avant et après les traitements à l'arginine ou avec le placebo. Il persiste toujours des foyers inflammatoires. Certaines cellules ont des noyaux centronucléés, témoin d'une activité de régénération.

Pour rendre cette interprétation plus objective et précise, on a calculé un index pathologique chez trois groupes de chiens (chiens malades traités à la L-arginine, chiens malades traités avec un placebo, chiens malades qui ne reçoivent rien). Cet index pathologique a été défini par Childers et al. (21). Les chiens choisis sont indiqués en annexe.

On a étudié des biopsies musculaires à l'âge de 4 mois et 8 mois. Chaque coupe est composée de neuf photos. Dans le logiciel PHOTOSHOP, on a appliqué une grille sur chaque photo et on a noté à chaque intersection sur la grille si l'on voyait un événement pathologique ou un événement sain (Figure 17). Les événements pathologiques que l'on pouvait voir étaient des fibres hyalines ou hypercontractées, des fibres avec un sarcolemme vide, du tissu fibreux, des cellules centronucléées, des fibres en myophagocytose ou un infiltrat inflammatoire. On a ensuite réalisées une moyenne de ces événements pathologiques et sains dans chaque groupe. L'index pathologique est le rapport entre le nombre d'événements pathologiques et le nombre d'événements totaux.

La figure 17 montre l'index pathologique chez le chien GRMD à l'âge de 4 mois traité dès son dixième jour. Cet index est même plus élevé chez les chiens traités à la L-arginine. Quant à la figure 18, elle montre que l'index pathologique chez le chien GRMD à l'âge de 8 mois après 4 mois de traitement est même plus élevé que le chien GRMD sans aucun traitement. Il semble plus intéressant de suivre l'évolution de l'index pathologique (Figure 19).

Dans la population GRMD sans aucun traitement, on voit une diminution du nombre d'événements pathologiques au cours du temps. Les chiens GRMD qui reçoivent une injection ont un index pathologique plus élevé que ceux qui ne sont pas manipulés. Le fait de manipuler les chiens et le stress pourrait accentuer le phénomène de nécrose musculaire et ainsi augmenter le nombre d'événements pathologiques. L'index est stable chez les chiens GRMD qui reçoivent un placebo, l'index pathologique est légèrement inférieur chez les chiens traités à la L-arginine. L'évolution de l'index histopathologique chez le chien GRMD traité à la L-arginine est différente de celle du chien GRMD traité avec un placebo. Elle s'approche de l'évolution de l'index pathologique du chien GRMD non traité qui, elle, diminue. On pourrait ainsi imaginer un effet positif du traitement à l'arginine qui limiterait les effets néfastes de la manipulation des chiens.

## 5. Immunocytochimie

### 5.1. Utrophine (cf Planches 2, 3 et 4)

Avant traitement, après immunomarquage de l'utrophine, on remarque la présence d'utrophine au niveau des jonctions neuromusculaires chez les chiens sains (Planche 2) et sous le sarcolemme tout le long de la fibre musculaire chez tous les chiens GRMD (Planche 2).

Après traitement à la L-arginine, on constate une surexpression de l'utrophine chez le chien sain visible chez RICARD et PHOEBUS (Planche4). L'utrophine n'est en effet plus seulement localisé à la jonction neuromusculaire. Par contre, chez tous les chiens GRMD, on ne constate pas de différences avant et après le traitement à la L-arginine ou le placebo (Planche 3). On peut résumer ces résultats dans le tableau suivant en ne tenant compte que de la surexpression dans la fibre musculaire (de 0 à +++):

	Avant traitement	Après traitement à la L-arginine
Chiens sains	0	+
Chiens GRMD	+++	+++

On peut seulement émettre une réserve. En effet, chez le chien malade, il existe une surexpression « naturelle » de l'utrophine pour compenser l'absence de dystrophine. En immunomarquage, on met donc en évidence sous le sarcolemme l'utrophine qui est déjà surexprimée. Il est dès lors difficile de voir une différence avant et après traitement par cette méthode semi-quantitative.

### 5.2. Sarcoglycanes (cf Planches 5, 6 et 7 ; Tableaux 20 et 21)

Le marquage des sarcoglycanes qui sont des protéines associées à la dystrophine doit nous permettre de voir si la distribution membranaire des sarcoglycanes est elle aussi perturbée.

Chez les animaux sains (Phoebus et Ricard), la distribution membranaire des sarcoglycanes est homogène. Chez les animaux malades, la distribution des sarcoglycanes est perturbée car très hétérogène.

Chez le chien sain, la L-arginine ne modifie pas la distribution des sarcoglycanes (Planche 5). Après traitement à la L-arginine chez le chien malade, on ne constate pas de modification de la distribution des sarcoglycanes. Il n'y a par ailleurs aucune différence entre un traitement placebo et un traitement à la L-arginine (Planches 6 et 7).

## 6. Devenir de ces chiens

Les chiens de notre protocole ont été presque tous euthanasiés. RADON et RADIUM ont été euthanasiés le 30 novembre 2000. Leur état général s'était considérablement dégradé. PHOEBUS et RICARD ont été euthanasiés peu de temps après la fin du protocole. RIESLING a été euthanasié le 20 février 2001. ROTULE est décédé de bronchopneumonie le 6 juillet 2001. PHOSPHORE et REFLEXE ont été euthanasiés respectivement le 18 octobre 2001 et en décembre 2002. Seul PHYTON est encore vivant : il est devenu reproducteur dans un centre.

## 7. Bilan et critiques

Les résultats sont décevants cliniquement, voire histologiquement. Cependant, on peut émettre certaines réserves quant à notre protocole. Les doses d'arginine utilisées chez les chiens ne sont peut être pas suffisantes. On s'est en effet basé sur les études précédentes chez la souris pour fixer nos doses. Or, il existe beaucoup de différences entre les deux modèles d'un point de vue clinique et histologique. L'effectif limité (deux chiens sains, cinq chiens malades traités à la L-arginine et deux chiens malades traités avec du sérum physiologique) est aussi un handicap. On ne peut que se limiter qu'à une étude purement descriptive et non statistique de nos résultats.

De plus, la surexpression naturelle de l'utrophine chez les chiens malades nous empêche peut être de voir par l'immunohistochimie une surexpression de l'utrophine qui est bien présente. Il serait ainsi intéressant d'utiliser d'autres méthodes plus quantitatives que celles utilisées.

Enfin, il faut nous rappeler que nous travaillons dans une structure biologique. Il se peut également que la monoxyde d'azote synthase qui produit du NO à partir de la L-arginine soit saturée et donc que l'on ne puisse augmenter la surexpression d'utrophine malgré des doses plus importantes de L-arginine.





## CONCLUSION

L'administration de L-arginine chez des chiens sains entraîne une surexpression de l'utrophine. En revanche, chez les animaux malades, il n'a pas été mis en évidence de bénéfice tant sur le plan biochimique et surtout clinique. L'expression de l'utrophine surexprimée naturellement chez les chiens GRMD n'est cependant pas affectée par le traitement à la L-Arginine.

Il a été mis en évidence un bénéfice chez la souris mdx lors d'administration de L-arginine. Ces résultats que nous avons obtenus ne doivent pas être interprétés de la même manière chez le chien GRMD. En effet, le statut clinique des deux modèles est bien différent. La souris est moins atteinte que le chien.

Cependant, l'étude des index pathologiques est compatible avec un effet biologique positif de la L-arginine car il semblerait, en analysant plus précisément des paramètres objectifs de l'étude, que le traitement par la L-arginine compense les effets néfastes de la manipulation des animaux, comme en témoignent l'évolution des index pathologiques des chiens GRMD traités à la L-arginine, traités avec un placebo ou non traités. L'effet pourrait ainsi être proportionnel à la quantité d'utrophine présent dans la cellule.

Il serait alors intéressant d'administrer des doses d'arginine beaucoup plus importantes ou encore d'utiliser des donneurs de NO plus puissant que la L-arginine comme la molsidomine. Enfin, il apparaît nécessaire de développer des méthodes quantitatives d'évaluation du bénéfice thérapeutique de la L-arginine plus sensibles que celles utilisées dans notre étude.



## **BIBLIOGRAPHIE**



A

1. **Ahn A. H. , Kunkel L. M. (1993).** The structural and functional diversity of dystrophin. *Nat. Genet.* 3, 283-291.
2. **Andrade F. H. , Porter J. D. , Kaminski H. J. (2000).** Eye muscle sparing by the muscular dystrophies : lessons to be learned. *Microsc. Res. Techniq.* 48, 192-203.

B

3. **Balon T. W. , Nadler J. L. (1997).** Evidence that nitric oxide increases glucose transport in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 82, 359-363.
4. **Barnea E., Zuk D., Simantov R., Nudel U., Yaffe D. (1990).** Specificity of expression of the muscle and brain dystrophin gene promoters in muscle and brain cells. *Neuron* 5, 881-888.
5. **Blake D. J. , Schofield J. N. , Zuellig R. A. , Gorecki D. C. , Phelps S. R. , Barnard E. A. , Edwards Y. H. , Davies K. E. (1995).** G-utrophin, the autosomal homologue of dystrophin Dp116 is expressed in sensory ganglia and brain. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 3697-3701.
6. **Blake D. J. , Tinsley J. M. , Davies K. E. (1996).** Utrophin: a structural and functional comparison to dystrophin. *Brain Pathol.* 6, 37-47.
7. **Blake D. J. , Tinsley J. M. , davies K. E. , Knight A. E. , Winder S. J. , Kendrick-Jones J. (1995).** Coiled-coil regions in the carboxy-terminal domains of dystrophin and related proteins: potentials for protein-protein interactions. *Trends Biochem. Sci.* 20, 133-135.
8. **Bonilla E. , Samitt C. E. , Miranda A. F. , Hays A. P. , Salviati G. , Di Mauro S. , Kunkel L. M. , Hoffman E. P. , Rowland L. P.(1988).** Duchenne muscular dystrophy : deficiency of dystrophin at the muscle cell surface. *Cell* 54, 447-452.
9. **Boyce F. M., Beggs A. H., Feener C., Kunkel L. M. (1991).** Dystrophin is transcribed in brain from a distant upstream promoter. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 1276-1280.
10. **Brenman J. E. , Chao D. S. , Xia H. , Aldape K. , Brecht D. S. (1995).** Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 82, 743-752.
11. **Brenman J. E. , Brecht D. S. (1997).** Synaptic signaling by nitric oxide. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7, 374-378.
12. **Buckle V. J. , Guenet J. L. , Simonchazottes D. , Love D. R. , Davies K. E. (1990).** Localisation of a dystrophin-related autosomal gene to 6Q24 in man, and to mouse chromosome 10 in the region of the dystrophin muscularis (Dy) locus. *Hum. Genet.* 85, 324-326.

- 13. Byers T. J. , Kunkel L. M. , Watkins S. C. (1991).** The subcellular distribution of dystrophin in mouse skeletal, cardiac, and smooth muscle. *J. Cell Biol.* 115, 411-421.
- 14. Byers T. J., Lidov H. G. W., Kunkel L. M. (1993).** An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve. *Nat. Genet.* 4, 77-81.

## C

- 15. Campbell K. P. , Crosbie R. H. (1996).** Utrophin to the rescue. *Nature* 384, 308-309.
- 16. Campbell K. P. , Kahl S. D. (1989).** Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature* 328, 259-262.
- 17. Carlson C. G. (1998).** The dystrophinopathies: an alternative to the structural hypothesis. *Neurobiol. Dis.* 5, 3-15.
- 18. Chang W. J. , Iannaccone S. T. , Lau K. S. , Masters B. S. S. , McCabe T. J. , McMillan K. , Padre R. C. , Spencer M. J. , Tidball J. G. , Stull J. T. (1996).** Neuronal nitric oxide synthase and dystrophin-deficient muscular dystrophy. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 9142-9147.
- 19. Chaubourt E. (2000).** Thèse de doctorat: “L’axe neuromusculaire: accumulation de l’acétylcholinestérase à la synapse et utilisation de la surexpression de l’utrophine par la voie du monoxyde d’azote comme traitement potentiel des dystrophinopathies. » 101-109.
- 20. Chevron M. P. , Girard F. , Claustres M. , Demaille J. (1994).** Expression of recombinant dystrophin and its localization to the cell membrane. *Nature* 349, 334-336.
- 21. Childers M. K. , Okamura C. S. , Bogan D. J. et al (2001).** Myofiber injury and regeneration in a canine homologue of Duchenne muscular dystrophy. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.*, 80, 175-181.
- 22. Cleeter M. W. , Cooper J. M. , Darley-Usmar V. M. , Moncada S. , Scapira A. H. (1994).** Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett.* 345, 50-54.
- 23. Clerk A. , Morris G. E. , Dubowitz V. , Davies K. E. , Sewry C. A. (1993).** Dystrophin-related protein, utrophin, in normal and dystrophic human fetal skeletal muscle. *Histochem. J.* 25, 554-561.
- 24. Clerk A. , Strong P. N. , Sewry C; A. (1992).** Characterisation of dystrophin during development of human skeletal muscle. *Development* 114, 395-402.
- 25. Cullen M. J. , Walsh J. , Nicholson L. V. , Harris J. B. (1990).** Ultrastructural localization of dystrophin in human muscle by using gold immunolabelling. *P. Roy. Soc. Lond. B. Sci.* 240, 197-210.

**26. Culligan K. G. , Mackey A. J. , Finn D. M. , Maguire P. B. , Ohlendieck K. (1998).** Role of dystrophin isoforms and associated proteins in muscular dystrophy. *Int. J. Mol. Med.* 2, 639-648.

D

**27. Deconinck A. E. , Potter A. C. , Tinsley J. M. , Wood S. J. , Vater R. , Young C. , Metzinger L. , Vincent A. , Slater C. R. , Davies K. E. (1997).** Postsynaptic abnormalities at the neuromuscular junctions of utrophin-deficient mice. *J. Cell Biol.* 136, 883-984.

**28. Deconinck A. E. , Rafael J. A. , Skinner J. A. , Brown S. C. , Potter A. C. , Metzinger L. , Watt D. J. , Dickson J. G. , Tinsley J. M. , Davies K. E. (1997).** Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 90, 717-727.

**29. Deconinck A. E. , Tinsley J. , De Backer F. , Fisher R. , Kahn D. , Phelps S. , Davies K. E. , Gillis J-M. (1997).** Expression of truncated utrophin leads to major functional improvements in dystrophin-deficient muscles of mice. *Nat. Med.* 3, 1216-1221.

**30. Drapier J. C. , Hibbs J. B. (1996).** Aconitases : a class of metalloproteins highly sensitive to nitricoxide synthesis. *Method. Enzymol.* 269, 26-36.

F

**31. Fardeau M. , Tomé F. M. S. , Collin H. , Augier N. , Pons F. , Léger J. , Léger J. (1990).** Presence of a dystrophin-like protein at the neur

gene transfer mitigates the dystrophic phenotype of mdx mouse muscles. *Hum. Gene Ther.* 10, 1299-1310.

**37. Gilbert R. , Nalbantoglu J. , Tinsley J. M. , Massie B. , Davies K. E. , Karpati G. (1998).** Efficient utrophin expression following adenovirus gene transfer in dystrophic muscle. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 242, 244-247.

**38. Gilgenkrantz H., Hugnot J. P., Lambert M., Chafey P., Kaplan J. C., Kahn A., (1992).** Positive and negative regulatory DNA elements including a CCArGG box are involved in the cell type-specific expression of the human muscle dystrophin gene. *J. Biol. Chem.* 267, 10823-10830.

**39. Gorecki D. C., Monaco A. P., Derry J. M., Walker A. P., Barnard E. A., Barnard P. J. (1992).** Expression of four alternative dystrophin transcripts in brain regions regulated by different promoters. *Hum. Mol. Genet.* 1, 505-510.

**40. Gramolini A. O. , Jasmin B. J. (1999).** Expression of the utrophin gene during myogenic differentiation. *Nucleic Acids Res.* 27, 3603-3609.

**41. Gramolini A. O. , Karpati G. , Jasmin B. J. (1999).** Discordant expression of utrophin and its transcript in human and mouse skeletal muscles. *J. Neuropath. Exp. Neur.* 58, 235-244.

**42. Grozdanovic Z. , Christova T. , Gosztonyi G. , Mellerowicz H. , Blottner D. , Gossrau R. (1997).** Absence of nitric oxide synthase I despite the presence of the dystrophine complex in human striated muscle. *Histochem. J.* 29, 97-104.

**43. Gullino P. , Wintz M. , Birnbaum S. M. (1955).** The toxicity of individual essential amino acids and their diastereoisomers in rats and the effect on blood sugar levels. *Arch. Biochem. Biophys.* 58, 253-255.

H

**44. Hammonds R. J. (1987).** Protein sequence of DMD gene is related to actin-binding domain of alpha-actinin. *Cell* 51,1.

**45. Haycock J. W. , Macneil S. , Jones P. , Harris J. B. , Mantle D. (1996).** Oxidative damage to muscle protein in Duchenne muscular dystrophy. *Neuroreport* 8, 357-361.

**46. Haycock J. W. , Macneim S. , Mantle D. (1998).** Differential protein oxidation in Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neuroreport* 9, 2201-2207.

**47. Helliwell T. R. , Ellis J. M. , Mountford R. C. , Appleton R. E. , Morris G. E. (1992).** A truncated dystrophin lacking the C-terminal domains is localized at the muscle membrane. *ZAM. J. Genet.* 50, 508-514.

**48. Helliwell T. R. , Nguyen T. M. , Morris G. E. , Davies K. E. (1992).** The dystrophin-related protein, utrophin, is expressed on the sarcolemma of regenerating human skeletal fibres in dystrophies and inflammatory myopathies. *Neuromuscular Disord.* 2, 177-184.



**49. Hobbs A. J. , Higgs A. , Moncada S. (1999).** Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 191-220.

**50. Hoffman E. P. , Fishbeck K. H. , Brown R. H. , Johnson M. , Medori R. , Loike J. D. , Harris J. B. , Waterston R. , Brooke M. , Specht L. et al. (1988).** Characterisation of dystrophin in muscle-biopsy specimens from patients with Duchenne's or Becker's muscular dystrophy. *New Engl. J. Med.* 318, 1363-1368.

**51. Hoffman E. P. , Hudecki M. S. , Rosenberg P. A. , Pollina C. M. , Kunkel L. M. (1988).** Cell and fiber-type distribution of dystrophin. *Neuron* 1, 411-420.

J

**52. Jung D. , Yang B. , Meyer J. , Chamberlain J. S. , Campbell K. (1995).** Identification and characterization of the dystrophin anchoring site on  $\beta$ -dystroglycan. *J. Biol. Chem.* 270, 27305-27310.

K

**53. Kapur S. , Bedard S. , Marcotte B. , Cote C. H. , Marette A. (1997).** Expression of nitric oxide synthase in skeletal muscle: a novel role for nitric oxide as a modulator of insulin action. *Diabetes* 46, 1691-1700.

**54. Karpati G. , Carpenter S. , Morris G. E. , Davies K. E. , Guerin C. , Holland P. (1993).** Localization and quantification of the chromosome 6-encoded dystrophin-related protein in normal and pathological human muscle. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 52, 119-128.

**55. Khurana T. S. , Hoffman E. P. , Kunkel L. M. (1990).** Identification of a chromosome 6-encoded dystrophin-related protein. *J. Biol. Chem.* 265, 16717-16720.

**56. Khurana T. S. , Watkins S. C. , Chafey P. , Chelly J. , Tomé F. M. , Fardeau M. , Kaplan J. C. , Kunkel L. M. (1991).** Immunolocalization and developmental expression of dystrophin related protein in skeletal muscle. *Neuromuscular Disord.* 1, 185-194.

