

TABLE DES MATIERES

ANALYSE IN VIVO DE LA REGENERATION MUSCULAIRE SPONTANEE ET MORPHOLOGIE DES PLAQUES MOTRICES CHEZ LE CHIEN CNM

INTRODUCTION	7
1^{ère} PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
INTRODUCTION.....	9
CHAPITRE I : PRESENTATION DE LA CNM.....	11
A. Le tableau clinique.....	11
B. L'examen neurologique.....	14
C. Les examens biochimiques.....	14
D. Le diagnostic.....	20
E. Questions et objectif de l'étude.....	21
CHAPITRE II : LA REGENERATION MUSCULAIRE	21
A. La myogenèse	23
1. Myogenèse <i>in vitro</i>	23
2. Myogenèse <i>in vivo</i>	24
a) Embryogenèse – Myotubes primaires et secondaires.....	24
b) Apparition de l'innervation.....	25
c) La synthèse de myosines.....	26
d) Les gènes et facteurs de régulation de la détermination et de la différenciation musculaire.....	26

B. La régénération musculaire	27
B1) Le mécanisme de la régénération	27
1) La dégénérescence ou nécrose des fibres matures.....	28
a) Phase intrinsèque	
b) La dégénérescence extrinsèque	
2) La revascularisation.....	29
3) Formation de nouvelles fibres.....	29
B2) Les cellules satellites	30
1) Localisation et distribution.....	30
2) Structure.....	31
3) Le nombre.....	31
4) Les rôles des cellules satellites.....	32
5) Les gènes de régulation myogénique.....	32
6) Les facteurs de régulation des cellules satellites durant la régénération....	33
7) Origine somitique des cellules satellites.....	35
8) Les autres sources de myoblastes.....	36
9) Les cellules satellites : cellules monopotentes ou pluripotentes.....	36
C. Les plaques motrices et l'innervation lors de la régénération	38
D. Les marqueurs de la régénération	40
D1) Une protéine contractile : la myosine	40
D2) Les protéines de surface :	43
1) La M-Cadhérine.....	43
2) La NCAM.....	44
D3) Les filaments intermédiaires :	45
1) La desmine.....	45

2) La vimentine.....	48
3) La nestine.....	49
2^{ème} PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE.....	51
CHAPITRE I : ETUDE DU PROCESSUS DE REGENERATION	53
I. ANIMAUX , MATERIEL ET METHODES	53
A. Animaux inclus dans l'étude	53
B. Etude du tissu musculaire	59
1. Biopsies musculaires.....	59
2. Congélation et conservation des prélèvements.....	59
3. Traitement des échantillons musculaires.....	60
a) Coloration Hématoxyline / Eosine.....	60
b) Analyse quantitative des signes de régénération.....	61
II. RESULTATS	62
CHAPITRE II : MORPHOLOGIE DES PLAQUES MOTRICES	71
I. ANIMAUX, MATERIEL ET METHODES	71
A. Animaux inclus dans l'étude	71
B. Etude des plaques motrices : étude <i>in toto</i>.....	71
1. Prélèvements musculaires.....	71
2. Traitement des prélèvements.....	71
a) Méthode de Koëlle et Friedenwald.....	71
b) Immunohistochimie – Coloration des plaques motrices.....	71
c) Analyse morphologique.....	72

II. RESULTATS :.....	73
3^{ème} PARTIE : DISCUSSION	77
CHAPITRE I :LA REGENERATION CHEZ LES CHIOTS CNM	77
A. Etude de la régénération par la coloration HE	
1) Le bilan de l'étude.....	77
2) Critique de la méthode.....	78
B. Utilisation de l'immunohistochimie dans l'étude de la régénération	79
1) La myosine néonatale	79
2) La M-Cadhérine.....	80
3) La NCAM.....	80
4) La desmine.....	80
5) La vimentine.....	81
6) La nestine.....	81
CHAPITRE.II :LA MORPHOLOGIE DES PLAQUES MOTRICES CHEZ LES CHIENS CNM	83
A. Bilan de l'étude	83
1) Le bourgeonnement axonal.....	83
2) La fragmentation des plaques motrices.....	83
B. Les connaissances antérieures sur le système nerveux périphérique	84
1) Un système nerveux périphérique normal chez les chiens CNM.....	84
2) L'électrophysiologie musculaire.....	84
C. Critique de la méthode	84
CONCLUSION	85

TABLES DES ILLUSTRATIONS

TABLE DES FIGURES :

Figure 1 : Comparaison des phénotypes des chiens CNM et des chiens sains.....	13
Figure 2 : Histologie comparée à partir de coupes transversales de biceps fémoraux prélevés chez des animaux sains et malades de 3,5 mois.....	17
Figure 3 : Histologie comparée à partir de coupes transversales de biceps fémoraux prélevés chez des chiens sains et malades de 54 mois.....	19
Figure 4 : Résumé des événements moléculaires responsables de l'activation des cellules satellites au cours de la régénération musculaire.....	34
Figure 5 : Schéma de la molécule de myosine.....	41
Figure 6 : Pedigree de la colonie de Labradors ENVA.....	53
Figures 7 : Phénotype comparé de chiots Labradors atteints et sains.....	55 et 57
Figure 8 : Répartition des pourcentages de fibres en régénération en fonction de l'âge (Graphique).....	65
Figures 9 : Photos de biopsies de chiots CNM et sains à différents âges.....	67, 68 et 69
Figures n°10 : Plaques motrices chez un chien témoin et un chien mutant de 58 mois. Biceps fémoraux. Méthode de Koëlle et Friedenwald.....	74
Figures n°11 : Plaques motrices de biceps fémoral de chiens de 58 mois marquées à l'aide de l'alpha-bungarotoxine (fluorescence rouge) et d'un anticorps dirigé contre la fasciculine (fluorescence jaune – verte).....	75
Figures 12 : Plaques motrices marquées à l'aide de l'α-BGT (fluorescence rouge) et d'un anticorps dirigé contre les neurofilaments (fluorescence verte) de l'axone. Biceps fémoral de chiens de 58 mois.....	75

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Chiens inclus dans l'étude de la régénération spontanée.....	59
Tableau 2 : Analyse quantitative chez les chiots de 4 mois.....	63
Tableau 3 : Analyse quantitative chez les chiots de 5 mois.....	64
Tableau 4 : Analyse quantitative chez deux chiots CNM.....	64
Tableau 5 : Chiens inclus dans l'étude morphologique des plaques motrices.....	71

ANNEXES.....	87
ANNEXE 1 : Synthèse bibliographique concernant les différents arguments en faveur des deux hypothèses.....	89
ANNEXE 2 : Synthèse bibliographique des différents arguments en faveur des deux hypothèses – thèse S. BLOT 1996.....	91
ANNEXE 3 : Coupe transversale de muscle en microscopie électronique.....	93
ANNEXE 4 : Coupe longitudinale de muscle strié – Coloration HE.....	93
ANNEXE 5 :Cellule satellite au microscope électronique.....	95
ANNEXE 6 : Tableau récapitulatif de l’expression des différentes molécules marqueurs de la régénération.....	97
ANNEXE 7 : Techniques de coloration des plaques motrices.....	98 et 99
ANNEXE 8 : Immunoréactivité à la desmine chez des Labradors mutants et témoins.....	101
ANNEXE 9 : Plaque motrice d’un chien CNM en microscopie électronique.....	103
ANNEXE 10 : Etude électrophysiologique chez les chiens CNM : les potentiels polyphasiques de réinnervation.....	105
BIBLIOGRAPHIE.....	109

LISTE DES ABREVIATIONS

α-BGT	Alpha-Bungarotoxine
AChE	Acétylcholinestérase
AChR	Récepteur à l’AcétylCholine
CNM	CentroNuclear Myopathy
ENVA	Ecole Nationale Vétérinaire d’Alfort
FGF	Fibroblast Growth Factor
HE	Hématoxyline / Eosine
JNM	Jonction NeuroMusculaire
M-CADH	M-Cadhérine

INTRODUCTION

En médecine vétérinaire, de très nombreuses affections neuromusculaires ont été décrites, mais elles sont très rarement diagnostiquées. Elles sont classées communément en deux grands types d'affections : les myopathies qui impliquent un dysfonctionnement des fibres musculaires non lié à une anomalie neurologique, et les neuropathies qui résultent de lésions du système nerveux périphérique ou central.

Bien qu'il semble facile de définir et de classer les affections neuromusculaires en fonction du niveau lésionnel primitif, les symptômes sont souvent similaires, parfois discrets et surtout non spécifiques. La faiblesse musculaire est le signe le plus récurrent. Les cliniciens sont donc amenés à réaliser des examens complémentaires. La méconnaissance de la physiopathologie d'une affection entrave le diagnostic de myopathie ou de neuropathie en raison de l'imbrication du tableau lésionnel.

La liste des myopathies héréditaires s'allonge. De ce fait, de nombreuses études sont entreprises afin d'élucider les mécanismes pathologiques, qui permettront l'élaboration de nouvelles techniques thérapeutiques. Par ailleurs, ces descriptions chez l'animal sont nécessaires pour révéler des modèles transposables à des maladies humaines.

Cette étude contribue aux travaux de recherche sur la myopathie centronucléaire du Labrador Retriever. Cette affection neuromusculaire congénitale héréditaire se caractérise par une faiblesse musculaire accompagnée d'une atrophie généralisée des muscles squelettiques responsable de troubles de la posture, de la locomotion et d'une aréflexie tendineuse. L'histologie met en évidence une inégalité de calibre des fibres musculaires, une prédominance des fibres de type I et une augmentation du nombre de fibres possédant des noyaux centraux. Le mécanisme physiopathogénique reste inconnu. La myopathie centronucléaire du Labrador Retriever semble être un modèle phénotypique de la myopathie centronucléaire humaine.

Cette étude s'inscrit dans le cadre de travaux recherchant le mécanisme expliquant les symptômes et les anomalies histologiques constatés dans cette maladie. Notre objectif est d'étudier la régénération spontanée des fibres musculaires chez de jeunes chiens myopathes

afin de répondre aux questions suivantes: s'agit-il d'un processus de nécrose / régénération comme dans la myopathie dystrophique du Golden Retriever ? La centralisation nucléaire est-elle le signe d'une forte régénération perturbée ?

Le second objectif est d'observer les plaques motrices ou jonctions neuromusculaires des chiens myopathes à l'aide de l'immunohistochimie et de répondre à la question suivante: existe-t-il des anomalies morphologiques des plaques expliquant les modifications des électromyogrammes des chiens atteints ?

Dans la partie bibliographique, nous rappellerons les connaissances acquises sur la myopathie centronucléaire du Labrador Retriever. Nous nous attarderons sur le processus normal de régénération musculaire. Puis nous observerons la régénération musculaire spontanée chez de jeunes chiots myopathes et témoins, ainsi que la morphologie des plaques motrices. Les résultats seront discutés dans un troisième partie.

1^{ère} PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION

L'objectif de cette étude bibliographique est de résumer les connaissances sur la myopathie centronucléaire du Labrador Retriever et sur le mécanisme de régénération musculaire.

La myopathie centronucléaire se révèle comme une entité nouvelle en raison de l'originalité de son processus pathologique. Elle ne peut être classée parmi les myopathies les mieux connues en raison de l'absence de certaines similitudes : les myopathies dystrophiques (celle du Golden Retriever s'apparentant à la myopathie de Duchenne chez l'Homme) très étudiées, les myasthénies, les myopathies inflammatoires, les myopathies métaboliques et les myopathies congénitales. (5,7)

CHAPITRE I : PRESENTATION DE LA CNM

La myopathie centronucléaire du Labrador Retriever (CNM, canine CentroNuclear Myopathy) est une affection neuromusculaire héréditaire à transmission autosomique récessive (5, 7, 36). Le terme « centronucléaire » qui a été employé pour qualifier cette myopathie fait référence à une anomalie histologique des fibres musculaires striées : la position centrale des noyaux dans un grand nombre de fibres. Cette myopathie canine présente en outre des similitudes cliniques, électrophysiologiques et histologiques avec la myopathie centronucléaire humaine (5, 36).

En 1991, à la suite de la présentation à l'ENVA d'un chien atteint d'une maladie neuromusculaire, fut décrite la myopathie centronucléaire du Labrador. Cette affection fut parfois classée dans la littérature parmi les myopathies dystrophiques définies histologiquement par une dégénérescence chronique associée à une régénération des fibres musculaires et une fibrose progressive. Les anglo-saxons furent les premiers à observer une myopathie héréditaire du Labrador Retriever (MHLR). Celle-ci fut décrite en 1976 par

KRAMER aux Etats unis, en 1984 par McKERRELL au Royaume-Uni et en 1988 par WATSON en Australie (7, 11, 25, 26, 44). La myopathie centronucléaire s'apparente à la MHLR en raison de nombreuses similitudes : les tableaux cliniques et neurologiques sont identiques. Les anomalies histologiques du tissu musculaire sont voisines, le seul point de divergence réside dans l'observation d'un processus de nécrose dans la MHLR qui n'est pas retrouvé dans la CNM (point sur lequel nous reviendrons plus en détail au cours de cette étude) (11, 22, 26, 27). Une évaluation génétique permettrait de confirmer ou d'infirmer l'identité des deux affections

A. Tableau clinique :

Les symptômes apparaissent chez les chiots vers l'âge de 3 à 7 mois (5, 36). Les manifestations cliniques sont similaires mais l'âge d'apparition et la gravité des signes sont variables (d'un simple handicap locomoteur à la tétraparésie). Les chiots atteints au sein d'une

même portée peuvent être dépistés par l'étude des courbes de poids, les animaux atteints présentant très tôt un retard pondéral (5, 7, 36).

Les symptômes majeurs sont la faiblesse locomotrice, des anomalies de posture et des troubles de la locomotion, une fatigabilité plus ou moins importante selon les chiens, pouvant induire un effondrement brutal après un effort ou un déplacement forcé. Une atrophie musculaire généralisée (des muscles temporaux, des muscles du tronc et des membres) apparaît et donne une silhouette élancée. Les anomalies posturales se traduisent par une ventroflexion ou le port de la tête anormalement bas, une hyperextension des carpes, des jarrets droits, un écartement exagéré des doigts (Figure 1). La démarche est raide, les foulées sont courtes et lors de la course les deux membres postérieurs s'engagent en même temps à la manière d'une course de lapin (5, 7, 8, 36).

L'évolution des symptômes est lente et la maladie se stabilise entre 6 et 12 mois. Néanmoins, le froid, le stress et l'exercice prolongé peuvent entraîner une aggravation transitoire qui parfois immobilise les animaux en décubitus pendant plusieurs heures (5, 7, 8, 36).

L'espérance de vie apparaît inchangée par la maladie. En particulier le myocarde n'est pas atteint contrairement à la plupart des myopathies dystrophiques(5, 8).



Figure 1a :
Labrador témoin de 2ans



Figure 1b : Labrador mutant, 2 ans.
Il présente une silhouette élancée,
une amyotrophie généralisée, un
port bas de la tête, des jarrets
droits.



Figure 1c : Cette photographie
d'un chien mutant montre bien la
modification importante du faciès
consécutive à une amyotrophie
des muscles temporaux.

Figures 1 : Comparaison du phénotype des chiens CNM avec celui des chiens sains.

B.Examen neurologique :

La vigilance et l'état de conscience de ces chiens sont normaux. Ils sont parfaitement vifs et alertes.

Aucun déficit de réactions posturales n'est observé (36). Cependant, on peut noter parfois un léger ralentissement des réponses, imputable à l'état de faiblesse des animaux les plus atteints (5, 8).

La particularité qui démontre le caractère congénital de cette myopathie est l'absence de réflexe tendineux (et en particulier du réflexe fémoro-patellaire) ou une nette diminution chez les animaux faiblement atteints (8, 36). Il s'agit du signe clinique le plus précoce et fiable. Il permet de dépister les animaux malades d'une portée à l'âge de 1 mois, âge de l'apparition normale des réflexes courts (5).

Le système neurovégétatif ne montre pas de dysfonctionnement. Cependant, il a été décrit le développement d'un mégaoesophage chez certains chiens. Il semblerait donc qu'il apparaisse avec le vieillissement, des mégaoesophages subcliniques (5, 7, 8, 36). Ceci est confirmé au sein de la colonie de l'ENVA : un tiers des chiens présentent un mégaoesophage subclinique et chez certains chiens myopathes des symptômes sont apparus.

C.Examens biochimiques :

Ils ne présentent aucune anomalie sauf une augmentation modérée des créatines kinases (aux alentours de 500 UI/L, la norme étant inférieure à 130 UI) mais de façon non systématique (8, 36).

D.Diagnostic :

Deux examens complémentaires permettent de confirmer la suspicion clinique d'une maladie neuromusculaire :

L'électromyographie révèle fréquemment une activité spontanée anormale dans la majorité des groupes musculaires. On observe des phénomènes variés d'activités électriques spontanées : des potentiels de fibrillation, des ondes positives lentes, des potentiels de fasciculation, des décharges complexes répétitives traduisant une atteinte neuromusculaire (7, 8, 36).

L'histologie des fibres musculaires :

Malgré la disparité des signes et des stades cliniques observés entre les animaux malades (8), on retrouve une unité dans les anomalies histologiques. On observe de plus une évolution en fonction de l'âge.

Chez les chiens jeunes âgés de 4 à 7 mois [Figure 2 et (5, 36)] :

On remarque surtout l'inégalité de calibre des fibres musculaires. Fréquemment on retrouve des fibres atrophiques anguleuses ou rondes regroupées parfois en îlots et quelques fibres hypertrophiques (fibres aussi bien de type I que de type II). Les images de nécrose sont très rares contrairement aux descriptions faites dans la MHLR. Occasionnellement, dans les deux types de fibres (I ou II), on peut observer des centralisations nucléaires (0% à l'âge de 4 mois, 5% à 6-7 mois) (5, 33). Il y a très peu de modifications du tissu conjonctif endomysial et périnysial. L'altération de l'architecture intermyofibrillaire débute : l'emploi de la coloration Hématoxyline / Eosine fait apparaître de rares taches centrales sombres dans les fibres atrophiques.

Chez les chiens adultes [Figure 3 et (5, 8, 36)] :

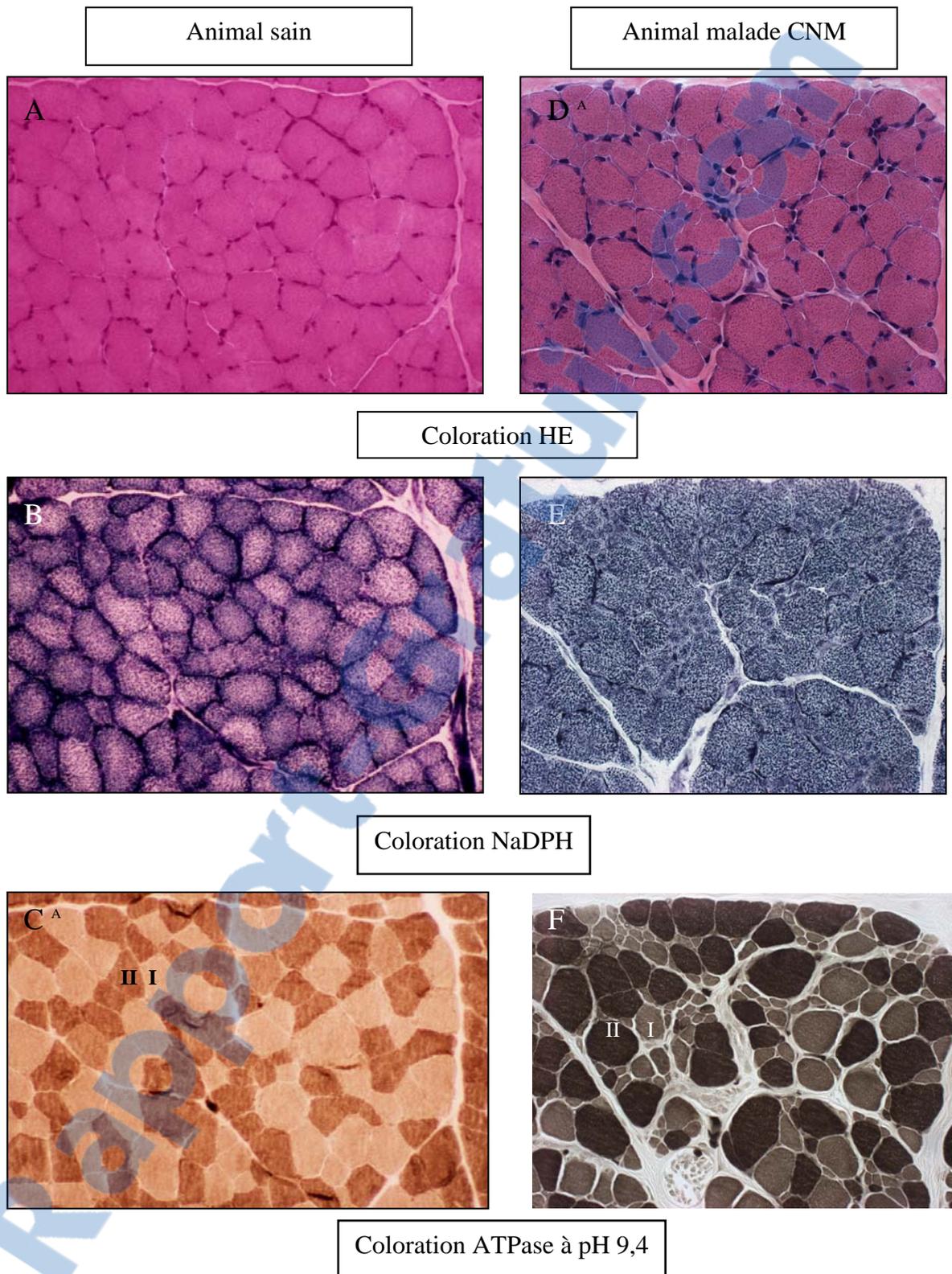
On retrouve l'inégalité de calibre mais les écarts sont plus atténués. Le tissu conjonctif interstitiel s'est développé et des adipocytes occupent la place des fibres atrophiées. Aucun signe de nécrose ou d'inflammation (infiltrats focaux de cellules inflammatoires, fibres fantômes) n'est visible. On retrouve également les anomalies architecturales avec l'apparition de figures géométriques centrales (en pointillés) et de couronnes périphériques. Les colorations oxydatives (NADPH) mettent en évidence des anomalies et une activité oxydative irrégulière des fibres : les fibres atrophiques présentent une réactivité centrale, des couronnes entourant un halo périnucléaire ou des formes radiées sont visibles (Figure 3D).

