

Table des matières

Liste des tableaux et figures	7
Liste des tableaux	7
Liste des figures	8
Liste des annexes	9
Liste des abréviations	11
Introduction	13
Première partie : Présentation du modèle expérimental.....	15
1. La myopathie centronucléaire du Labrador, un modèle de myopathie humaine	15
<i>1.1. Les myopathies myotubulaires/centronucléaires humaines</i>	15
<i>1.1.1. Myopathie myotubulaire : forme récessive liée à l’X</i>	15
<i>1.1.2. Myopathies centronucléaires : formes autosomiques</i>	18
<i>1.2. La myopathie héréditaire du Labrador, un modèle spontané de myopathie centronucléaire.</i>	18
<i>1.2.1. Historique</i>	18
<i>1.2.2. Présentation clinique de la myopathie centronucléaire du Labrador</i>	19
1.2.2.1. Posture et démarche	19
1.2.2.2. Examen neurologique	20
1.2.2.3. Examens complémentaires	20
<i>1.2.3. Analyse histologique</i>	22
1.2.3.1. Atrophie et hypertrophie des fibres musculaires	22

1.2.3.2.	Centralisations nucléaires	22
1.2.3.3.	Remodelage des fibres musculaires	23
1.2.3.4.	Modification de la topographie des fibres	23
1.2.4.	<i>Analogie entre myopathie centronucléaire du Labrador et formes autosomiques de myopathies centronucléaires humaines</i>	23
1.3.	<u>La myopathie centronucléaire du Labrador à l'origine d'un nouveau locus pour les maladies neuromusculaires</u>	24
1.3.1.	<i>La myopathie myotubulaire à l'origine d'une nouvelle famille de gènes impliqués dans les maladies neuromusculaires</i>	24
1.3.2.	<i>Mode de transmission de la myopathie centronucléaire du Labrador</i>	25
1.3.3.	<i>Caractérisation du gène responsable</i>	25
1.3.3.1.	Caractérisation du locus canin	25
1.3.3.2.	Identification d'un gène candidat	26
1.3.3.3.	Recherche d'un test de complémentation fonctionnelle.....	26
2.	L'urètre de la chienne : physiologie et évaluation fonctionnelle	27
2.1.	<u>Structure et innervation du bas appareil urinaire de la chienne</u>	27
2.1.1.	<i>Structure du bas appareil urinaire de la chienne</i>	24
2.1.1.1.	Anatomie	28
2.1.1.1.1.	Anatomie de la vessie	28
2.1.1.1.1.1.	Conformation extérieure et topographie	28
2.1.1.1.1.2.	Dimensions et variations physiologiques	28
2.1.1.1.1.3.	Structure de la paroi vésicale	28
2.1.1.1.1.4.	Cas particulier du trigone vésical	28
2.1.1.1.2.	Anatomie de l'urètre de la chienne	29
2.1.1.1.2.1.	Conformation extérieure et topographie	29
2.1.1.1.2.2.	Dimensions et variations physiologiques	29

2.1.1.1.2.3.	Structure de la paroi urétrale	29
2.1.1.2.	Histologie et morphométrie du bas appareil urinaire de la chienne	30
2.1.1.2.1.	Analyse histologique de l'urètre et de la vessie de la chienne	30
2.1.1.2.2.	Analyse morphométrique de l'urètre et de la vessie chez la chienne	32
2.1.1.2.3.	Histochimie et morphométrie des structures assurant la continence urinaire	35
2.1.2.	<i>Innervation du bas appareil urinaire de la chienne</i>	38
2.1.2.1.	Innervation périphérique	38
2.1.2.1.1.	Innervation sensitive	38
2.1.2.1.2.	Innervation motrice	39
2.1.2.1.2.1.	Innervation végétative	39
2.1.2.1.2.1.1.	Les fibres sympathiques.....	39
2.1.2.1.2.1.2.	Les fibres parasympathiques.....	40
2.1.2.1.2.2.	Innervation somatique.....	40
2.1.2.1.2.3.	Les terminaisons nerveuses intra-pariétales.....	41
2.1.2.2.	Le contrôle central de l'activité vésico-sphinctérienne.....	43
2.1.2.2.1.	Les centres médullaires.....	43
2.1.2.2.2.	Les centres encéphaliques.....	43
2.1.3.	<i>Fonctionnement du bas appareil urinaire chez le Chien</i>	44
2.1.3.1.	Le cycle de fonctionnement vésico-urétral.....	45
2.1.3.2.	Le remplissage vésical ou phase de continence urinaire.....	45
2.1.3.2.1.	Continence passive : premier temps du remplissage vésical.....	45
2.1.3.2.2.	Continence active : second temps du remplissage vésical.....	46
2.1.3.3.	La vidange vésicale: phase mictionnelle.....	47
2.1.3.3.1.	Déclenchement de la miction avec le réflexe mictionnel.....	47
2.1.3.3.2.	Maintien du réflexe mictionnel.....	48
2.2.	<u>Evaluation de l'activité urétrale par la profilométrie</u>	