**57. Khurana T. S. , Watkins S. C. , Kunkel L. M. (1992).** The subcellular distribution of chromosome 6-encoded dystrophin-related protein in the brain. *J. Cell. Biol.* 119, 357-366.

**58. Kobzik L. , Reid M. B. , Bredt D. S. , Stamler J. S. (1994).** Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature* 372, 546-548.

**59. Koenig M. , Monaco A. P. , Kunkel L. M. (1988).** The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 53, 219-228.

**60. Koh T. J. , Tidball J. G. (1999).** Nitric oxide synthase inhibitors reduce sarcomere addition in rat skeletal muscle. *J. Physiol.* 519, 189-196.

**61. Kornegay J. N. , Tuler S. M. , Miller D. M. , Levesque D. C. (1988).** Muscular dystrophy in a litter of Golden Retriever dogs. *Muscle nerve* 11, 1056-1064.

- 62. Kramarcy N. R. , Vidal A. , Froehner S. C. , Sealock R. (1994).** Association of utrophin and multiple dystrophin short forms with the mammalian Mr 58,000 dystrophin-associated proteins (syntrophin). *J. Biol. Chem.* 269, 2870-2876.
- 63. Kusner L. L. , Kaminski H. J. (1996).** Heme oxygenase-2 expression at rat neuromuscular junctions. *Neurosci. Lett.* 273, 143-146.
- 64. Kuznetsov A. V. , Winkler K. , Wiedermann F. R. , Von Bossanyi P. , Dietzmann K. , Kunz W. S. (1998).** Impaired mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle of the dystrophin-deficient mdx mouse. *Mol. Cell. Biochem.* 183, 87-96.

## L

- 65. Lederfein D., Yaffe D., Nudel U. (1993).** A housekeeping type promoter, located in the 3' region of the Duchenne muscular dystrophy gene, controls the expression of Dp71, a major product of the gene. *Hum. Mol. Genet.* 2, 1883-1888.
- 66. Lee K. H. , Baek M. Y. Moon K. Y. , Song W. K. , Chung C. H. , Ha D. B. , Kang M. S. (1994).** Nitric oxide as a messenger molecule for myoblast fusion. *J. Biol. Chem.* 269, 14371-14374.
- 67. Lemaire G. , Alvarez-Pachon F. J. , Beuneu C. , Lepoivre M. , Petit J. F. (1999).** Differential cytostatic effects of NO donors and NO producing cells. *Free Rad. Biol. Med.* 26, 1274-1283.
- 68. Lidov H. G. W. , Byers T. J. , Watkins S. C. , Kunkel L. M. (1990).** Localization of dystrophin to postsynaptic regions of central nervous system cortical neurons. *Nature* 348, 725-728.
- 69. Lidov H. G. W., Selig S., Kunkel L. M. (1995).** Dp140: a novel 140 kDa CNS transcript from the dystrophin locus. *Hum. Mol. Genet.* 4, 329-335.
- 70. Lin S. , Burgunder J. (2000).** Utrophin may be a precursor of dystrophin during skeletal muscle development. *Brain Res. , Dev. Brain Res.* 119, 289-295.
- 71. Love D. R. , Byth B. C. , Tinsley J. M. , Blake D. J. , Davies K. E. (1993).** Dystrophin and dystrophin-related proteins : a review of protein and RNA studies. *Neuromuscular Disord.* 3, 5-21.
- 72. Love D. R., Hill D. F., Dickson G., Spurr N. K., Byth B. C., Marsden R. F., Bloomfield J. R., Edwards Y. H., Davies K. E. (1989).** An autosomal transcript in skeletal muscle with homology to dystrophin. *Nature* 339, 55-58.
- 73. Love D. R. , Morris G. E. , Ellis J. M. , Fairbrother U. , Marsden R. F. , Bloomfield J. R. , Edwards Y. H. , Slater C. P. , Parry D. J. , Davies K. E. (1991).** Tissue distribution of the dystrophin-related gene product and expression in the mdx and dy mouse. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3243-3247.

**74. Lumeng C. N. , Phelps S. , Rafael J. A. , Cox G. A. , Hutchinson T. L. , Begy C. R. , Adkins E. , Wiltshire R., Chamberlain J. S. (1999).** Characterization of dystrophin and utrophin diversity in the mouse. *Hum. Mol. Genet.* 8, 593-599.

## M

**75. Maréchal G. , Gailly P. (1999).** Effects of nitric oxide on the contraction of skeletal-muscle-based gene therapy. *Curr. Opin. Genet.* 8, 360-365.

**76. Matsumura K. , Ervasti J. M. , Ohlendieck K. , Kahl S. , Campbell K. P. (1992).** Association of dystrophin-related protein with dystrophin-associated proteins in mdx mouse muscle. *Nature* 360, 588-591.

**77. Matsumura K. , Yamada H. , Shimizu T. , Campbell K. P. (1993).** Differential expression of dystrophin, utrophin and dystrophin-associated proteins in peripheral nerve. *FEBS Lett.* 334, 281-285.

**78. Melone M. A. B. , Peluso G. , Petillo O. , Galderisi U. , Cotrufo R. (2000).** Defective growth in vitro of Duchenne muscular dystrophy myoblasts : the molecular and biochemical basis. *J. Cell Biochem.* 76, 118-132.

**79. Miike T. , Miyatake M. , Zhao J. , Yoshioka K. , Uchio M. (1989).** Immunohistochemical dystrophin reaction in synaptic regions. *Brain Dev.* 11, 344-346.

**80. Minetti C. , Ricci E. , Bonilla E. (1991).** Progressive depletion of fast alpha-actinin-positive muscle fibers in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 41, 1977-1981.

**81. Mizuno Y. , Nonaka I. , Hirai S. , Ozawa E. (1993).** Reciprocal expression of utrophin (dystrophin-related protein) and dystrophin-associated glycoproteins in muscles from patients with Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 17, 206-216.

**82. Monaco A. P. , Neve R. L. , Colletti-Feener C. , Bertelson C. J. , Kurnit D. M. , Kunkel L. M. (1986).** Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature* 323, 646, 650.

## N

**83. Nakane M. , Schmidt H. W. , Pollock J. S. , Förstermann U. , Murad F. (1993).** Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett.* 316, 175-180.

**84. Nguyen T. M. , Ellis J. M. , Love D. R. , Davies K. E. , Gatter K. C. , Dickson G. , Morris G. E. (1991).** Localization of the DMDL gene-encoded dystrophin-related protein using a panel of nineteen monoclonal antibodies: presence at neuromuscular junctions, in the sarcolemma of dystrophic skeletal muscle, in vascular and other smooth muscles, and in proliferating brain cell lines. *J. Cell Biol.* 115, 1695-1700.

**85. Nguyen T. M. , Ellis J. M. , Ginjaar I. B. , Van Paassen M. M. B. , Van Ommen G. J. B. , Moorman A. F. M. , Cartwright A. J. , Morris G. E. (1992).** Monoclonal antibody evidence for structural similarities between the central rod regions of actinin and dystrophin. *FEBS Let.* 272, 109-112.

**86. Nishio H. , Takeshima Y. , Narita N. , Yanagawa H. , Suzuki Y. , Ishikawa Y. , Minami R. , Nakamura H. , Matsuo M. (1994).** Identification of a novel first exon in the human dystrophin gene and a new promoter located more than 500kb upstream of the nearest known promoter. *J. Clin. Invest.* 94, 1037-1042.

O

**87. Ohlendieck K. , Ervasti J. M. , Matsumara K. , Kahl S. D. , Leveille C. J. , Campbell K. P. (1991).** Dystrophin-related protein is localized to neuromuscular junctions of adult skeletal muscle. *Neuron* 7, 499-508.

**88. Ohlendieck K. , Ervasti J. M. , Snook J. B. , Campbell K. P. (1991).** Dystrophin-glycoprotein complex is highly enriched in isolated skeletal muscle sarcolemma. *J. Cell Biol.* 112, 135-148.

**89. Oyanagi K. , Nakamura K. , Sogawa H. , Tsukazaki H. , Minami R. , Nakao T. (1980).** A study of urea-synthesizing enzymes in prenatal and postnatal human liver. *Pediatr. Res.* 14, 236-241.

P

**90. Partridge T. A. , Morgan J. E. , Pagel C. N. , Coleman M. , Watt D. J. (1982).** Prospects for cell transplantation and gene therapy in inherited myopathies. *Neuromuscular Dev. Dis.* Raven Press, Ltd. , New York, 351-359.

**91. Pearce M. , Blake D. J. , Tinsley J. M. , Byth B. C. , Campbell L. , Monaco A. P. , Davies K. E. (1993).** The utrophin and dystrophin genes of developing adult and mutant mice. *J. Cell Biol.* 139, 1507-1521.

**92. Pillers D. A. M., Bulman D. E., Weleber R. G., Sigesmund D. A., Musarella M. A., Powell B. R., Murphey W. H., Westall C., Pantou C., Becker L. E., Worton R. G., Ray P. N. (1993).** Dystrophin expression in the retina is required for normal function as defined by electroretinography. *Nat. Genet.* 4, 82-86.

**93. Prele A. , Chianese L. , Moggio M. , Gallanti A. , Sciacco M. , Checarelli N. , Comi G. , Scarpini E. , Bonilla E. , Scarlato G. (1991).** Appearance and localization of dystrophin in normal human fetal muscle. *Int. J. Dev. Neurosci.* 9, 607-612.

## R

- 94. Reiser P. J. , Kline W. O. , Vighy P. L. (1997).** Induction of neuronal type nitric oxide synthase in skeletal muscle by chronic electrical stimulation in vivo. *J. Appl. Physiol.* 82, 1250-1255.
- 95. Rentschler S. , Linn H. , Deininger K. , Bedford M. T. , Espanel X. , Sudol M. (1999).** The WW domain of dystrophin requires EF-hands region to interact with beta-dystroglycan. *Biol. Chem.* 380, 431-442.
- 96. Rivier F. , Robert A. , Hugon G. , Mornet D. (1997).** Different utrophin and dystrophin properties related to their vascular smooth muscle distributions. *FEBS Lett.* 408, 94-98.

## S

- 97. Schatzberg S. J. , Anderson L. V. B. , Wilton S. D. , Kornegay J. N. , Mann C. J. , Solomon G. G. , Sharp N. J. H. (1998).** Alternative dystrophin gene transcripts in golden retriever muscular dystrophy. *Muscle nerve* 21, 991-998.
- 98. Schofield J. N., Blake D. J., Simmons C., Morris G. E., Tinsley J. M., Davies K. E., Edwards Y. H. (1994).** Apo-dystrophin-1 and apo-dystrophin-2, products of the Duchenne muscular dystrophy locus: expression during mouse embryogenesis and in cultured cell lines. *Hum. Mol. Genet.* 3, 1309-1316.
- 99. Sealock R. , Butler M. H. , Kramarcy N. R. , Gao K. X. , Murnane A. A. , Douville K. , Froehner S. C. (1991).** Localization of dystrophin relative to acetylcholine receptor domains in electric tissue and adult and cultured skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 113, 1133-1144.
- 100. Sharp N. J. , Kornegay J. N. , Van Camp S. D. , Herbstreith M. H. Secore S. L. , Kettle S. , Hung W. Y. , Constantinou C. D. , Dyskstra M. J. , Roses A. D. , et al. (1992).** An error in dystrophin mRNA processing in golden retriever muscular dystrophy, an animal homologue of Duchenne muscular dystrophy. *Genomics* 13, 115-121.
- 101. Small E. , Ettinger S J (1995).** Textbook of veterinary internal medicine. Diseases of the dog and cat. 684-690.

## T

- 102. Tanaka H. , Ishiguro T. , Eguchi C. , Saito K. , Ozawa E. (1991).** Expression of a dystrophin-related protein associated with the skeletal muscle cell membrane. *Histochemistry.* 96, 1-5.
- 103. Thomas G. D. , Sander M. , Lau K. S. , Huang P. L. , Stull J. T. , Victor R. G. (1998).** Impaired metabolic modulation of  $\alpha$ -adrenergic vasoconstriction in dystrophin-deficient skeletal muscle. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 15090-15095.

**104. Tidball J. G. , Lavergne E. , Lau K. S. , Spencer M. J. , Stull J. T. , Wehling M. (1998).** Mechanical loading regulates NOS expression and activity in developing and adult skeletal muscle. *AM. J. Physiol.* 275, C260-261.

**105. Tinsley J. M. , Davies K. E. (1996).** Utrophin : a potential replacement for dystrophin. *Neuromuscular Disord.* 3, 537-539.

**106. Tommasi di Vignano A. , Di Zenzo G. , Sudol M. , Cesareni G. , Dente L. (2000).** Contribution of the different modules in the utrophin carboxy-terminal region to the formation and regulation of the DAP complex. *FEBS Lett.* 471, 229-234.

**107. Torres L. F. B. , Duchen L. W. (1987).** The mutant mdx : inherited myopathy in the mouse. *Brain* 110, 269-299.

## U

**108. Uchino M. , Araki S. , Miike T. , Teramoto H ; , Nakamura T. , Yasutake T. (1989).** Localization and characterization of dystrophin in muscle biopsy specimens from Duchenne muscular dystrophy and various neuromuscular disorders. *Muscle Nerve* 12, 1009-1016.

## V

**109. Valentine B. A. , Cooper B. J. , Cummings J. F. , De Lahunta A. (1986).** Progressive muscular dystrophy in a golden retriever dog: light microscope and ultrastructural features at 4 and 8 months. *Acta Neuropathol.* 71, 301-310.

**110. Valentine B. A. , Blue J. T. , Shelley S. M. , Cooper B. J. (1990).** Increased serum alanine aminotransferase activity associated with muscle necrosis in the dog. *Journal of Veterinary Internal Medicine* vol.4, 140-143.

## W

**111. Wakayama Y. , Inoue M. , Murahashi M. , Shibuya S. , Jimi T. , Kojima H. , Oniki H. (1997).** Ultrastructural localization of alpha 1-syntrophin and neuronal nitric oxide synthase in noormal skeletal myofiber, and their relation to each other and to dystrophin. *Acta Neuropathol.* 94, 455-464.

**112. Wang T. , Xie Z. , Lu B. (1995).** Nitric oxide mediates activity-dependent synaptic suppression at developing neuromuscular synapses. *Nature* 374, 262-266.

**113. Webster C. , Silberstein L. , Hays A. P. , Blau H. M. (1988).** Fast muscle fibers are preferentially affected in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 52, 502-513.

**114. Wessels A. , Ginjaar I. B. , Moorman A. F. M. , van Ommen G. J. B. (1991).** Different localisation of dystrophin in developing and adult human skeletal muscle. *Muscle nerve* 14, 771-774.

**115. Wilson J., Putt W., Jimenez C., Edwards Y. H. (1999).** Up71 and up140, two novel transcripts of utrophin that are homologues of short forms of dystrophin. *Hum. Mol. Genet.* 8, 1271-1278.

**116. Winck D. A. , Hanbauer I. , Krishna M. C. , DeGraff W. , Gamson J. , Mitchell J. B. (1993).** Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species. *P. Natl. Acad. Sci.* 90, 9813-9817.

**117. Winder S. J. (1997).** The membrane-cytoskeleton interface: the role of dystrophin and utrophin. *J. Muscle Res. Cell M.* 18, 617-629.

**118. Winder S. J. , Gibson T. J. , Kendrick-Jones J. (1995)a.** Dystrophin and utrophin : the missing links! *FEBS Lett.* 369, 27-33.

**119. Winder S. J. , Hemmings L. , Maciver S. K. , Bolton S. J. , Tinsley J. M. , Davies K. E. , Critchley D. R. , Kendrick-Jones J. (1995)b.** Utrophin actin binding domain: analysis of actin binding and cellular targeting. *J. Cell Sci.* 108, 63-71.

**120. Winder S. J. , Kendrick-Jones J. (1995).** Calcium/calmoduline-dependent regulation of the NH<sub>2</sub>-terminal F-actin binding domain of utrophin. *FEBS Lett.* 357, 125-128.

**121. Wu G. , Morris S. M. (1998).** Arginine metabolism : nitric oxide and beyond. *Biochem. J.* 336, 1-17.

Y

**122. Yang C. C. , Alvarez R. B. , Engel W. K. , Haun C. K. , Askanas V. (1997).** Immunolocalization of nitric oxide synthases at the postsynaptic domain of human and rat neuromuscular junctions-Light and electron microscopic studies. *Exp. Neurol.* 148, 34-44.

**123. Yun H. Y. , Dawson V. L. , Dawson T. M. (1996).** Neurobiology of nitric oxide. *Crit. Rev. Neurobiol.* 10, 291-316.

Z

**124. Zuellig R. A., Bornhauser B. C., Knuesel I., Heller F., Fritschy J. M., Schaub M. C. (2000).** Identification and characterisation of transcript and protein of a new short N-terminal utrophin isoform. *J. Cell. Biocem.* 77, 418-431.



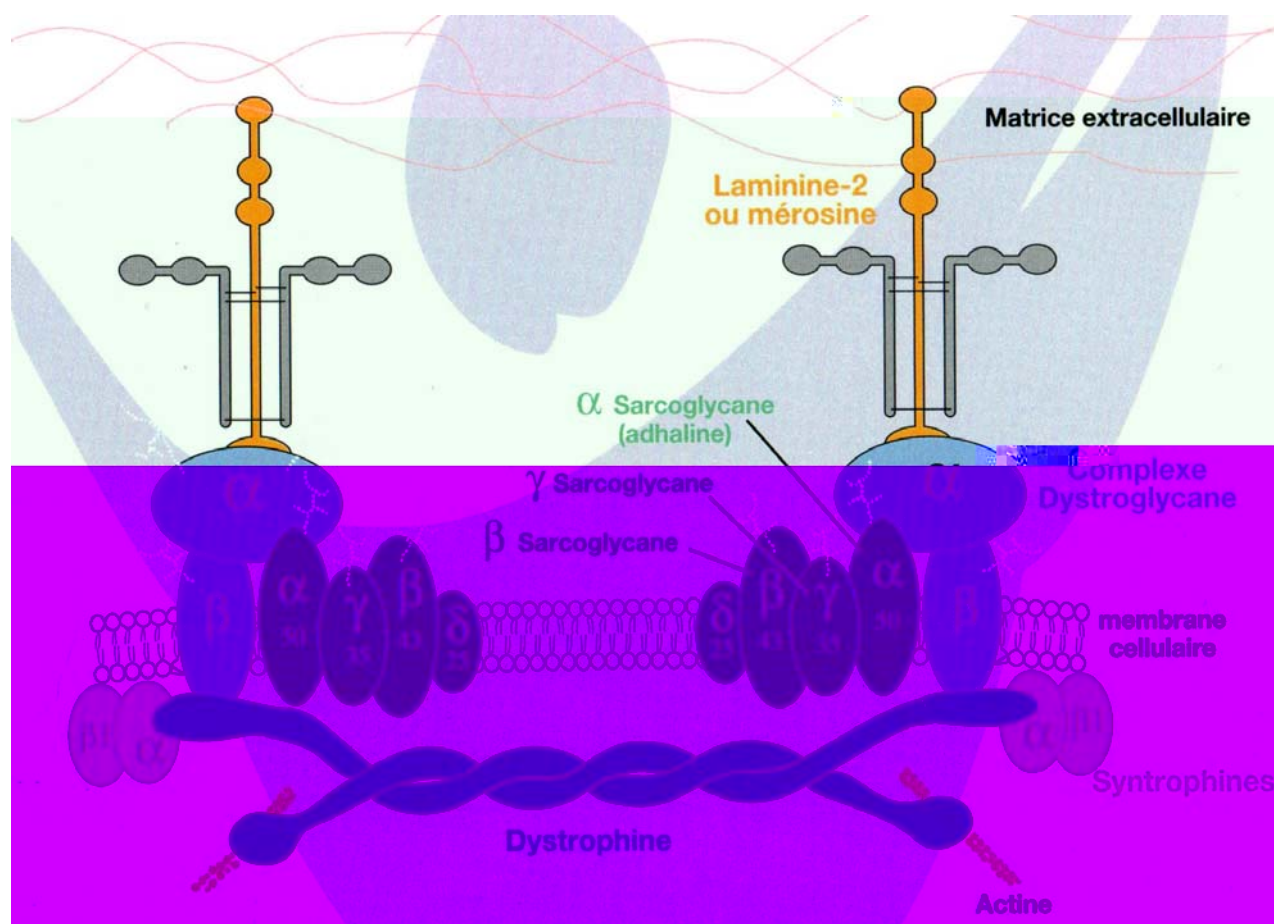


**ANNEXE 1**

**FIGURES**



Figure 1 :Schéma de la dystrophine



Source :AFM Association Française contre la Myopathie

## Figure 2 : Les domaines de la dystrophine et de l'utrophine

(ABS : sites principaux de liaison de l'actine ; CAM : site de liaison de la calcium calmoduline ; WW : domaine WW ; Ca : motif EF de liaison du calcium ; Cys : domaine riche en cystéine ; H1 et H2 : hélices H1 et H2 ; \* : position relative des séquences répétées n°15 et 19 absente dans la séquence de l'utrophine) Winder et al., 1995.