La formule histochimique est également altérée puisqu'elle présente un déficit en fibres musculaires de type II.

Chez les malades le pourcentage de fibres possédant un ou plusieurs noyaux en position centrale, pour un muscle donné, est plus important chez les adultes (28.5% à 34 mois) que chez les jeunes (0 % à 4 mois, 5% à 6-7 mois). Il y a une augmentation constante avec l'âge selon une corrélation positive de 0.84. (5)

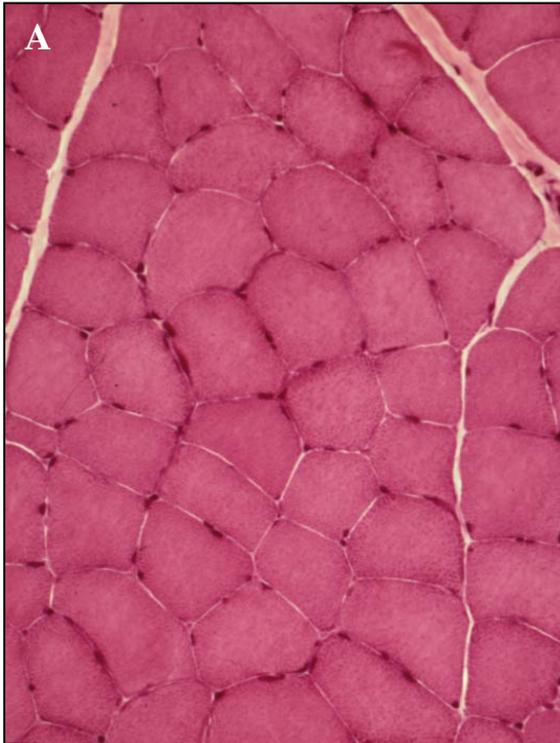
Cette entité pathologique, bien que clairement définie sur les plans clinique, neurologique et histologique, reste obscure malgré de nombreuses études sur sa physiopathogénie. De nombreuses questions restent en suspens.

Les chiens atteints sont détectés précocement grâce au retard pondéral et l'absence de réflexe tendineux.

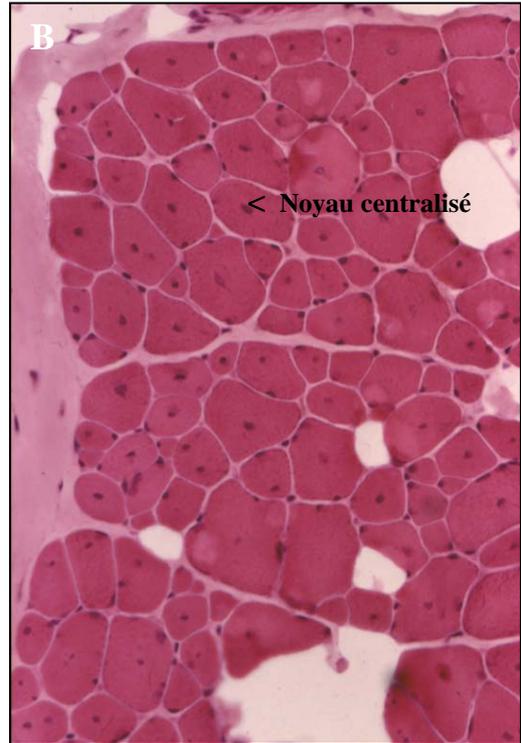


Figures 2 : Histologie comparée à partir de coupes transversales de biceps fémoraux prélevés chez des animaux sains et malades CNM de 3,5 mois.

Animal sain

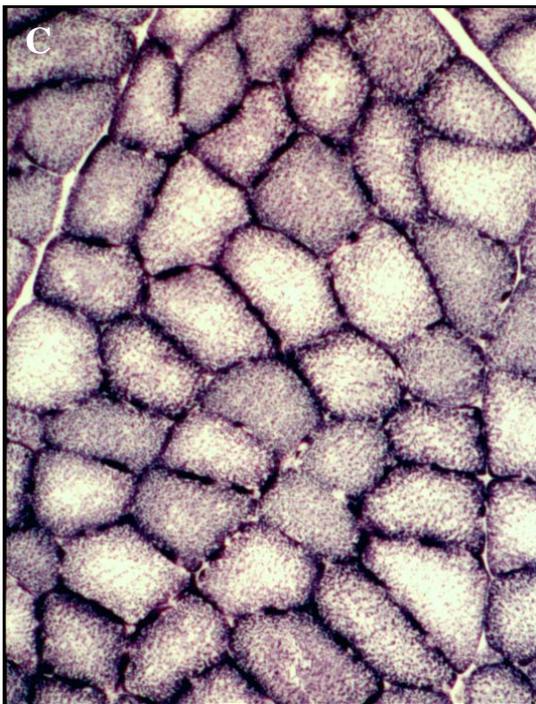


Animal malade



Inégalité de calibre, tissu conjonctif développé.

Coloration HE



Coloration NaDPH

Figures 3 : Histologie comparée à partir de coupes transversales de biceps fémoraux prélevés chez des chiens sains et malades CNM de 54 mois.

E. Questions, objectif de l'étude : (Annexe 1)

Quelle est l'origine de la faiblesse musculaire ? Que signifient l'altération de la formule histochimique, l'importante centralisation des noyaux à l'âge adulte et la désorganisation structurale du cytosquelette ? A-t-on affaire à une neuropathie ou une myopathie ? S'agit-il d'un processus de nécrose / régénération musculaire comme le suggèrent les anglo-saxons dans la MHLR ?

Bien que ces signes puissent être parfois retrouvés lors de processus de dénervation chronique, l'association des signes de nécrose et de régénération, bien connue dans la myopathie dystrophique du Golden Retriever, indiquerait une myopathie primaire. Dans ce cas, la centralisation des noyaux serait le signe d'une importante régénération inachevée. Viennent alors les questions : quand aurait lieu cette nécrose que nous ne visualisons pas sur les coupes de muscles ? Aurait-elle lieu à bas bruit ? Etant donné que l'expression des marques de la régénération persiste plus longtemps que les signes de nécrose, il serait intéressant d'essayer de mettre en évidence une forte activité régénératrice des cellules musculaires chez les jeunes animaux de moins de six mois. Car on observe l'apparition d'une centralisation de cinq pour cent vers six mois chez les jeunes chiens atteints par la mutation. Il est justifié également de retenir l'hypothèse d'une neuropathie périphérique chronique héréditaire puisque la majorité des altérations morphologiques s'observent aussi bien dans les neuropathies que les myopathies et d'autant plus que la maladie est chronique. (5, 7)

CHAPITRE II : LA REGENERATION MUSCULAIRE

Introduction

La régénération est la reconstruction d'un tissu ou d'une partie d'un organe après sa destruction ou sa perte. Cette capacité à restaurer l'intégrité structurale et fonctionnelle d'un tissu ou d'un organe après une lésion est essentielle pour la survie.

En médecine, les lésions tissulaires peuvent avoir des origines très diverses. Il peut s'agir de dommages induits par des facteurs infectieux, chimiques, thermiques, être la conséquence de radiations, d'hémorragies, de traitements médicaux, du vieillissement, de la malnutrition et de maladies métaboliques ou génétiques.

Il est indispensable de savoir comment chaque tissu ou organe se comporte et réagit face à un traumatisme afin d'optimiser les traitements de soutien de cette régénération et de comprendre certains mécanismes physiopathologiques.

Les premiers documents évoquant la capacité d'un muscle squelettique mature à se régénérer datent de la seconde moitié du XVIII^{ème} siècle. Les investigations du XIX^{ème} montrent que le muscle a un pouvoir de régénération après des dommages chimiques ou physiques, les plus importants travaux sont ceux de Zenker (1864), Waldeyer (1865), Weber (1867), Newman (1868) et Volkmann (1893) [cités dans (2, 19)]. Leurs observations sont bien connues et ont été confirmées par beaucoup de travaux récents. Il existe beaucoup de descriptions du phénomène de régénération après un préjudice, un dommage musculaire ou une transplantation mais les interactions cellulaires qui contrôlent ce processus restent inconnues. Le succès de la régénération varie avec la nature de la blessure et l'étendue de la lésion primitive. Dans toutes les situations, le processus évolue par une revascularisation, une infiltration cellulaire, une phagocytose du muscle nécrosé, une prolifération des cellules musculaires précurseurs, la fusion aux extrémités des fibres endommagées ou la formation de myotubes, une maturation et finalement une réinnervation.

Les développements récents de la biologie cellulaire et moléculaire ont fourni d'importants éclaircissements sur les rôles des facteurs de croissance, les interactions, les événements complexes du contrôle de la régénération.

Beaucoup d'études ont tout d'abord porté sur les cultures tissulaires afin de comprendre les processus *ex vivo* puis sur des modèles animaux transgéniques permettant d'étendre et de transposer connaissances à l'échelle de l'organisme entier.

A. La myogenèse :

La myogenèse est le processus de formation du tissu musculaire. Elle a lieu durant le développement fœtal et lors de la régénération du muscle adulte. La myogenèse fut d'abord étudiée *ex vivo*. Il est actuellement admis que les mécanismes anatomiques ou moléculaires de la régénération musculaire sont très proches de ceux gouvernant le développement musculaire embryonnaire. Etant donné que le processus de régénération apparaît plus complexe, la compréhension dans un premier temps du développement musculaire est importante afin d'apprécier dans un second temps les processus cellulaires et moléculaires de la régénération.

1. Myogenèse *ex vivo* : (32):

La dissociation mécanique et chimique (traitement par les trypsines) de tissu musculaire néonatal de quelque espèce que ce soit libèrent des cellules mononucléées souvent bipolaires et fusiformes qui mises en culture engendrent des fibres musculaires. Ces cellules mononucléées n'expriment aucune protéine de cellules musculaires matures et leur pouvoir mitotique permet la prolifération des cellules dans les stades précoces de la myogenèse. Elles sont qualifiées de myoblastes présomptifs. L'activité mitotique est contrôlée par le facteur de croissance fibroblastique (FGF) et le facteur de croissance Insuline-like Growth Factor (IGF) (32).

Les cultures en présence de sérum fœtal, riche en facteurs de croissance, ont une prolifération rapide. La surface de culture se couvre de myoblastes et grâce à la fibronectine, l'alignement cellulaire s'amorce et induit l'étape suivante : la fusion cytoplasmique des myoblastes formant un syncytium appelé myotube. L'évolution ultérieure est marquée par la synthèse de protéines spécifiques (protéines myofibrillaires) et la croissance des myotubes grâce à la fusion de myoblastes post mitotiques. Les myotubes finissent par mourir avant de devenir des fibres musculaires matures. Néanmoins, la co-culture avec des explants de corde spinale, permet de maintenir les cultures plusieurs mois, et d'observer la différenciation en fibres musculaires capables d'exprimer le phénotype adulte. Les motoneurones forment des jonctions neuromusculaires avec les myotubes et permettent leur différenciation.

2. Myogenèse *in vivo* : (6, 21, 32)

a) Embryogenèse - myotubes primaires et secondaires :

Les myoblastes, cellules mononucléées, précurseurs du muscle sont dérivés du mésoderme de l'embryon. Le processus de myogenèse commence lorsque les cellules du mésoderme paraxial (bandes de mésoderme situées à côté de la notochorde et du tube neural) s'engagent dans la lignée myogénique plutôt que dans la lignée fibroblastique ou chondroblastique sous l'action des facteurs de régulation tels que Myf 5, MyoD1, myogénine (21).

Une fois engagées, les cellules souches myogéniques migrent sous la direction de facteurs environnementaux, de la matrice extracellulaire de collagène et ses fibronectines. Au départ ces cellules souches sont dépourvues de toute détermination région-spécifique. Par exemple, lorsque des somites d'origine cervicale sont greffés à la place de somites thoraciques en région brachiale, ils donnent des muscles de membre (expériences réalisées chez des embryons de poulets et de cailles). Inversement les somites brachiaux, greffés à la place de somites cervicaux, donnent naissance à la musculature de la tête et du cou (21, 32). C'est donc le site d'implantation après la greffe qui contrôle la destinée des cellules souches mésodermiques.

Après migration, elles s'isolent et prolifèrent. Les myoblastes sortent du cycle cellulaire et s'alignent pour former des myotubes. Le territoire anatomique d'un muscle est imposé par le tissu conjonctif quand les premières fibres sont formées. Pendant la myogenèse, deux vagues temporellement distinctes de formation de myotubes se produisent. Très tôt, il apparaît des myotubes qualifiés de primaires qui fournissent en quelque sorte un échafaudage pour muscle mature et établissent les territoires anatomiques de la musculature. Autour des myotubes primaires souvent groupés par trois, on retrouve des cellules souches mononucléées. Puis, chaque myotube primaire s'isole en s'entourant de quelques cellules souches. Une membrane basale commune les entoure. C'est à l'intérieur de cette membrane que se développent les myotubes secondaires à partir des cellules mononucléées. Par conséquent, le nombre de fibre augmente. Cette phase de la myogenèse est très sensible à l'innervation, sans laquelle peu de myotubes secondaires se forment. Durant cette formation

les myotubes secondaires sont connectés avec les fibres primaires parentes via des connexions (jonctions de type gap).

L'étape suivante est caractérisée par la croissance et la maturation des myotubes en fibres musculaires. La maturation s'accompagne de la migration des noyaux en périphérie qui se trouvaient jusqu'à présent en enfilade au centre des myotubes. Les myotubes secondaires deviennent innervés, se différencient en fibres musculaires et forment leur propre lame basale. Les cellules mononuclées persistent en dessous des membranes et sont à l'origine des cellules satellites que nous définirons plus loin.

Les stades du développement foetal auxquels se forment les fibres primaires et secondaires varient selon l'espèce animale. Chez le Rat, les fibres primaires des membres apparaissent au quatorzième jour de gestation et les fibres secondaires sont détectées aux alentours du dix-huitième jour. A la naissance, les muscles de rat sont très immatures mais rapidement ils changent et sont matures à trois ou quatre semaines de vie. Par contre, les muscles d'un cochon d'inde nouveau-né sont très avancés dans leur développement. Chez l'embryon humain, les myotubes primaires se forment vers la neuvième semaine de gestation, les myotubes secondaires se forment vers la douzième semaine. Au moment de la naissance, les muscles sont à un stade très avancé du développement et deviennent pleinement matures à l'âge d'un mois. Beaucoup d'animaux peuvent marcher très vite à la naissance car les muscles sont très précoces.

Pour une grande majorité des espèces animales comme le Mouton et l'homme, une troisième vague de formation de fibres (myotubes tertiaires) vient augmenter le nombre total de fibres pour un muscle donné.

b) Apparition de l'innervation

Les motoneurones atteignent le muscle au moment de la formation des fibres primaires. Ils forment des jonctions neuromusculaires (JNM) à mi-longueur des fibres. Quand les fibres secondaires apparaissent, des collatérales axonales innervent les fibres secondaires (32, 35).

Initialement, les plaques motrices reçoivent l'innervation de plusieurs axones, on parle d'innervation polyneurale. Au cours de la maturation des fibres, les terminaisons axonales secréteraient un facteur nécessaire à la formation des myotubes secondaires à partir des myoblastes.

c) Synthèse de myosines (32)

Durant le développement du muscle squelettique, il y a une expression séquentielle de myosines sous différentes isoformes. Les myotubes expriment initialement l'isoforme embryonnaire puis l'isoforme fœtale. Ces isoformes sont associées à une contraction lente. Ces formes sont remplacées plus tard par un isoforme adulte rapide ou lente conférant à chaque type de fibres des propriétés contractiles différentes (type I, IIa , IIb).

d) Les gènes et facteurs de régulation de la détermination et de la différenciation (19, 21)

Les cellules mésodermiques multipotentes suivent un processus de détermination qui les engage dans la voie de la différenciation musculaire en devenant des cellules myogéniques. Plus tard ces cellules suivent un autre processus de différenciation durant lequel elles prolifèrent, fusionnent en myotubes et expriment des myofibrilles. Une série de découvertes récentes a montré que la détermination et la différenciation sont contrôlées par l'expression de gènes de facteur de régulation musculaire appelés Myf5, MyoD (découvert en 1987), Myogénine et MRF4 (Muscle Regulatory Factor 4). Il y a une différence spatiale et temporelle dans l'expression de ces gènes. Les cellules musculaires en culture exprimant MyoD et Myf5 prolifèrent en myoblastes, par contre la transcription de myogénine augmente lors de la formation des myotubes.

Les rôles de ces facteurs de régulation qui sont bien définis pendant l'embryogenèse sont encore inconnus dans le muscle squelettique postnatal. Mais les techniques transgéniques pour ces facteurs myogéniques apporteront des réponses.

Le développement du muscle squelettique des mammifères commence durant les stades précoces embryonnaires et continue après la naissance. Les cellules multipotentes du mésoderme s'engagent dans la lignée myogénique en réponse aux signaux locaux des tissus adjacents. Un certain nombre de ces cellules destinées à devenir musculaires ne se différencient pas immédiatement. Une multitude de signaux intrinsèques et extrinsèques contrôlent la myogenèse et permettent la prolifération de la population de cellules musculairement souches. Ces cellules souches sont les précurseurs des cellules satellites présentes dans le muscle adulte. Les cellules satellites participent après la naissance à la croissance, l'hypertrophie et la régénération musculaires.

B) La régénération musculaire :

B1) Le mécanisme de la régénération : (19, 32)

Certaines espèces d'amphibiens, comme l'Axolotl ont la capacité de régénérer la totalité d'un membre (le muscle, le tissu conjonctif, les vaisseaux et nerfs) à la suite d'une amputation. Chez les mammifères, la capacité du muscle squelettique à se régénérer est plus modeste mais reste tout de même considérable.

Les lésions musculaires peuvent être le résultat d'un traumatisme physique, d'une ischémie, d'un choc thermique, de l'action de toxines ou la conséquence de maladies. L'activité physique peut également entraîner des lésions musculaires. Dans tous les cas, la première réponse à une blessure tissulaire est la nécrose des fibres musculaires.

L'injection intramusculaire de toxines (venins de serpent essentiellement) a été beaucoup utilisée afin de créer des modèles vivants de régénération une lésion musculaire.

1) La dégénérescence ou nécrose des fibres matures

La dégénérescence des fibres musculaires a lieu en deux étapes distinctes et consécutives. La phase initiale intrinsèque non inflammatoire et la phase de dégénérescence extrinsèque liée à l'envahissement du site lésionnel par des cellules sanguines.

a) Phase intrinsèque (19, 32)

C'est une réponse tissulaire très rapide. Elle se met en place dès les premières heures. On observe une augmentation du calcium intracellulaire. Cet excès de calcium inhibe l'activité respiratoire des mitochondries qui se désintègrent en même temps que les autres organites cellulaires. Le calcium active également des enzymes protéolytiques qui dépolymérisent les microtubules. Il y a également une caryolyse.

C'est probablement la diminution brutale du calcium extracellulaire dans les parties non endommagées des fibres qui entraîne une forte contraction de l'extrémité de celles-ci qui sont ainsi isolées de dommages futurs. Les enzymes musculaires qui s'infiltrent dans la circulation, peuvent être détectées dans le sang périphérique. Leurs élévations (par exemple des créatines kinases) sont les signes biochimiques d'une destruction musculaire ou d'une maladie.

La lame basale reste globalement intacte à ce stade. Son intégrité est importante pour le succès de la régénération car elle sert d'échafaudage pour la formation des nouveaux myotubes et sa présence minimise la fibrose.

b) la dégénérescence extrinsèque

Le tissu nécrosé est alors envahi par les cellules inflammatoires. Les leucocytes polynucléaires sont les premiers observés puis les macrophages commencent la phagocytose. L'activation du complément par le dommage est importante. En effet, C5 est un important chémoattracteur des leucocytes. Les dérivés de l'acide arachidonique (Leukotriène B4 par exemple) libérés par la rupture des phospholipides membranaires sont également des médiateurs chémoattractants. Le contenu sarcoplasmique et les myofibrilles sont phagocytés.

Seules subsistent la membrane basale et les cellules qualifiées de cellules satellites qui vont entrer en activité.

2) La revascularisation (19)

Le succès de la formation du nouveau muscle dépend de la revascularisation. Dans les gros dommages, souvent la zone centrale ne se régénère pas et se fibrose. L'ischémie prolongée et une concentration faible en oxygène favoriseraient la formation des fibroblastes.

Beaucoup de facteurs sont connus pour stimuler la revascularisation. Les macrophages placés dans un milieu avec une faible concentration en oxygène, similaires aux conditions hypoxiques en regard des sites fortement endommagés, secrètent des facteurs angiogéniques. Un de ces facteurs est le facteur de croissance fibroblastique (FGF) qui stimule la néovascularisation *ex vivo*. Le FGF est également produit par les cellules endothéliales de façon autocrine. D'autres facteurs sont connus dont des chémoattractants et la prostaglandine E1.

3) Formation de nouvelles fibres

Après une lésion, des myoblastes nouvellement recrutés s'alignent et fusionnent en myotubes. On retrouve les mêmes séquences (qui ont lieu sans les membranes basales initiales) que durant l'embryogenèse. Pendant la maturation, une nouvelle membrane basale est formée dans les zones qui ne sont pas en contact avec l'ancienne. Les myotubes s'isolent donc avec quelques cellules mononucléées. Suit alors la phase de maturation, les noyaux situés au centre migrent à la périphérie. Leur taille diminue. La chromatine se condense en plages. L'assemblage de myofilaments se resserre. La différenciation en fibre de type I (lente) ou II (rapide) s'observe à la fin de la période de maturation et dépend du type de motoneurone qui innerve la fibre.

B2) Les cellules satellites : (2, 3, 21, 32) ANNEXE 3, 4 et 5

Les nouvelles fibres proviennent du recrutement de cellules de renouvellement présentes à l'état quiescent dans le muscle : les cellules satellites. Elles sont métaboliquement inactives. Elles ont été qualifiées de myoblastes présomptifs

1) Localisation et distribution :

Les cellules satellites ont été découvertes en 1961 par MAURO qui a mis en évidence pour la première fois l'existence de cellules mononucléées indifférenciées. Elles ont été qualifiées plus tard de cellules satellites en raison de leurs localisations en périphérie des myotubes multinucléés et des fibres matures. Elles sont situées sous la lame basale qui entoure la cellule satellite associée à la fibre. Elles ne sont présentes ni dans le muscle cardiaque, ni dans les muscles lisses.