2.2.1.	<i>Principes de la profilométrie urétrale</i>	49
2.2.2.	<i>Lecture et interprétation des profils de pression urétrale</i>	51
2.2.3.	<i>Relation entre le profil de pression urétrale de la chienne et l'anatomie de l'urètre</i>	53
2.2.4.	<i>Relation entre le profil de pression urétrale et le fonctionnement sphinctérien</i>	55
2.3.	<u>Influence du cycle sexuel de la chienne sur le profil de pression urétral</u>	55
2.3.1.	<i>Sécrétions hormonales au cours du cycle sexuel de la chienne</i>	55
2.3.2.	<i>Influence hormonale sur le sphincter strié</i>	58
2.3.2.1.	Les récepteurs aux hormones sexuelles du système vésico-sphinctérien.....	58
2.3.2.2.	Rôle des œstrogènes.....	58
2.3.2.3.	Rôle de la progestérone.....	59
2.3.3.	<i>Conséquences sur le profil de pression urétrale</i>	60

Deuxième partie : Analyse fonctionnelle

du tonus urétral chez les Labradors

femelles *cnm* au cours de l'anœstrus.....61

1.	Présentation de l'étude	61
1.1.	<u>Présentation des travaux d'EDERY réalisés en 2003</u>	61
1.2.	<u>Objectifs de l'étude</u>	63
2.	Animaux, matériel et méthodes	63
2.1.	<u>Animaux utilisés</u>	63
2.1.1.	<i>Choix et identification des animaux</i>	63
2.1.2.	<i>Dosage de la progestéronémie</i>	64
2.1.3.	<i>Préparation des animaux</i>	65
2.1.4.	<i>Traitement anti-inflammatoire et prophylaxie antiseptique</i>	65
2.2.	<u>Profilométrie urétrale</u>	65

2.2.1.	<i>Matériel utilisé</i>	65
2.2.2.	<i>Description des sondes et mise en place</i>	66
2.2.3.	<i>Capteurs de pression, traitement du signal</i>	66
2.2.4.	<i>Retrait de la sonde</i>	66
2.2.5.	<i>Description du déroulement d'un profil de pression urétrale</i>	67
2.2.6.	<i>Paramètres quantitatifs des profils obtenus</i>	68
2.3.	<i>Outils statistiques</i>	71
3.	Résultats	71
3.1.	<u>Effet du génotype sur la pression de clôture</u>	71
3.2.	<u>Effet du génotype sur la longueur urétrale fonctionnelle</u>	72
3.3.	<u>Effet du génotype sur l'aire sous la courbe</u>	72
3.4.	<u>Modifications du profil de pression urétrale avec l'âge</u>	77
	Troisième partie : Discussion	81
1.	Discussion de certains choix dans le protocole expérimental	81
1.1.	<u>Intérêt du choix de l'ancêtre pour la réalisation des profils</u>	81
1.2.	<u>Méthodes employées pour connaître la phase du cycle sexuel des chiennes</u>	81
1.3.	<u>Intérêt de la réalisation des examens sur les animaux vigiles</u>	82
1.4.	<u>Intérêt de l'utilisation du logiciel <i>Canvas</i></u>	83
2.	Absence d'effet de la myopathie centronucléaire sur le sphincter urinaire strié	83
3.	Absence d'effet de l'âge sur le tonus urétral des chiennes	84
	Conclusion	87
	Bibliographie	89

Annexe.....95

Liste des tableaux et figures

Liste des tableaux

Tableau 1 : Effet de la myopathie centronucléaire du Labrador sur la pression de clôture (PC), la longueur urétrale fonctionnelle (LUF) et l'aire sous la courbe (AC) chez les mâles.

Tableau 2 : Effet de la myopathie centronucléaire du Labrador sur la pression de clôture (PC) en phase d'œstrus et de pro-œstrus (F), et en phase d'ancœstrus et de fin de métœstrus (A).

Tableau 3 : Test F réalisé entre le groupe témoin et le groupe malade pour la pression de clôture (PC).

Tableau 4 : Test t réalisé entre le groupe témoin et le groupe malade pour la pression de clôture (PC) et éclaté en fonction des classes d'âge adulte (A) et jeune (J).

Tableau 5 : Statistiques descriptives de la pression de clôture (PC) en fonction des groupes malades (séparés en adultes et jeunes) et témoins (séparés en adultes et jeunes).

Tableau 6 : Test F réalisé entre le groupe témoin et le groupe malade pour la longueur urétrale fonctionnelle (LUF).

Tableau 7 : Test t réalisé entre le groupe témoin et le groupe malade pour la longueur urétrale fonctionnelle (LUF) et éclaté en fonction des classes d'âge adulte (A) et jeune (J).

Tableau 8 : Statistiques descriptives de la longueur urétrale fonctionnelle (LUF) en fonction des groupes malades (séparés en adultes et jeunes) et témoins (séparés en adultes et jeunes).

Tableau 9 : Test F réalisé entre le groupe témoin et le groupe malade pour l'aire sous la courbe (AC).

Tableau 10 : Test t réalisé entre le groupe témoin et le groupe malade pour l'aire sous la courbe (AC) et éclaté en fonction des classes d'âge adulte (A) et jeune (J).

Tableau 11 : Statistiques descriptives de l'aire sous la courbe (AC) en fonction des groupes malades (séparés en adultes et jeunes) et témoins (séparés en adultes et jeunes).

Tableau 12 : Test t réalisé entre le groupe adulte (A) et le groupe jeune (J) pour l'aire sous la courbe (AC) et éclaté en fonction des phénotypes malade et témoin.