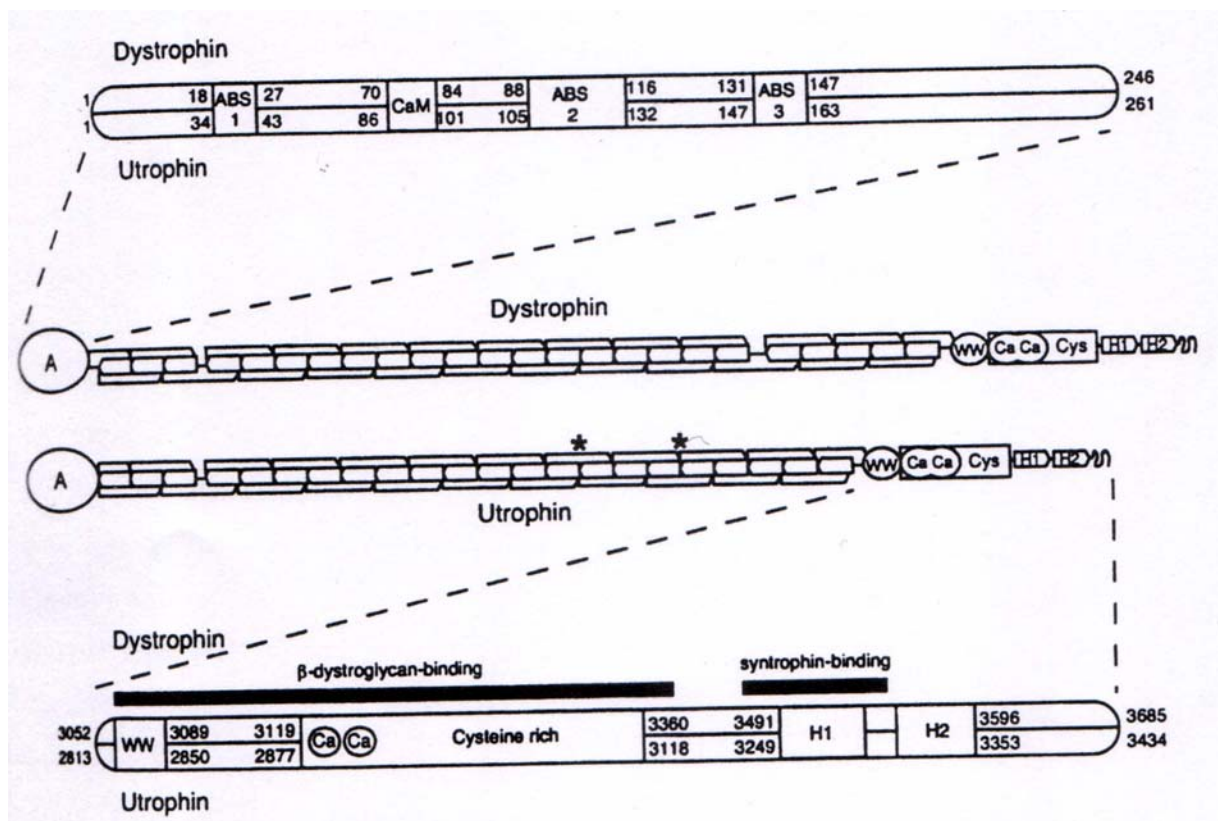
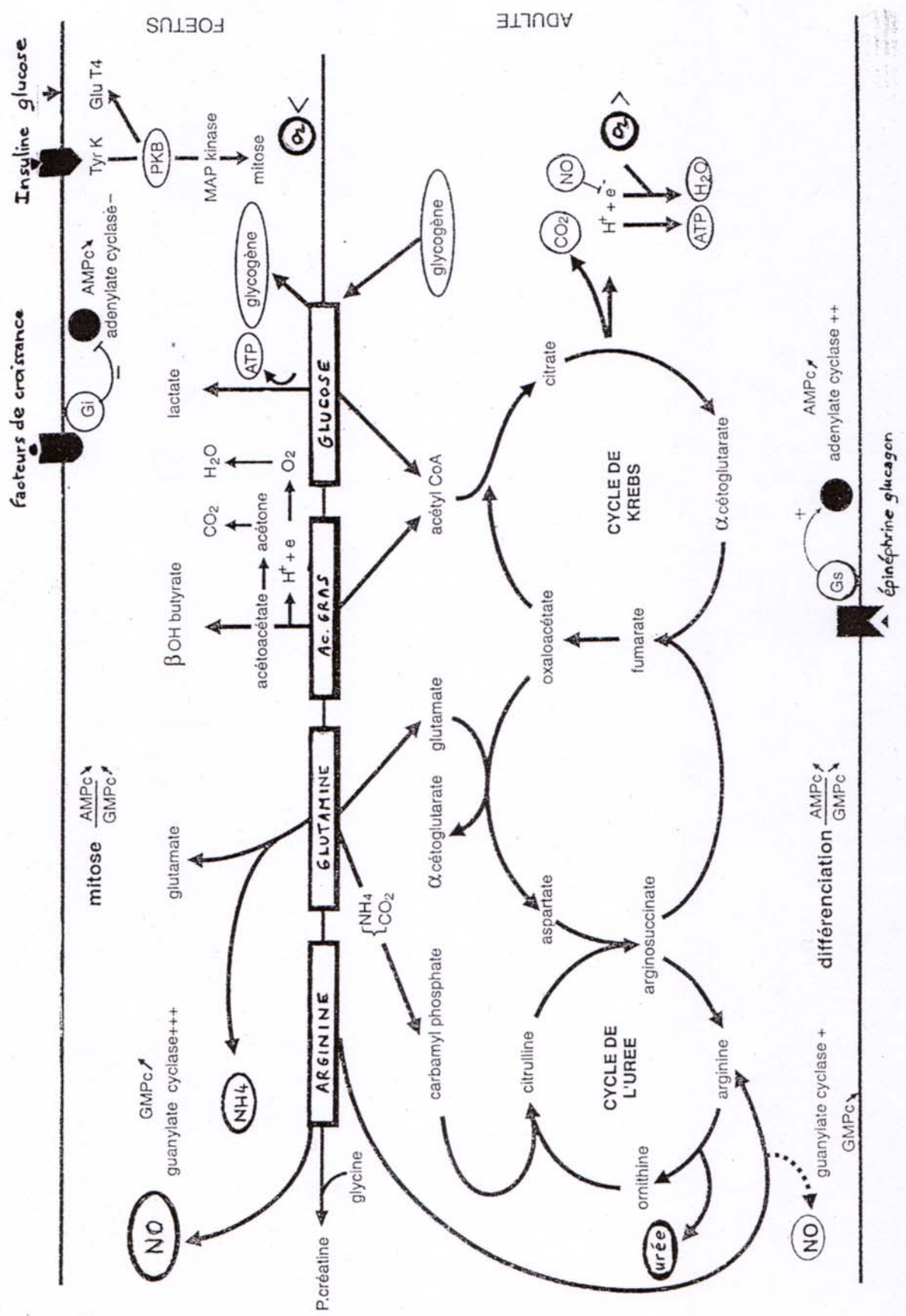


Figure 3 : Métabolisme de la L-Arginine



## Figure 4 : Traitement à la L-Arginine

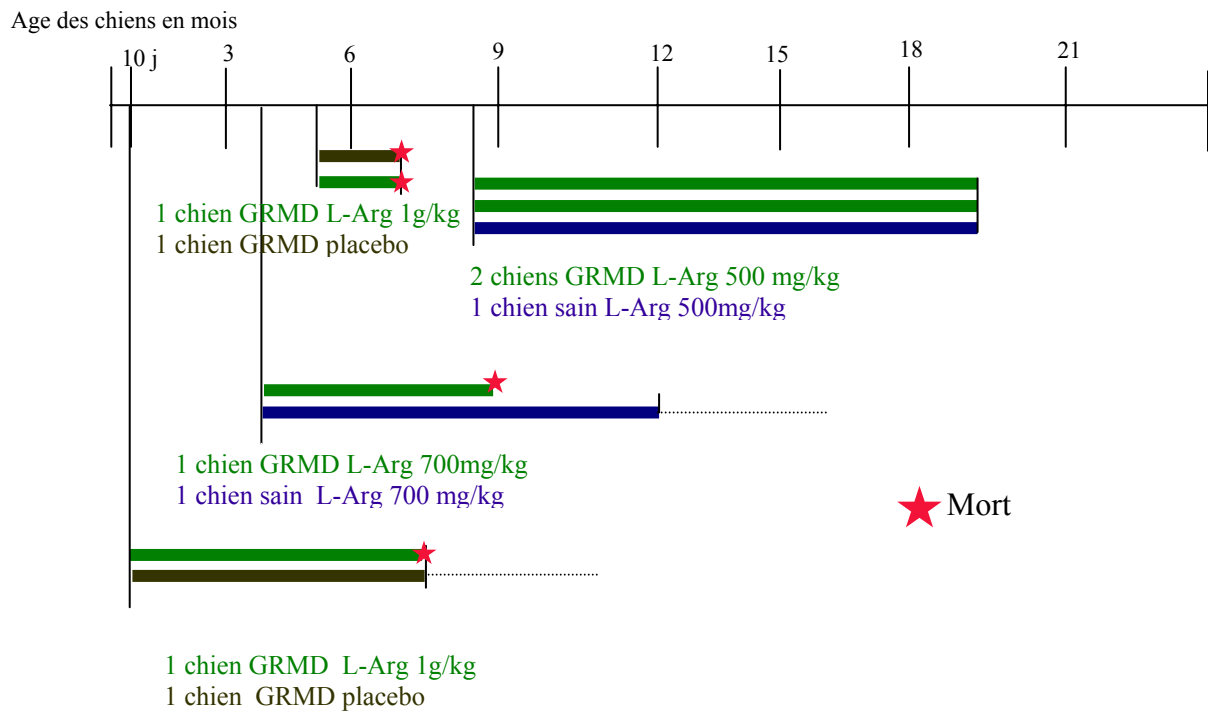


Figure 5: Evolution de l'état clinique des chiens malades qu'ils soient traités ou non