Les cellules satellites sont distribuées le long des fibres musculaires mais certaines investigations ont montré qu'elles seraient plus fréquentes dans certains sites. Il a été dit qu'elles seraient présentes en nombre important au niveau des jonctions neuromusculaires des fibres matures et fœtales (2). Dans le muscle fœtal ou néonatal, les fibres satellites sont présentes en plus grand nombre au niveau de la terminaison des fibres afin de permettre la croissance en longueur. Elles seraient capables de migrer sous la lame basale le long de la fibre parente en réponse à un stimulus. Leur fréquente forme étoilée suggère une aptitude à la migration.

Au microscope électronique sur une section transversale de muscle, la membrane cytoplasmique des cellules satellites est séparée des fibres par une zone claire de quinze à vingt nanomètres. Aucun pont cytoplasmique n'a été rapporté.

2) Structure : (2, 21, 32) (Annexe 5)

Les cellules satellites dans le muscle strié squelettique de mammifères mesurent en général $25 \times 4 \times 5$ micromètres. Elles sont allongées, fusiformes. Leur grand axe est orienté de façon parallèle à l'axe de la fibre. Elles peuvent présenter des expansions atteignant

jusqu'à 40 micromètres de long de part et d'autre du corps cellulaire. Ainsi les îlots de cytoplasme sous les lames basales que l'on observe sur les coupes de muscles appartiendraient parfois à des cellules satellites. Le noyau est ovale en coupe transversale et mesure $10-15 \times 2-5 \times 1-3$ micromètres. L'hétérochromatine est nettement visible, ce qui aide à distinguer le noyau des cellules satellites des noyaux euchromatiques des myonucléi.

Le cytoplasme est peu abondant en volume et ne contient aucune particularité. Le rapport nucléo-cytoplasmique est élevé. Les organites cytoplasmiques sont en petit nombre. Quelques petites mitochondries, un petit appareil de Golgi, un réticulum endoplasmique peu développé, des ribosomes dispersés et parfois quelques filaments. En raison de cet aspect ultrastructural, les cellules satellites sont des cellules quiescentes.

3) Le nombre : (2, 21, 32)

Le nombre de cellules satellites est dépendant de l'espèce, de l'âge, du muscle concerné et du type de fibres. Les noyaux des cellules satellites constituent environ trente pour cent des noyaux du muscle chez le souriceau nouveau-née puis décroît avec l'âge. Le pourcentage n'est plus que de quatre pour cent environ à l'état adulte et diminue jusque deux pour cent à l'état sénile de l'animal (21). Des observations de muscles chez de jeunes rats de quatorze jours et vingt et un jours ont montré un changement dans la proportion de cellules satellites en fonction de l'âge et du type de muscle : Les pourcentages sont respectivement de 16.9 %, 17.4% et 21.2% dans les muscles tibial crânial, gastrocnémien et soleus à quatorze jours et de 9.7%, 13.4% et 10.7% à vingt et un jours de vie.

Il n'y a aucune relation apparente entre le nombre de cellules satellites et le nombre de myonucléi durant le développement fœtal et postnatal. En effet, les cellules satellites produisent par mitose les myoblastes qui alors s'additionnent continuellement au pool de myonucléi.

Néanmoins, pendant une grande partie de la vie adulte, le nombre de cellules satellites reste relativement constant (environ quatre à cinq pour cent) malgré de multiples cycles de nécrose / régénération. Cela démontre leur capacité inhérente d'autorenouvellement. Mais les mécanismes par lesquels elles s'autorenouvellent sont encore mal compris (32). Plusieurs

hypothèses ont été avancées mais non démontrées (division asymétrique, dédifférenciation des cellules précurseurs myogéniques, un auto-renouvellement Myf5 -dépendant).

Pourtant, le nombre et le potentiel de multiplication des cellules satellites deviennent sévèrement diminués dans les maladies musculaires telles que la myopathie de Duchenne, probablement dû à un niveau élevé de régénération. Les cellules sont rapidement en phase de sénescence.

4) Les rôles des cellules satellites : (3, 32)

Les cellules satellites jouent un rôle essentiel dans le processus de croissance postnatale, l'hypertrophie musculaire et la régénération musculaire.

En réponse à différents stimuli (étirements, exercices, blessures musculaires), elles sont activées, entrent dans un cycle cellulaire et se répliquent intensément en formant des myoblastes qui fusionnent ultérieurement. Ils fusionnent ensembles pour former de nouvelles fibres ou avec des fibres existantes pour en assurer leur croissance ou pour réparer les segments endommagés.

5) Les gènes de régulation myogénique : (32)

Le programme d'expression des gènes régulateurs durant l'activation, la prolifération et la différenciation des cellules satellites est analogue au programme manifesté durant le développement embryonnaire.

Les cellules quiescentes expriment le récepteur à activité tyrosine kinase c-Met (récepteur du HGF, Hepatocyte Growth Factor).

Les cellules satellites quiescentes expriment un niveau indétectable de MRFs. MyoD est rapidement exprimé dans les douze heures après le traumatisme musculaire. La myogénine est exprimée plus tard durant la période de fusion et de différenciation.

Les cellules satellites activées expriment d'abord Myf5 ou MyoD puis une co-expression des deux.

La myogénine et MRF4 sont exprimés dans les cellules en différenciation.

L'absence de détection de MRF4 dans les cellules satellites laisse suggérer qu'elles soient des cellules souches avec une identité bien distincte de celles des myoblastes.

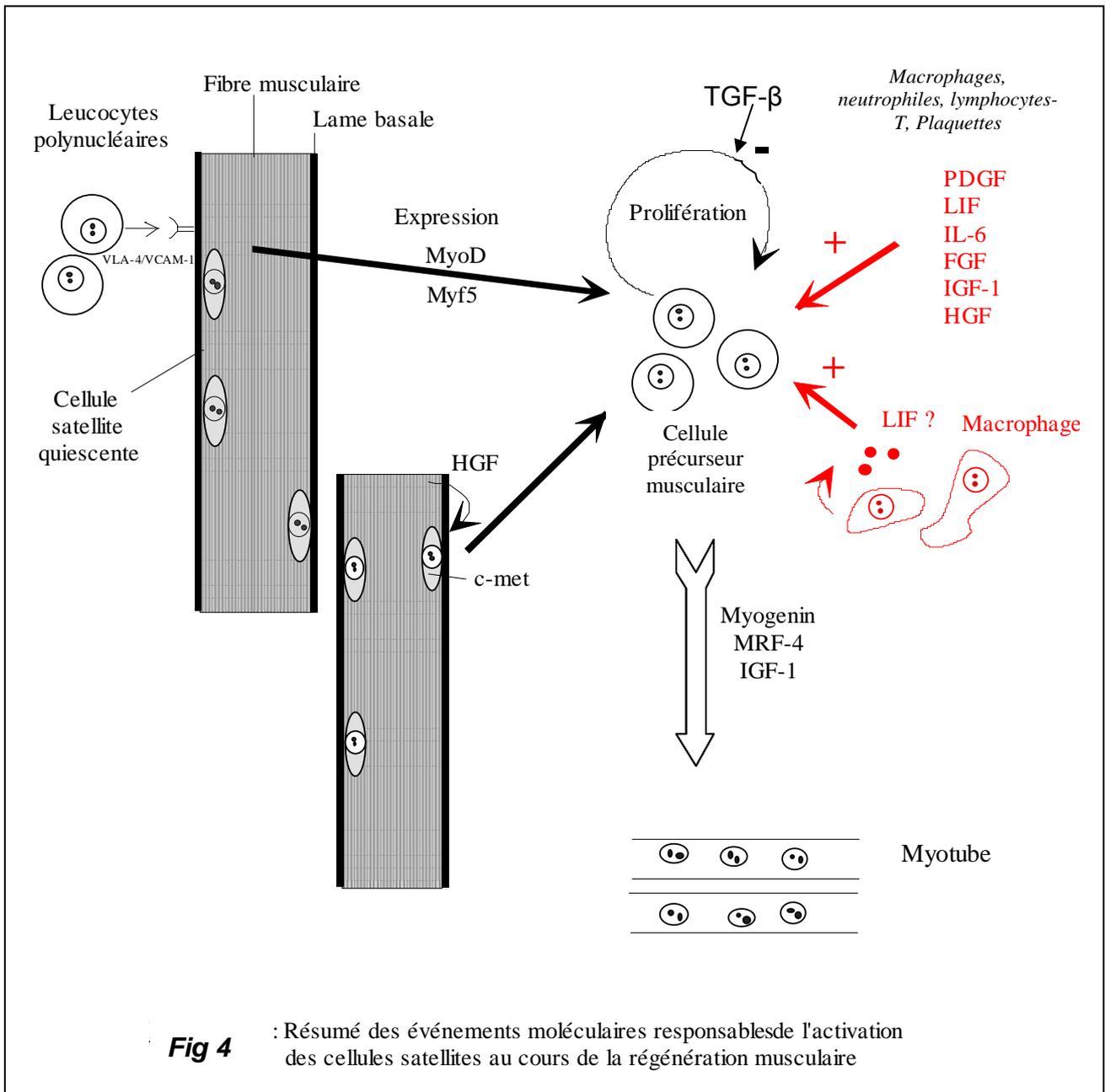
6) Facteurs de régulation des cellules satellites durant la régénération : (19, 21, 37)

Les mécanismes qui régulent l'activation des cellules satellites et leur entrée dans un cycle cellulaire ne sont pas totalement élucidés. Les cultures cellulaires ont permis d'identifier plusieurs de ces facteurs. Un nombre important d'études ont impliqué divers mécanismes incluant la réponse inflammatoire et l'action de facteurs de croissance.

Les mécanismes suivants ont été proposés :

- L'activation des cellules satellites résulterait de la fixation d'une intégrine, la VLA des leucocytes polynucléaire sur la molécule d'adhésion vasculaire VCAM-1 exprimée par les cellules satellites.
- Le HGF (Hepatocyte Growth Factor) activerait les cellules satellites par l'intermédiaire du récepteur c-Met exprimé par les cellules quiescentes. HGF serait produit par les myofibres endommagées.
- L'activation des cellules satellites entraîne l'expression de MyoD ou Myf5 et la prolifération.

Illustration : figure 4.



De nombreux facteurs sont impliqués dans la régulation de la prolifération des cellules précurseurs : HGF, PDGF, LIF (Leukemia Inhibitory Factor), IL-6 (Interleukine-6), FGF et IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1). Le TGF- β (Transforming Growth Factor β) inhibe la prolifération et la différenciation.

Beaucoup d'autres facteurs seraient impliqués dans la régulation des cellules satellites. Les facteurs de croissance plaquettaire et endothéliaux auraient également une action.

Les études *in vivo* sur l'effet des facteurs de croissance sont encore peu nombreuses.

7) Origine somitique des cellules satellites (21,32,34,37)

Il a été clairement démontré que les cellules satellites sont d'origine somitique et elles peuvent être considérées comme des cellules souches de la lignée myogénique. (32)

Différentes hypothèses sur l'origine des cellules satellites ont été proposées mais aucune n'a vraiment été démontrée :

- Les cellules satellites appartiendraient à la même lignée que les myoblastes embryonnaires. Il s'agirait de myoblastes embryonnaires entrés en état de quiescence au cours du développement.
- Les cellules satellites seraient une sous-classe de la lignée embryonnaire au même titre que les myoblastes embryonnaires.
- Une dédifférenciation des myonucléi qui se seraient séparés des fibres musculaires auraient donné les cellules satellites.
- De récents travaux (De Angelis et al., 1999) [(cités dans (21, 37))] ont suggéré que d'autres cellules multipotentes pourraient être des précurseurs myogéniques, voire des précurseurs des cellules satellites (21, 37). Des cellules isolées de l'aorte dorsale d'embryon de souris ont présenté la même morphologie et le même profil génétique que les cellules satellites. La transplantation de ces cellules chez des souriceaux nouveau-nés a participé à la croissance musculaire post-natale et à la régénération. Les auteurs ont alors suggéré que les cellules satellites dériveraient des cellules endothéliales ou auraient un précurseur commun avec les cellules endothéliales (également d'origine somitique). Le fait que les cellules dérivées de l'aorte expriment les mêmes marqueurs (myogéniques et endothéliaux) que les cellules satellites adultes conforte cette hypothèse. La présence de ces cellules myogéniques dans l'aorte dorsale embryonnaire laisse présumer d'une origine somitique indirecte des cellules satellites.

8) Les autres sources de myoblastes (autres que les cellules satellites)

(3, 32, 34,37) :

La notion que seules les cellules satellites induisent la régénération musculaire a été largement supplantée par la découverte de cellules capables de produire des lignées myogéniques.

- Il a été démontré que les fibroblastes du derme ont la capacité sous l'effet de facteurs d'engendrer une lignée myogénique.
- Des études récentes (Ferrari et al., 1998, Bittner et al., 1999) [cités dans(37)] ont montré l'aptitude des cellules de la moelle osseuse à donner des cellules myogéniques capables de participer à la régénération. Cependant, il n'est pas dit que les cellules greffées de moelle osseuse engendrent des cellules satellites. Elles sont capables de subir la différenciation terminale.
- Plus récemment, Gussoni et al. (1999) [cité dans (37)] démontrent que les cellules hématopoïétiques hautement purifiées contribuent aux noyaux des fibres régénérées après injection intraveineuse chez les souris mdx irradiées. Aucun noyau donneur n'est observé dans les cellules satellites.

Ces cellules souches, cellules qui ont gardé la possibilité de se différencier en plusieurs cellules de différentes lignées, sont une source alternative de cellule pour la régénération, mais *in vivo*, cela reste de évènements rares.

Par contre cette potentialité prend toute sa valeur dans l'optique de nouvelle thérapeutique des maladies musculaires.

9) Les cellules satellites : cellules monopotentes ou pluripotentes : (34, 37)

Ces récentes expérimentations ont soulevé d'importantes questions concernant le potentiel des cellules souches dérivant de différents tissus incluant également le muscle.

Pendant longtemps, les cellules satellites ont été considérées comme monopotentes avec le potentiel de donner seulement une lignée myogénique.

Gussoni et al (1999) [cité dans (37)] ont également purifié des cellules souches de muscles de souris adultes d'une culture cellulaire qu'ils ont injectées chez une souris irradiée. Ces cellules souches ont contribué à régénérer les myofibres. Des cellules du donneur ont été retrouvées dans les fibres musculaires du receveur. Comparativement aux cellules souches de la moelle osseuse, les cellules souches musculaires donnent des cellules satellites au niveau des fibres régénérées. De plus, les cellules souches musculaires ont reconstitué l'ensemble du système hématopoïétique. Ces expériences démontrent la pluripotentialité des cellules dérivées du tissu musculaire. Ces cellules ont la faculté d'activer des programmes génétiques en fonction de l'environnement auquel elles sont exposées.

Plusieurs questions sont alors soulevées : est-ce que ces cellules dérivées du muscle correspondent aux cellules satellites, qui ne seraient plus de simples précurseurs myogéniques ? Ces cellules pourraient être à un stade juste avant les cellules satellites ou une population de cellules entre la cellule satellite et le myoblaste engagé. Il est possible que ces cellules souches représentent une population de cellules indépendantes des cellules satellites. Les analyses biochimiques et moléculaires des cellules souches pourraient peut être aider à répondre à ces questions.

C) Les plaques motrices et l'innervation durant la régénération musculaire : (32, 35, 43)

Les plaques motrices ou jonctions neuromusculaires sont des synapses spécialisées entre l'axone d'un nerf moteur et la cellule musculaire. L'activation de l'axone moteur provoque la libération d'acétylcholine par exocytose à partir de granules de stockage. L'acétylcholine diffuse ensuite et interagit avec les récepteurs spécifiques de la membrane de la fibre musculaire. La fibre se dépolarise et la contraction est initiée. L'acétylcholine sécrétée est rapidement inactivée par hydrolyse réalisée par l'enzyme acétylcholinestérase fixée à la membrane basale du sarcolemme de la plaque.

Lors de l'embryogenèse, les motoneurones atteignent le muscle lors de la formation des myotubes intramusculaires.

A la suite de la fusion des myoblastes, un changement au niveau des protéines de la membrane se produit. Il apparaît des récepteurs nicotiques à l'acétylcholine, des acétylcholinestérases et d'autres canaux associés avec le changement de l'excitabilité membranaire.

Les récepteurs à l'acétylcholine sont absents au niveau des myoblastes. Cette protéine est un complexe de quatre polypeptides de 40 à 65KD et forme un canal ligand-dépendant au niveau de la jonction neuromusculaire.

Les récepteurs peuvent être révélés par la fixation de l' α -bungarotoxine. Une augmentation rapide de la fixation a pu être démontrée en coïncidence avec la fusion cellulaire. Les récepteurs sont initialement distribués sur l'ensemble de la surface cellulaire, mais plus tard se forment des agrégats avec l'expression de la rapsine. Ces agrégats interagissent avec les axones pour former les jonctions neuromusculaires. Le regroupement des récepteurs à acétylcholine (AChR) est dû à l'interaction avec une protéine appelée agrine sécrétée par la partie terminale du nerf en formation.

Dans une culture de tissu musculaire, le niveau d'activité acétylcholinestérase augmente après la fusion. Une grande partie de cette enzyme est sécrétée par le milieu extracellulaire au niveau des jonctions neuromusculaires. S-Laminine, une protéine de la

matrice extracellulaire spécifique des jonctions neuromusculaires est également sécrétée. Cette protéine a une affinité spécifique pour les fibres motrices en développement et aide à la formation des jonctions neuromusculaires

Durant la régénération, les fibres régénérées subissent les mêmes changements morphologiques, biochimiques et fonctionnels que pendant le développement musculaire embryonnaire. Les myosines embryonnaires et fœtales sont synthétisées dans les myotubes et la myosine adulte dans les fibres matures. La présence des nerfs n'est pas indispensable pour cette expression de myosines. Cependant sans innervation, le muscle régénéré ne peut pas développer de fibres matures. L'influence du nerf sur l'expression du type de myosine est plus prononcée durant la régénération que lors du développement. Elle influence le type de myosine synthétisée.

Une fibre non innervée est atrophique. Il existe toutefois un programme de différenciation par défaut. La myosine fœtale est coexprimée avec la myosine adulte. A long terme, le muscle régénéré en l'absence de nerf tend à être remplacé par du tissu fibrosé.

D) Les marqueurs de la régénération musculaire :

Au cours du développement musculaire embryonnaire et de la régénération des fibres, des protéines sont exprimées à la surface et/ou dans le cytoplasme des différentes cellules (cellules satellites, myoblastes, myotubes, fibres musculaires matures). La connaissance de l'expression spatiale et temporelle de ces protéines constitue une aide à l'identification des différentes cellules de la lignée musculaire lors de la régénération. Nous verrons une série de protéines parmi les plus connues actuellement.

D1) Une protéine contractile : La myosine : (15, 31, 40, 45-47)

La myosine est une protéine contractile spécifique du muscle, composée de deux chaînes lourdes et de quatre chaînes légères. La chaîne lourde a plusieurs isoformes qui sont spécifiques des différents types de fibre (I ou II). Il s'agit d'un composant majeur du muscle et son rôle est central dans la performance du tissu musculaire adulte.

Lors du développement, le muscle prénatal contient des myosines différentes des formes adultes et ces isoformes sont des marqueurs caractéristiques des différents stades physiologiques du tissu musculaire. Les différentes isoformes se distinguent par ses caractères chimiques, immunochimiques et génétiques.

L'étude de la séquence d'expression de ces isoformes constitue un moyen pour apprécier le développement musculaire, ainsi que l'influence neurale et hormonale qui contribuent à la régulation des transitions.

Lors de la régénération, on retrouve également cette expression séquentielle des isoformes de la myosine.

Structure de la molécule de myosine et des différentes isoformes :

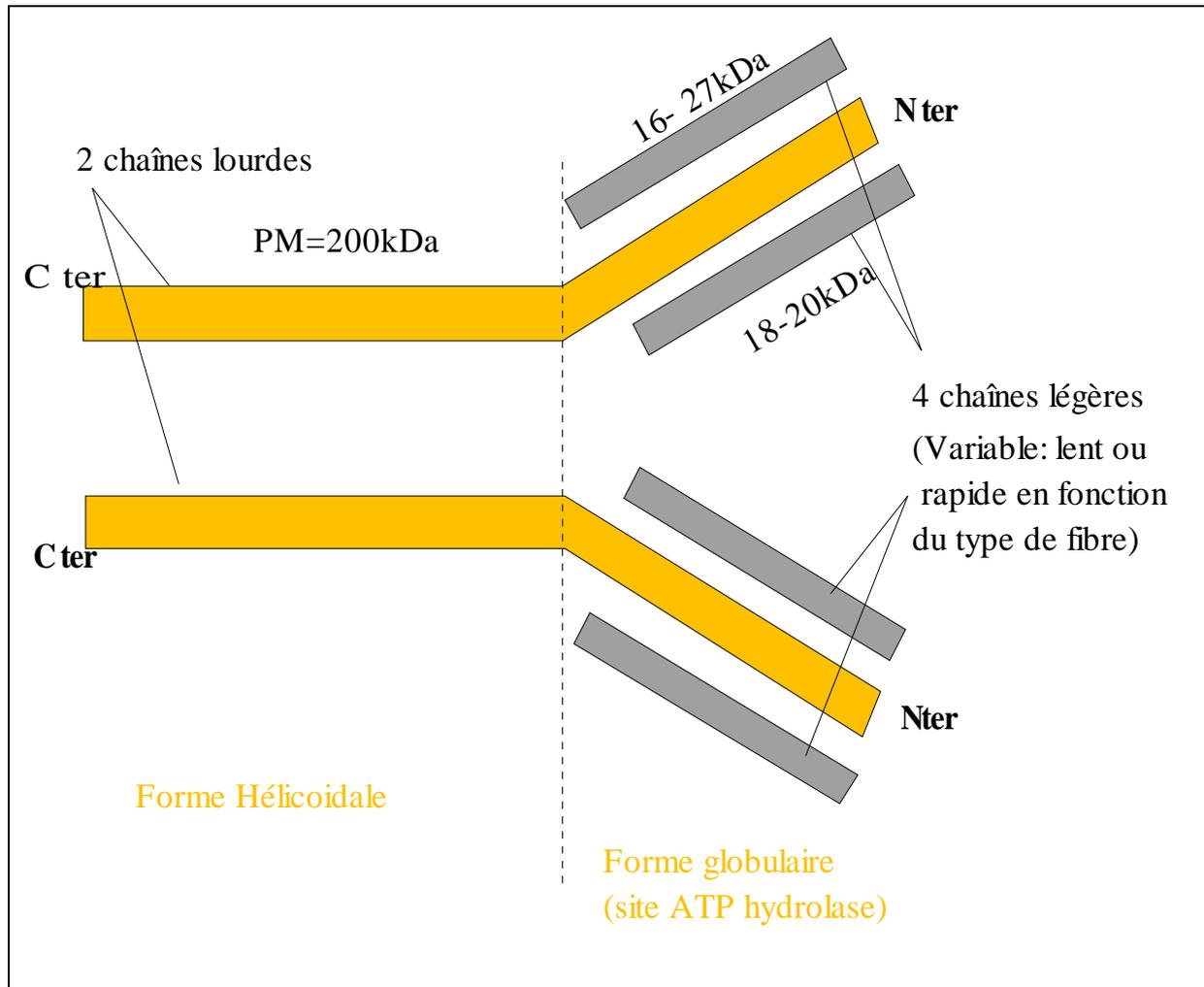


Figure n°5 : Schéma de la molécule de myosine.