Tableau 13 : Statistiques descriptives de l'aire sous la courbe (AC) en fonction des classes d'âge adulte (A) et jeune (J), divisées selon les phénotypes témoin ou malade.

Tableau 14 : Test t réalisé entre les trois classes d'âges (vieilles (V), adulte (A), et le groupe jeune (J)) pour la pression de clôture (PC) et éclaté en fonction des phénotypes malade et témoin.

Tableau 15 : Test t réalisé entre les trois classes d'âges (vieille (V), adulte (A), et jeune (J)) pour l'aire sous la courbe (AC) et éclaté en fonction des phénotypes malade et témoin.

Liste des figures

Figure 1 : Organisation des cellules musculaires au cours de la myogénèse. D'après LAPORTE *et al* (32).

Figure 2 : Désorganisation du réseau myofibrillaire sur des coupes transversales de muscles schématisées. D'après LAPORTE *et al* (32).

Figure 3 : Amyotrophie sévère, ventroflexion du cou et augmentation du polygone de sustentation chez un Labrador Retriever malade.

Figure 4 : Structure de la paroi de la vessie et de l'urètre chez la chienne (représentation des volumes relatifs des constituants tissulaires). D'après CULLEN *et al* (17).

Figure 5 : Volume moyen (en % du total) des constituants du muscle strié D'après AUGSBURGER et CRUZ-ORIVE (2).

Figure 6 : Innervation du bas appareil urinaire du chien. D'après COUTO (15).

Figure 7 : Schéma d'un profil de pression urétrale : la sonde urinaire (en haut), lors du retrait, enregistre la pression le long de l'urètre (en bas). D'après GOOKIN *et al* (22).

Figure 8 : Paramètres caractérisant le profil de pression urétrale.

Figure 9 : Profil de pression urétrale en relation avec les structures anatomiques chez la chienne. D'après GOOKIN *et al* (22).

Figure 10 : Le cycle sexuel de la chienne.

Figure 11 : Tracé brut du profil de pression urétrale de « Myo » obtenu par le logiciel, avec les valeurs des paramètres calculées par celui-ci (AC, LUF, PC, ZC).

Figure 12 : Profil de pression urétrale de « Myo », après avoir retravaillé le tracé sous *Canvas*.

Figure 13 : Histogrammes représentant les moyennes +/- l'erreur standard moyenne de chacun des paramètres étudiés (PC, LUF, AC) pour le groupe des malades et le groupe des témoins.

Liste des annexes

Annexe : Liste des chiennes et de toutes les données prises en compte au cours de l'étude. (PC : pression de clôture exprimée en centimètres d'eau, LUF : longueur urétrale fonctionnelle en millimètres, ZC : zone de clôture en millimètres, AC : aire sous la courbe en millimètres par millimètres d'eau, A : adulte, J : jeune)

Liste des abréviations

AC : aire sous la courbe

cnm : myopathie centronucléaire du Labrador

LH : luteinizing hormone, hormone lutéinisante

LUF : longueur urétrale fonctionnelle

MLR ou LRM : myopathie du Labrador retriever

MTM1 : myotubularine, protéine responsable de la myopathie myotubulaire humaine

MTMR : Myotubularine Related

PC : pression maximale de clôture

ZC : zone de clôture

Introduction

Le Chien présente un regain d'intérêt en médecine par la contribution qu'il peut offrir aujourd'hui dans l'identification d'allèles responsables de maladies, modèles d'affections humaines. La domestication du chien a en effet conduit à fixer de nombreuses races en concentrant, de façon évidemment involontaire, des combinaisons alléliques délétères. L'utilisation abusive, dans de nombreuses races, de certains animaux « champion » la dissémination de combinaisons néfastes à la santé des chiens : aujourd'hui, on recense plus de 400 maladies héréditaires canines. Le décryptage récent du génome canin est une étape majeure dans l'avancée des études portant sur la caractérisation de locus de maladies, tremplin pour la meilleure compréhension de l'étiologie et de la physiopathologie des maladies homologues chez l'homme.

Un pedigree expérimental de Labradors Retrievers atteints de myopathie centronucléaire a été développé à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort par le docteur Stéphane BLOT qui, le premier a identifié cette myopathie en France. Cette myopathie à transmission autosomique récessive présente un tableau clinique, un aspect histologique, et un mode de transmission génétique similaires à une myopathie humaine. Elle représente donc un bon modèle animal pour celle-ci. Cette myopathie centronucléaire du Labrador touche les muscles striés squelettiques. Cependant, une partie des chiens présente également un mégacœsophage, et l'on peut légitimement se demander si d'autres muscles striés non squelettiques sont touchés.

La possibilité de réaliser des profils de pression urétrale sur les chiens a permis d'explorer une atteinte éventuelle du sphincter urinaire strié. Une étude préalable à la nôtre sur l'ensemble du pedigree expérimental n'a mis en évidence aucune atteinte du sphincter urinaire strié chez les mâles. En revanche, des résultats en faveur d'une atteinte du sphincter chez les femelles étaient à la limite de la significativité ; le faible nombre d'animaux dans cette étude ne permettait pas de conclure de façon sûre.

Dans cette étude, nous nous proposons de poursuivre ces expériences en ciblant sur une atteinte possible du sphincter urinaire strié chez les Labradors myopathes femelles. Le protocole expérimental a été repris pour réaliser les profils de pression urétrale pendant la même phase du cycle sexuel.