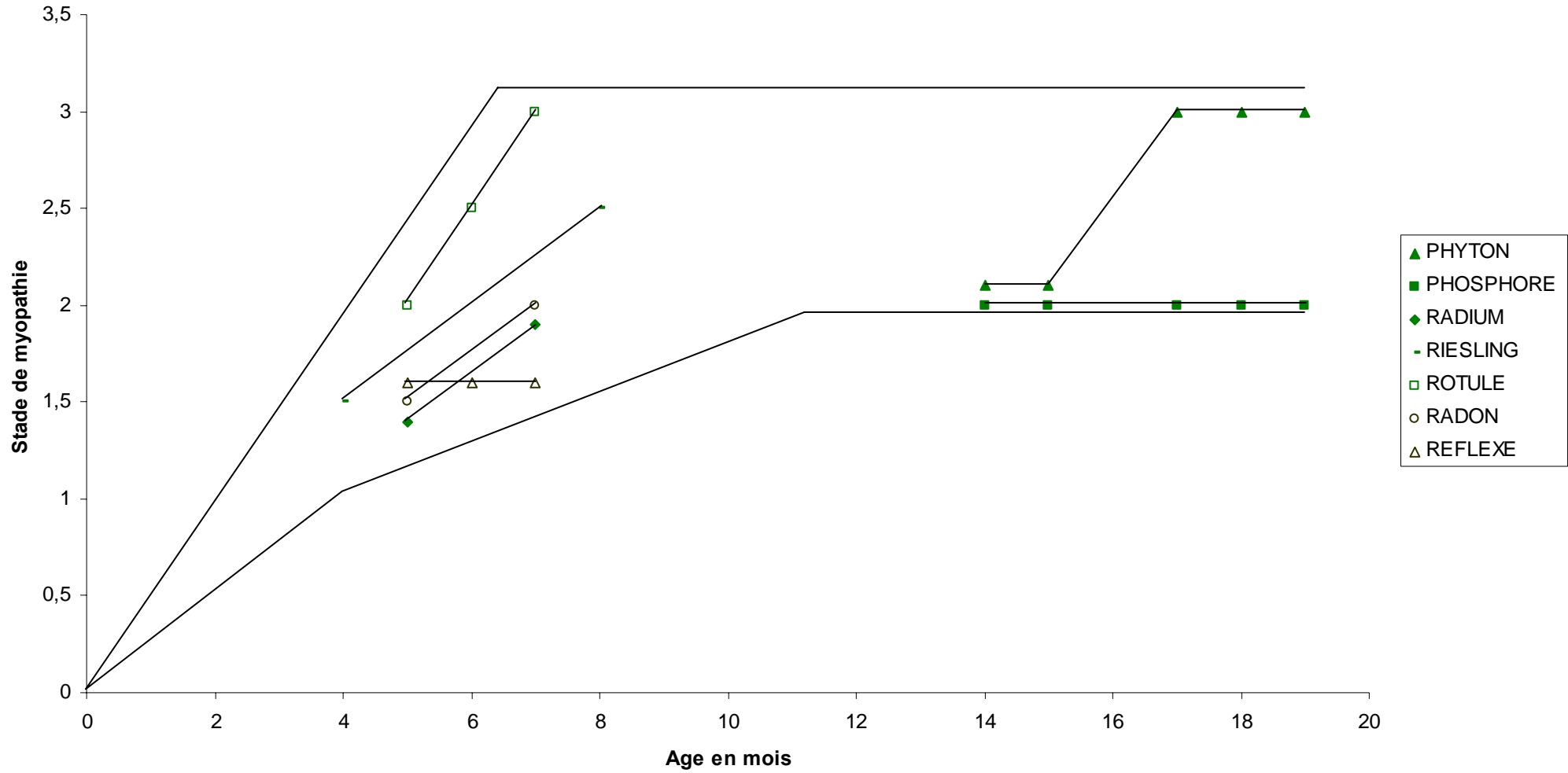


Figure 6 : Pressions Artérielles Moyennes dans les trois groupes de chiens

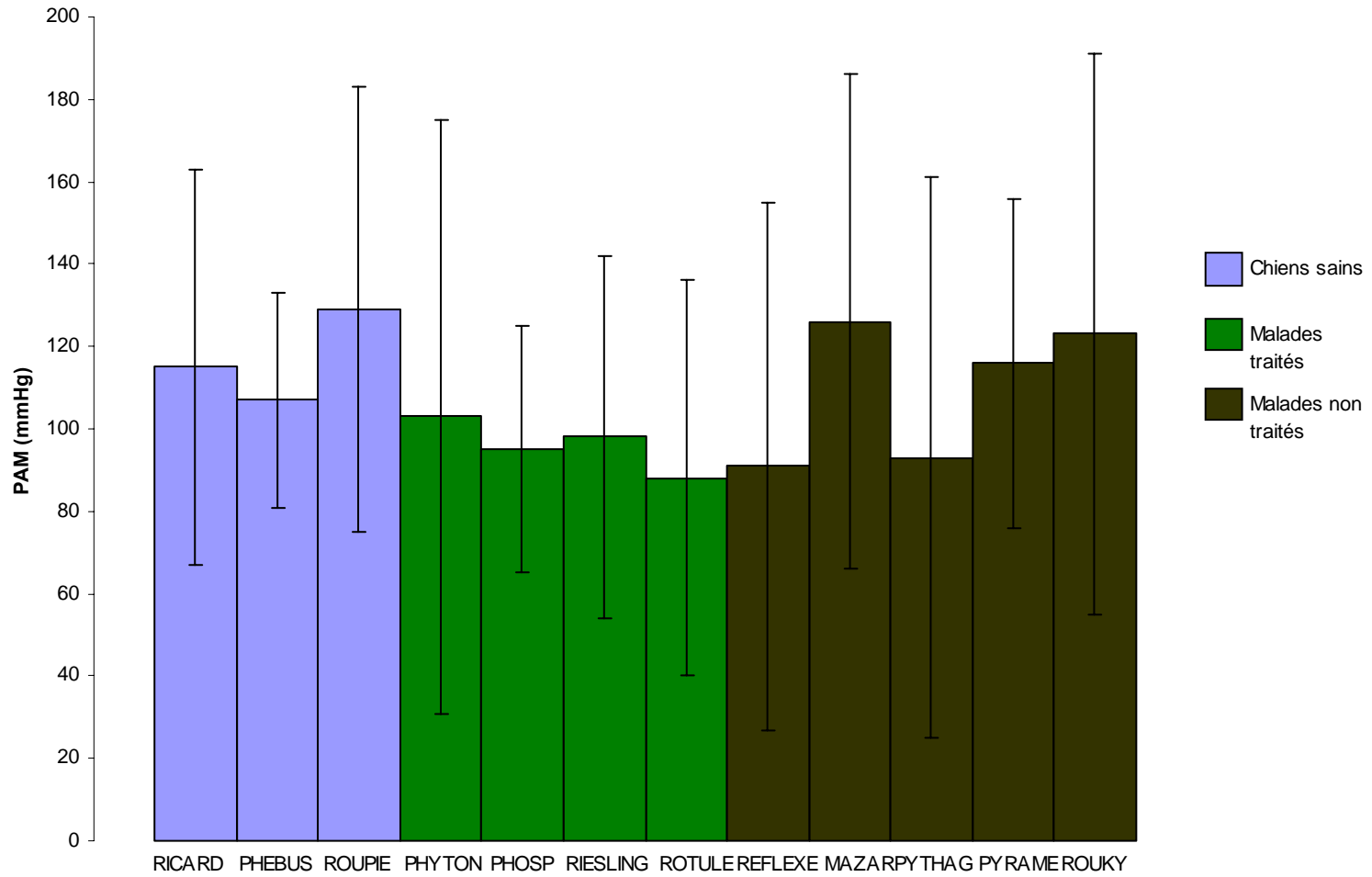




Figure 7: Pressions systoliques dans les trois groupes de chiens

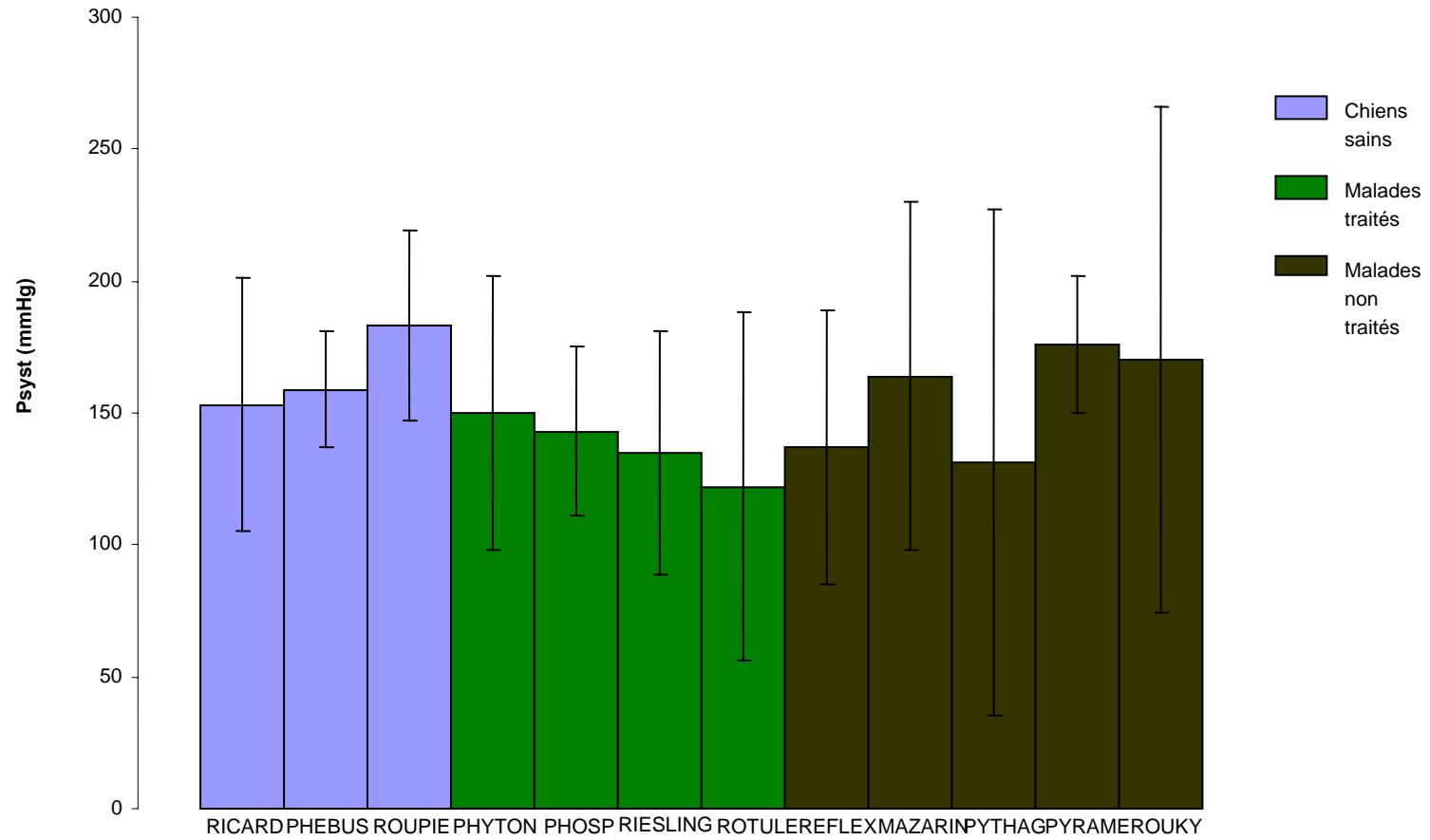


Figure 8 : Pressions diastoliques dans les trois groupes de chiens

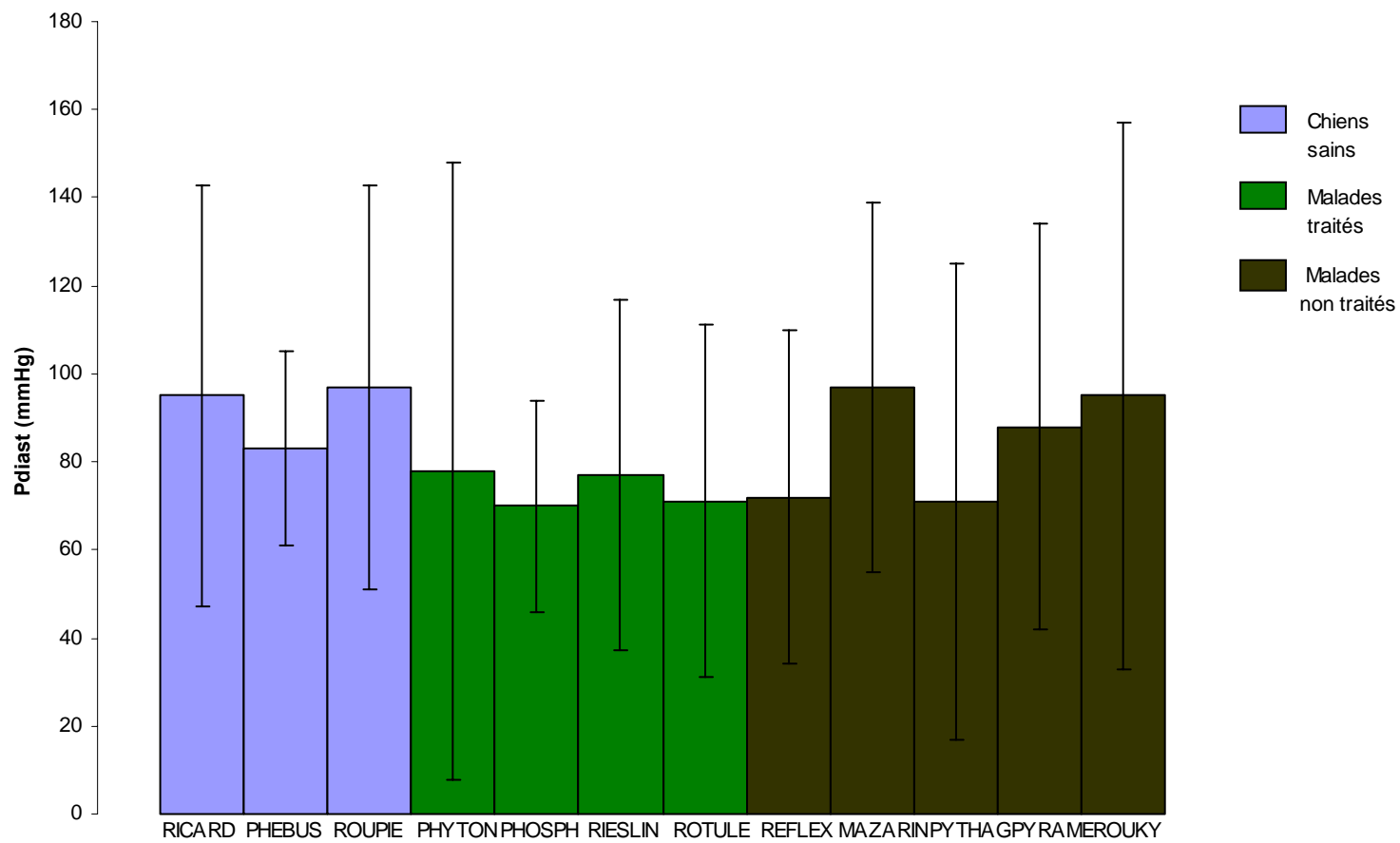
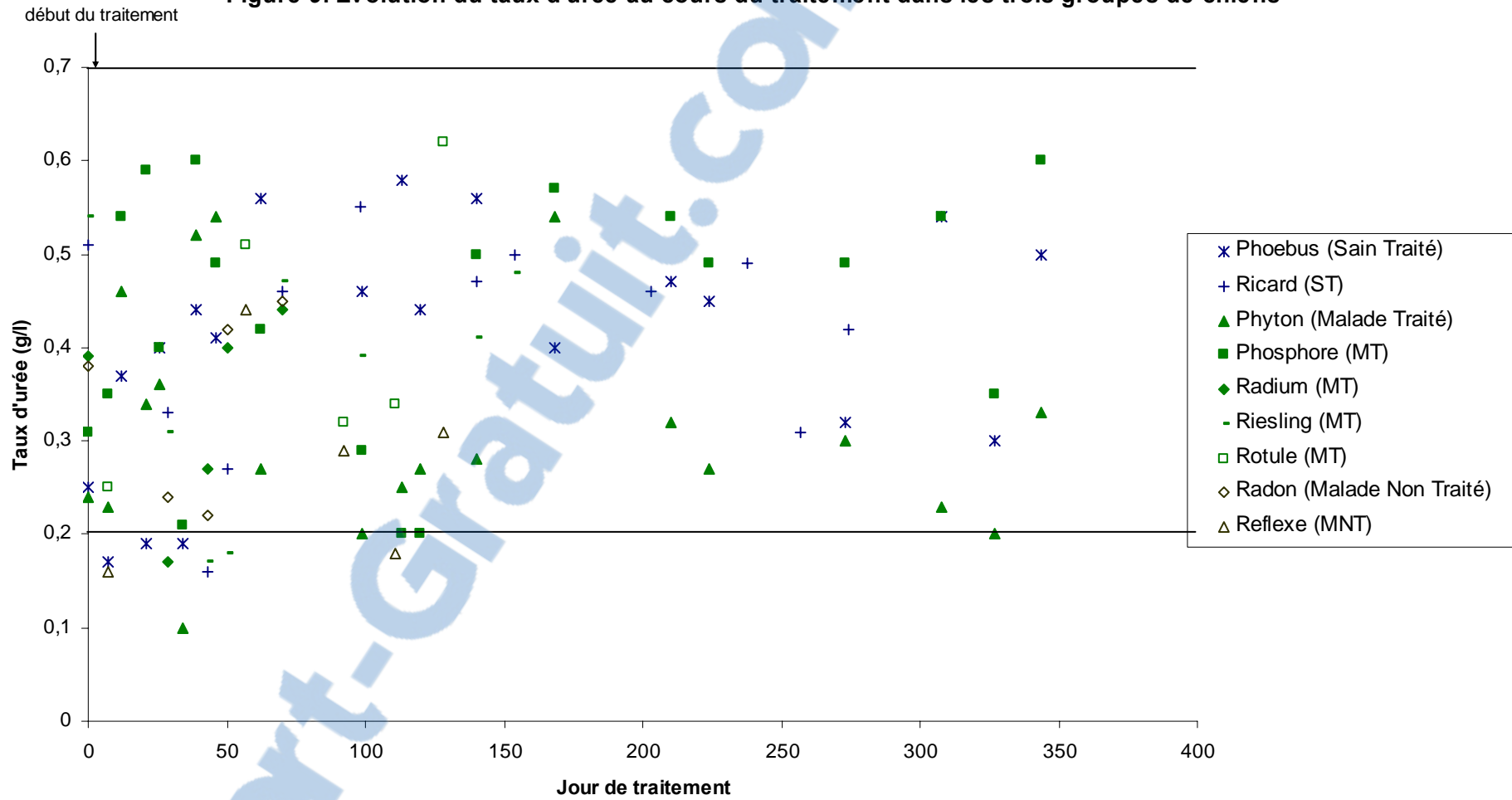
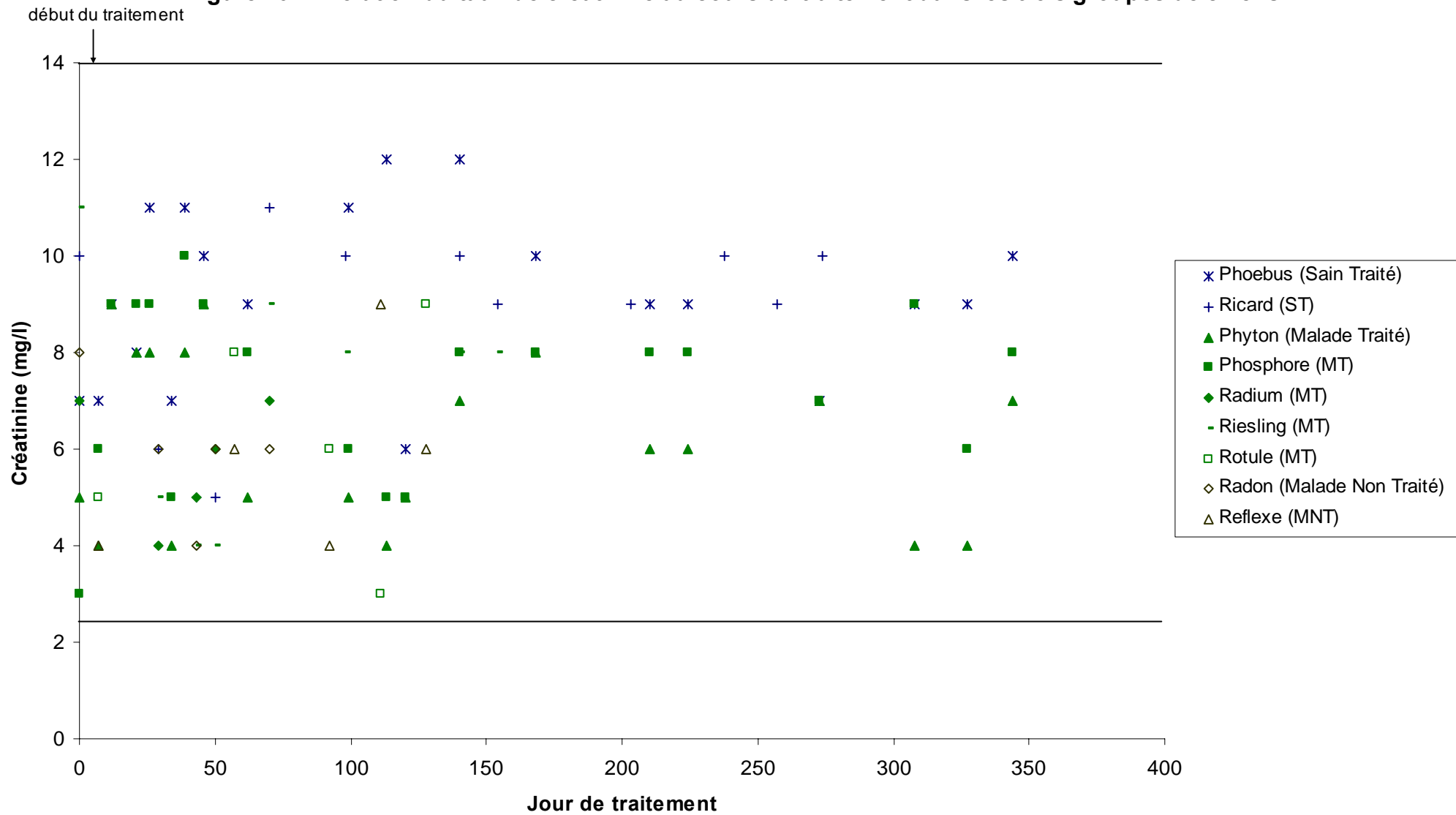


Figure 9: Evolution du taux d'urée au cours du traitement dans les trois groupes de chiens