Ce sont les chaînes lourdes qui sont hautement conservées dans la structure générale. Les deux isoformes du développement (la myosine embryonnaire et néonatale) et les deux formes principales adultes (myosine lente ou rapide) ont des sous-unités de chaînes légères (MHC) différentes.

Whalen et al (1979, 1981) [cités dans (45)] ont utilisé des anticorps anti-chaîne légère pour analyser les différentes isoformes. Les anticorps reconnaissent un site antigénique composé d'acides aminés spécifiques. Avec un anticorps donné, ils ont obtenu des réactivités différentes pour deux myosines. Cela prouve la différence dans la séquence des chaînes polypeptidiques. Il a alors été supposé que deux chaînes légères avec des séquences différentes sont produites par deux gènes différents. Le clonage moléculaire a par la suite

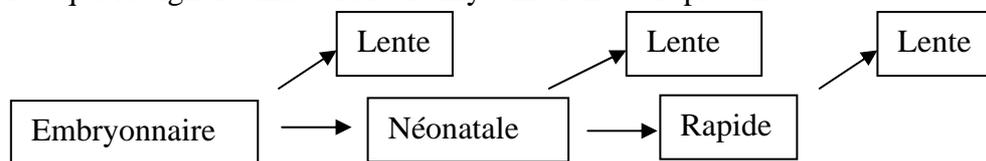
permis de confirmer cette hypothèse. Dans les années 1983-84, différents gènes codant pour les quatre isoformes ont été isolés chez le Rat.

Les transitions isoformiques de la myosine :

La myosine est un marqueur moléculaire qui permet non seulement de différencier le tissu musculaire d'un autre tissu, mais également de différencier les stades physiologiques du tissu musculaire. Il existe lors du développement une expression séquentielle des isoformes de la chaîne lourde : embryonnaire, néonatale, rapide et lente. Les formes embryonnaires et néonatales apparaissent avant les fibres rapides et lentes. Lors d'une injection de toxine nécrosante dans le muscle de chiens normaux ou de chiens atteints de dystrophie musculaire, on retrouve l'expression séquentielle des isoformes du premier jour au jour cinquante-six après injection (46). Ces isoformes du développement sont donc réexprimées dans le muscle en régénération qui est la particularité de plusieurs maladies musculaires. Les fibres suivent la séquence suivante :

Myosine embryonnaire -> néonatale -> rapide ou lente.

L'induction de myosine lente peut avoir lieu à tout instant du développement musculaire pourvu que le signal d'induction à la myosine lente soit présent.



La transition des isoformes est régulée par des facteurs hormonaux et des facteurs nerveux.

Les fibres musculaires immatures et en régénération expriment l'isoforme néonatale mais dans les muscles squelettiques adultes normaux, il n'y a pas d'expression d'isoforme néonatale.

La myosine néonatale est un indicateur de la régénération qui persiste dans les fibres immatures mais qui disparaît après la restauration musculaire accomplie.

D2) Les protéines de surface :

1) La M-Cadhérine : (10)(23)

Les cadhérines sont une famille multigénique de glycoprotéines transmembranaires. Il s'agit de molécules d'adhésion cellulaire calcium dépendant. Une dizaine a été isolé. Les plus étudiées sont : N-Cadh (Neural Cadherin), E-Cadh (Epithelial Cadherin), P-Cadh (Placental Cadherin), B-Cadh (Brain Cadherin), L-Cadh (Liver Cadherin), T-Cadh (Truncated Cadherin) et M-Cadh (Muscle Cadherin). La M-Cadherine a été détectée à bas niveau *in vitro* dans des myoblastes de souris (Donalies et al., 1991).

Ces protéines sont semblables par leur structure primaire (conservation de quarante-cinq à soixante-quatorze pour cent des acides aminés), par leur dépendance au calcium, leur sensibilité aux protéases et leur poids moléculaire. Cependant, elles se distinguent par leurs sites d'expression et leur réactivité immunologique.

La M-Cadhérine est exprimée dans le muscle squelettique prénatal et dans le muscle adulte.

Dans le muscle normal : la M-Cadh est présente dans les cellules satellites et sur le sarcolemme des fibres matures parentes mais au niveau uniquement des sites de contact cellules satellites/fibre. La M-Cadh n'est pas détectable au niveau des cellules sanguines, de la matrice extracellulaire ou des branches nerveuses.

Dans le muscle en régénération : La M-Cadh est fortement exprimée dans les myoblastes mais après la fusion de ceux-ci en myotubes, on observe une diminution importante de son niveau d'expression et elle devient peu détectable dans les myotubes plus matures.

L'expression de la M-Cadh dans les myoblastes puis la diminution de son expression dans les myotubes suggère un rôle crucial dans la fusion myoblastique. La M-Cadh forme également des complexes avec les caténines du cytosquelette des cellules musculaires. Par conséquent, il est suggéré que l'interaction M-Cadh/cytosquelette pourrait jouer un rôle dans l'alignement des myoblastes pendant la fusion.

Sa localisation au niveau des sites de contact entre les cellules satellites quiescentes et les fibres parentes impliquerait un rôle de stabilisation des contacts.

La M-Cadhérine joue un rôle dans la morphogenèse embryonnaire et dans la régénération musculaire.

2) La NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule), la molécule d'adhésion neurale : (1)(23)(39)(43)

La NCAM est une molécule d'adhésion exprimée à la surface des myoblastes, des myotubes et des axones des motoneurones. Dans le muscle adulte, elle n'est détectable qu'au niveau des jonctions neuromusculaires. Elle est impliquée dans le développement et la plasticité des jonctions neuromusculaires, en particulier dans le bourgeonnement axonal en réponse à une paralysie musculaire ou une dénervation.

Le blocage de la transmission neuromusculaire dans un muscle adulte (grâce à une toxine paralysante ou une section de nerf) entraîne un bourgeonnement terminal des nerfs intacts. Ce bourgeonnement semble récapituler les événements intervenant lors du processus de réinnervation. Il est accompagné de la réexpression de molécules d'adhésion à la surface des myofibres. La NCAM de la myofibre interagit avec son homologue sur le motoneurone (43).

Walsh et al (2000) (43) ont fait plusieurs observations chez des souris transgéniques où la molécule d'adhésion NCAM est surexprimée (expression ectopique) :

- Un nombre significatif de jonctions neuromusculaires chez ces souris adultes montre un bourgeonnement terminal (supérieur à vingt pour cent).
- La taille et la complexité des jonctions ont significativement augmenté.
- Il n'y a pas de changement ultrastructural des jonctions neuromusculaires au microscope électronique, ni de modification de la transmission neuromusculaire.

Les résultats montrent qu'une expression ectopique de NCAM peut directement moduler la structure synaptique et l'interaction motoneurone/myofibre.

La NCAM est rarement détectée dans les cellules satellites quiescentes. Elle est trouvée dans les myoblastes et les myotubes jusqu'au moment où l'innervation est fonctionnelle lors de la régénération et après dénervation. La NCAM est donc un marqueur de la régénération et de la dénervation.

D3) Les filaments intermédiaires :

1) La desmine (1)(9)(17)(18)(20)(23)(28)(38)(42)

La desmine a un poids moléculaire de 52-53 kDa. Elle est constituée d'un polypeptide de trois cents acides aminés, codés par un gène simple. Ce dernier a été cloné chez l'Homme, la Souris, le Rat, le Hamster et le Xénope (1) (18).

Les filaments de desmine appartiennent au groupe des filaments intermédiaires du cytosquelette présent dans les fibres musculaires squelettiques, des myocytes cardiaques et de certaines cellules de muscle lisse. Ils lient les myofibrilles adjacentes les unes aux autres et les maintiennent alignées. De plus ils fixent les myofibrilles à la membrane cellulaire.

Localisation :

Dans les fibres matures de muscle normal, la desmine est localisée par immunofluorescence au niveau de la strie Z sur une coupe longitudinale et au niveau du réseau inter-myofibrillaire sur une coupe transversale. L'immunoréactivité est supérieure dans la région du sarcolemme. Il y a une quantité significative de desmine dans les jonctions neuromusculaire au niveau post synaptique et particulièrement le long et autour des plis jonctionnels.

Rôle :

La desmine n'est pas uniquement une protéine de structure mais également un des plus précoces marqueurs des cellules précurseurs activées du muscle. Elle pourrait être impliquée dans la myogenèse. L'inhibition de la desmine *in vitro* bloque la myogenèse, mais les études *in vivo* divergent (38).

Elle est liée au noyau via la lamine B (également filament intermédiaire). Il a été alors suggéré que la desmine aurait un rôle médiateur entre le sarcolemme et le noyau. Une étude en 1997, montre que le noyau a une position et une forme anormale chez des souris transgéniques invalidées pour la *desmine* *-/-*. Les myofibrilles sont également faiblement alignées et insuffisamment ancrées au sarcolemme. Le phénotype de ces souris est très altéré et elles souffrent de myopathie cardiaque. Les muscles ont une intégrité structurale compromise, ils sont vulnérables aux dommages, alors que l'absence de desmine *ex vivo* inhibe la fusion myoblastique. La survie des souris *desmine* *-/-* démontre que la desmine n'est pas essentielle au développement musculaire. Smythe G.M. et al. (38) apportent plusieurs conclusions sur le rôle de la desmine dans son étude de 2001 sur des souris *desmine* *-/-*. Ils démontrent que chez les souris adultes *desmine* *-/-*, il y a un retard d'un jour dans la fusion des myoblastes qui est associé à une augmentation de la période de prolifération des myoblastes lors de la régénération. Ces résultats renvoient à l'étude de White et al. en 2000 (citée dans (38) qui montre un retard de deux jours dans la fusion chez les souris *MyoD* *-/-*. Le manque de desmine ou de MyoD entraîne un retard à la formation des myotubes. On peut penser qu'il y avait une relation directe ou indirecte entre MyoD et la desmine.

Chez la souris, il apparaît que l'absence de desmine cause un phénotype anormal qui se caractérise par une faible organisation et une sensibilité aux dommages. Ainsi l'absence de desmine aurait peut-être un rôle dans les myopathies variées squelettiques et cardiaques.

Agbulut et al en 2001 (1) font plusieurs observations chez les souris *desmine* *-/-* :

- Les fibres musculaires sont significativement plus petites chez les souris mutantes.

- Le processus de régénération est retardé et défectueux en l'absence de desmine. La persistance de molécules d'adhésion neurale (N-CAM) et de myosine néonatale au niveau des fibres de petits diamètres prouvent que la régénération est incomplète chez ces souris.
- Les fibres musculaires ont tendance à avoir un phénotype lent et les fibres régénérées sont à 95 % de type lent.
- Plusieurs anomalies ont été observées au niveau des plaques motrices et essentiellement sur la partie post-synaptique : un allongement de la taille des synapses est observé avec l'âge, ainsi qu'une réduction de l'activité acétylcholinestérase. Il est observé chez toutes les souris mutantes certaines plaques motrices anormales. Ces anomalies expliqueraient peut-être la faiblesse musculaire et la fatigabilité anormale des souris *desmine* $-/-$. Ces résultats indiquent que la desmine jouerait un rôle important dans le maintien de la structure de la région post-synaptique des jonctions neuromusculaires.

Ces résultats suggèrent que la desmine a un rôle important dans les événements myogéniques précoces, jouerait un rôle dans la régulation de la prolifération et la fusion des myoblastes, ainsi que dans l'architecture fonctionnelle de la membrane post-synaptique.

Chez l'homme, la plupart des myopathies relatives à la desmine sont caractérisées plutôt par une accumulation de la protéine (contrairement à la dystrophine, absente ou diminuée dans les myopathies de Duchenne et de Becker).

Les desminopathies chez l'Homme peuvent être classées en deux catégories

- Une augmentation diffuse de la desmine dans la fibre musculaire : Une augmentation persistante de desmine est trouvée dans les fibres musculaires immatures (fibre foétale) avec une augmentation associée de la vimentine.

- Une accumulation focale de la desmine qui peut être qualifiée d'agrégation ou d'inclusion. Dans la dystrophie myotonique atrophique, seule la desmine est surexprimée dans les fibres de petits diamètres. Dans l'atrophie musculaire spinale, l'augmentation de desmine peut être expliquée par l'immaturité des fibres, la dénervation ou la jonction des deux.

Dans cette atrophie spinale, il est donc difficile de différencier par marquage à la desmine, les fibres atrophiques dénervées et les fibres en régénération suite à une réinnervation. Car elles se présentent toutes comme des fibres de petit diamètre exprimant fortement la desmine. (18)

Expression lors de la régénération (9)(19)

La desmine est présente à très bas niveau dans les cellules satellites ; Elle est également identifiée dans les myoblastes activés. L'expression et la distribution intracellulaire de la desmine dans le muscle en régénération ressemble au muscle fœtal. Elle est exprimée intensément et diffusément dans les myoblastes et les jeunes myotubes. Puis, la réactivité de la desmine diminue avec la maturité et s'organise autour des myofibrilles au niveau des striées Z où elle persiste.

Plusieurs auteurs ont proposé que la coloration de la desmine soit utilisée pour les investigations des biopsies musculaires parce que les fibres régénérées marquent plus intensément que les fibres matures. La différence entre une fibre régénérée et mature est graduelle.

Immunoréactivité dans certaines myopathies (17)

La localisation intra-myofibrillaire de desmine est normale chez l'Homme atteint de myopathie distale, de dystrophie de Duchenne, de polymyosite, d'atrophie musculaire spinale. Par contre dans les myopathies à noyaux centraux, il est observé une absence d'immunoréactivité à la desmine dans les régions correspondant à la position normale des noyaux et une forte réactivité autour des noyaux centraux.

2) La Vimentine (9)(17)(18)(42)

La vimentine est un filament intermédiaire qui n'est pas mis en évidence par les techniques immunohistochimiques dans les fibres musculaires matures, mais elle est fortement exprimée durant la myogenèse. Certains auteurs soutiennent que la vimentine serait exprimée dans les fibres musculaires en culture et même chez l'animal adulte et que la

vimentine aurait la même distribution que la desmine. Elle est présente dans les myoblastes et les jeunes myotubes. Elle a la même distribution intracellulaire que la desmine.

Le tissu conjonctif et les vaisseaux sanguins sont les seules structures du muscle mature qui expriment la vimentine. Par conséquent, après la naissance, toutes les fibres musculaires qui montrent une réaction discrète à l'immunohistochimie de la vimentine sont très probablement des fibres régénérées ou immatures. Dans ces fibres, la vimentine apparaît de manière diffuse, les accumulations circonscrites sont très rarement décrites.

3) La Nestine (18)(42)

Il s'agit du filament intermédiaire le moins connu. Il a été détecté plus tardivement dans le muscle squelettique. Il semble jouer un rôle dans la régénération neuronale. Dans le muscle adulte, la nestine est présente en très faible quantité au niveau des jonctions neuromusculaires et des jonctions myotendineuses. Elle est également localisée au niveau de l'endothélium vasculaire et des branches nerveuses intramusculaires.

Elle est plus amplement présente dans le muscle en développement et elle colocalise avec la desmine. Durant les stades précoces de la myogenèse (les myoblastes et les myotubes), le réseau de la nestine semble parallèle à celui de la desmine.

Plus tard, elle est remplacée par la desmine, et elle n'est plus exprimée qu'au niveau des jonctions neuromusculaires et myotendineuses. Dans les fibres dénervées, la nestine a une localisation diffuse comme les récepteurs cholinergiques. Elle ne semble pas être exprimée dans les cellules satellites.

ANNEXE 6 :Tableau récapitulatif de l'expression des différentes molécules marqueurs

La régénération est donc caractérisée par la réexpression de molécules typiques du développement musculaire embryonnaire et fœtal. L'étude de celles-ci par des techniques d'immunohistochimie constitue une aide précieuse à l'étude du processus de régénération musculaire, en particulier lors des maladies neuromusculaires.

2^{EME} PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

Introduction

L'étude suivante porte sur l'observation de séries de biopsies musculaires réalisées chez de jeunes chiens Labradors atteints ou non de myopathie centronucléaire, et la mise en évidence de phénomènes de régénération des fibres musculaires. Elle consiste également à l'observation de la morphologie des plaques motrices ou jonctions neuromusculaires.

Dans l'hypothèse où la physiopathogénie de cette affection neuromusculaire résiderait dans un processus de nécrose/régénération, l'apparition d'un pourcentage élevé de fibres centronucléées serait le signe d'une importante régénération des fibres musculaires. Etant donné que dans les études antérieures, aucune nécrose importante n'a été observée, cette étude tente de rechercher par une méthode simple des signes de régénération avant l'âge de six mois. Les marques de la régénération persiste plus longtemps que ceux de la nécrose. Cette étude permettra peut-être de répondre à certaines questions et d'aider à situer le niveau lésionnel de cette affection proche de la maladie centronucléaire humaine.

Dans cette étude, aucune nécrose musculaire n'a été provoquée. Nous avons observé un processus de régénération spontanée.

CHAPITRE 1 : ETUDE DU PROCESSUS DE REGENERATION

I. Animaux, matériel et méthodes :

A) Animaux inclus dans l'étude :

L'étude porte sur des chiots Labradors de quatre à six mois, mutants malades (fig 7 A, B et C) et témoins sains (fig 7 D). Ces chiens appartiennent à une colonie de Labradors (fig 6) de l'UETM située à l'ENVA. Ils sont issus de croisements prospectifs. La chienne Gipsy, fondatrice de cette colonie avait été présentée à la consultation de l'ENVA en 1991, ainsi que trois autres chiens mâles atteints.

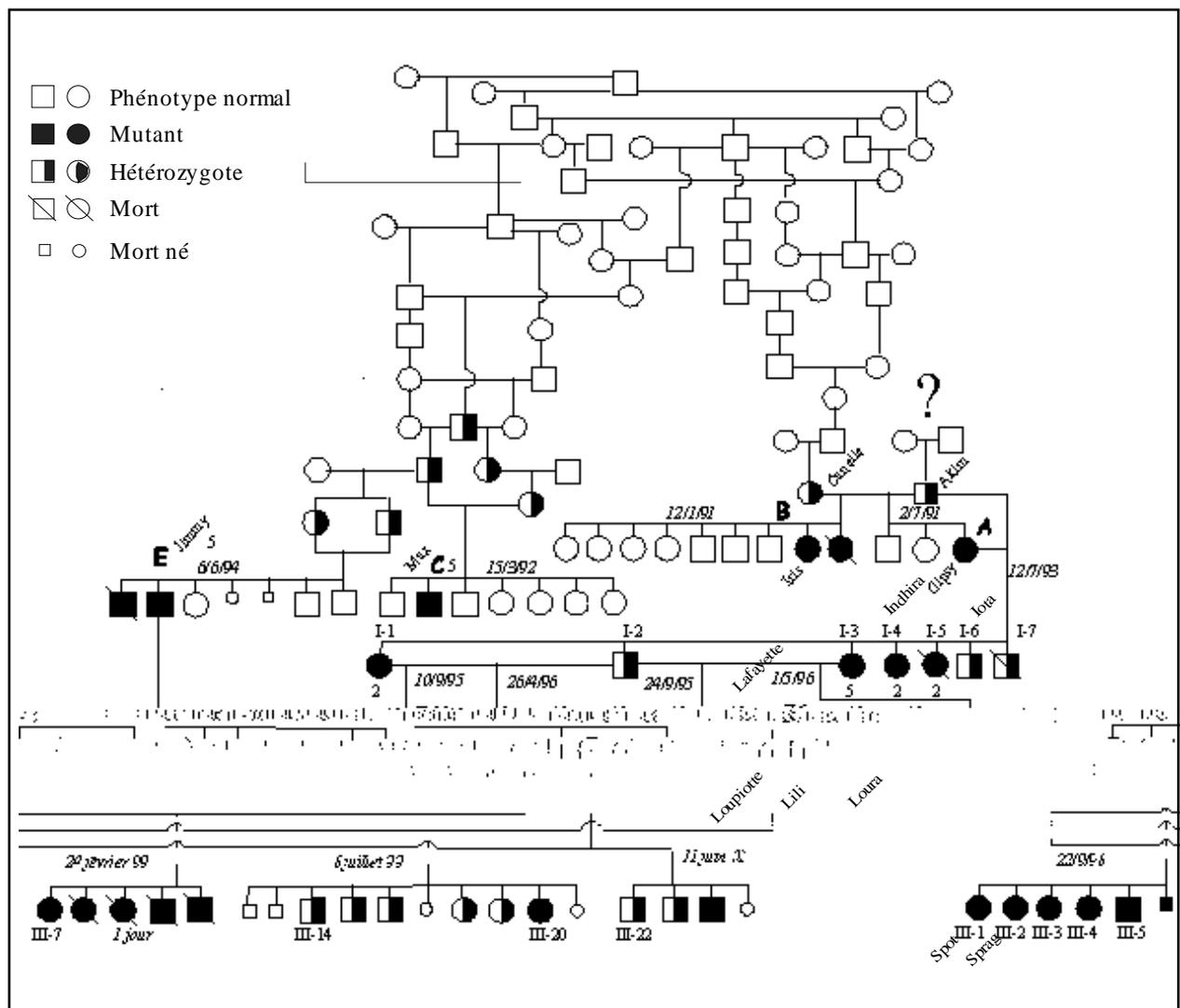


Figure N°6 : Pedigree de la colonie de Labradors. ENVA



Fig. 7 A :TANIA. Phénotype d'un chiot Labrador sain de 4 mois



Fig. 7 B : Profil de Tania



Fig. n°7 C : Phénotype d'un chiot mâle labrador témoin âgé de 7 mois.
SPRAG 03.02



Fig. n°7 D: Chiot CNM âgé de 7 mois.
Phénotype bien marqué : silhouette élancée, amyotrophie, jarrets droits
SPOT 03.02

Figures n° 7 : Phénotypes comparés des chiots Labradors malades et sains.