Dans une première partie, nous présenterons la myopathie centronucléaire du Labrador comme modèle des myopathies centronucléaires humaines, en insistant sur les aspects cliniques et histologiques. Puis nous présenterons le bas appareil urinaire de la chienne. Enfin, nous montrerons les effets probables du cycle sexuel sur ces profils de pression urétrale. La deuxième partie présente notre étude expérimentale, nos résultats et l'analyse statistique qui en a été faite. Dans une dernière partie, nous discuterons de l'absence d'effet significatif de la myopathie sur le fonctionnement du sphincter urinaire et des techniques utilisées au cours de cette étude.

Première partie : Présentation du modèle expérimental

1. La myopathie centronucléaire du Labrador, un modèle de myopathie humaine

1.1. Les myopathies myotubulaires/centronucléaires humaines

Les myopathies myotubulaires sont un groupe nosologique de maladies neuromusculaires évolutives, congénitales et héréditaires (11, 44).

En 1966 SPIRO *et al.* décrivent pour la première fois chez un adolescent de 12 ans atteint de diplégie faciale et de faiblesse musculaire généralisée, une myopathie inhabituelle. Elle fut qualifiée de myotubulaire, car sur la biopsie les fibres musculaires ressemblaient à des myotubes. Celles-ci présentaient également de très nombreuses centralisations nucléaires et la myopathie fut peu après décrite sous le terme de myopathie centronucléaire, terme le plus généralement utilisé (11, 21, 28, 49).

Le grand nombre de cas rapportés depuis a fait apparaître une très grande hétérogénéité dans la forme et l'évolution clinique, tout comme dans les modes de transmission. Les tentatives de classifications à partir des signes cliniques ou histopathologiques se sont révélées hasardeuses. Les meilleurs critères semblent être l'âge d'apparition des symptômes et surtout le mode de transmission génétique. Ceux-ci permettent, à part quelques cas sporadiques, de classer les myopathies myotubulaires/centronucléaires sous 3 formes. La myopathie récessive liée au chromosome X, souvent appelée "myotubulaire", est la plus fréquente et la mieux documentée. Les formes dominantes et récessives autosomiques, dont les signes cliniques apparaissent plus tardivement, sont appelées "centronucléaires" (11, 21, 44, 49, 54).

1.1.1. *Myopathie myotubulaire : forme récessive liée à l'X*

Elle est la forme la plus rencontrée et la plus étudiée. Elle ne concerne que les garçons avec une apparition anténatale ou néonatale. Le tableau clinique est dominé par une faiblesse musculaire généralisée (avec souvent une atteinte faciale), une hypotonie sévère, une aréflexie tendineuse et une insuffisance respiratoire. Le pronostic vital est très sombre avec plus de 85% de mortalité avant un an (44). Le décès fait généralement suite à des complications respiratoires ou cardiaques. Si

certaines garçons vivent plusieurs années (jusqu'à 27 ans), la plupart d'entre eux présente d'importantes incapacités motrices (54).

L'analyse histologique des fibres musculaires met en évidence une hypotrophie des fibres, notamment les fibres de type 1. Celles-ci prédominent par rapport aux fibres de type 2. Les fibres présentent par ailleurs une centralisation nucléaire : une zone centrale dépourvue de myofibrilles correspondant à une agrégation centrale des mitochondries. (54) Cet aspect des fibres, proche de celui des myotubes, a tout de suite fait penser que cette myopathie était liée à un arrêt de la morphogenèse musculaire (28, 49). (voir figure 1 et 2)

SARNAT (1990) a mis en évidence un arrêt de la morphogenèse de l'architecture de la myofibrille, et non un arrêt général du développement musculaire en comparant des fibres musculaires au cours de l'étape myotubulaire avec des fibres musculaires de garçons atteints de myopathie myotubulaire. Il a notamment montré une persistance de la desmine et de la vimentine dans les fibres des malades. Ceci corrobore l'hypothèse d'une persistance de protéines cytosquelettiques, à l'origine du maintien de la localisation centrale des noyaux et des mitochondries (47, 54).

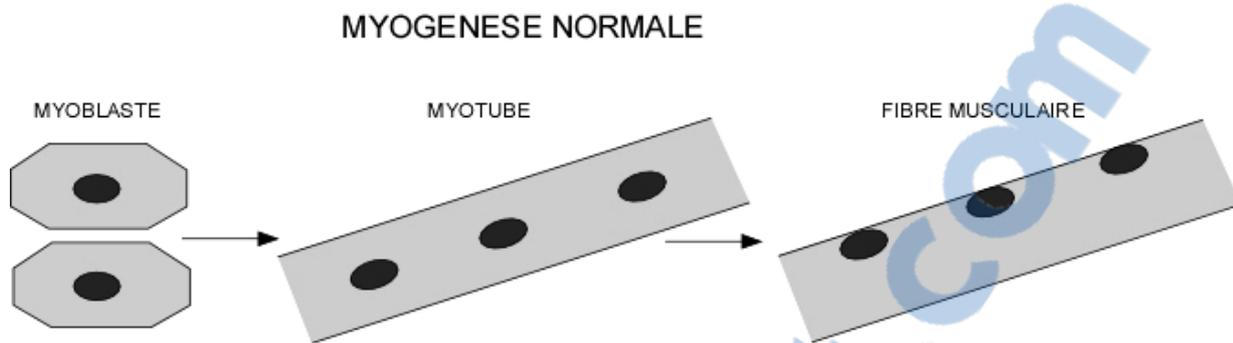


Figure 1: Organisation des cellules musculaires au cours de la myogenèse. Vue longitudinale représentant la fusion des myoblastes en cellules plurinucléées et la migration des noyaux en périphérie de la fibre musculaire lors de la différenciation. D'après LAPORTE *et al* (32).