**Figure 10 : Evolution du taux de créatinine au cours du traitement dans les trois groupes de chiens**



**Figure 11 : Evolution du taux de créatine kinase au cours du traitement dans les trois groupes de chiens**

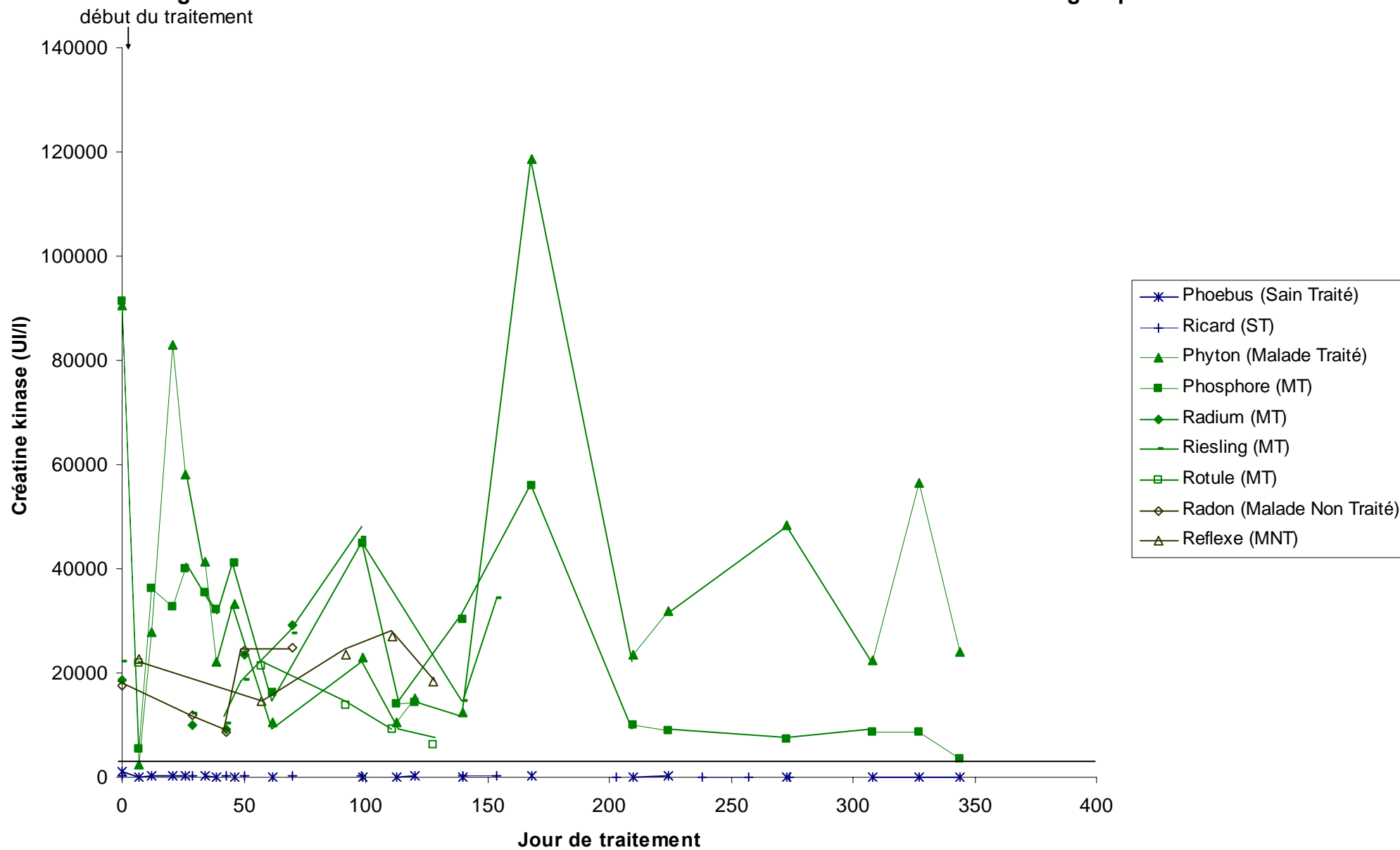
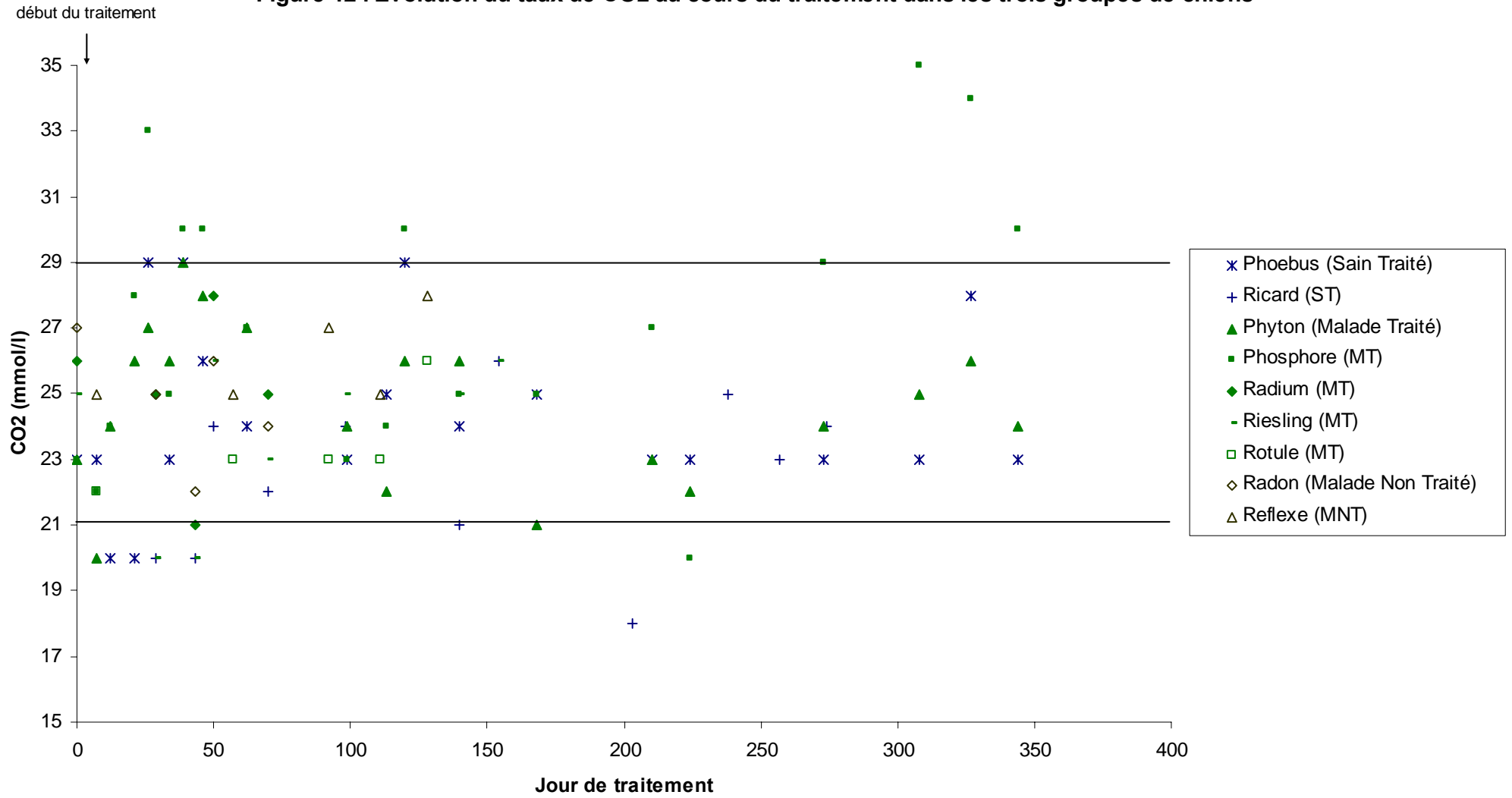
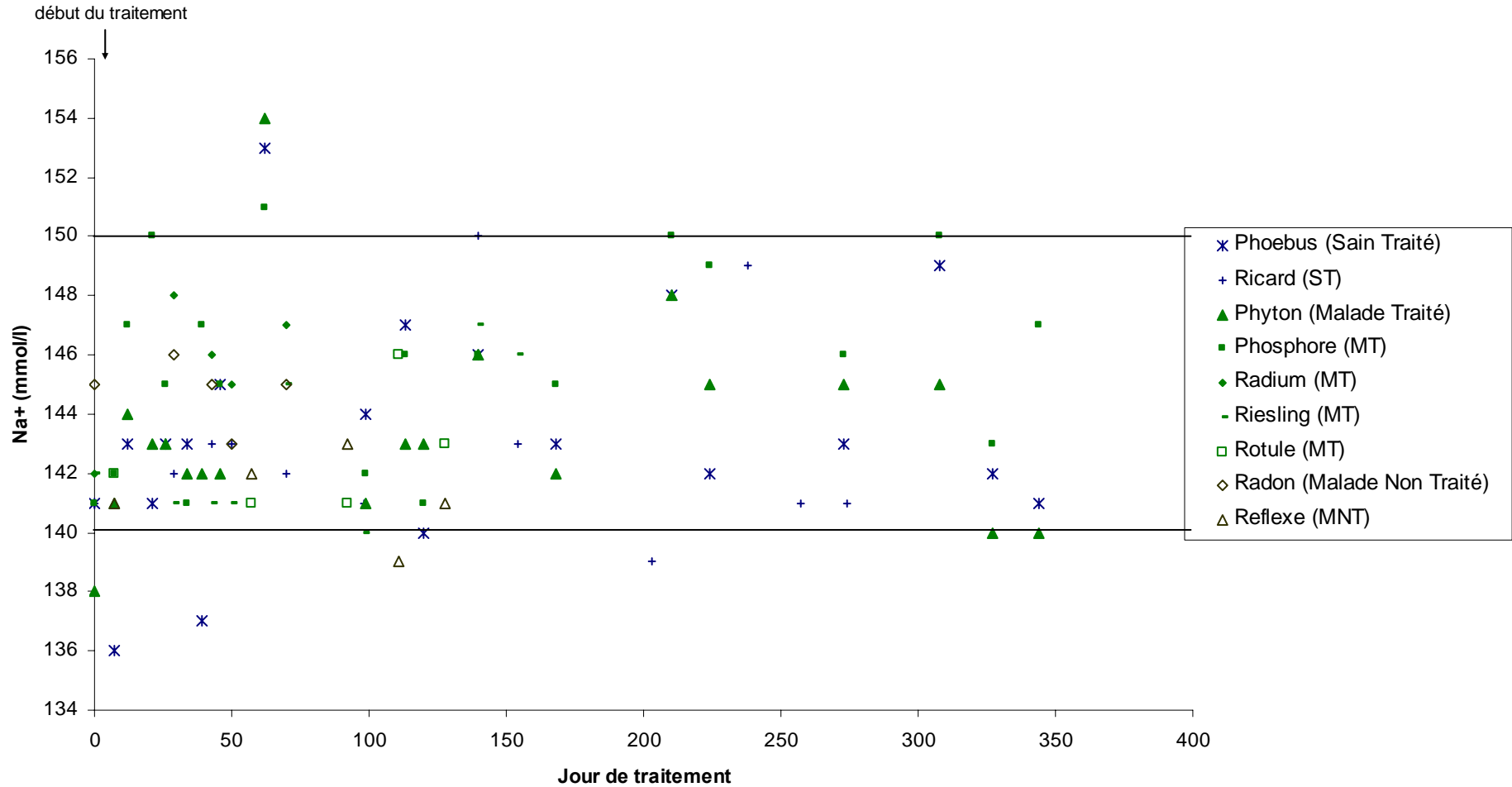


Figure 12 : Evolution du taux de CO2 au cours du traitement dans les trois groupes de chiens



**Figure 13 : Evolution du taux de Na<sup>+</sup> au cours du traitement dans les trois groupes de chiens**



**Figure 14 : Evolution du taux de K<sup>+</sup> au cours du traitement dans les trois groupes de chiens**

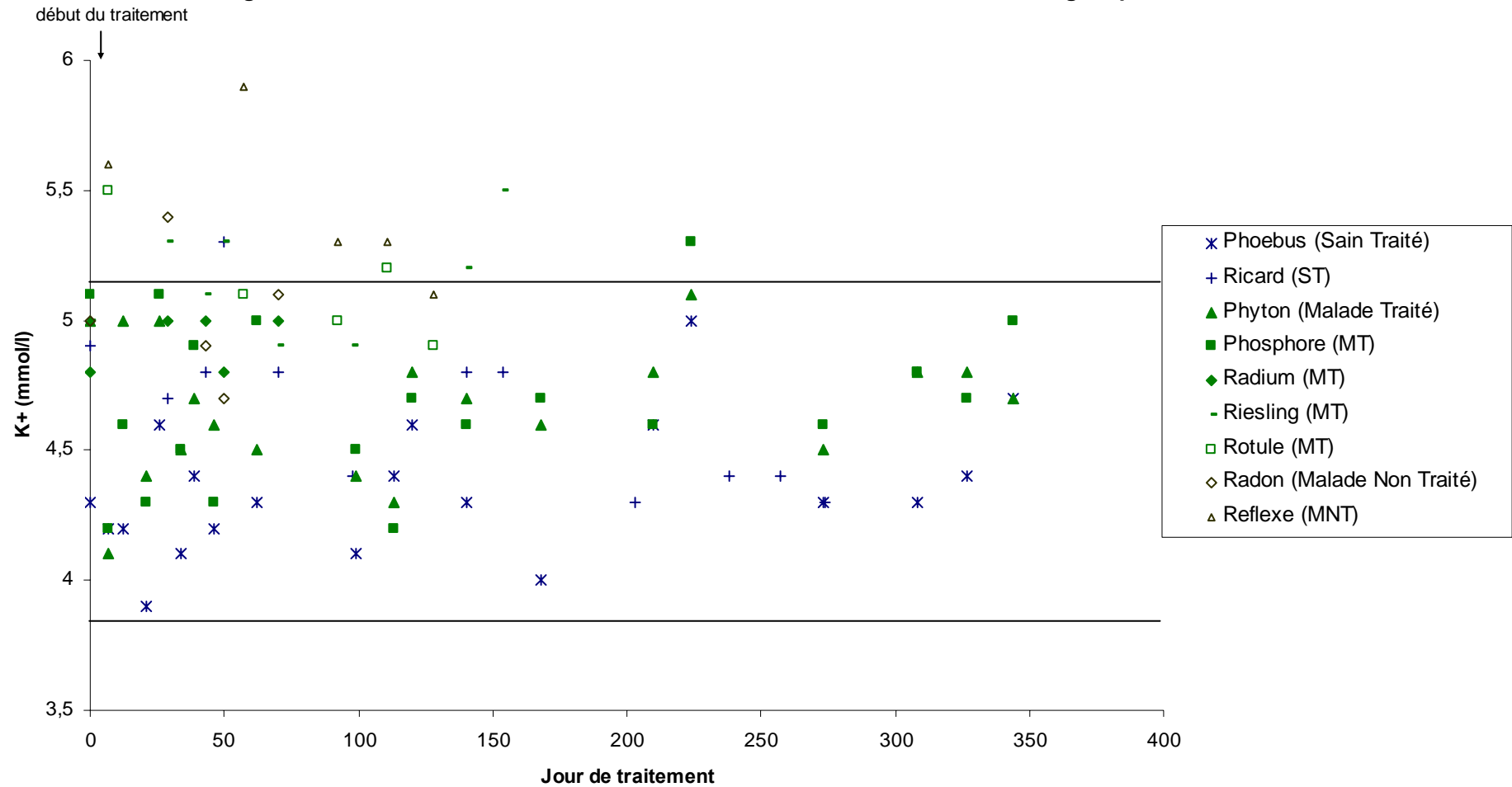
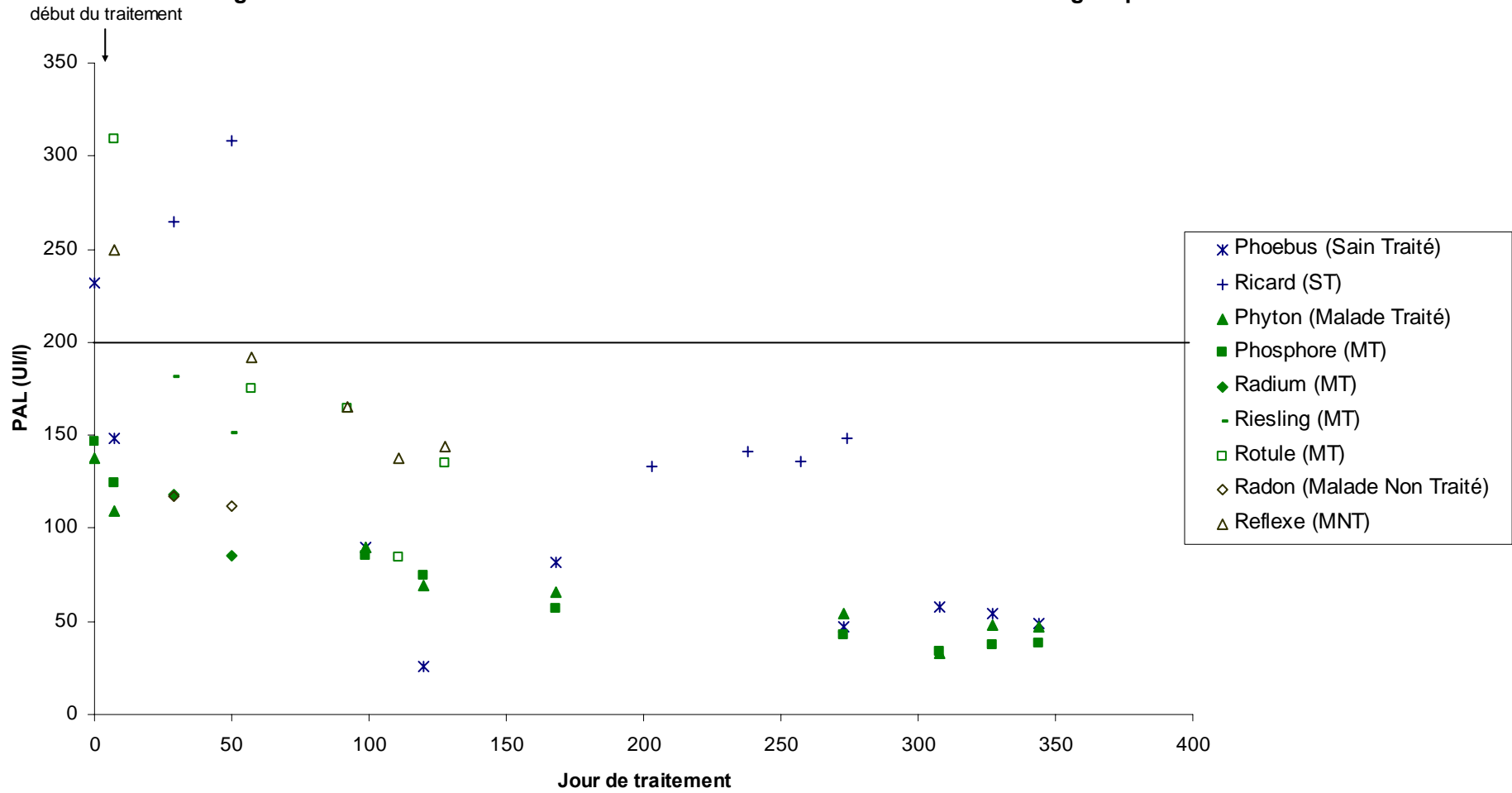




Figure 15 : Evolution du taux de PAL au cours du traitement dans les trois groupes de chiens



**Figure 16 : Evolution du taux de SGPT au cours du traitement dans les trois groupes de chiens**

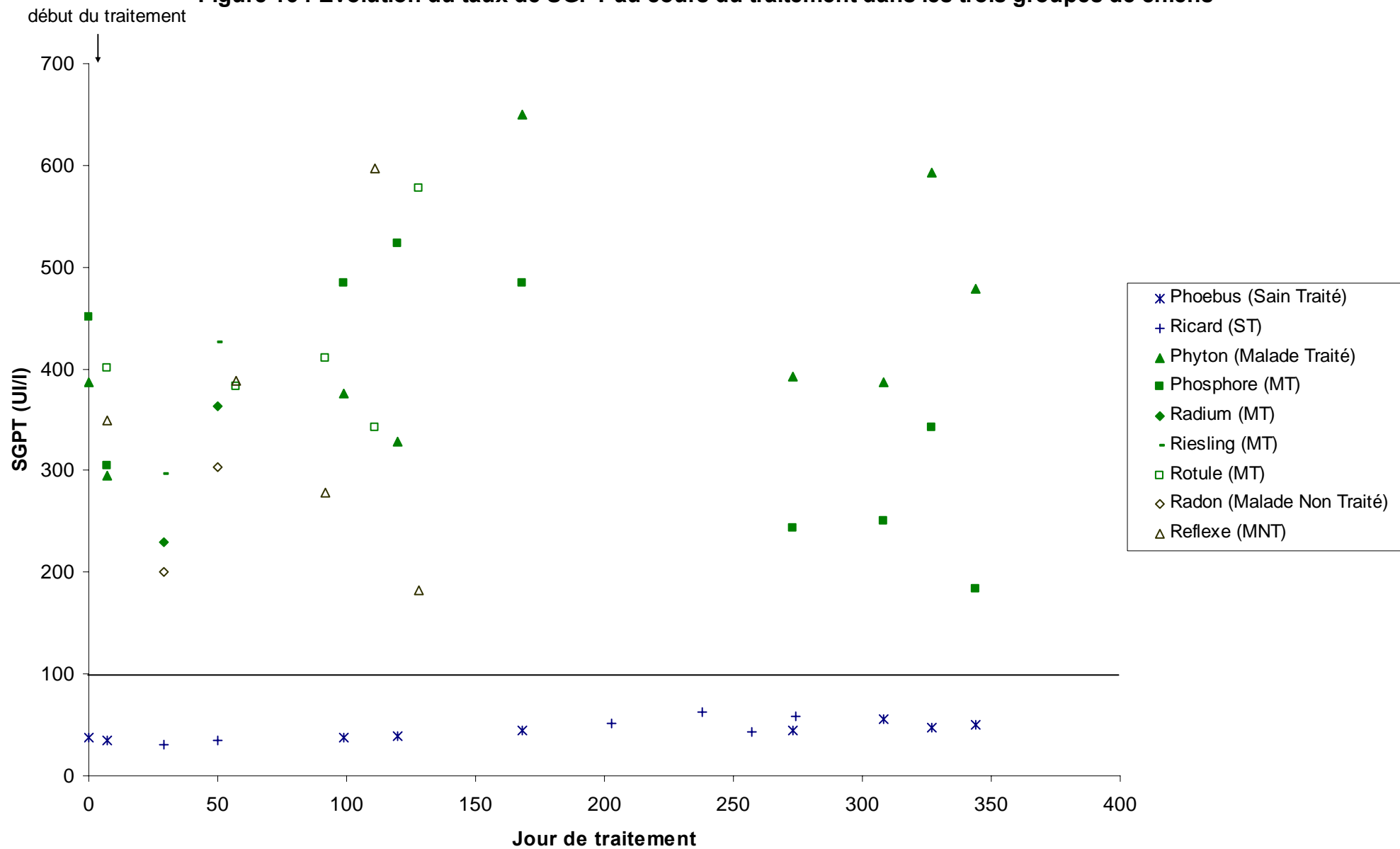
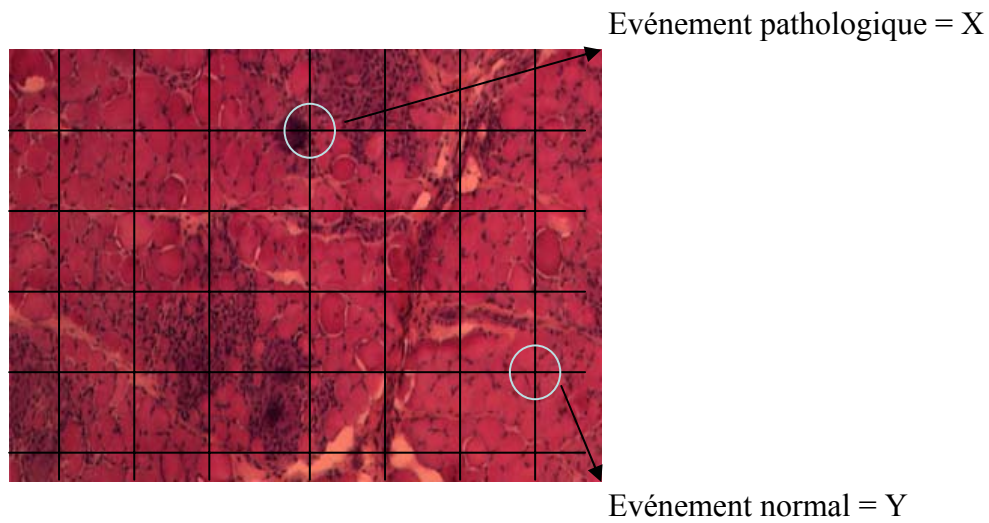