Dix chiots mutants et trois chiots témoins entrent dans cette étude.

Age	Malades CNM	Sains
4 mois	Indhira (F) Isatis (F) Ismène (F) Isis (F) Iota (M)	Isidore (M) Icare (M)
4,5 mois	Lafayette (M)	
5 mois	Gipsy (F) Lili (F) Loupiotte (F)	Timide (M)
6 mois	Max (M)	

Tableau n°1 : Chiens inclus dans l'étude.

(F)=femelle (M)=mâle

B) Etude du tissu musculaire :

Au moment de cette étude, aucun chien de la colonie n'était âgé de moins de six mois. Par conséquent, les biopsies musculaires et les coupes histologiques étudiées ont été réalisées antérieurement lors d'autres études. La procédure de prélèvement musculaire est rappelée brièvement ici, ainsi que le traitement des échantillons.

1) Les biopsies musculaires :

Les biopsies concernent exclusivement le biceps fémoral. Ce muscle est facile d'accès chirurgical et son analyse histologique est bien connue et référencée (12-14). Il s'agit d'un muscle couramment prélevé lors de suspicion de myopathie. De plus, les études ultérieures

qui mettent en évidence les anomalies histologiques chez les chiens atteints de CNM, ont porté essentiellement sur le biceps fémoral (5, 36).

Sous anesthésie générale, la cuisse est tonduée puis la peau est préparée à un abord chirurgical dans les règles d'asepsie. Une incision cutanée est réalisée au niveau du biceps fémoral dans l'axe proximal distal du membre au milieu du muscle. Un fragment musculaire est prélevé dans l'axe des fibres, d'une longueur d'un centimètre et d'une section de cinq millimètres. Le tissu est immédiatement placé dans un pot réfrigéré par de la glace. Le fascia musculaire, le tissu sous-cutané et la peau sont suturés.

2) Congélation et conservation des prélèvements : (5,12-14, 36)

Chaque fragment de muscle est très rapidement traité (dans les quinze minutes) afin de limiter les processus de dégradation cellulaire. Les fragments sont coupés et sont fixés à l'aide de gomme adragante sur un support de liège. Ils sont alors rapidement congelés par une immersion dans l'isopentane refroidi dans les vapeurs d'azote liquide (30-40 secondes). Puis ils sont stockés à -80°C .

3) Traitement des échantillons musculaires :

a) Coloration Hématoxyline / Eosine :

A partir des biopsies congelées, des coupes de $10\ \mu\text{m}$ d'épaisseur, perpendiculaires à l'axe des fibres, ont été réalisées à l'aide d'un cryostat. Les lamelles de muscles ont été montées sur des lames et séchées sous hotte pendant une heure.

Chaque prélèvement a subi une coloration à l'Hématoxyline / Eosine. Cette coloration permet une observation de la morphologie générale des fibres musculaires et des autres tissus intramusculaires.

b) Analyse quantitative des signes de régénération :

Intérêt :

La coloration H/E permet une observation histologique globale du tissu musculaire. On peut apprécier le diamètre et la forme des fibres, la position des noyaux et les signes de régénération. Les petites cellules basophiles, possédant un gros noyau vésiculaire et un cytoplasme peu volumineux sont des fibres en régénération, c'est à dire des myoblastes activés (14). Nous avons également recherché les éventuels signes de nécrose, se présentant comme des infiltrats de cellules inflammatoires et des fibres fantômes.

Méthode :

Chaque lame du biceps fémoral des chiens de l'étude a été examinée au microscope au grossissement 20 et photographiée. Un logiciel de traitement d'image (QWIN LEICA) a permis de réaliser un comptage précis des fibres.

Un total de 846 à 1219 fibres matures a été visualisé pour chaque chien sur un nombre de 4 à 7 champs optiques choisis arbitrairement et totalement indépendants les uns des autres. Les noyaux centralisés et les fibres en régénération ont été comptabilisés. Les pourcentages correspondants par rapport au nombre de fibres matures comptabilisées ont été réalisés. Il ne s'agit pas ici d'une étude statistique mais une simple comparaison de pourcentages entre des chiots sains et des chiots atteints de CNM.

II. Résultats :

Les différents résultats sont présentés dans les **tableaux n°2, 3 et 4 et dans la figure n° 8.**

L'examen histologique global met en évidence les anomalies que l'on observe normalement chez les jeunes chiens CNM âgés de moins de 7 mois et qui sont absentes chez les chiots sains :

- l'inégalité de calibres des fibres musculaires.
- la présence de fibres de petit calibre et anguleuse.
- des fibres centronucléées très occasionnelles.

→ Le pourcentage de centralisation nucléaire est nul ou proche de zéro chez les chiens atteints ou témoins.

→ Le pourcentage de fibres en régénération est inférieur à 1% chez les chiots CNM et témoins. Il ne semble pas y avoir de différence du point de vue des signes de régénération entre les animaux de l'étude. La figure n° 8 présente l'ensemble des pourcentages obtenus.

Photos de quelques lames : Figures 9.

Nom du chien	Age (mois)	Phénotype	Champs	Nombres de fibres matures	Centralisation nucléaire (%)	Fibres en régénération (%)	Observations		
Indhira	4	CNM	N° 1	276	1	1	Inégalité de calibre Présence de fibres de petit calibre		
			2	321					
			3	247					
			4	302					
			Total	1146				1 (0.08%)	1 (0.08%)
Isatis	4	CNM	N° 1	245	0	8	Inégalité de calibre Présence de fibres de petit calibre		
			2	270					
			3	294					
			4	283					
			Total	1092				0	8 (0.73%)
Ismène	4	CNM	N° 1	323	0	4	Inégalité de calibre Présence de fibres de petit calibre		
			2	370					
			3	343					
			Total	1036				0	4 (0.38%)
			Isis	4				CNM Malade	N° 1
2	209								
3	224								
4	212								
5	204								
Total	1059	0			9 (0.84%)				
Iota	4	CNM Malade	N° 1	210	0	5	Inégalité de calibre Présence de fibres de petit calibre		
			2	209					
			3	224					
			4	212					
			5	204					
			Total	1059				0	5 (0.45%)
Isidore	4	Sain	N° 1	206	0	4	Egalité de calibre		
			2	229					
			3	208					
			4	206					
			5	213					
			Total	1062				0	4 (0.37%)
Icare	4	Sain	N° 1	160	0	5	Egalité de calibre		
			2	193					
			3	190					
			4	167					
			5	233					
			6	212					
			Total	1155				0	5 (0.43%)

Tableau N°2 :Analyse quantitative chez les chiots de 4 mois

Nom du chien	Age (mois)	Phénotype	Champs	Nombre de fibres matures	Centralisation nucléaire	Fibres en régénération (%)	Observations
Gypsie	5	CNM Malade	1	301	0	1	Inégalité de calibre. Présence de fibres de petit diamètre
			2	328		2	
			3	265		2	
			4	325		1	
			Total	1219		6 (0,48%)	
Lili	5	CNM Malade	1	241	0	2	Inégalité de calibre. Présence de fibres de petit diamètre
			2	240			
			3	241			
			4	233			
			5	249		1	
Total	1204	3 (0,24%)					
Loupiotte	5	CNM Malade	1	225	0	1	Inégalité de calibre. Présence de fibres de petit diamètre
			2	242			
			3	279			
			4	288			
			Total	1097		1 (0,09%)	
Timide	5	Sain	1	120	0	0	Egalité de calibre
			2	117			
			3	111			
			4	140			
			5	124			
			6	107			
			7	127			
			Total	846			

Tableau N°3 :Analyse quantitative chez les chiots de 5 mois

Nom du chien	Age (mois)	Phénotype	Champs	Nombre de fibres matures	Centralisation nucléaire	Fibres en régénération (%)	Observations	
Lafayette	4,5	CNM Malade	N°1	262	0	6 (0,49%)	Inégalité de calibre. Présence de fibres de petit diamètre	
			2	273				2
			3	343				
			4	334				4
			Total	1212				
Max	6	CNM Malade	1	198	2	2	Inégalité de calibre. Présence de fibres de petit diamètre	
			2	270	1			
			3	192	2			
			4	199	6			
			5	184	3	1		
			Total	1043	14 (1,3%)	3 (0,29%)		

Tableau N°4 :Analyse quantitative chez deux chiots CNM.

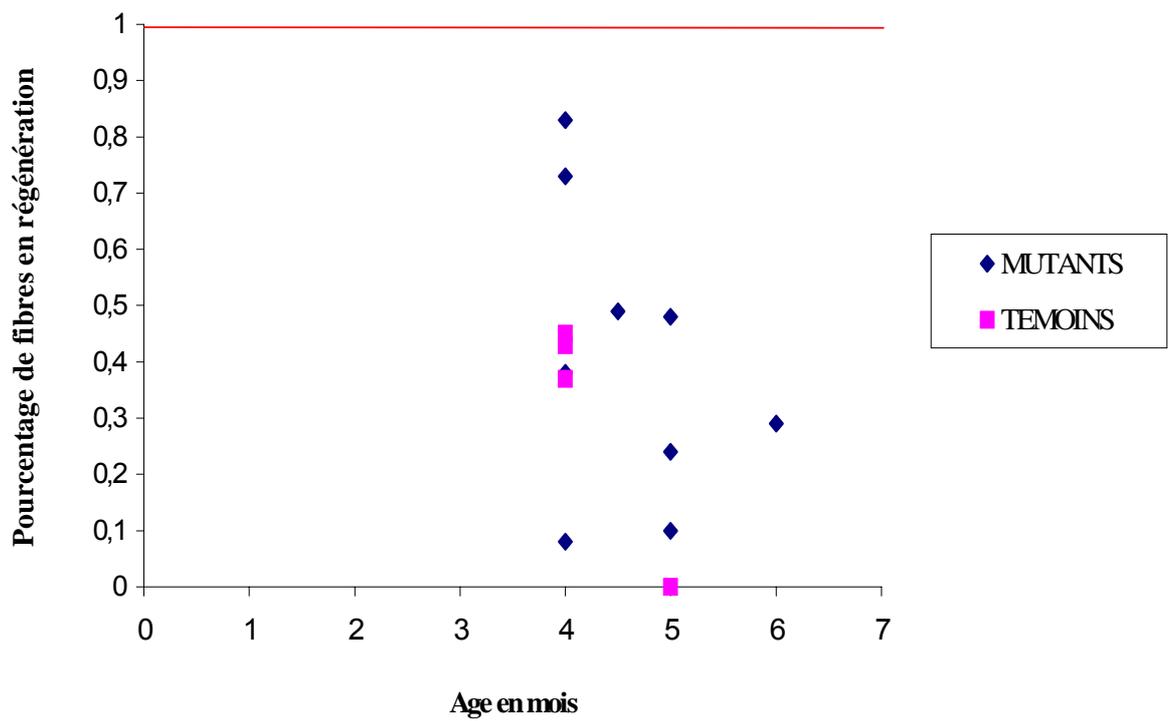


Figure n° 8 : Répartition des pourcentages de fibres en régénération en fonction de l'age.

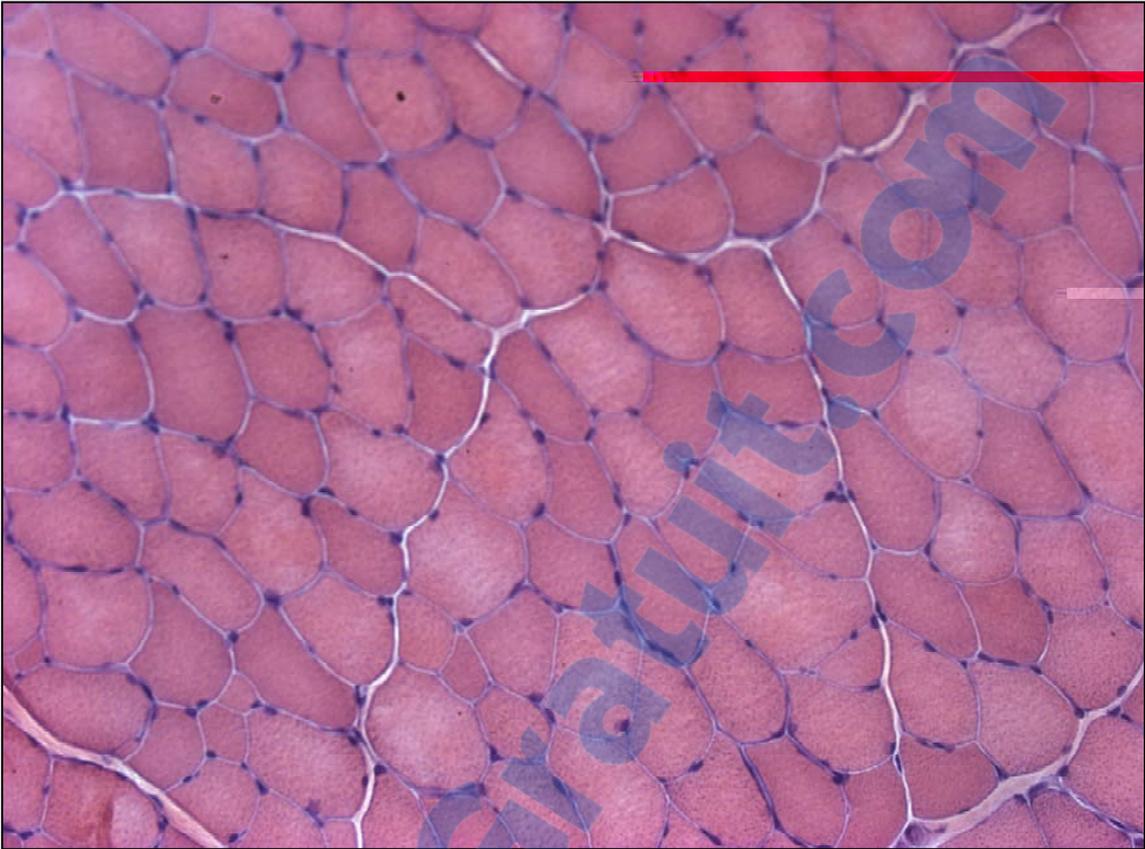


FIG. 9a: Biopsie d'un chien témoin (Timide, champs 5), biceps fémoral, 5mois, coloration HE

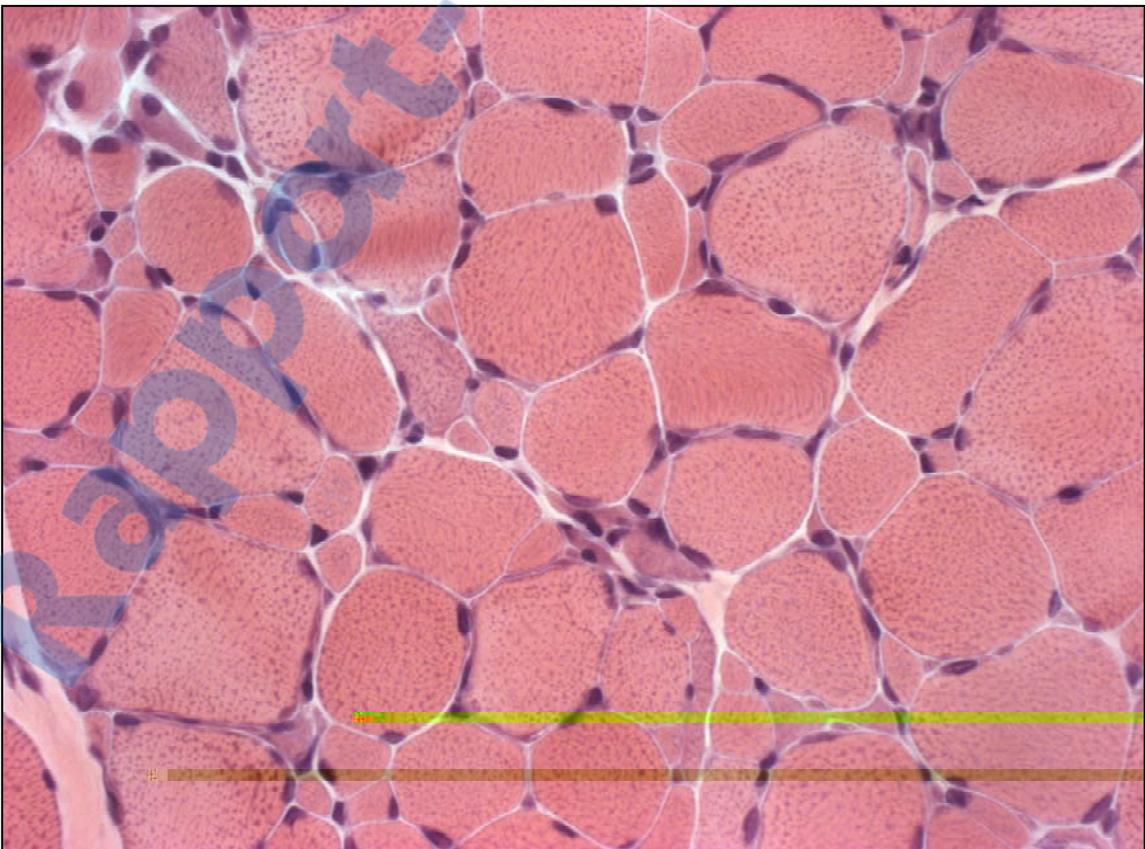


Fig. 9b: Biopsie d'un chien CNM (Gypsie, champs 2), biceps fémoral, 5 mois, coloration HE. L'inégalité de calibre est plus marquée et le nombre de fibres atrophiées plus important.

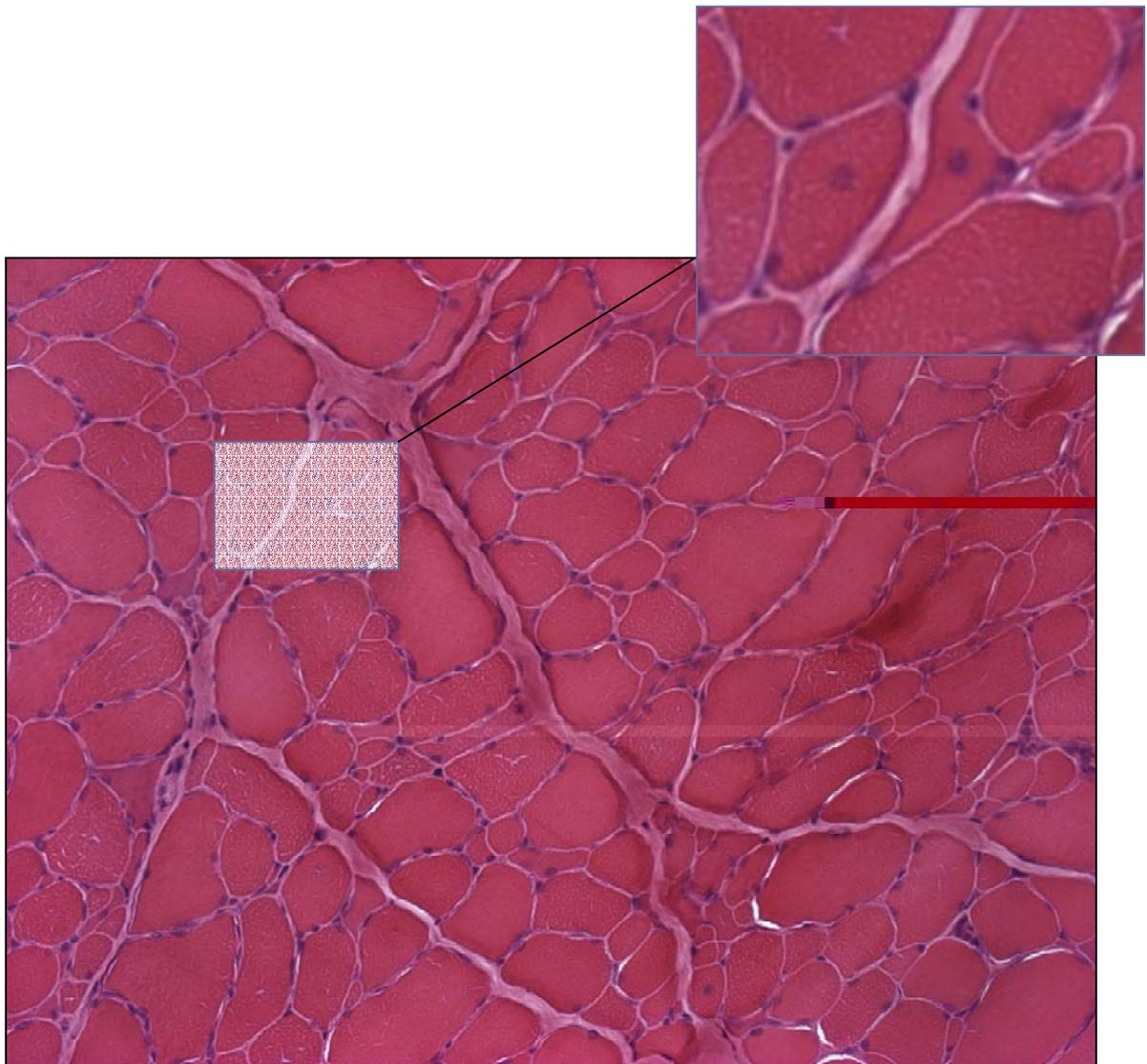


FIG. :9c : Biopsie de chien CNM (Max, champs 4), biceps fémoral, Coloration HE.
Encart : Deux fibres centronucléées. La centralisation nucléaire devient visible.