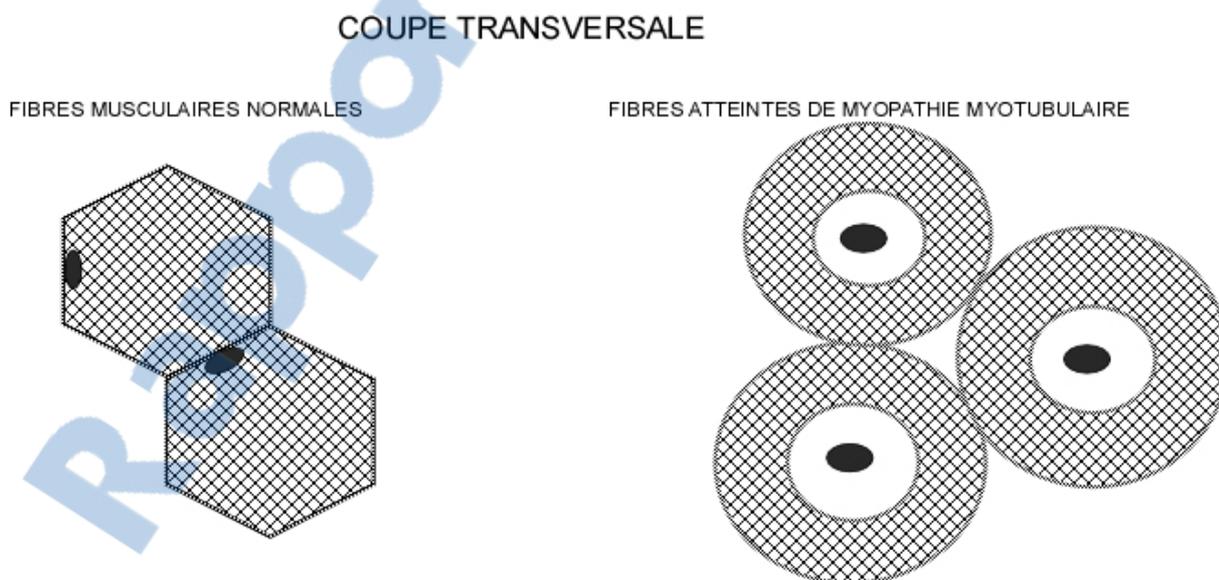


Figure 2 : Désorganisation du réseau myofibrillaire. Sur des coupes transversales de muscles schématisées, on observe chez les malades un halo clair autour du noyau et un réseau myofibrillaire désorganisé. D'après LAPORTE *et al* (32).

1.1.2. *Myopathies centronucléaires: formes autosomiques*

D'après WALLGREN-PETTERSON *et al* (1995), la forme autosomique dominante a été identifiée de façon certaine dans seulement deux familles (onze autres familles sont compatibles avec ce mode de transmission). La forme autosomique récessive est suspectée dans au moins onze familles (54).

L'âge d'apparition des symptômes est variable dans la forme dominante, mais dans l'ensemble beaucoup plus tardif que dans la forme récessive liée à l'X. Les cas recensés se répartissent de manière homogène de la petite enfance à l'âge adulte. Les symptômes, à savoir une faiblesse musculaire généralisée à prédominance proximale (avec souvent une atteinte faciale) sont à peu près identiques à ceux décrits précédemment. Ils sont cependant moins sévères. L'espérance de vie est normale. La forme autosomique récessive est intermédiaire entre les deux autres formes, tant pour le moment d'apparition des symptômes que pour la gravité de l'expression clinique (21, 54).

L'analyse histologique de biopsies musculaires met en évidence des centralisations nucléaires essentiellement dans les fibres de type 1, une hypotrophie et une dominance des fibres de type 1, voire une absence de fibres de type 2. Dans la partie centrale, entre les noyaux, on observe une absence de myofibrilles et la présence de mitochondries. Cet aspect est similaire à celui de la forme récessive liée à l'X. Mais, contrairement à cette dernière, il n'est pas présent dès la naissance et semble évoluer au cours de l'âge, avec notamment une centralisation nucléaire et une disparition tardive des fibres de type 2. La pathogénie est donc très probablement différente et serait sans doute liée à des processus dégénératifs et/ou régénératifs des fibres musculaires (8, 51, 54).

1.2. La myopathie héréditaire du Labrador, un modèle spontané de myopathie centronucléaire

1.2.1. *Historique*

La myopathie du Labrador retriever (MLR ou LRM en anglais) est une maladie neuromusculaire relativement commune affectant la plupart du temps plusieurs chiots d'une portée. Elle fut décrite pour la première fois aux Etats-Unis en 1976 par KRAMER *et al*. Depuis, plusieurs lignées ont été recensées aux Etats-Unis, en Angleterre, en Suisse et en Australie. Elle fut reconnue comme une affection à transmission autosomique récessive en 1981 sur les chiens américains, et en 2002 sur les

chiens suisses. Elle se caractérise par une atteinte des fibres musculaires squelettiques avec principalement : réduction du nombre, atrophie/hypotrophie, nécrose des fibres de type 2 et parfois centralisations nucléaires dans les fibres de type 1 (7, 29, 30, 36).