Figure 17 : Index histopathologique à l'âge de 4 mois



$$X / (X+Y) = \text{INDEX HISTOPATHOLOGIQUE}$$

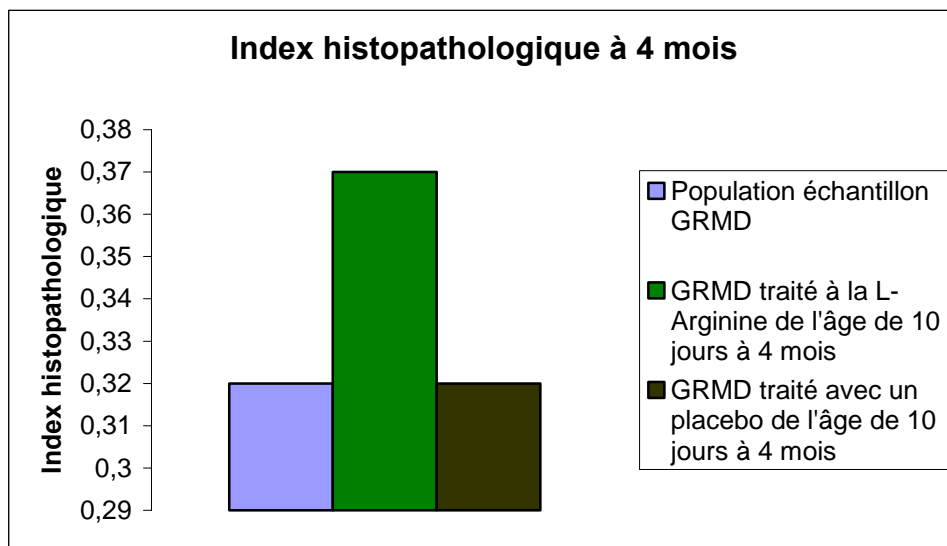


Figure 18 : Index histopathologique à l'âge de 8 mois

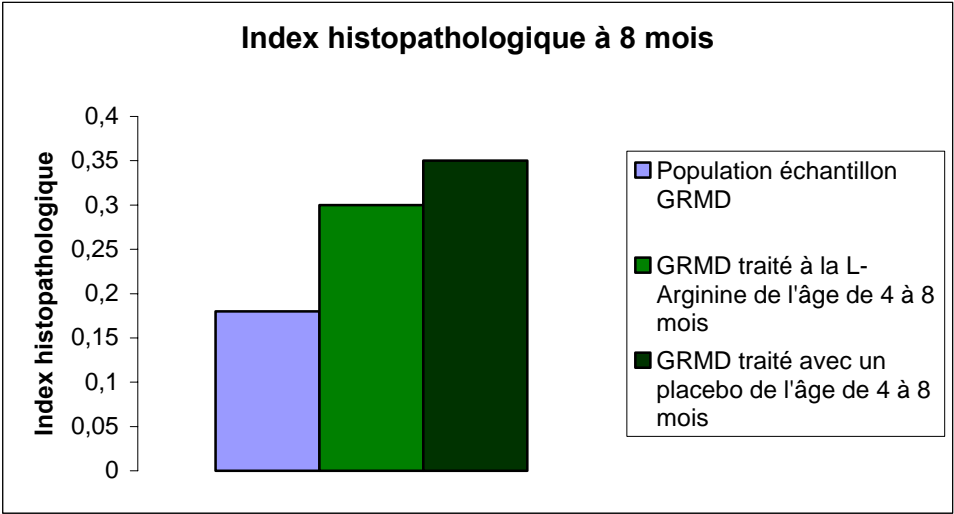
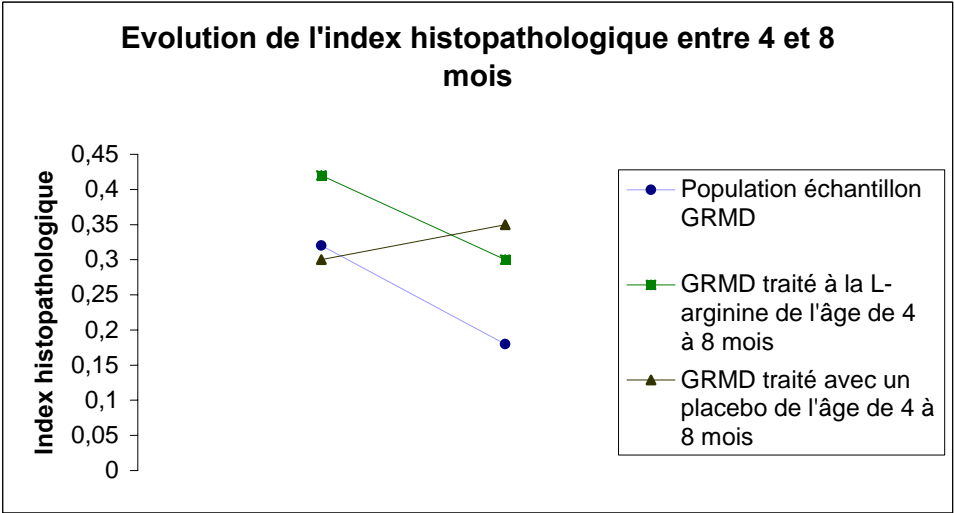


Figure 19 : Evolution de l'index histopathologique



RapportGratuit.com

**ANNEXE 2**

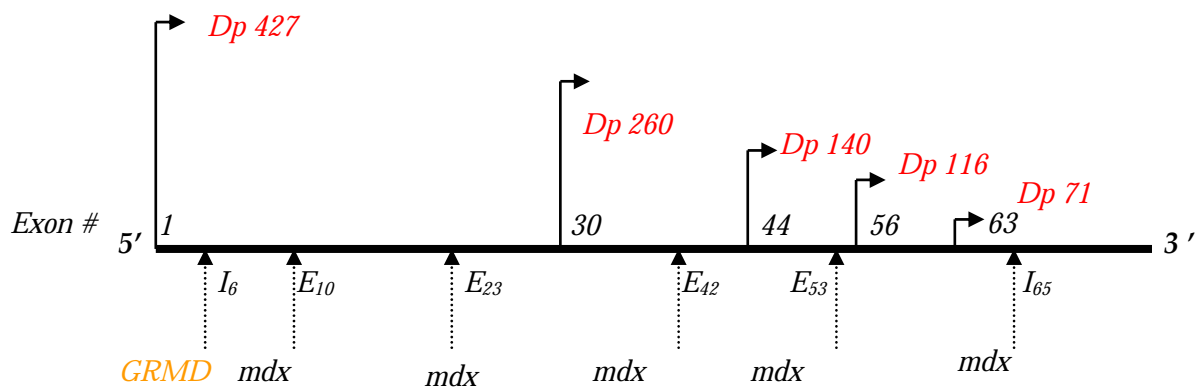
**TABLEAUX**



Tableau 1 : Isoformes de la dystrophine

ISOFORMES	PROMOTEUR	ORGANES
<b>Dp427</b>	Promoteur cortical	neurones du cortex et de l'hippocampe muscles cardiaque et squelettique
	Promoteur des cellules musculaires différenciées	muscles squelettique, cardiaque et lisse
	Promoteur des cellules de Purkinje	cortex fœtal, muscles cardiaque, squelettique
	Promoteur des cellules lymphocytaires	lymphocytes
<b>Dp260</b>	Promoteur des cellules de la rétine	rétine, cerveau, muscle cardiaque
<b>Dp140</b>	Promoteur de nombreuses cellules dans le cerveau	neurones du cortex, cervelet, hippocampe, bulbe olfactif, moelle épinière
<b>Dp116</b>	Promoteur des cellules de Schwann	cellules de Schwann cerveau des nouveaux-nés
<b>Dp71</b>	Promoteur du foie, poumon, rein et testicule	ubiquitaire. également les fibres musculaires squelettiques et les myoblastes en prolifération

## LOCI DES MUTATIONS SUR LE CHROMOSOME X



**Tableau 2 : Protocole et traitement**

<b>Chien</b>	<b>Age au début du traitement</b>	<b>Traitement</b>	<b>Durée</b>	<b>Date de Biopsie de muscle</b>	<b>Immunocytochimie</b>
<b>PHOSPHORE</b>	8,5mois	L-arginine 500mg/kg IV (1ml/kg)	11mois	To, To+3, +8, +35sem Te +6sem	Ut-Vw, Ut-Ab, DAGs (To, To+35sem)
<b>PHYTON</b>	8,5mois	L-arginine 500mg/kg IV (1ml/kg)	11mois	To, To+3, +8, +35sem Te+6sem	Ut-Vw, Ut-Ab
<b>PHOEBUS</b>	8,5mois	L-arginine 500mg/kg IV (1ml/kg)	11mois	To, To+3, +8, +35sem Te+6sem	Ut-Vw, Ut-Ab, DAGs (To, To+35sem)
<b>RIESLING</b>	4mois	L-arginine 700mg/kg IV (1,4ml/kg)	5 mois	To, To+3, +13, +22sem	Ut-Vw, Ut-Ab, DAGs (To, To+22sem)
<b>RICARD</b>	4mois	L-arginine 700mg/kg IV (1,4ml/kg)	8mois	To, To+3, +13, +22sem Te+4sem	Ut-Vw, Ut-Ab, DAGs (To, To+22sem)
<b>RADON</b>	5mois	NaCl 0,9% 1ml/kg IV (1ml/kg)	3mois	To, To+4, +11sem	Ut-Vw, Ut-Ab
<b>RADIUM</b>	5mois	L-arginine 500mg/kg IV (1ml/kg)	3mois	To, To+4, +11sem	Ut-Vw, Ut-Ab
<b>ROTULE</b>	10jours	L-arginine 1g/kg IPjusqu'à3mois puis IV	7mois	To+18sem Te+6sem	Ut-Vw, Ut-Ab, DAGs (To, To+18sem)
<b>REFLEXE</b>	10jours	NaCl 0,9% 2ml/kg IPjusqu'à3mois puis IV	7mois	To+18sem Te+6sem	Ut-Vw, Ut-Ab, DAGs (To, To+18sem)



**Tableau 3 : Paramètres cliniques à évaluer (de 0 à +++) chez les chiens malades. Modèle de tableau.**

Chien	Dysphagie (difficulté à avaler, ptyalisme, régurgitations)	Macroglossie	Incapacité à ouvrir complètement la machoire	Respiration abdominale	Doigts écartés	Démarche anormale (bunny hopping, raideur, abduction de l'épaule)	Rétractions musculotendineuses (épaule, coude, hanche, genou)	Palmigradie Plantigradie	Hypertrophie des muscles proximaux

**Tableau 4 : Stade de myopathie des différents chiens en fonction de leur âge**

Age en mois	4	5	6	7	8	9	10	12	13	14	15	16	17	18	19
<b>PHYTON</b>										2	2		3	3	3
<b>PHOSPHORE</b>										2	2		2	2	2
<b>RADIUM</b>		1,5		2											
<b>RIESLING</b>	1,5				2,5										
<b>ROTULE</b>		2	2,5	3											
<b>RADON</b>		1,5		2											
<b>REFLEXE</b>		1,5	1,5	1,5											

**Tableau 5 : Mesures des pressions artérielles moyennes, systolique et diastolique chez les chiens sains (en mm Hg)**

dates		12-janv	18-janv	25-janv	01-févr	15-mars	29-mars	23-avr	09-mai	01-juin	var	ectype	moy	n
<b>RICARD</b>	<b>PAM</b>	83	128	138	92,5	130	158,5	114,5	85	108,5	587	24	115	9
	<b>Psyst</b>	141	175,5	150,5	153,5	152,5	177	149,5	96,5	177	557	24	153	9
	<b>Pdiast</b>	65	98	126	75	106	141,5	90	70	84,5	590	24	95	9
<b>PHOEBUS</b>	<b>PAM</b>	127	88,5	102,5	112	119	120,5	86	98	106	182	13	107	9
	<b>Psyst</b>	171	142,5	143	153	175	171	156	156	159,5	125	11	159	9
	<b>Pdiast</b>	87	68,5	76,5	92	95	99,5	66	83,5	79,5	119	11	83	9
<b>ROUPIE</b>	<b>PAM</b>	159	114,5	138	168	76,5	101,5	140	146	120	746	27	129	9
	<b>Psyst</b>	204	159	174	210	155,5	188	195	183	178	309	18	183	9
	<b>Pdiast</b>	119	93,5	113,5	134,5	55	73	96	109,5	83	541	23	97	9

**Tableau 6 : mesures des pressions artérielle moyenne, systolique et diastolique chez les chiens malades traités (en mm Hg)**

dates		12- janv	18- janv	25- janv	01- févr	15-mars	29-mars	23- avr	09- mai	01- juin	var	ectype	moy	n
<b>PHYTON</b>	<b>PAM</b>	192	117	101	113	60	80	99	79,5	84,5	1279	36	103	9
	<b>Psyst</b>	207	156	138,5	153,5	128,5	140,5	174	129	119	662	26	150	9
	<b>Pdiast</b>	169	84,5	71,5	85	36	61	66	54	75	1244	35	78	9
<b>PHOSPHORE</b>	<b>PAM</b>	104	110,5	100,5	108	99,5	99	100,5	70,5	66,5	222	15	95	9
	<b>Psyst</b>	153	158	142,5	147	125	147	158	105,5	148	260	16	143	9
	<b>Pdiast</b>	80	88,5	71,5	79,5	76	67,5	65,5	59	44,5	152	12	70	9
<b>RIESLING</b>	<b>PAM</b>	120	71	119	81						486	22	98	4
	<b>Psyst</b>	163	105,5	149,5	121						515	23	135	4
	<b>Pdiast</b>	88	59	105	56,5						412	20	77	4
<b>ROTULE</b>	<b>PAM</b>				96	90,5	38	111	83,5	107,5	583	24	88	6
	<b>Psyst</b>				111	128	55,5	162	136,5	136	1097	33	122	6
	<b>Pdiast</b>				75,5	73,5	30,5	94	73	81	383	20	71	6



**Tableau 8: Analyse de variance pour le facteur pression artérielle moyenne entre les chiens GRMD traités ou non**

<i>Groupes</i>	<i>Nombre d'échantillons</i>	<i>Somme</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Variance</i>
malades traités	4	384	96	39,3
malades non traités	5	549	109,8	277,7

**ANALYSE DE VARIANCE**

<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>	<i>Valeur critique pour F</i>
Entre Groupes	423	1	423	2,4	0,16	5,59
A l'intérieur des groupes	1229	7	176			
<b>Total</b>	<b>1652</b>	<b>8</b>				

**Tableau 9: Analyse de variance pour le facteur pression systolique entre les chiens GRMD traités ou non**

<i>Groupes</i>	<i>Nombre d'échantillons</i>	<i>Somme</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Variance</i>
malades traités	4	550	137,5	144,3
malades non traités	5	778	155,6	411,3

**ANALYSE DE VARIANCE**

<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>	<i>Valeur critique pour F</i>
Entre Groupes	728	1	728	2,5	0,16	5,59
A l'intérieur des groupes	2078	7	297			
<b>Total</b>	<b>2806</b>	<b>8</b>				

**Tableau 10: Analyse de variance pour le facteur pression diastolique entre les chiens GRMD traités ou non**

<i>Groupes</i>	<i>Nombre d'échantillons</i>	<i>Somme</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Variance</i>
malades traités	4	296	74	16,7
malades non traités	5	423	84,6	154,3

#### **ANALYSE DE VARIANCE**

<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>	<i>Valeur critique pour F</i>
Entre Groupes	250	1	250	2,6	0,15	5,59
A l'intérieur des groupes	667	7	95			
<b>Total</b>	917	8				

**Tableau 11: Résultats des dosages d'urée dans les trois groupes de chiens (en g/l)**

Jour de traitement	0	7	12	21	26	29	34	39	43	46	50	57	62	70	92	98	99	111
Phoebus (Sain Traité)	0,25	0,17	0,37	0,19	0,4		0,19	0,44		0,41			0,56				0,46	
Ricard (ST)	0,51					0,33			0,16		0,27			0,46		0,55		
Phyton (Malade Traité)	0,24	0,23	0,46	0,34	0,36		0,1	0,52		0,54			0,27				0,2	
Phosphore (MT)	0,31	0,35	0,54	0,59	0,4		0,21	0,6		0,49			0,42				0,29	
Radium (MT)	0,39					0,17			0,27		0,4			0,44				
Riesling (MT)	0,54					0,31			0,17		0,18			0,47		0,39		
Rotule (MT)		0,25										0,51			0,32			0,34
Radon (Malade Non Traité)	0,38					0,24			0,22		0,42			0,45				
Reflexe (MNT)		0,16										0,44			0,29			0,18

Jour de traitement	113	120	128	140	154	168	203	210	224	238	257	273	274	308	327	344	Moy	Ectype
Phoebus (Sain Traité)	0,58	0,44		0,56		0,4		0,47	0,45			0,32		0,54	0,3	0,5	0,40	0,13
Ricard (ST)				0,47	0,5		0,46			0,49	0,31		0,42				0,41	0,12
Phyton (Malade Traité)	0,25	0,27		0,28		0,54		0,32	0,27			0,3		0,23	0,2	0,33	0,31	0,12
Phosphore (MT)	0,2	0,2		0,5		0,57		0,54	0,49			0,49		0,54	0,35	0,6	0,43	0,14
Radium (MT)																	0,33	0,11
Riesling (MT)				0,41	0,48												0,37	0,14
Rotule (MT)			0,62														0,41	0,15
Radon (Malade Non Traité)																	0,34	0,11
Reflexe (MNT)			0,31														0,28	0,11

**Tableau 12 : Résultats des dosages de créatinine dans les trois groupes de chiens  
(en mg/l)**

Jour de traitement	0	7	12	21	26	29	34	39	43	46	50	57	62	70	92	98	99	111
Phoebus (Sain Traité)	7	7	9	8	11		7	11		10			9				11	
Ricard (ST)	10					6			5		5			11		10		
Phyton (Malade Traité)	5	4	9	8	8		4	8		9			5				5	
Phosphore (MT)	3	6	9	9	9		5	10		9			8				6	
Radium (MT)	7					4			5		6			7				
Riesling (MT)	11					5			4		4			9		8		
Rotule (MT)		5										8			6			3
Radon (Malade Non Traité)	8					6			4		6			6				
Reflexe (MNT)		4										6			4			9