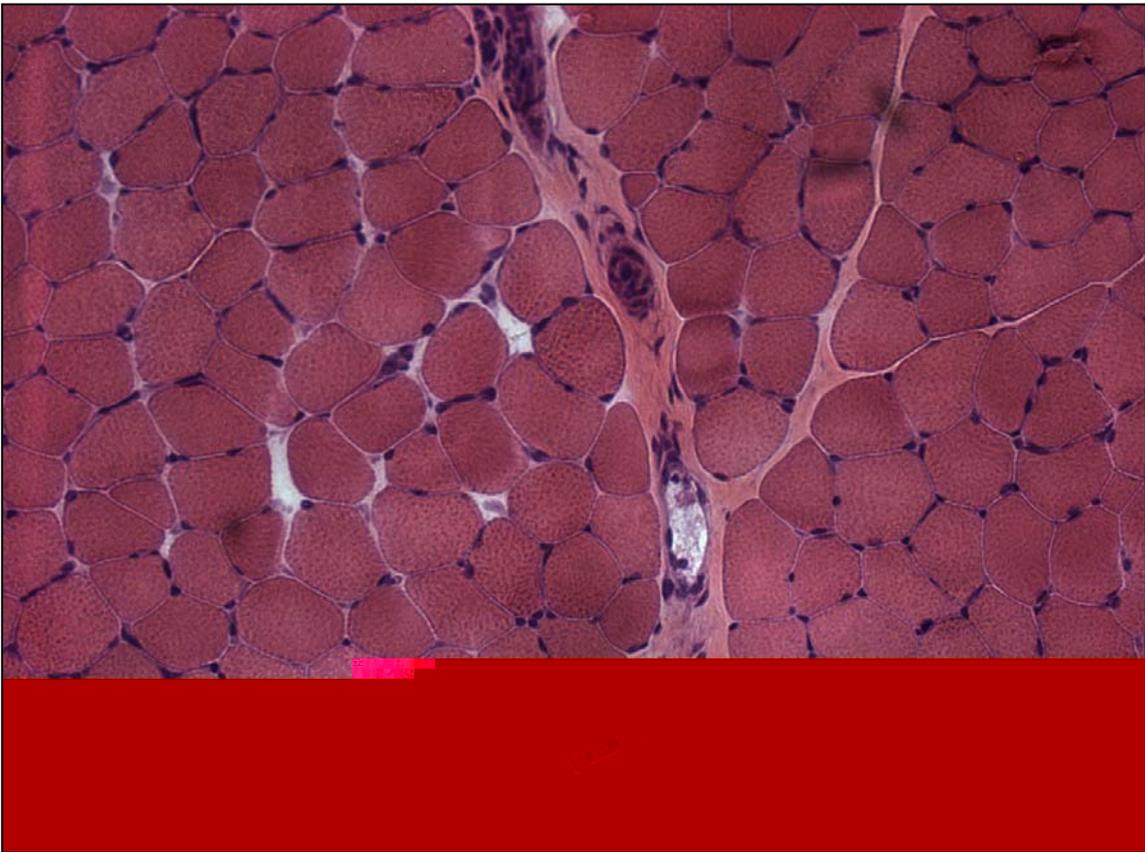


FIG.9 d : Biopsie musculaire d'un chien témoin (Icare), biceps fémoral, 4mois, coloration HE

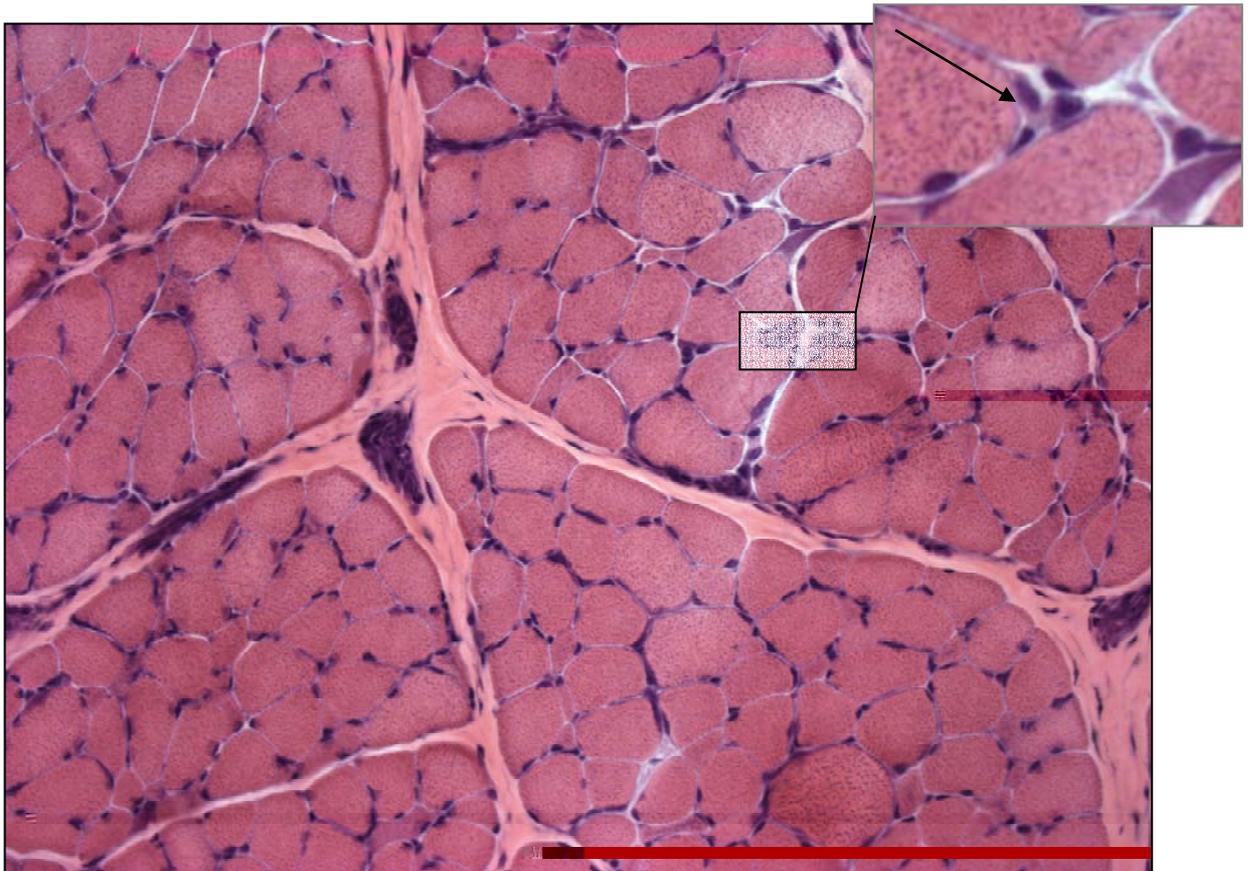


FIG. 9e: Biopsie d'un chien CNM (Isatis, champs n°2), Biceps fémoral, 4 mois, Coloration HE.
Encart : agrandissement d'une zone contenant une fibre en régénération (flèche).
On observe la variation de la taille des fibres avec la présence de fibres atrophiées

CHAPITRE II : MORPHOLOGIE DES PLAQUES MOTRICES

I. Animaux, matériel et méthode :

A) Animaux inclus dans l'étude

L'étude des plaques motrices a été réalisée sur des animaux plus âgés (58 mois) qui présentent des anomalies histologiques plus marquées : développement du tissu adipeux entre les fibres, altération de la formule histochimique avec une prédominance des fibres de type I et un pourcentage de centralisation nucléaire élevé.

MYSOLINE	FEMELLE	58 MOIS	CNM
MYO	FEMELLE	58 MOIS	TEMOIN

Tableau 5 : Chiens inclus dans l'étude morphologique des plaques motrices.

B) Etudes des plaques motrices : Etude *in toto*

1) Les prélèvements musculaires :

Les prélèvements ont été réalisés en suivant la même méthode que les biopsies précédentes sur le biceps fémoral. Les fragments de muscle sont utilisés frais. Ils subissent une série de traitements et coloration afin de visualiser les plaques motrices.

2) Traitement des prélèvements :

a) La méthode de Koëlle et Friedenwald :

Cette méthode permet de visualiser les jonctions neuromusculaires grâce à la mise en évidence des cholinestérases. On obtient les images suivantes : **FIG. 10 A et B.**

ANNEXE 7 : les étapes de la technique.

b) Immunohistochimie – Coloration des plaques motrices :

Puis différentes colorations ont été effectuées. Chaque prélèvement a subi un marquage à l'alpha-bungarotoxine (α -BGT) conjuguées à la Rhodamine fluorescente. Cette toxine de venin de serpent présente la particularité de se fixer au niveau des récepteurs nicotiques à l'acétylcholine. On obtient donc un marquage des régions post synaptiques des jonctions neuromusculaires.

Les prélèvements ont subi un deuxième marquage qui permet de visualiser la partie pré synaptique des plaques et/ou de l'axone. On a utilisé des anticorps anti-neurofilament qui se fixent donc sur le cytosquelette axonal et révèle la partie terminale des axones. Nous avons également utilisé la fasciculine pour mettre en évidence la partie pré-synaptique et l'espace jonctionnel des plaques motrices. Les fasciculines sont de petites protéines (61 acides aminés) appartenant à la famille structurale des toxines à « trois doigts » de venins de serpents. Ce sont des inhibiteurs sélectifs et puissant des acétylcholinestérases de mammifères.

ANNEXE 7 : technique de coloration

c) Analyse morphologique :

Les lames ont été examinées en microscopie confocale et photographiées.

Nous avons donc comparé les plaques motrices mises en évidence entre le chien CNM et les chien témoin sur le plan morphologique. L'objectif était de rechercher d'éventuelles anomalies chez les chiens myopathes qui pourraient nous orienter sur le niveau lésionnel de cette affection.

II. Résultats :

Les figures n°10, 11 et 12 représentent les photographies comparées des plaques motrices marquées entre le chiens CNM et Témoin.

Les colorations immunohistochimiques et la technique de Koëlle et Friedenwald ont permis de mettre en évidence des anomalies morphologiques :

→ Un bourgeonnement terminal de l'axone a été mis en évidence (**figure n° 14b**) chez le chien CNM. Le motoneurone s'est ramifié dans sa partie terminale et a formé une nouvelle branche axonale aboutissant à une nouvelle plaque motrice.

→ Il semble également que la plaque motrice observée chez le chien CNM a subi une fragmentation. Cette fragmentation a été mise en évidence par la technique de Koëlle et Friedenwald et en immunohistochimie (**Figures 10 b et 11 b**). La taille des plaques est apparue plus importante par rapport au chien témoin en raison de son éclatement. Mais cette différence n'a pas été quantifiée.

En revanche, chez le chien témoin et chez le chien CNM, on a observé un recouvrement des marquages et donc par conséquent un recouvrement des régions post-synaptiques et pré-synaptiques. Cet alignement suggère une absence d'anomalie de la plaque elle-même. Il n'y avait pas de dénervation visible.

A



B

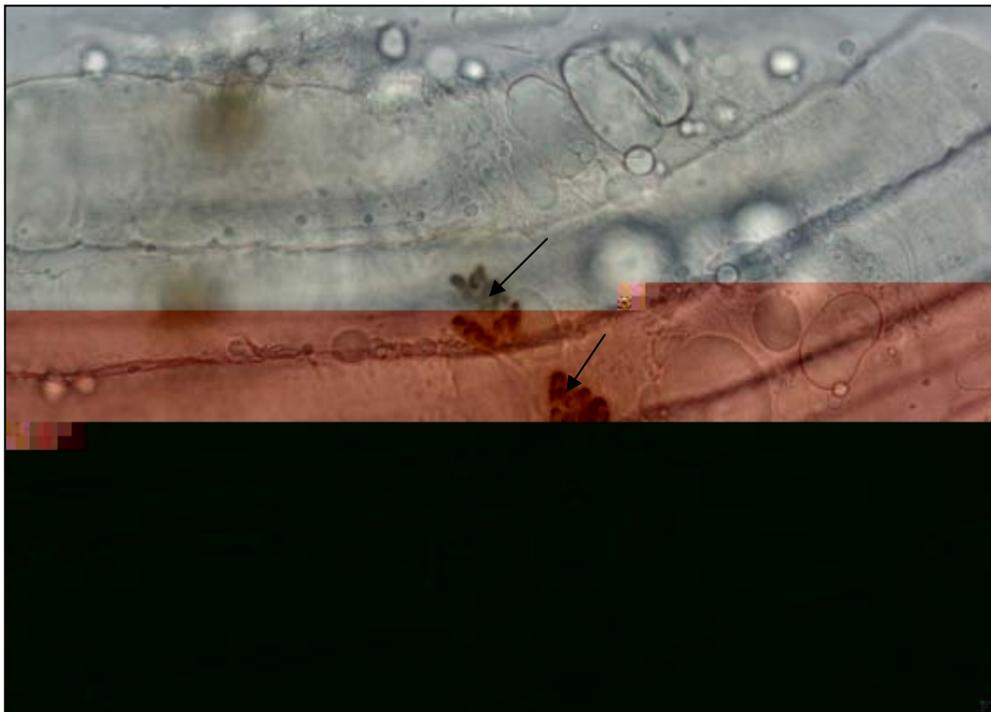


Figure n°10 : Plaques motrices chez un chien témoin et un chien mutant de 58 mois. Biceps fémoraux. Méthode de Koëlle et Friedenwald.

A : Chien sain

B : Chien malade CNM

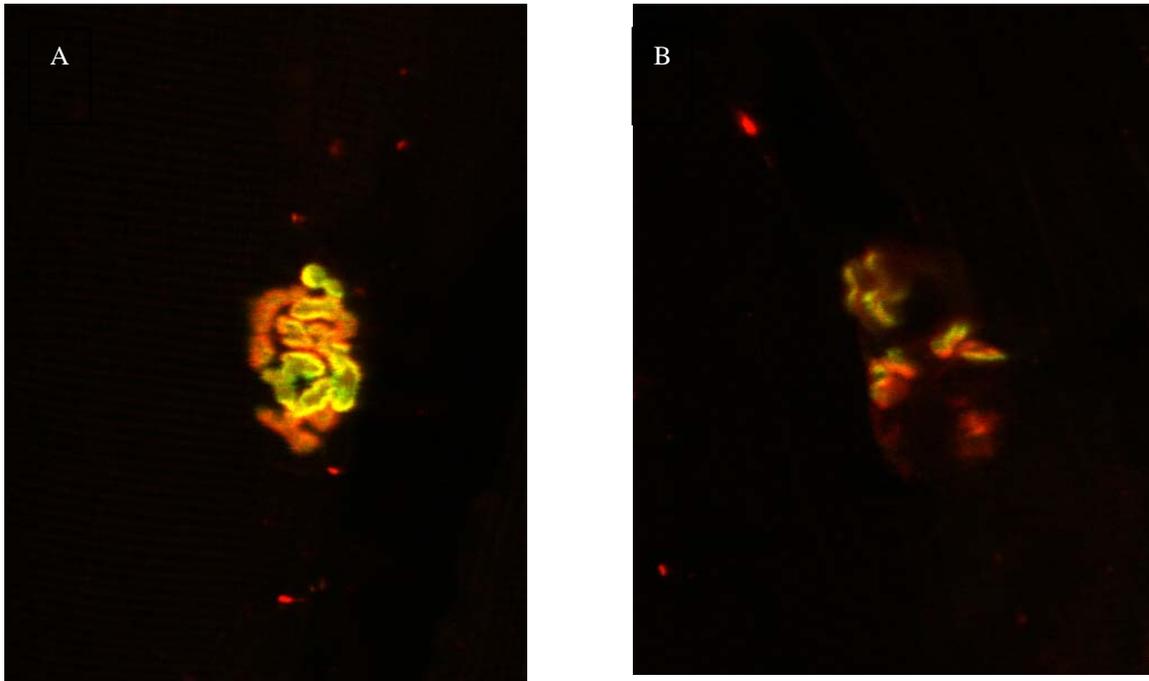
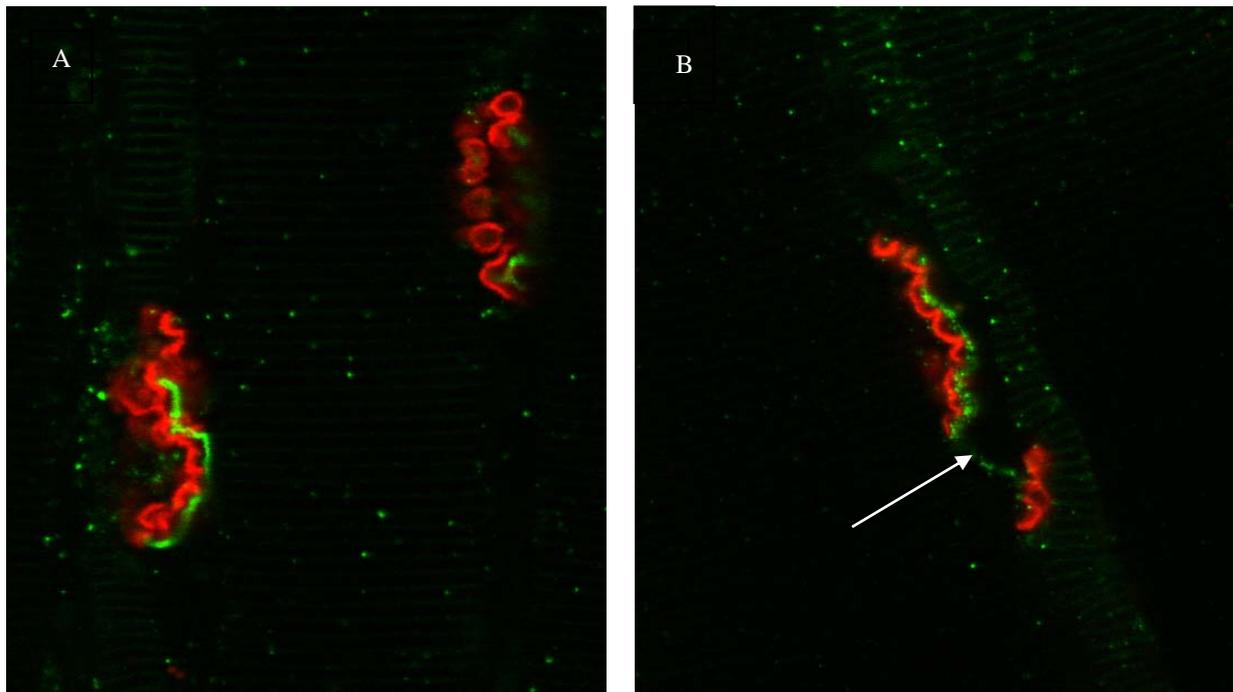


Figure n°11 : Plaques motrices de biceps fémoral de chiens de 58 mois marquées à l'aide de l'alpha-bungarotoxine (fluorescence rouge) et d'un anticorps dirigé contre la fasciculine (fluorescence jaune – verte)

A : Labrador sain **B** : Labrador atteint de CNM



Bourgeonnement axonal (flanche blanche) et formation d'une nouvelle plaque motrice chez un chien CNM.

Figures 14 : Plaques motrices marquées à l'aide de l' α -BGT (fluorescence rouge) et d'un anticorps dirigé contre les neurofilaments (fluorescence verte) de l'axone. Biceps fémoral de chiens de 58 mois.

A : Labrador sain **B** : Labrador CNM

3^{EME} PARTIE : DISCUSSION

La myopathie centronucléaire du Labrador Retriever est une affection qui étudiée depuis maintenant un peu plus d'une dizaine d'années en France est dorénavant bien connue sur le plan clinique et neurologique. Les anomalies histologiques associées sont bien décrites. Malheureusement, la méconnaissance quasi totale du processus physiopathogénique de cette affection pose de réel problème dans l'avancement des travaux qu'elle alimente.

Cette étude s'attache à deux points bien précis et s'inscrit dans un ensemble de travaux.

CHAPITRE I : LA REGENERATION CHEZ LES CHIOTS CNM.

A. Etude de la régénération par la coloration H/E :

Le point de départ de l'étude réside en l'hypothèse suivante : l'observation de fibres en régénération dans les biopsies musculaires de jeunes chiens âgés de moins de 6 mois permettrait de justifier l'augmentation du pourcentage de fibres centronucléées par l'existence d'un processus chronique de nécrose / régénération. Les fibres centronucléées seraient le signe d'une importante régénération inachevée.

1) Le bilan de l'étude :

Les résultats de l'observation histologique des biopsies à l'aide de la coloration HE n'ont pas montré de pourcentage de régénération supérieur chez les animaux mutants par rapport aux animaux témoins quel que soit l'âge des chiots. D'ailleurs, tous les pourcentages restent inférieurs à 1 %. Il est admis que le nombre de fibres possédant un ou plusieurs noyaux centralisés ne doit pas excéder une valeur de 1 % dans un muscle normal. Chez

l'homme, il est considéré comme normal de trouver dans les biopsies musculaires entre 1 et 7 noyaux centralisés (14).

Par conséquent, toutes nos biopsies révèlent un muscle normal sur le plan de la régénération.

Que signifie ce résultat ? Les résultats des travaux antérieurs (5, 36) sur la CNM n'ont pas mis en évidence de signes majeurs de nécrose. Notre étude ne semble pas révéler les signes d'une importante régénération chez les animaux CNM. Ces observations ne sont donc pas en faveur d'un processus de nécrose / régénération tel qu'on le rencontre dans la myopathie dystrophique du Golden Retriever. Ces résultats n'excluent en aucune manière une affection myopathique primaire. Ils indiquent que la mutation génétique concernant la CNM n'induit pas une déficience moléculaire responsable d'une fragilité accrue du tissu musculaire vis à vis des dommages (telle que la déficience en dystrophine).

2) Critique de la méthode :

Dans notre étude, nous n'avons pas observé un comportement de régénération anormal des cellules musculaires. Un des éléments qui pourrait limiter la valeur de nos résultats est la certaine subjectivité qui réside dans l'observation des fibres en régénération. En effet, il est apparu au cours de l'étude une difficulté à reconnaître de façon sûre les cellules en régénération (en coloration H/E et au grossissement 20). Les cellules basophiles possédant un noyau central vésiculaire ont été interprétées comme des signes de régénération, c'est à dire comme des cellules engagées dans la myogenèse. Il s'agit de myoblastes. La confusion peut néanmoins avoir lieu avec des cellules satellites dont les expansions cytoplasmiques, l'aspect fusiforme ou l'hétérochromatine ne sont pas visibles. Certaines coupes présentent également des cellules qui apparaissent sans noyaux. Ces imprécisions peuvent générer des erreurs dans les comptages.

En revanche, il est certain que ces quelques erreurs de comptage ne peuvent faire varier les pourcentages étant donné le nombre total élevé de fibres visualisées.

Il aurait peut être été utile de réaliser plus de biopsies entre 5 et 6 mois, si l'on pense que le phénomène de régénération importante nous a échappé.

D'autres techniques permettraient de mieux apprécier le processus de régénération. Dans la première partie, nous avons vu que certaines molécules sont des marqueurs de la régénération musculaire. Ces marqueurs aideraient à identifier les stades précoces de la régénération et / ou les fibres dénervées.