Des cas spontanés de myopathies chez le Labrador, similaires d'un point de vue clinique et histologique aux myopathies centronucléaires humaines ont été décrits en France depuis une dizaine d'années. Un large pedigree expérimental a été développé à partir de deux individus (père sain et sa fille malade) à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort afin de permettre l'étude de cette myopathie centronucléaire du Labrador (*cnm*). De nombreuses ressemblances cliniques et histologiques avec la myopathie du Labrador retriever (LRM), ainsi qu'un mode de transmission identique ont été mis en évidence. Ceci laisse penser que ces deux entités pourraient n'en former qu'une. Les différences observées, comme la nécrose possible de fibres musculaires dans la LRM pourraient s'expliquer par le faible polymorphisme de la colonie *cnm* étudiée à Alfort. Pour ces raisons, nous considérerons dans la suite du texte que LRM et *cnm* sont chez le chien une seule et même maladie apparentée à la myopathie centronucléaire humaine. La démonstration de cette identité doit attendre des données moléculaires en cours (8).

1.2.2. *Présentation clinique de la myopathie centronucléaire du Labrador*

Bien qu'il existe quelques variations, les manifestations cliniques sont assez similaires chez tous les chiens atteints et se caractérisent par une faiblesse musculaire généralisée et une ataxie. Les chiots atteints ne présentent aucune particularité à la naissance. Les premiers signes apparaissent généralement entre l'âge de 6 semaines et 7 mois, puis évoluent jusqu'à un an pour se stabiliser ensuite. Des rechutes, aggravées par le froid, sont souvent observées ; elles peuvent durer quelques jours. Un retard de croissance peut être observé dès l'âge d'un mois chez les chiots les plus atteints. L'espérance de vie est comparable à celle d'individus parfaitement sains (7, 8, 20, 38).

1.2.2.1. Posture et démarche

Les chiots malades présentent une faiblesse locomotrice associée à une intolérance à l'effort, un port de tête bas (ventroflexion du cou), une cyphose, une augmentation du polygone de sustentation associée à une surextension des carpes et des tarses (voir figure 3). Quel que soit l'âge, la démarche se caractérise par une raideur, des enjambées courtes et parfois des déplacements simultanés des antérieurs ("saut de lapin"). Ces anomalies s'accroissent lors d'un exercice, et si l'effort doit se

prolonger, les chiens s'effondrent sans présenter de perte de conscience ou de cyanose. Quelques uns, atteints moins sévèrement, ont une bonne tolérance à l'effort (8, 20, 38).

Une amyotrophie très marquée est également observée, elle touche principalement les muscles de la tête, du tronc, et les muscles proximaux des membres (voir figure 3). Les muscles ne sont pas douloureux à la palpation. Quelques chiens développent un mégacœsophage lié probablement à la part importante des fibres musculaires striées dans la partie proximale de la paroi oesophagienne (8, 20).

1.2.2.2. Examen neurologique

Les chiots atteints sont alertes et présentent un état de conscience normal. L'examen des nerfs crâniens est normal malgré une amyotrophie temporale sévère. Cependant, une extrémité linguale amincie et une ouverture palpébrale réduite sont parfois observées. Les réactions posturales sont réalisées sans anomalies bien qu'effectuées lentement par les animaux les plus atteints.

L'absence de réflexe myotatique semble être la seule atteinte neurologique. Ce signe permet un dépistage fiable et précoce de la maladie. Chez les chiots sains, les réflexes tendineux apparaissent à un mois. Chez les chiots myopathes, ils n'apparaissent pas ou sont très diminués : on parle d'aréflexie ou d'hyporéflexie tendineuse (8, 20).

1.2.2.3. Examens complémentaires

Les examens biochimiques sont normaux, les dosages des créatine phosphokinases sériques sont dans les valeurs usuelles ou présentent une légère augmentation. L'imagerie par tomodensitométrie a permis de confirmer l'atrophie musculaire généralisée et une infiltration adipeuse des masses musculaires. Un électrocardiogramme et une échocardiographie, effectués sur certains chiens, n'ont mis en évidence aucune anomalie.

Chez la plupart des chiots atteints, les électromyogrammes mettent en évidence des pointes lentes positives, une activité spontanée anormale, et des potentiels de fibrillation fréquents, qui disparaissent souvent chez l'adulte. Les chiens atteints moins sévèrement et plus tardivement



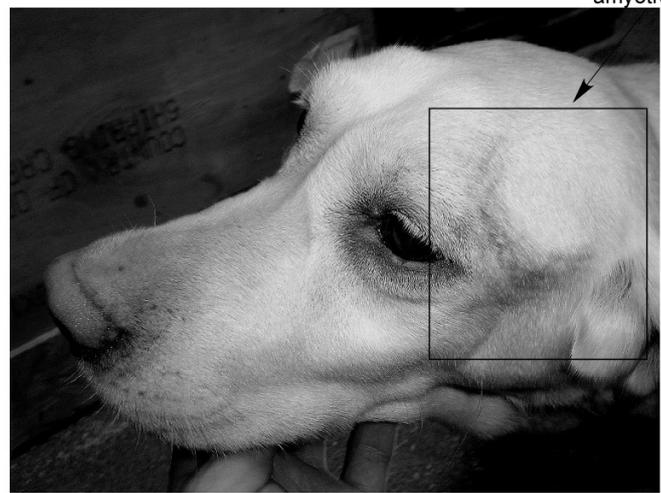
a)



b)



c)



amyotrophie

d)

Figure 3 : Amyotrophie sévère, ventroflexion du cou et augmentation du polygone de sustentation chez un Labrador Retriever malade (b et d). On peut observer un chien sain en comparaison sur les photos a et c.

présentent rarement une activité musculaire spontanée. Les vitesses de conduction enregistrées au niveau des nerfs sont dans les valeurs usuelles (8, 20, 38).