Jour de traitement	113	120	128	140	154	168	203	210	224	238	257	273	274	308	327	344	Moy	Ectype
Phoebus (Sain Traité)	12	6		12		10		9	9			7		9	9	10	9	2
Ricard (ST)				10	9		9			10	9		10				9	2
Phyton (Malade Traité)	4	5		7		8		6	6			7		4	4	7	6	2
Phosphore (MT)	5	5		8		8		8	8			7		9	6	8	7	2
Radium (MT)																	6	1
Riesling (MT)				8	8												7	3
Rotule (MT)			9														6	2
Radon (Malade Non Traité)																	6	1
Reflexe (MNT)			6														6	2



**Tableau 13 : Résultats des dosages de créatine kinase dans trois groupes de chiens (en UI/l)**

**2**

Jour de traitement	0	7	12	21	26	27	39	43
--------------------	---	---	----	----	----	----	----	----

**Tableau 14 : Résultats des dosages de CO2 dans les trois groupes de chiens  
(en mmol/l)**

Jour de traitement	0	7	12	21	26	29	34	39	43	46	50	57	62	70	92	98	99	111
Phoebus (Sain Traité)	23	23	20	20	29		23	29		26			24				23	
Ricard (ST)	26					20			20		24			22		24		
Phyton (Malade Traité)	23	20	24	26	27		26	29		28			27				24	
Phosphore (MT)	23	22	24	28	33		25	30		30			27				23	
Radium (MT)	26					25			21		28			25				
Riesling (MT)	25					20			20		26			23		25		
Rotule (MT)		22										23			23			23
Radon (Malade Non Traité)	27					25			22		26			24				
Reflexe (MNT)		25										25			27			25

Jour de traitement	113	120	128	140	154	168	203	210	224	238	257	273	274	308	327	344	Moy	Ecart type
Phoebus (Sain Traité)	25	29		24		25		23	23			23		23	28	23	24	3
Ricard (ST)				21	26		18			25	23		24				23	3
Phyton (Malade Traité)	22	26		26		21		23	22			24		25	26	24	25	2
Phosphore (MT)	24	30		25		25		27	20			29		35	34	30	27	4
Radium (MT)																	25	3
Riesling (MT)				25	26												24	2
Rotule (MT)			26														23	2
Radon (Malade Non Traité)																	25	2
Reflexe (MNT)			28														26	1

**Tableau 15 : Résultats de dosages du Na<sup>+</sup> dans les trois groupes de chiens  
(en mmol/l)**

Jour de traitement	0	7	12	21	26	29	34	39	43	46	50	57	62	70	92	98	99	111
Phoebus (Sain Traité)	141	136	143	141	143		143	137		145			153				144	
Ricard (ST)	141					142			143		143			142		141		
Phyton (Malade Traité)	138	141	144	143	143		142	142		142			154				141	
Phosphore (MT)	141	142	147	150	145		141	147		145			151				142	
Radium (MT)	142					148			146		145			147				
Riesling (MT)	142					141			141		141			145		140		
Rotule (MT)		142										141			141			146
Radon (Malade Non Traité)	145					146			145		143			145				
Reflexe (MNT)		141										142			143			139

Jour de traitement	113	120	128	140	154	168	203	210	224	238	257	273	274	308	327	344	Moy	Ecart type
Phoebus (Sain Traité)	147	140		146		143		148	142			143		149	142	141	143	4
Ricard (ST)				150	143		139			149	141		141				143	3
Phyton (Malade Traité)	143	143		146		142		148	145			145		145	140	140	143	3
Phosphore (MT)	146	141		146		145		150	149			146		150	143	147	146	3
Radium (MT)																	146	2
Riesling (MT)				147	146												143	3
Rotule (MT)			143														143	2
Radon (Malade Non Traité)																	145	1
Reflexe (MNT)			141														141	1

**Tableau 16 : Résultats des dosages de K+ dans les trois groupes de chiens  
(en mmol/l)**

Jour de traitement	0	7	12	21	26	29	34	39	43	46	50	57	62	70	92	98	99	111
Phoebus (Sain Traité)	4,3	4,2	4,2	3,9	4,6		4,1	4,4		4,2			4,3				4,1	
Ricard (ST)	4,9					4,7			4,8		5,3			4,8		4,4		
Phyton (Malade Traité)	5	4,1	5	4,4	5		4,5	4,7		4,6			4,5				4,4	
Phosphore (MT)	5,1	4,2	4,6	4,3	5,1		4,5	4,9		4,3			5				4,5	
Radium (MT)	4,8					5			5		4,8			5				
Riesling (MT)	5					5,3			5,1		5,3			4,9		4,9		
Rotule (MT)		5,5										5,1			5			5,2
Radon (Malade Non Traité)	5					5,4			4,9		4,7			5,1				
Reflexe (MNT)		5,6										5,9			5,3			5,3

Jour de traitement	113	120	128	140	154	168	203	210	224	238	257	273	274	308	327	344	Moy	Ecart type
Phoebus (Sain Traité)	4,4	4,6		4,3		4		4,6	5			4,3		4,3	4,4	4,7	4,3	0,3
Ricard (ST)				4,8	4,8		4,3			4,4	4,4		4,3				4,7	0,3
Phyton (Malade Traité)	4,3	4,8		4,7		4,6		4,8	5,1			4,5		4,8	4,8	4,7	4,7	0,3
Phosphore (MT)	4,2	4,7		4,6		4,7		4,6	5,3			4,6		4,8	4,7	5	4,7	0,3
Radium (MT)																	4,9	0,1
Riesling (MT)				5,2	5,5												5,2	0,2
Rotule (MT)			4,9														5,1	0,2
Radon (Malade Non Traité)																	5,0	0,3
Reflexe (MNT)			5,1														5,4	0,3

**Tableau 17 : Résultats des dosages de PAL dans les trois groupes de chiens  
(en UI/l)**

Jour de traitement	0	7	12	21	26	29	34	39	43	46	50	57	62	70	92	98	99	111
Phoebus (Sain Traité)	232	148															90	
Ricard (ST)						265					308							
Phyton (Malade Traité)	138	109															90	
Phosphore (MT)	147	124															85	
Radium (MT)						118					85							
Riesling (MT)						181					151							
Rotule (MT)		309										175			164			84
Radon (Malade Non Traité)						117					112							
Reflexe (MNT)		250										192			165			138

Jour de traitement	113	120	128	140	154	168	203	210	224	238	257	273	274	308	327	344	Moy	Ecart type
Phoebus (Sain Traité)		26				82						47		58	54	49	87	65
Ricard (ST)							133			141	136		148				189	77
Phyton (Malade Traité)		69				66						54		33	48	47	73	34
Phosphore (MT)		75				57						43		34	37	38	71	41
Radium (MT)																	102	23
Riesling (MT)																	166	21
Rotule (MT)			135														173	84
Radon (Malade Non Traité)																	115	4
Reflexe (MNT)			144														178	46

**Tableau 18 : Résultats des dosages de SGPT dans les trois groupes de chiens  
(en UI/l)**

Jour de traitement	0	7	12	21	26	29	34	39	43	46	50	57	62	70	92	98	99	111
Phoebus (Sain Traité)	38	35															37	
Ricard (ST)						30					35							
Phyton (Malade Traité)	387	295															376	
Phosphore (MT)	451	305															484	
Radium (MT)						229					363							
Riesling (MT)						297					426							
Rotule (MT)		401										383			411			342
Radon (Malade Non Traité)						200					303							
Reflexe (MNT)		350										388			278			597

Jour de traitement	113	120	128	140	154	168	203	210	224	238	257	273	274	308	327	344	Moy	Ecart type
Phoebus (Sain Traité)		39				45						44		56	47	50	43	7
Ricard (ST)							52			62	43		59				47	13
Phyton (Malade Traité)		328				650						392		387	593	479	432	119
Phosphore (MT)		523				484						244		251	343	184	363	125
Radium (MT)																	296	95
Riesling (MT)																	362	91
Rotule (MT)			577														423	90
Radon (Malade Non Traité)																	252	73
Reflexe (MNT)			182														359	154

**Tableau 19 : Index histopathologiques**

**Index histopathologiques à l'âge de 4 mois**

	Population échantillon GRMD	GRMD traité à la L-Arginine de l'âge de 10 jours à 4 mois	GRMD traité avec un placebo de l'âge de 10 jours à 4 mois
Index histopathologique 4mois (= Moy A, B, C)	0,32	0,37	0,32
Ecart type	0,1		
chien A PYRAME	0,25		
chien B ROUKY	0,48		
chien C RUMBA	0,23		

Nom des chiens

**ROTULE**

**REFLEXE**

**Index histopathologiques à l'âge de 8 mois**

	Population échantillon GRMD	GRMD traité à la L-Arginine de l'âge de 4 à 8 mois	GRMD traité avec un placebo de l'âge de 4 à 8 mois
Index histopathologique 8mois (=Moy 1, 2, 3)	0,18	0,3	0,35
Ecart type	0,03		
chien A PYRAME	0,15		
chien B ROUKY	0,16		
chien C RUMBA	0,22		

Nom des chiens

**RADIUM**

**RADON**

**Evolution de l'index histopathologique**

Index histopathologique	Population échantillon GRMD	GRMD traité à la L-arginine	GRMD traité avec un placebo
4 mois	0,32	0,42	0,3
8 mois	0,18	0,3	0,35

Nom des chiens

**PYRAME, ROUKY, RUMBA**

**RADIUM**

**RADON**

**Tableau 20 : Immunocytochimie des  $\beta$ -sarcoglycanes chez les chiens sains et dystrophiques**

<b><math>\beta</math>-sarcoglycanes</b>	<b>T0</b>	<b>T1</b>
<b>PHOEBUS sain, L-arginine</b>	Pourtour des fibres bien marqué	Idem à To
<b>RICARD sain, L-arginine</b>	Pourtour des fibres bien marqué	Idem à To
<b>RIESLING malade L-arginine</b>	Marquage très hétérogène ++ Diamètre hétérogène des fibres Distribution perturbée	Marquage un peu plus homogène en épaisseur que To + Distribution perturbée
<b>REFLEXE malade placebo</b>		Marquage très très hétérogène Très forte disparité par groupe de fibres +++
<b>ROTULE malade L-arginine</b>		Marquage très très hétérogène Très forte disparité par groupe de fibres +++
<b>PHYTON malade L-arginine</b>	Marquage discrètement hétérogène + Marquage discret du cytoplasme +	Fin marquage périphérique des fibres musculaires +



**Tableau 21 : Immunocytochimie des  $\gamma$ -sarcoglycanes chez les chiens sains et dystrophiques**

<b><math>\gamma</math>-sarcoglycanes</b>	<b>To</b>	<b>T1</b>
<b>PHOEBUS sain, L-arginine</b>	Pourtour des fibres bien marqué et homogène	Idem à T0
<b>RICARD sain, L-arginine</b>	Pourtour des fibres bien marqué et hétérogène	Idem à T0
<b>RIESLING malade L-arginine</b>	Marquage hétérogène +	Idem à To
<b>REFLEXE malade placebo</b>		Marquage cytoplasmique +++ Marquage périphérique fin et hétérogène +
<b>ROTULE malade L-arginine</b>		Marquage cytoplasmique +++ Marquage périphérique fin et hétérogène +
<b>PHYTON malade L-arginine</b>	Marquage cytoplasmique ++	Marquage très discret à absent 0/+ Fin marquage hétérogène périphérique



## **ANNEXE 3**

## **PLANCHES**



## PLANCHE 1

Aspect de deux chiens atteints de myopathie dystrophique

### PHYTON



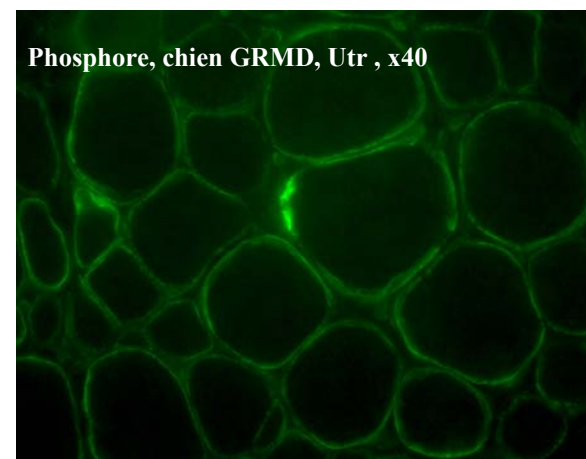
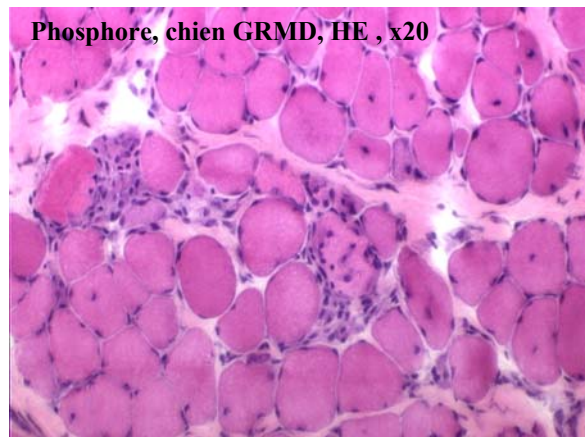
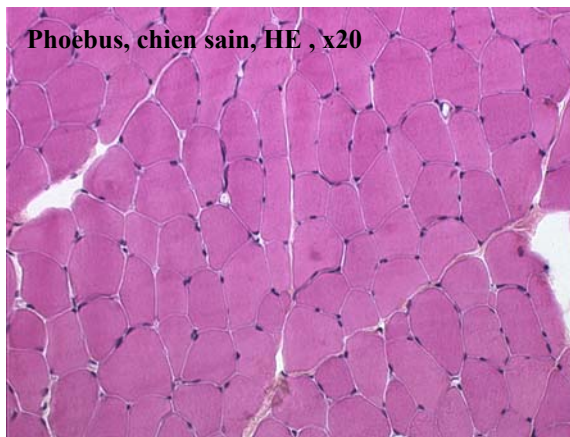
### PHOSPHORE





## PLANCHE 2

### Aspect histologique et immunocytochimique du biceps fémoral avant traitement chez des chiens sains et des chiens GRMD

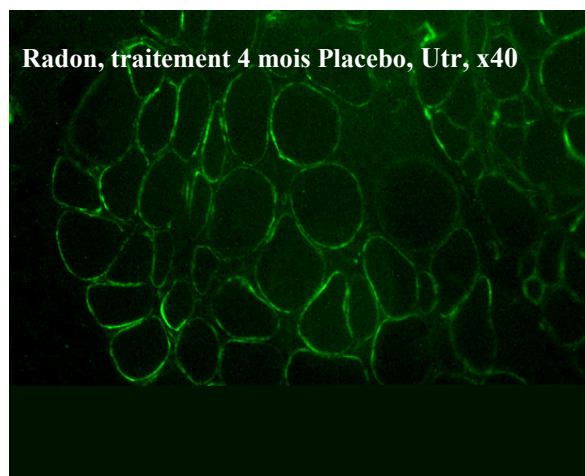
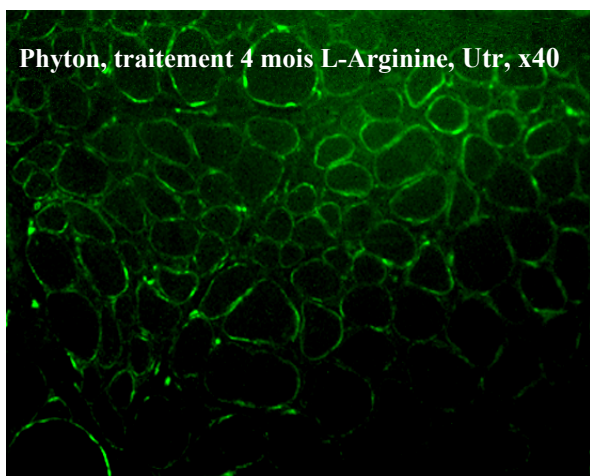
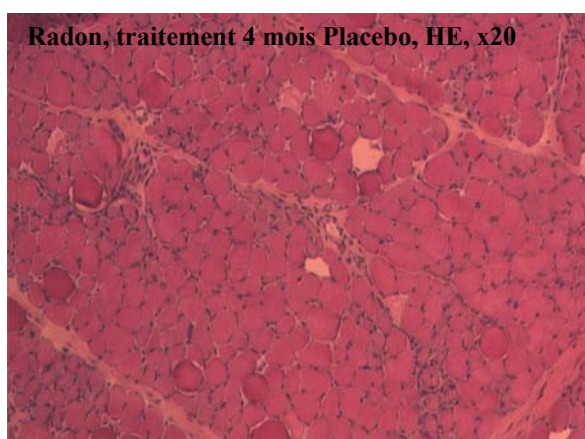
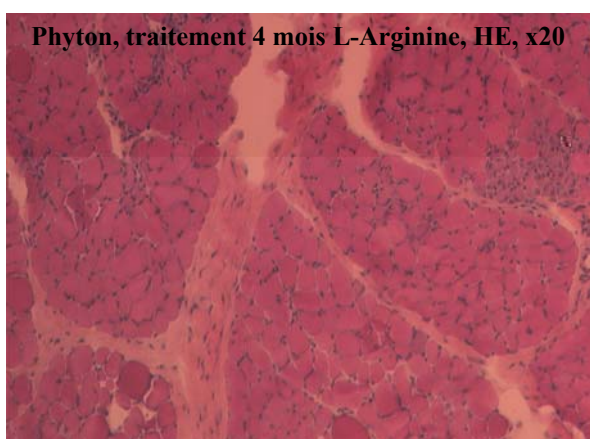






### PLANCHE 3

**Aspect histologique et immunocytochimique du biceps fémoral après 4 mois de traitement à la L-arginine ou avec un placebo chez des chiens GRMD**

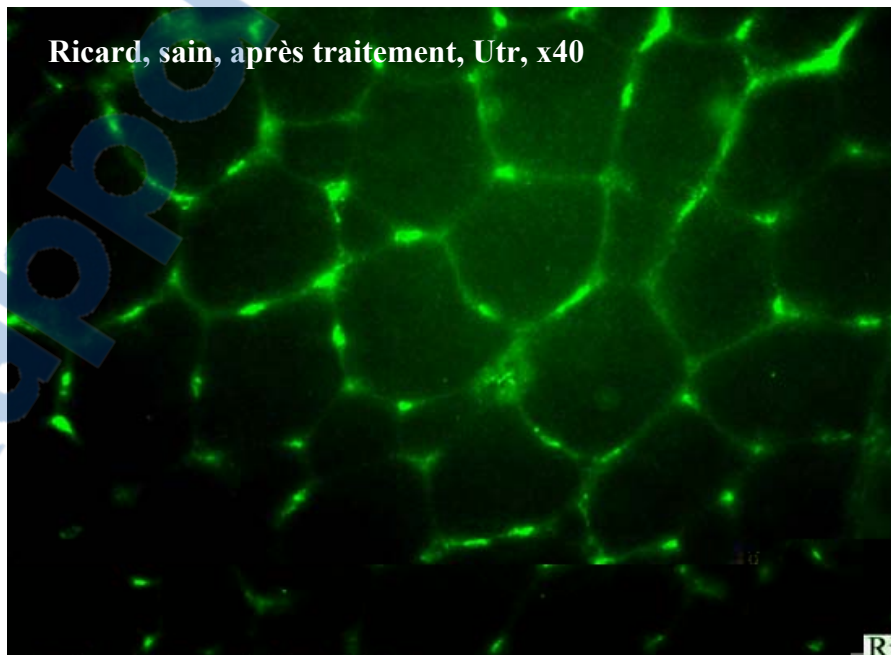
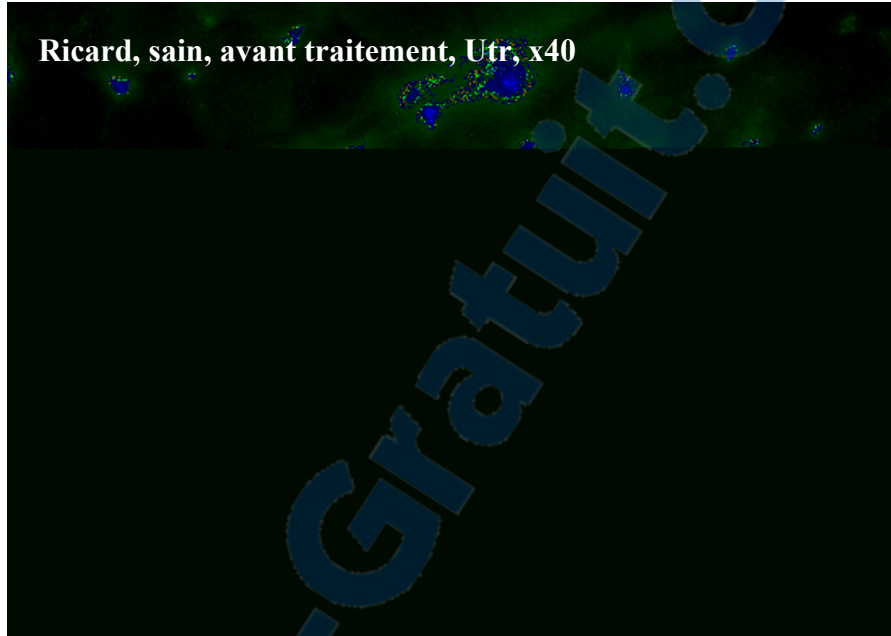