B.Utilisation de l'immunohistochimie dans l'étude de la régénération :

L'immunohistochimie a élargi nos connaissances sur les protéines des fibres musculaires qui peuvent être maintenant visualisées par microscopie à fluorescence. Un grand nombre de protéines a été mis en évidence et certaines présentent des anomalies dans certaines affections neuromusculaires.

L'expression des molécules de la régénération persiste plus longtemps que les modifications cellulaires lors du renouvellement des fibres. Elle persiste également plus longtemps que les signes de nécrose. En médecine humaine, les anticorps sont utilisés pour caractériser les fibres en régénération dans les myopathies nécrosantes.

Nous avons vu qu'il existe une série de marqueurs de la régénération musculaire qui sont exprimés ou surexprimés dans des territoires différents et à des stades différents de la myogenèse.

1) La myosine néonatale :

La myosine néonatale est un excellent marqueur de la régénération, beaucoup utilisé. Elle est exprimée dans les fibres immatures et n'est plus visible lorsque l'intégrité morphologique des fibres est restaurée. Cette molécule qui apparaît dans les derniers stades de la régénération serait intéressante pour une telle étude.

2) La M-Cadhérine : (23)

La M-Cadhérine a un profil d'expression très ciblé : Les myoblastes et les myotubes récemment formés (c'est-à-dire de petit diamètre et sans lame basale propre). Son expression trop éphémère nécessiterait une succession plus importante de biopsies dans le temps pour estimer le potentiel de régénération.

3) La NCAM :

La NCAM est surexprimée lors de la régénération mais également lors d'une dénervation des fibres musculaires. La NCAM est un marqueur de la régénération et de la dénervation. Etant donné que nous ne connaissons pas la lésion primaire de cette affection (neuropathie ou myopathie) et l'influence neurale lors de la régénération chez les animaux CNM, ce marqueur ne pourrait être utilisé sans risque de fausser les résultats.

4) La desmine :

La desmine est surexprimée dans les jeunes myotubes, donc dans les stades tardifs de la régénération. Elle est également exprimée dans les fibres dénervées. L'identification des fibres atrophiées dénervées et des fibres en régénération semble difficile avec ce marqueur en raison d'un aspect similaire des deux types de fibres.

De plus, la différenciation entre les fibres régénérées et les fibres matures repose sur une différence d'intensité de réactivité qu'il faudrait quantifier.

Une autre difficulté réside dans le fait que la coloration non sarcomérique des très jeunes myotubes est difficile à voir sur les sections de muscles congelés (9).

Dans les études antérieures (5, 36), il a été mis en évidence une distribution irrégulière de la desmine dans les fibres matures chez les animaux CNM (ANNEXE 8). Ne connaissant pas la signification de cette expression anormale, la desmine ne semble pas être un marqueur à retenir pour l'étude de la régénération dans la CNM.

5) La vimentine :

La vimentine par son profil d'expression apparaît comme un marqueur potentiellement utilisable. Il a été montré que la vimentine n'était pas exprimée dans le muscle des chiens CNM adultes (36).

Indépendamment des quelques traces de vimentine présentes dans les fibres matures selon certains auteurs, les fibres matures et les fibres dénervées n'ont pas de réactivité dans les muscles congelés (9).

6) La nestine :

La nestine est un marqueur encore assez peu connu pour être utilisé.

La myosine néonatale et la vimentine sont les deux marqueurs les plus intéressants. Leur association dans l'étude de la régénération permettrait de révéler les stades de la détermination (avec la vimentine) et les stades de la différenciation.

L'association de la myosine néonatale et de la M-Cadhérine pourrait également être intéressante bien que la surexpression de la M-Cadhérine soit peu persistante. Mais l'étude de l'intensité de la réactivité serait nécessaire.

L'étude immunohistochimique serait un bon complément à notre étude de la régénération chez les chiots CNM et permettrait de supprimer le facteur subjectif de nos observations.

CHAPITRE II : LA MORPHOLOGIE DES PLAQUES MOTRICES CHEZ LES CHIENS CNM

A. Bilan de l'étude :

L'observation simple des plaques motrices à l'aide de l'immunohistochimie a permis de révéler des anomalies morphologiques des plaques motrices chez les animaux CNM : l'existence d'un bourgeonnement terminal du motoneurone et une fragmentation apparemment des plaques motrices.

1) Le bourgeonnement axonal :

Le bourgeonnement axonal est le signe d'une réinnervation accompagnant un processus de régénération ou de dénervation chronique. Le bourgeonnement terminal se rencontre donc dans les myopathies et les neuropathies dégénératives. Il peut s'agir d'une anomalie de guidage consécutive à un déficit des interactions moléculaires impliquées dans la formation des synapses. (30, 35, 41)

2) La fragmentation des plaques motrices :

L'élargissement des plaques motrices chez le chien CNM peut être également le reflet d'une anomalie dans la synaptogenèse ou dans le maintien de la structure des synapses. Ces modifications morphologiques expliqueraient peut être la faiblesse musculaire et la fatigabilité anormale des chiens atteints de CNM.

De toute évidence, il s'agit d'une preuve d'une affection neuromusculaire mais ces anomalies ne permettent en aucun cas de définir le niveau lésionnel de la CNM. Nous pouvons néanmoins exclure une anomalie morphologique majeure. Ces anomalies évoquent un défaut de la communication Nerf – Muscle.

B. Les connaissances antérieures sur le système nerveux périphérique : (5, 36)

1) Un système nerveux normal chez les chiens CNM :

Jusqu'à présent les différents travaux concernant la CNM n'ont pas mis en évidence d'anomalie du système nerveux périphérique, des motoneurons en particulier. Les plaques motrices n'ont pas d'anomalie ultrastructurale au microscope électronique (**Annexe 9**)

2) L'électrophysiologie musculaire: Annexe 10

En revanche, les examens électrophysiologiques de différents groupes musculaires ont mis en évidence des potentiels unitaires polyphasiques avec des composantes satellites qui révèlent une réorganisation des plaques motrices (que l'on rencontre dans les processus de réinnervation (15)).

Notre étude a ainsi montré les structures responsables de ces phénomènes électriques anormaux.

C. Critique de la méthode :

Cette étude a permis de révéler certaines anomalies au niveau des plaques motrices chez les chiens CNM, mais la fréquence de ces anomalies morphologiques n'a pas été évaluée.

Il serait intéressant d'établir le pourcentage de plaques présentant ces anomalies et d'étendre cette étude à un plus grand panel de chien d'âge différent.

L'élargissement des plaques n'a pas été quantifié. Une mesure des plaques permettrait d'appuyer nos observations microscopiques.

CONCLUSION

Notre analyse du phénomène spontané de la régénération musculaire chez les chiots atteints de myopathie centronucléaire semble permettre d'écarter l'hypothèse d'une dystrophie caractérisée par un processus de nécrose / régénération des fibres musculaires. Devant une régénération musculaire normale, l'hypothèse d'un processus régénératif perturbé expliquant la centralisation nucléaire, ne semble plus être à retenir. L'idée d'un mécanisme de migration secondaire des noyaux en position centrale serait à développer.

Les modifications que nous avons visualisées au niveau de certaines plaques motrices allongent la liste des anomalies histologiques connues chez les chiens malades. Elles sont les signes d'une réinnervation rencontrée dans les neuropathies et les myopathies.

Des découvertes génétiques récentes de la localisation de la mutation en cause sur le chromosome deux canin a permis d'utiliser des marqueurs génétiques dans le dépistage des animaux malades ou porteurs sains de la mutation. L'objectif à présent, est de caractériser l'anomalie génique d'évaluer les conséquences structurelles et fonctionnelles de cette anomalie sur la protéine codée par ce gène . Ces travaux sont effectués en comparaison avec les études réalisées sur la myopathie centronucléaire autosomique humaine qui s'apparente phénotypiquement à la CNM.

Cette étude ouvre la porte à plusieurs perspectives : étudier le potentiel et le mécanisme de régénération chez les chiens malades après une induction volontaire d'une nécrose musculaire, tester grâce à la biologie moléculaire et l'immunohistochimie différentes protéines susceptibles être liée à cette mutation.

Rapport-Gratuit.com

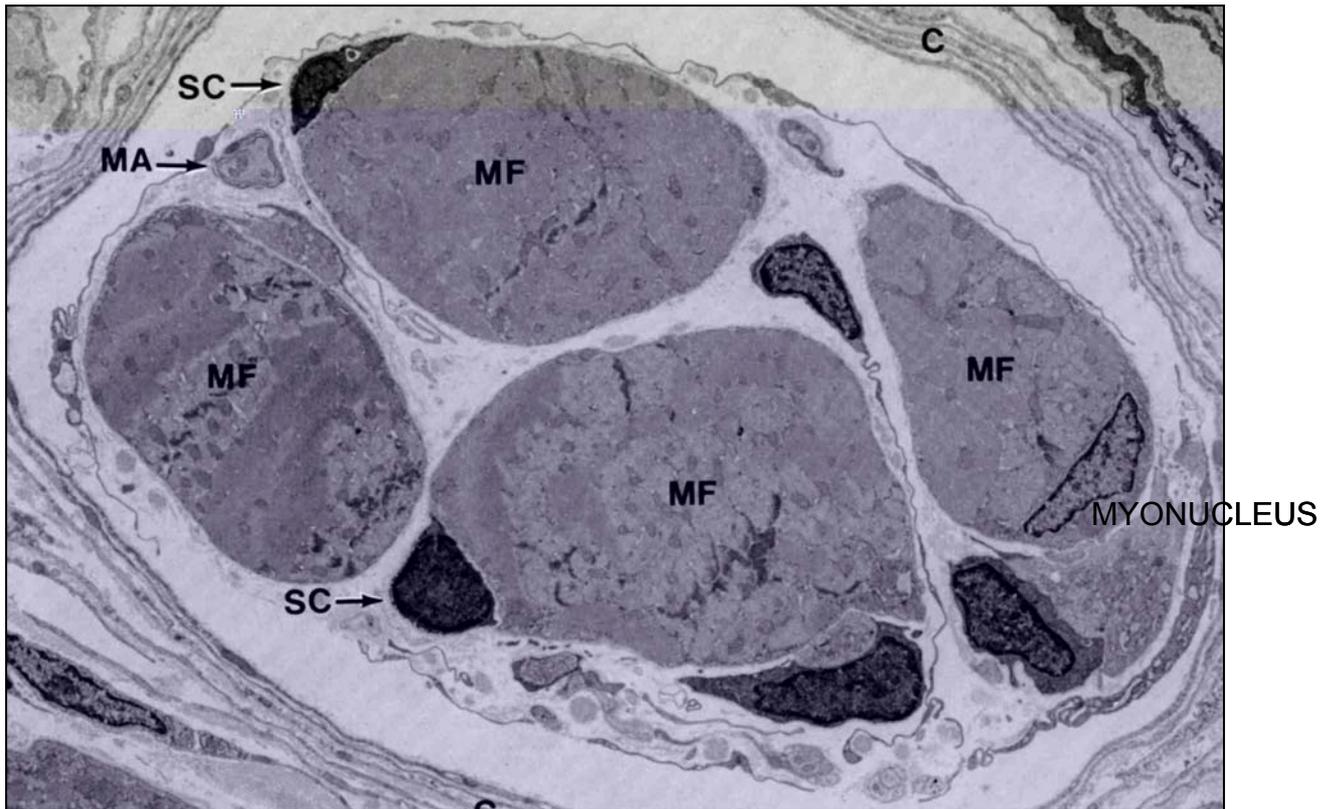
ANNEXES

Articles concernés	Maladie	Arguments en faveur d'une neuropathie primaire	Arguments en faveur d'une neuropathie 2°	Remarques
1987 McKerrel & Al (26)	MLRC		<ul style="list-style-type: none"> • Signe de régénération visibles sur les biopsies associées (présence de fibres basophiles avec un noyau vésiculaire) • Signes de nécrose (phagocytose de fibres, infiltrats focaux de cellules inflammatoires et présence de quelques fantômes) 	Hypothèse : Processus de nécrose / régénération
1988 Watson & Al (40)	MLRC	<ul style="list-style-type: none"> • Hyporéflexie • Présence de potentiel de fibrillation • Regroupement des fibres de type semblable (I ou II) 	<ul style="list-style-type: none"> • Centralisation importante • Modifications architecturales • Phénomènes de nécrose visibles • Signe de régénération associée de la fibrose 	
1991 Blot S. (7)	CNM	<ul style="list-style-type: none"> • Rares fibres nécrosées, fibres hypertrophiées surtout de type I, noyaux centraux, segmentation des fibres (signes retrouvés dans les formes chroniques de dénervation) • Hyporéflexie • Existence de potentiels polyphasiques de longue durée • Regroupement topographique des fibres I & II 	<ul style="list-style-type: none"> • Absence de lésion du nerf fibulaire commun 	Hypothèse émise : Amyotrophie spinale par dégénérescence des corps cellulaires des motoneurones de la corne ventrale

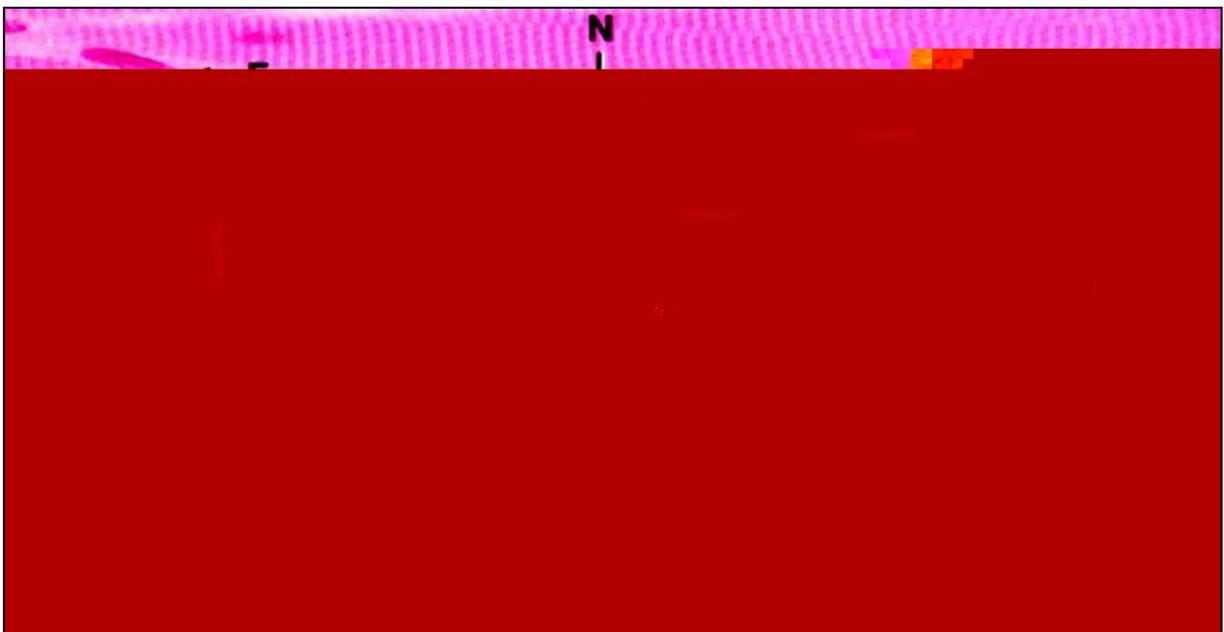
ANNEXE 1: Synthèse bibliographique concernant les différents arguments en faveur des deux hypothèses.

Types d'arguments	En faveur d'une neuropathie	Eléments rencontrés dans les 2 affections	En faveur d'une myopathie
CLINIQUES	Souvent de règle	Absence de réflexes myotatiques	Dans les myopathies congénitales
ELECTROPHYSIOLOGIQUES		Activité spontanée Potentiels de fibrillation Ondes positives lentes Décharges complexes répétitives Potentiels unitaires polyphasiques avec des composantes satellites (=phénomène de réorganisation des plaques motrices)	
BIOCHIMIQUES		CK normal à modérément élevé	Rem : dystrophine présente. Pas un processus de type dystrophinopathie
HISTOLOGIQUES	Potentiel de fasciculation	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Inégalité de calibre des fibres ➤ Prédominance fibres type 1 ➤ Accumulation d'adipocytes ➤ Centralisation nucléaire 	Altérations spécifiques du réseau intermyofibrillaire

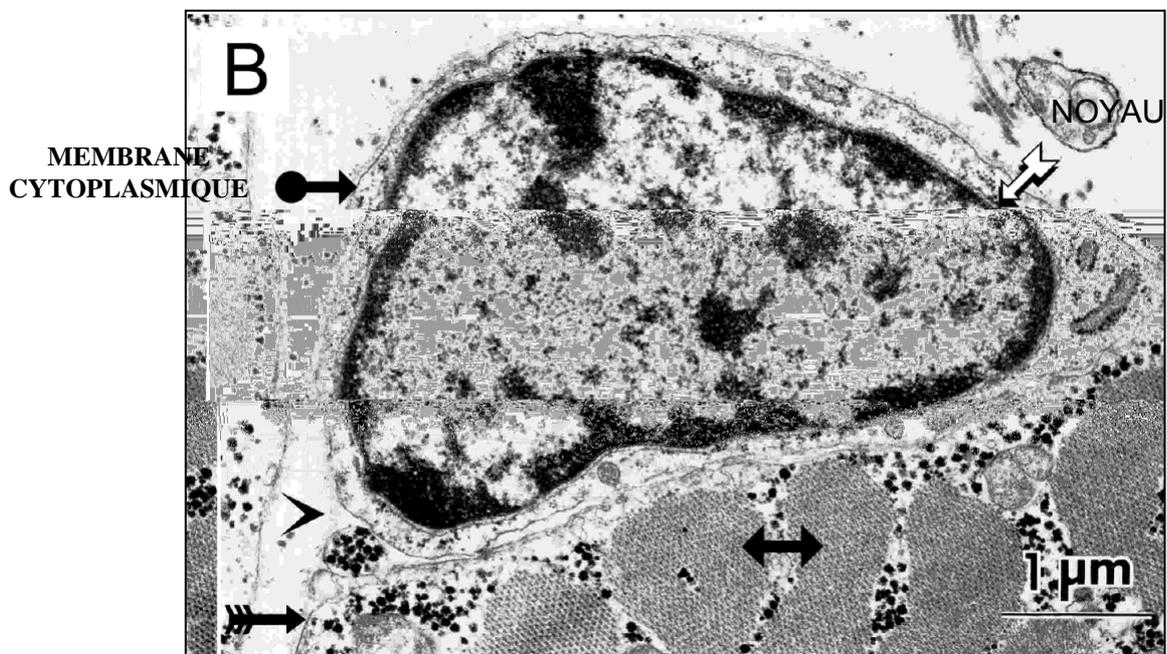
ANNEXE 2: Synthèse bibliographique des différents arguments en faveur des deux hypothèses. Thèse S. BLOT 1996.



ANNEXE 3: Coupe transversale de muscle au microscope électronique.
On peut observer 4 fibres musculaires (MF), et deux cellules satellites (SC).



ANNEXE 4: Coupe longitudinale d'un muscle strié . Coloration H / E.
La striation des fibres musculaires est due à l'alignement des sarcomères.
Les noyaux (N) sont en position subsarcolemmale (en périphérie)



ANNEXE 5: Cellule satellite au microscope électronique.

Marqueurs	Fibres matures	Cellules satellites	Myoblastes	Myotubes	Fibres dénervées	Autres sites d'expression musculaire
Desmine	+ stries Z Réseau intermyofibrillaire Sarcolemmes Jonctions NM	+ Bas niveau	+	++ Jeunes myotubes	+	
Vimentine			++	++ Jeunes myotubes		+ fibroblastes et vaisseaux sanguins
Nestine	+ Jonctions NM et MT		++	++		+ endothélium vasculaire et branches nerveuses intra musculaire
Myosine néonatale				++		
M-Cadhérine	+ Sarcolemme (uniquement site contact fibre/Cellule satellite)	+	++	Diminution après fusion		
NCAM	+ uniquement plaques motrices	rarement	++	++	++	+ axones des motoneurones

ANNEXE 6: Tableau récapitulatif de l'expression des différentes molécules marqueurs
(+ : faiblement exprimé, ++ : fortement exprimé)

➤ Lavage des coupes à l'eau distillée 2 minute

➤ Pré-incubation avec la solution :

Tampon acide acétique acétate M/5 à pH 5	5 mL
Eau distillée	4.6 mL
Solution A	0.4 mL

➤ Incubation avec la solution :

Tampon acide acétique acétate M/5 à pH5	5 mL
Eau distillée	4.6 mL
Solution A	0.4 mL
Iodure d'acétylthiochlorure	12 mg
Inhibiteur de l'AchE ou de la BchE	10 :m

➤ Lavage à l'eau distillée au moins 2 minutes

➤ Révélation au sulfure d'ammonium à 1%

➤ Lavages à l'eau distillée (plusieurs bains)

➤ Montages au sirop de levulose ou au « water mounting »

ANNEXE 7a : METHODE DE KOELLE ET FRIEDENWALD.

➤ Fixation du muscle au PAF (paraformaldéhyde) 4%, 60 minutes à température ambiante.

➤ Lavage au PBS, 3 fois 30 minutes à température ambiante

➤ Lavage au PBS/Glycine 0.1 M, toute la nuit à 4°C

➤ Lavage au PBS, 2 fois 30 minutes à température ambiante

➤ Saturation au PBS/BSA 3% 30 minutes

➤ Incubation avec l' α -Bgt-FITC au 1/2000 et la fasciculine-TRITC au 1/2000 dans PBS/BSA 3%, 2 heures à température ambiante et au noir.