1.2.3. *Analyse histologique*

De nombreuses modifications morphologiques sont visibles sur les biopsies musculaires, elles permettent de confirmer la suspicion clinique de myopathie centronucléaire. Ces altérations évoluent qualitativement et quantitativement en fonction de l'âge de l'animal.

1.2.3.1. Atrophie et hypertrophie des fibres musculaires

Une variation de taille associée à une atrophie et une hypertrophie multifocales des fibres musculaires est facilement observée dans toutes les biopsies musculaires. Cependant, la proportion de fibres atrophiées et hypertrophiées diffère selon l'âge de l'animal et la nature du muscle biopsié, on remarque en particulier une augmentation du nombre de fibres atteintes au cours de la vie de l'animal. La sévérité de l'atrophie des fibres musculaires varie de quelques petites fibres minces au milieu de fibres de taille normale à une majorité de fibres petites et rondes au sein d'un faisceau musculaire. Ces modifications morphologiques touchent les fibres de type 1 et de type 2 (8, 37, 51).

1.2.3.2. Centralisations nucléaires

On observe une centralisation nucléaire caractéristique des fibres de type 1. La proportion de noyaux en position centrale augmente avec l'âge, avec des valeurs proche de 0% à la naissance, 30% à 3 ans, et 60% à 7 ans (observées sur des biopsies de biceps fémoral). Chez l'adulte sain, le pourcentage de noyaux centralisés est inférieur à 1%, et correspond aux fibres immatures (myotubes) impliquées dans le processus physiologique de régénération. La maturation de ces fibres s'accompagne d'une migration en position sous-sarcolemmale. Les mécanismes impliqués dans cette migration sont à ce jour inconnus.

L'origine de la position centrale des noyaux dans les fibres musculaires (structure proche des myotubes) pourrait être, comme dans la myopathie myotubulaire humaine, liée à un défaut de différenciation des nouvelles fibres musculaires. Néanmoins, une altération tardive des fibres préexistantes ne peut être exclue (8, 20, 37).

1.2.3.3. Remodelage des myofibres

La centralisation nucléaire des fibres de type 1 s'accompagne d'un défaut d'organisation du réseau myofibrillaire, mis en évidence grâce aux marquages enzymologiques et à la microscopie électronique. On observe un halo clair autour du noyau, indiquant une répartition périphérique des myofibrilles, contrairement aux fibres normales où les myofibrilles occupent la quasi-totalité du cytoplasme. De plus le métabolisme des myofibrilles est modifié. En effet, l'activité oxydative montre une distribution centrale et radiaire des mitochondries, confirmée par la microscopie électronique (8, 20, 37).

1.2.3.4. Modification de la topographie des fibres

Une prédominance des fibres de type 1 est retrouvée dans la plupart des biopsies de muscles mixtes, notamment le biceps fémoral et le vaste latéral. Cette prédominance s'accroît avec l'âge, et devient particulièrement visible chez l'adulte. En outre, les fibres de type 1 présentent une réduction notable de leur diamètre. Celui des fibres de type 2, bien qu'anormalement variable, est en moyenne proche de la normale

Par ailleurs, les adultes présentent une augmentation du périmysium et de l'endomysium, ainsi qu'une infiltration adipeuse interstitielle du muscle. Des zones de nécrose sont parfois visibles (8, 20, 37, 51).

1.2.4. Analogie entre myopathie centronucléaire du Labrador et formes autosomiques de myopathies centronucléaires humaines

La myopathie centronucléaire du Labrador présente de nombreuses ressemblances avec les myopathies centronucléaires humaines. L'évolution, la présentation clinique et les examens histologiques sont tout à fait similaires.

L'âge d'apparition se répartit, dans les deux cas, de la petite enfance à l'âge adulte. La maladie évolue au cours du temps avant de se stabiliser. Elle ne limite pas l'espérance de vie. Les symptômes principaux sont dans les deux cas : un déficit moteur, une amyotrophie, une faiblesse musculaire généralisée avec parfois intolérance à l'effort et aréflexie tendineuse. L'activité créatine kinase sérique est normale et l'examen électrophysiologique n'est pas spécifique.

Les critères essentiels de diagnostic histologique sont dans les deux cas : une centralisation nucléaire avec présence d'un halo clair autour des noyaux, une distribution centrale périnucléaire des mitochondries, l'hypotrophie et la prédominance des fibres musculaires de type 1 (8, 21, 51, 53, 54).