Pas de différences histologiques entre les chiens GRMD traités et non traités



## PLANCHE 4

### Aspect immunocytochimique du biceps fémoral avant et après traitement chez des chiens sains

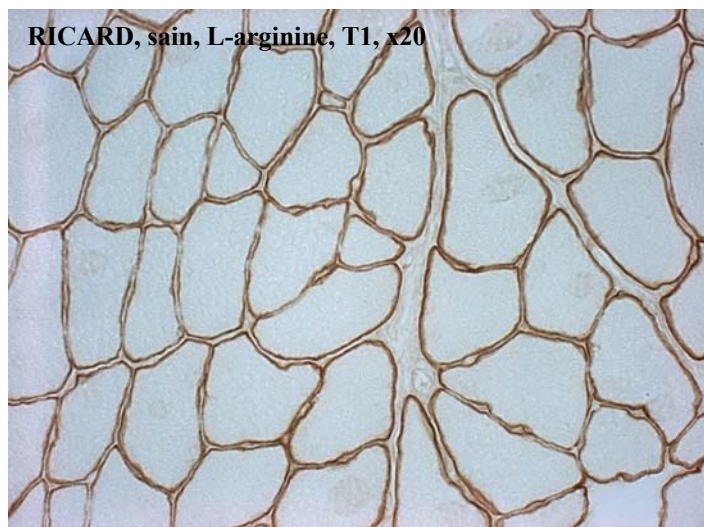
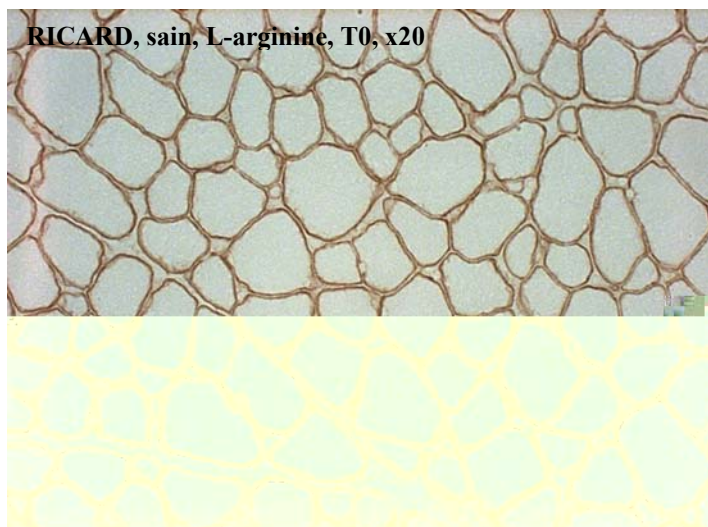


Surexpression de l'utrophine chez les chiens sains traités à la L-arginine

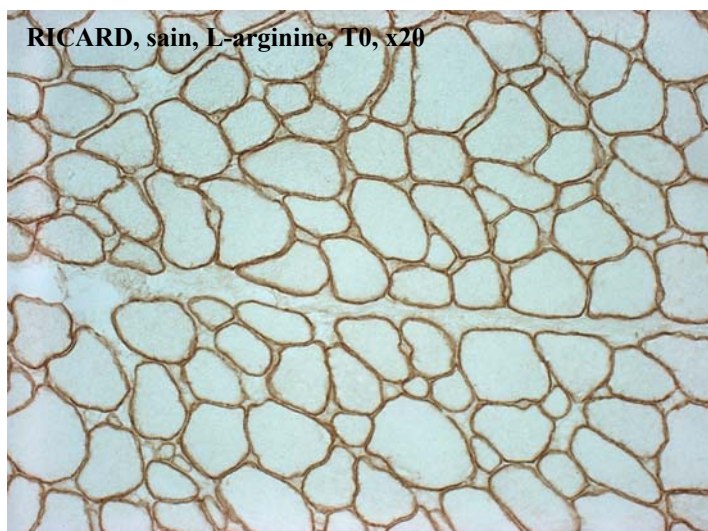


## PLANCHE 5

### Immunomarquage des $\beta$ -sarcoglycanes chez des chiens sains avant et après traitement à la L-arginine



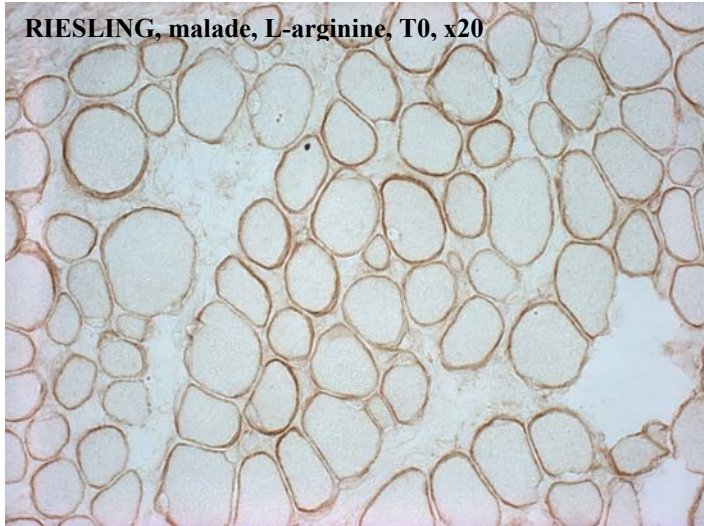
### Immunomarquage des $\gamma$ -sarcoglycanes chez des chiens sains avant et après traitement à la L-arginine



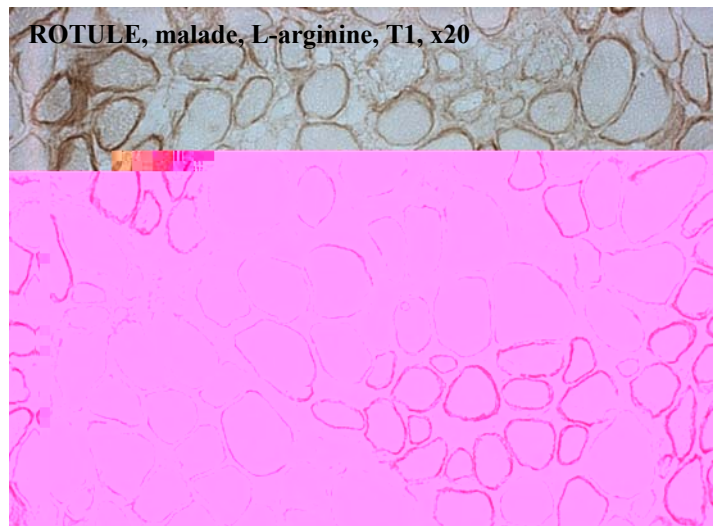
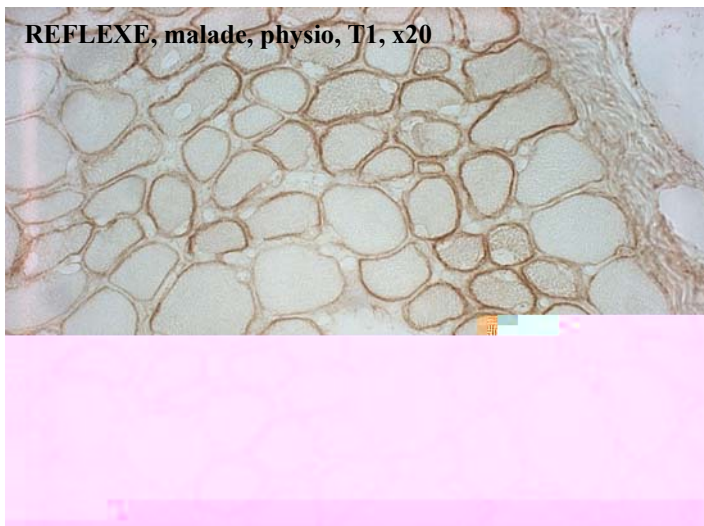


## PLANCHE 6

### Immunomarquage des $\beta$ -sarcoglycanes chez un chien malade avant et après traitement à la L-arginine



### Immunomarquage des $\beta$ -sarcoglycanes chez deux chiens malades après un traitement à la L-arginine ou au sérum physiologique.

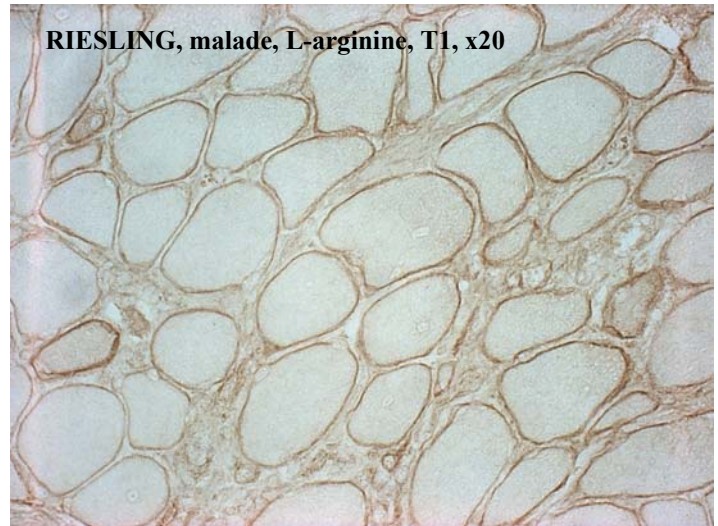
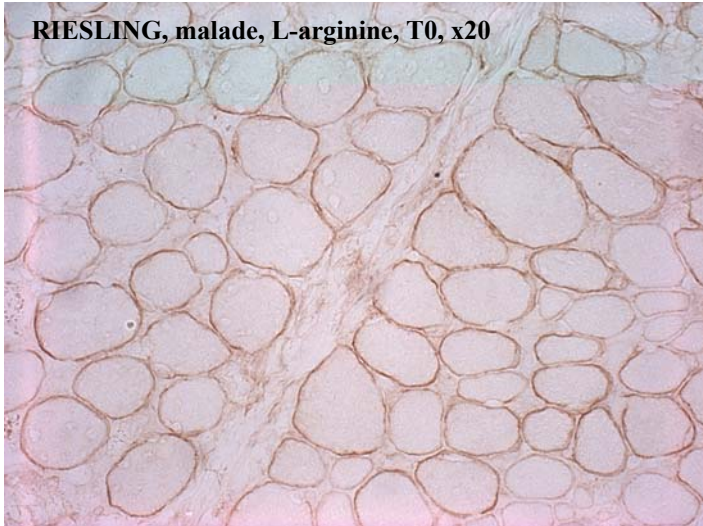




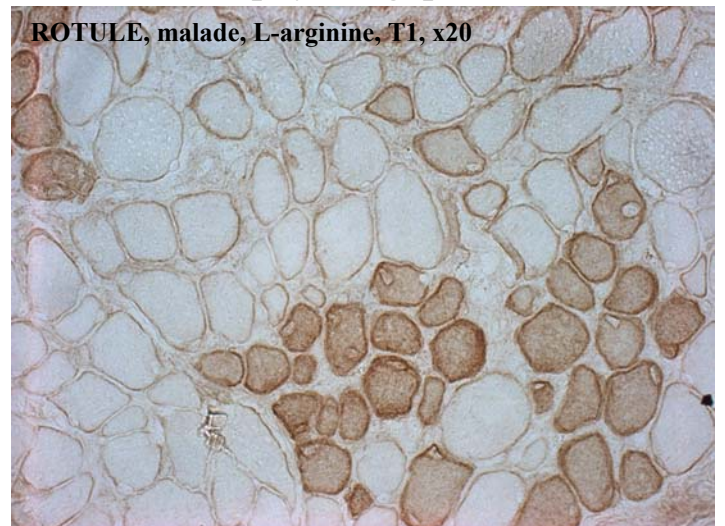
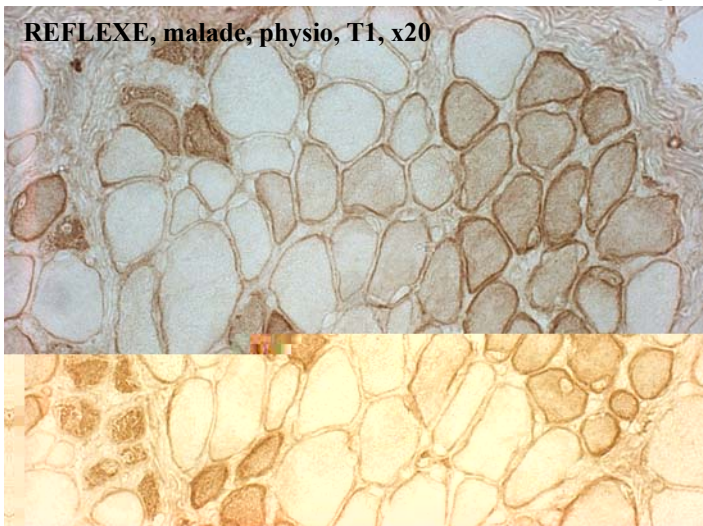


## PLANCHE 7

### Immunomarquage des $\gamma$ -sarcoglycanes chez un chien malade avant et après traitement à la L-arginine



### Immunomarquage des $\gamma$ -sarcoglycanes chez deux chiens malades après un traitement à la L-arginine ou au sérum physiologique





## **APPROCHE THERAPEUTIQUE DE LA MYOPATHIE DE DUCHENNE PAR LA SUREXPRESSION PHARMACOLOGIQUE DE L'UTROPHINE CHEZ LE CHIEN**

Nom et Prénom : KERHOAS Jean-Marie

### RESUME :

Jusqu'à présent, la myopathie de Duchenne est une maladie létale pour laquelle il n'existe aucun traitement. La surexpression d'utrophine est capable de compenser sur le plan du phénotype l'absence de dystrophine chez la souris mdx. Un donneur de NO comme la L-arginine provoque l'accumulation d'utrophine dans le muscle de la souris mdx. A partir de ces observations, nous avons évalué l'effet d'un traitement à base de L-arginine dans la Dystrophie Musculaire du Golden Retriever, l'expression phénotypique de cette dystrophie chez le chien présentant des similitudes avec celle chez l'Homme.

Neuf chiens (deux sains et sept malades) âgés de 10 jours à 8 mois reçoivent de la L-arginine (500 mg/kg à 1g/kg par jour) par voie intrapéritonéale ou intraveineuse pendant 3 à 11 mois. Deux de ces chiens reçoivent un placebo (NaCl 0,9%). L'effet du traitement est évalué régulièrement par un examen clinique, un examen biochimique et un score clinique. Des analyses cytochimiques ont été réalisées sur des coupes de muscles préparés à partir de biopsies du biceps fémoral (muscle moyennement affecté) et/ou du sartorius (muscle sévèrement affecté) réalisées avant et pendant le traitement.

Dans ces conditions, l'évolution de la maladie n'est pas modifiée chez les chiens GRMD traités par rapport aux chiens non traités. On retrouve le même taux d'événements pathologiques (fibres nécrotiques, fibres hyalines, infiltration macrophagique, fibrose,...) chez les chiens traités et non traités. Quelque soit le traitement, l'utrophine est surexprimée au niveau du sarcolemme des fibres musculaires des chiens GRMD, tandis que son expression est restreinte à la plaque motrice chez les chiens sains non traités. Cependant, chez les chiens sains traités, l'expression d'utrophine est légèrement élevée autour de la fibre musculaire mais jamais autant que dans le muscle GRMD.

Dans notre étude, le traitement par un donneur de NO tel que la L-arginine ne provoque donc pas de bénéfice thérapeutique chez le chien GRMD.

Mots-Clés : myopathie dystrophique - dystrophine – utrophine – L-arginine – chien

### JURY :

Président : Pr

Directeur : Dr BLOT

Assesseur : Pr ENRIQUEZ

Invitée : Dr Escriou

### Adresse de l'auteur :

Mr KERHOAS Jean-Marie

6, rue Pierre Curie

94700 Maisons Alfort

## THERAPEUTIC TREATMENT OF DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY BY PHARMACOLOGIC OVEREXPRESSION OF UTROPHIN IN THE DOG

SURNAME and first name: KERHOAS Jean-Marie

### SUMMARY:

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is fatal disease for which there is no treatment. **Based on the facts that utrophin overexpression was able to compensate the dystrophic phenotype in the *mdx* mouse muscle and that chronic nitric oxide (NO) donors cause an accumulation of utrophin in the same *mdx* mouse muscle in vivo, we evaluated the effect of treatment by NO donors in Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD). This disease shares striking phenotypic similarities with human DMD.**

**Nine dogs (2 normal and 7 dystrophic dogs) from 10 days to 8 months of age received L-Arginine (500 mg/kg to 1g/kg) daily delivered intravenously or intraperitoneally for 3 to 11 months, 2 dystrophic dogs received Phosphat Buffer Saline (control dogs). The effect of the treatment was evaluated by a daily clinical examination, weekly biochemical assays including creatinine kinase and a monthly muscular test. Light microscopy analysis, utrophin and dystrophin-associated-glycoproteins immunocytochemistry coupled with end-plate and vessels immunostaining were performed on muscle sections prepared from biceps femoralis (mildly affected) and/or sartorius (severely affected) biopsies taken before and during treatment.**

In our study, the evolution of GRMD was not modified by treatment when compared to control dogs. The same level of pathological features including; necrotic/regenerative fibers, hyaline fibers, macrophagic infiltration and fibrosis (histopathologic index) was observed in both untreated and treated GRMD dogs. Whatever the treatment, utrophin was overexpressed at the sarcolemma of GRMD myofibers, while it was restricted to the motor end plate in the untreated normal dogs. However, in the treated normal dogs utrophin expression was slightly elevated around the muscle fiber but never as high as in the GRMD muscle.

**In GRMD dogs, in our study, the treatment by a NO donor such as L-arginine does not result in an utrophin overexpression that modifies the clinical time course of the disease.**

Key Words: Duchenne Muscular Dystrophy – dystrophin – utrophin – L-arginine – dog

### JURY:

President : Pr

Director : Dr BLOT

Assessor : Pr ENRIQUEZ

Guest : Dr ESCRIOU

### Author's Adress:

Mr KERHOAS Jean-Marie

6, rue Pierre Curie

94700 Maisons Alfort