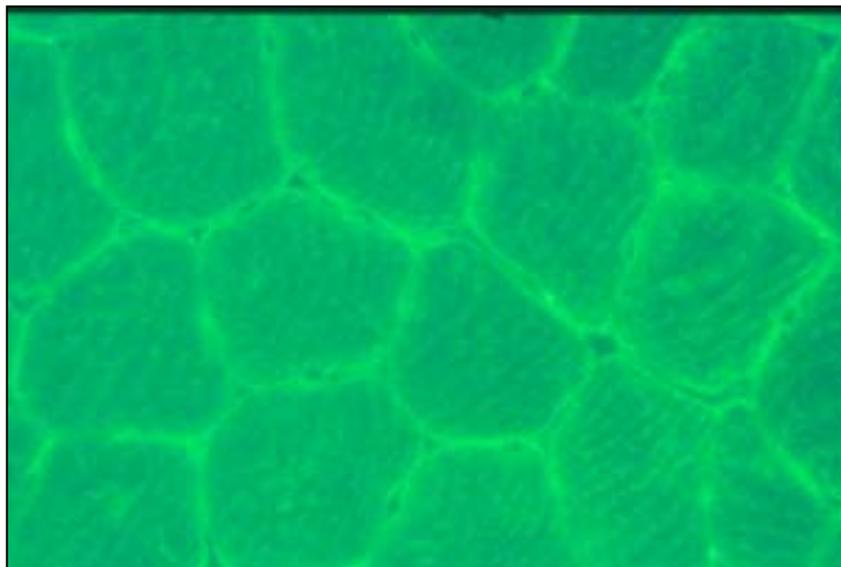
➤ Lavage au PBS, 3 fois 30 minutes à température ambiante et au noir

➤ Montage au VECTASHIELD (spécial confocal)

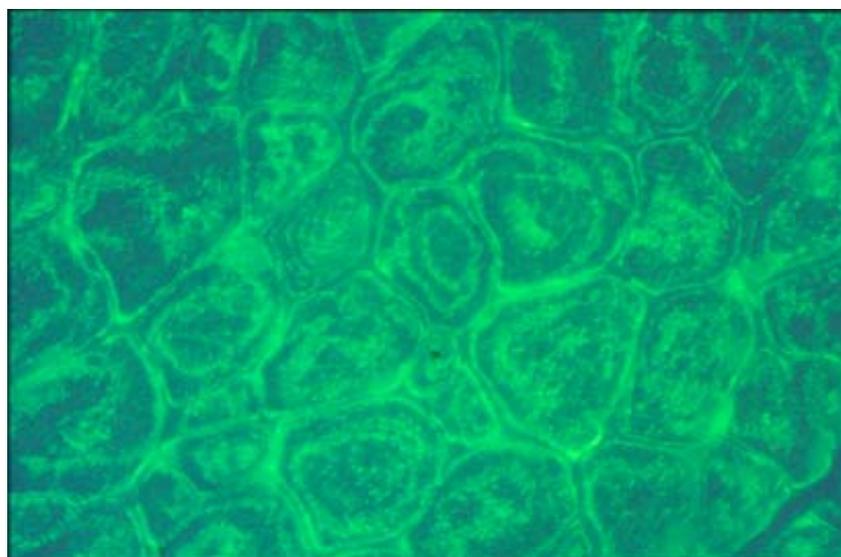
ANNEXE 7b : IMMUNOHISTOCHIMIE AChR / Fasciculine

- Fixation du muscle au PAF (paraformaldéhyde) 4%, 60 minutes à température ambiante.
- Lavage au PBS, 3 fois 30 minutes à température ambiante
- Lavage au PBS/Glycine 0.1 M, toute la nuit à 4°C
- Lavage au PBS, 2 fois 30 minutes à température ambiante
- Saturation au PBS/BSA 3% 30 minutes
- Incubation avec l' α -Bgt rhodaminée au 1/2000 dans PSB/BSA 3%, 2 heures à température ambiante et au noir
- Lavage au PBS, 3 fois 30 minutes à température ambiante à température ambiante et au noir
- Lavage au PBS, 3 fois 30 minutes à température ambiante et au noir
- Incubation avec l' anticorps secondaire anti-Ig G1 de souris couplé à la fluorescéine au 1/400 ou anti-Ig G de lapin couplé à la fluorescéine au 1/400 dans PBS/BSA 3% / Triton X 100 0.5%, toute la journée à 4°C et au noir
- Lavage au PBS, 3 fois 30 minutes au noir
- Montage au VECTASHIELD (spécial confocal)

ANNEXE 7c: IMMUNOHISTOCHIMIE AChR / Neurofilament



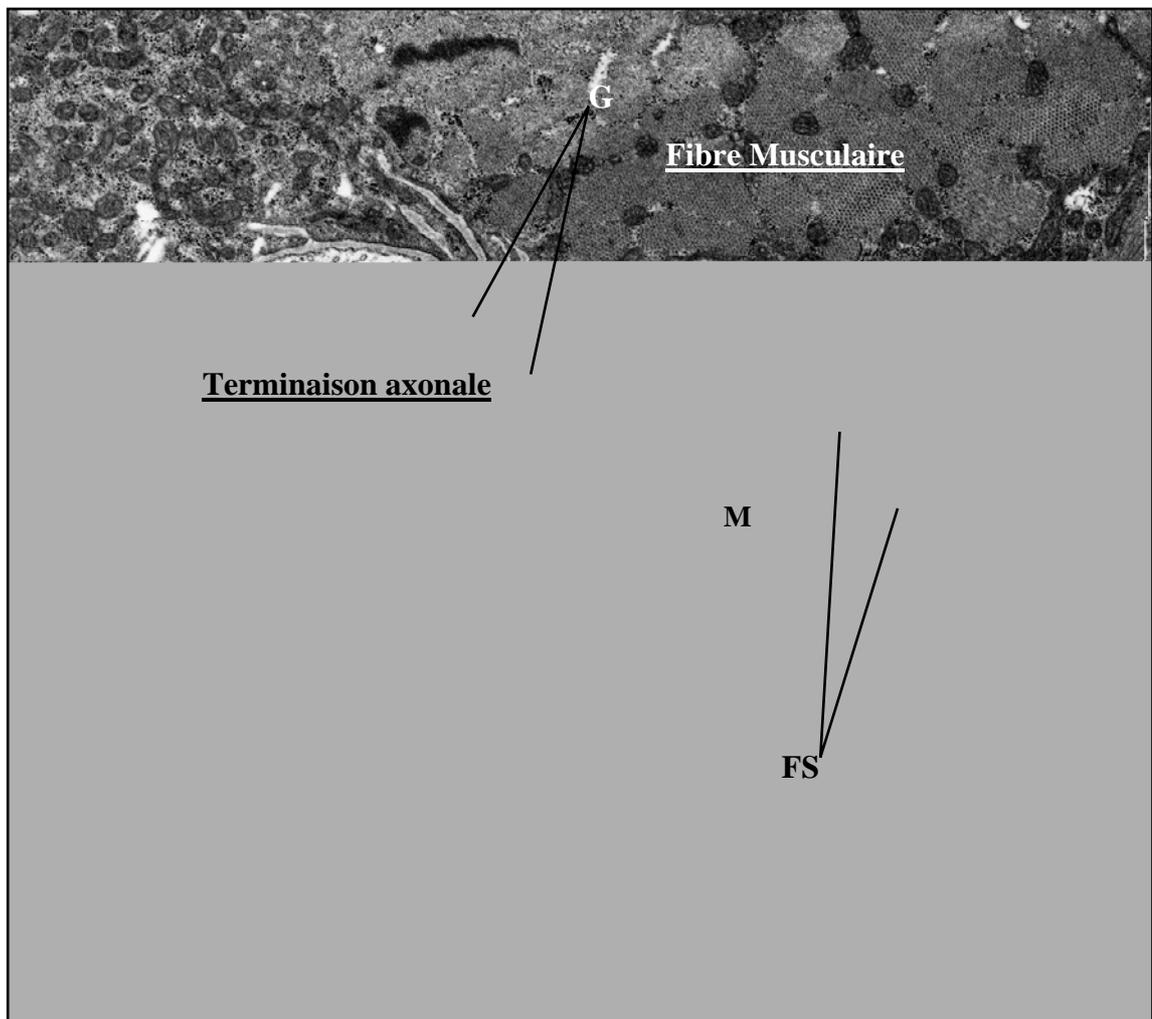
A: Chien sain.



B. Chien CNM On observe une perturbation de l'expression de la desmine.

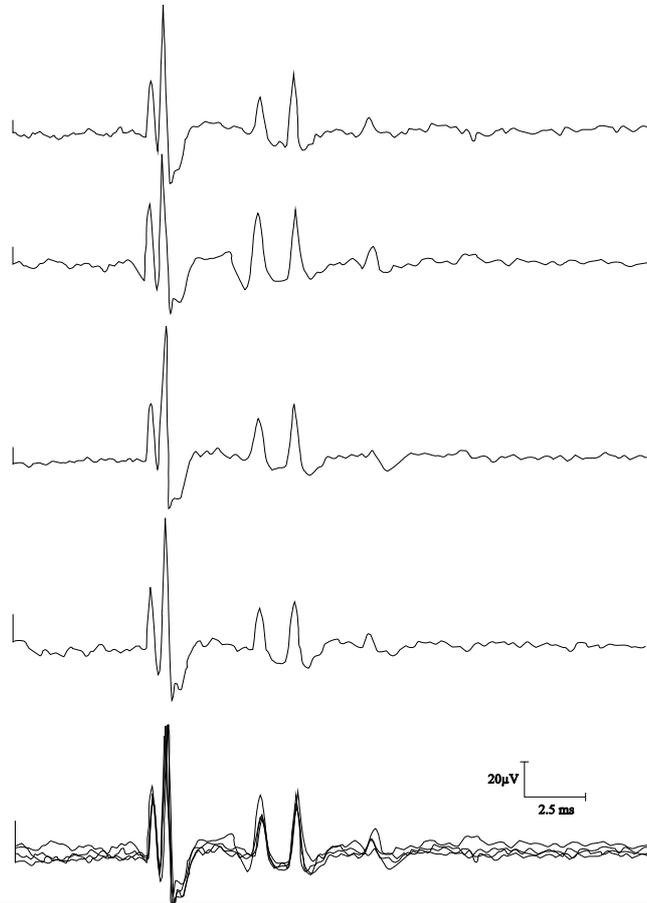
ANNEXE 8 : Immunoreactivité à la desmine chez un Labradors malade CNM et sain de 24 mois.

Fluorescence verte. (Photos S. BLOT)



ANNEXE 9 : Plaque motrice d'un chien CNM au microscope électronique.

On n'observe aucune anomalie ultrastructurale. La membrane plasmique de la fibre musculaire forme des replis profonds : les fentes synaptiques (**FS**). Dans la terminaison axonale, on observe de nombreux granules neurosécrétoires (**G**) contenant de l'acétylcholine et de nombreuses mitochondries (**M**).



Potentiels polyphasiques recueillis sur les électromyogrammes de chiens CNM. (S. BLOT)

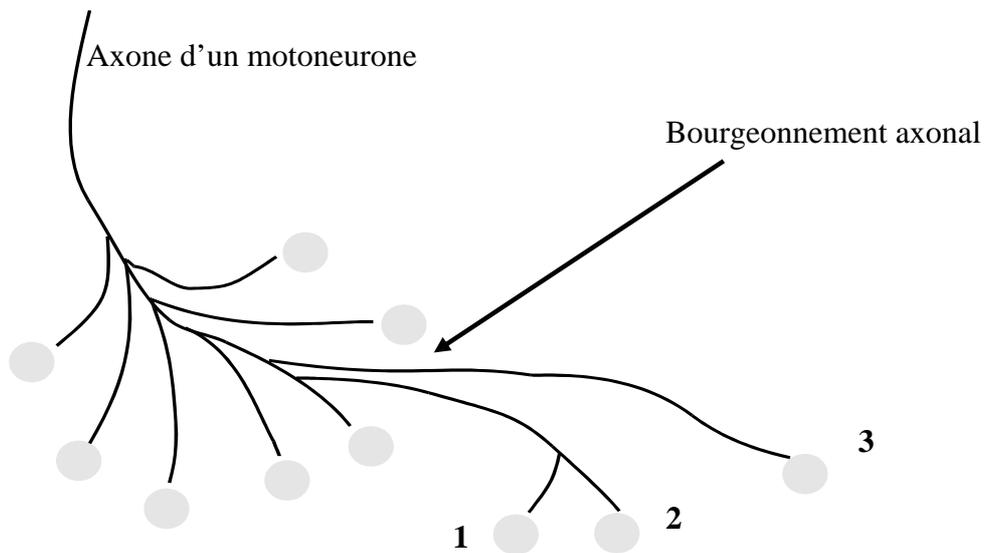


Schéma explicatif des potentiels polyphasiques de réinnervation.

ANNEXE 10 : Etude électrophysiologique de chiens CNM : les potentiels polyphasiques de réinnervation.

Rapport-Gratuit.com

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- (1) AGBULUT O., LI Z., PRERIE S., LUDOSKY M.A., PAULIN D., CARTAUD J., BUTLER-BROWNE G., Lack of desmin results in abortive muscle regeneration and modifications in synaptic structure, *Cell Motil. Cytoskeleton*, 2001, **49**(2), 51-66.
- (2) ALLBROOK D., Skeletal muscle regeneration, 1981, *Muscle Nerve*, **4**, 234-245.
- (3) BAILEY P. HOLOWACZ T., LASSAR A.B., The origin of skeletal stem cells in the embryo and the adult, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2001, **13**, 679-689.
- (4) BALICE-GORDON R.J., SMITH B.J., GOLDMAN J., CORK L. C., SHIRLEY A., COPE T. C., PINTER M.J., Functional motor unit failure precedes neuromuscular degeneration in canine motor neuron disease, *Ann. Neurol.*, 2000, **47**, 596-605.
- (5) BLOT S., *Caractérisation de deux mutations neuromusculaires animales : une amyotrophie spinale chez la souris et une myopathie « centronucléaire » chez le chien. Valeur et limites des phénotypes issus de mutations spontanées*, Thèse doct., université Paris VI, 1996, 166p.
- (6) BLOT S., Les myopathies des carnivores domestiques. Première Partie : le muscle strié squelettique : structure, fonction et sémiologie, *Prat. Méd. Chir. Anim. Comp.*, 1995, **30**, 11-25.
- (7) BLOT S., FUHRER L., Les myopathies des carnivores domestiques. Deuxième Partie : étude spéciale, *Prat. Méd. Chir. Anim. Comp.*, 1995, **30**, 27-43.
- (8) BLOT S., MORAILLON R., Myopathie héréditaire d'un Labrador Retriever, *Point Vét.*, 1991, **23**, N° spécial Neurologie, 757-765.
- (9) BORNEMANN A., SCHMALBRUCH H., Desmin and vimentin in regenerating muscles, *Muscle Nerve*, 1992, **15**, 14-20.

- (10) BORNEMANN A., SCHMALBRUCH H., Immunocytochemistry of M-Cadherin in mature and regenerating rat muscle, *Anat. Rec.*, 1994, **239**, 119-125.
- (11) BRAUND K.G., Hereditary myopathy in Labrador Retrievers, *Calif. Vet.*, 1985, **39**(2), 18-24.
- (12) BRAUND K.G., AMLING K.A., Muscle biopsy samples for histochemical processing : alterations induced by storage, *Vet. Pathol.*, 1988, **25**, 77-82.
- (13) BRAUND K.G., HOFF E.J., RICHARDSON E.Y., Histochemical identification of fiber types in canine skeletal muscle, *Am. J. Vet. Res.*, 1978, **39**(4), 561-565.
- (14) BRAUND K.G., McGUIRE J.A., LINCOLN C.E., Observations on normal skeletal muscle of mature dogs : a cytochemical, histochemical and morphometric study, *Vet. Pathol.*, 1982, **19**, 577-595.
- (15) D'ALBIS A., COUTEAUX R., MIRA J.C., JANMOT C., ROULET A., Isoformes de la myosine synthétisées au cours de la régénération de muscles squelettiques à contraction rapide, en présence du nerf moteur et après dénervation. Etude chez le rat et la souris adultes, *Reprod. Nutr. Develop.*, 1988, **28**(3b), 753-756.
- (16) DONALIES M., CRAMER M., RINGWALD M., STARZINSKI-POWITZ A., Expression of M-Cadherin, a member of the cadherin multigene family, correlates with differentiation of skeletal muscle cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, **88**, 8024-8028.
- (17) GALLANTI A., PRELLE A., MOGGIO M., CISCATO P., CHECCARELLI N., SCIACCO M., COMINI A., SCARLATO G., Desmin and vimentin as markers of regeneration in muscle diseases, *Acta Neuropathol.*, 1992, **85**, 88-92.
- (18) GOEDEL H.H., Desmin-related neuromuscular disorders, *Muscle Nerve*, 1995, **18**, 1306-1320.

- (19) GROUNDS M.D., Towards understanding skeletal muscle regeneration, *Path. Res. Pract.*, 1991, **187**, 1-22.
- (20) GROUNDS M.D., Muscle regeneration : molecular aspects and therapeutic implications, *Curr. Opin. Neurol.*, 1999, **12**, 535-543.
- (21) HAWKE T.J., GARRY D.J., Myogenic satellite cells : physiology to molecular biology, *J. Appl Physiol.*, 2001, **91** (2), 534-551.
- (22) HOSKINS J.D., ROOT C.R., Myopathy in a Labrador Retriever, *Vet. Med. Small Anim. Clin.*, 1983, **78**, 1387-1390.
- (23) IRINTCHEV A., ZESCHNIGK M., STARZINSKI-POWITZ, WERNIG A., Expression pattern of M-Cadherin in normal, denervated and regenerating mouse muscles, *Dev. Dyn.*, 1994, **199**, 326-337.
- (24) ISHII A., LO S.H., A role of tensin in skeletal muscle regeneration, *Biochem. J.*, 2001, **356**, 737-745.
- (25) KRAMER J.W., HEGREBERG G.A., BRYAN G.M.B., MEYERS K., OTT R.L., A muscle disorder of Labrador Retrievers characterized by deficiency of type II muscle fibers, *J.A.V.M.A.*, 1976, **169** (8), 817-820.
- (26) McKERRELL R.E., BRAUND K.G., Hereditary myopathy in Labrador Retriever : A morphologic study, *Vet. Pathol.*, 1986, **23**, 411-417.
- (27) McKERREL R.E., BRAUND K.G., Hereditary myopathy in Labrador Retrievers : clinical variations, *J. Small Anim. Pract.*, 1987, **28**, 479-489.
- (28) MENDLER L., ZADOR E., VER MEYEN M., DUY L., WUYTACK F., Myostatin levels in regenerating rat muscles and myogenic cell cultures, *J. Muscle Res. Cell Mot.*, 2000, **21**, 551-563.

- (29) MERLY F., LESCAUDRON L., ROUAUD T., CROSSIN F., GARDAHAUT M.F., Macrophages enhance muscle satellite cell proliferation and delay their differentiation, *Muscle Nerve*, 1999, **22**(6), 724-732.
- (30) MILLECAMPS S., NICOLLE D., CEBALLOS-PICOT I., MALLET J., BARKATS M., Synaptic sprouting increase the uptake capacities of motoneurons in amyotrophic lateral mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, **98**(13), 7582-7587.
- (31) PETTE D., STARON R.S., Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions, *Microsc. Res. Tech.*, 2000, **50**, 500-509.
- (32) PLAGHKI L., Régénération et myogenèse du muscle strié, *J Physiol.*, 1985, **80**, 51-110.
- (33) POUGET J., GASTAUT J.L., PELLISIER J.F., CROS D., SERRATRICE G., Aréflexie tendineuse au cours des myopathies congénitales comportant une atrophie des fibres de type I. Etude électrophysiologique, *Rev. E.E.G. Neurophysiol.*, 1984, **13**, 323-328.
- (34) RENAULT V., PIRON-HAMELIN G., FORESTIER C., DIDONNA S., DECARY S., HERTATI F., SAILLANT G., BUTLER-BROWNE G.S., MOULY W., Skeletal muscle regeneration and the mitotic clock, *Exp. Gerontol.*, 2000, **35** (6-7), 711-719.
- (35) SANES J.R., LICHTMAN J.W., Development of vertebrate neuromuscular junction, *Annu. Rev. Neurosci.*, 1999, **22**, 389-442.
- (36) SAVARY M., *Contribution à l'étude d'une maladie neuromusculaire canine : la myopathie centronucléaire du Labrador Retriever*. Thèse Méd. Vét., Alfort, 1995, 72p.
- (37) SEALE P., RUDNICKI M.A., A new look at the origin fonction and « stem-cell » status of muscle satellite cells, *Dev. Biol.*, 2000, **218**, 115-124.

- (38) SMYTHE G.M., DAVIES M.J., PAULIN D., GROUNDS M.D., Absence of desmin slightly prolongs myoblast proliferation and delays fusion in vivo in regeneratig grafts of skeletal muscle, *Cell Tissue Res.*, 2001, **304**, 287-294.
- (39) TAYLOR M.V., Muscle differentiation : How two cells become one, *Curr. Biol.*, 2002, **12**, 224-228.
- (40) TORGAN C.E., DANIELS M.P., Regulation of Myosin Heavy Chain expression during rat skeletal muscle development in vitro, *Mol. Biol. Cell*, 2001, **12** (5), 1499-1508.
- (41) UHM C.-S., NEUHUBER B., LOWE B., CROCKER V., DANIELS M., Synapse – forming axons and recombinant agrin induce microprocess formation on myotubes, *J. Neurosci.*, 2001, **21**(24), 9678-9689.
- (42) VAITTINEN S., LUKKA R., SAHLGREN C., HURME T., RANTANEN J., LENDAHL U., ERIKSSON E., KALIMO H., The expression of intermediate filament protein nestin as related to vimentin and desmin in regenerating skeletal muscle, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 2001, **60**, 588-596.
- (43) WALSH F.S., HOBBS C., WELLS D.J., SLATER C.R., FAZELI S., Ectopic expression of NCAM in skeletal muscle of transgenic mice results in terminal sprouting at the neuromuscular junction and altered structure but not function, *Mol. Cell. Neuro.*, 2000, **15**, 244-261.
- (44) WATSON A.D.J., FARROW B.R.H., MIDDLETON D.J., SMYTH J.B.A., Myopathy in Labrador Retriever, *Aust. V. J.*, 1988, **65** (7), 226-227.
- (45) WHALEN R.G., Myosin isoenzymes as molecular markers for muscle physiology, *J. Exp. Biol.*, 1985, **115**, 43-53.
- (46) WILSON L.A., DUX L., COOPER B. J., DUBOWITZ V.,SEWRY C.A., Experimental regeneration in canine muscular dystrophy. 2. Expression of myosin heavy chain isoforms, *Neuromusc. Disord.*, 1994, **4** (1), 25-37.

- (47) WINTER A., BORNEMANN A., NCAM, vimentin and neonatal myosin heavy chain expression in human muscle diseases, *Neuropathol. Ap neurobiol.*, 1999, **25**, 417-424.
- (48) ZESCHNIGK M., KOZIAN D., KUCH C., SCHMOLLM., STARZINSKI-POWITZ A., Involvement of M-Cadherin in terminal differentiation of skeletal muscle cells, *J. Cell Sci.*, 1995, **108**, 2973-2981.