La myopathie centronucléaire du Labrador semble donc représenter un modèle canin spontané des myopathies centronucléaires humaines. Ce modèle est très intéressant car il est le seul modèle animal spontané de myopathie centronucléaire. De plus, les formes autosomiques humaines sont encore peu explorées, la pathogénie et les gènes impliqués sont inconnus. La colonie développée à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort est un bon modèle pour tenter de définir un locus pour ce groupe de maladies (8, 53, 54).

1.3. La myopathie centronucléaire du Labrador à l'origine d'un nouveau locus pour les maladies neuromusculaires

1.3.1. La myopathie myotubulaire à l'origine d'une nouvelle famille de gènes impliqués dans les maladies neuromusculaires

La myopathie myotubulaire (forme récessive liée à l'X) est la forme la plus fréquente de myopathie centronucléaire humaine. De récentes études ont ainsi pu permettre d'identifier le gène (*MTM1*) responsable de cette maladie. Il code pour une protéine, la myotubularine, à activité phosphatase, dont le substrat est le phosphatidylinositol-3-phosphate. Plus de 152 mutations ont été décrites à ce jour dans plusieurs dizaines de familles. Les mutations diminuent ou annulent totalement l'activité phosphatase de la protéine. *MTM1* est le membre fondateur de la famille des myotubularines (14 gènes ont été identifiés chez l'homme : *MTM1* et les *MTMR*: Myotubularine Related (de *MTMR1* à *MTMR13*)). Elle constitue un large groupe à l'intérieur de la super famille des tyrosine-phosphatases à double spécificité, dont les membres sont présents dans quasiment tous les organismes eucaryotes. Deux autres membres (*MTMR2* et *MTMR13*) ont été récemment trouvés mutés dans deux formes de la maladie de Charcot-Marie-Tooth. *MTM1* a ainsi permis de définir une nouvelle famille de gènes impliquée dans les maladies neuromusculaires. Aucune mutation de ces derniers n'a été trouvée dans les myopathies centronucléaires de la forme autosomique, dont les origines génétiques pourraient peut-être définir de nouveaux gènes impliqués dans ces maladies (5, 32, 33, 34).

1.3.2. Mode de transmission de la myopathie centronucléaire du Labrador

Depuis les premiers cas rapportés dans la littérature de myopathie héréditaire du Labrador (LRM), un mode de transmission autosomique récessif était suspecté. Il a été confirmé en 1981 par KRAMER *et al* (30, 33).

A partir de la première femelle atteinte de myopathie centronucléaire (que nous considérons ici être la même entité que la LRM) amenée à la consultation de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, une analyse du phénotype des animaux apparentés a pu être conduite. Les parents de cette chienne et trois autres descendants étaient sains. Ces éléments ont suggéré un mode de transmission autosomique récessif, dans l'hypothèse où un seul gène à pénétrance complète serait impliqué. Le pedigree développé depuis a permis de confirmer ces hypothèses (51).

1.3.3. Caractérisation du gène responsable

1.3.3.1. Caractérisation du locus canin

A partir de ces résultats, une analyse de liaison génétique a pu être initiée. La méthode employée a été la cartographie par homozygotie. Cette méthode a été permise par l'existence de marqueurs génétiques cartographiés chez le chien (identification de microsatellites, carte méiotique, carte d'hybrides de radiation). La femelle atteinte et son père sain, qui sont à l'origine du pedigree expérimental, ont d'abord été génotypés, ce qui a permis d'obtenir 15 marqueurs homozygotes chez la fille et hétérozygotes chez le père. Tous les animaux ont alors été génotypés pour ces 15 marqueurs. Un marqueur systématiquement homozygote chez les chiens malades et hétérozygote chez les chiens sains a ainsi été mis en évidence. Ce marqueur a permis de repérer la région du génome canin porteuse du locus *cnm*. Les animaux ont alors été génotypés pour d'autres marqueurs de la région, ce qui a permis de définir un intervalle de 18.1 centiMorgans sur la région centromérique du chromosome 2 canin où se situe *cnm* (9, 39, 51).

1.3.3.2. Identification d'un gène candidat

Grâce à une peinture chromosomique établie entre le Chien et l'homme, la région centromérique du chromosome 2 canin supportant *cnm* a été décrite comme une région orthologue du bras court du chromosome 10 humain. Les données du séquençage humain ont permis de révéler l'existence de nombreux gènes dans l'intervalle génétique correspondant. La proximité phénotypique entre la myopathie centronucléaire du Labrador et la myopathie myotubulaire humaine a conduit dans un premier temps à rechercher dans l'intervalle considéré, des gènes apparentés à la myotubularine. Malheureusement, aucun des 14 gènes de la famille n'est localisé sur le bras court du chromosome 10 humain. De ce fait, la région orthologue de *cnm* semble être un nouveau locus pour les maladies neuromusculaires (10, 20, 51, 55).

Le choix d'un gène candidat repose sur sa fonction, son site, et sa fenêtre d'expression spatio-temporelle. Des gènes ont ainsi été choisis en prenant comme critère de sélection qu'ils soient exprimés dans le muscle, lors de l'embryogenèse et dans la vie périnatale. Finalement, l'analyse de la séquence codante du gène *PTPLA* codant pour une protéine tyrosine phosphatase-like a permis de révéler une mutation insertionnelle qui coségrège parfaitement avec la maladie. Cette insertion conduit à des anomalies transcriptionnelles du gène, dont le bilan est une traduction quasi-nulle des transcrits sauvages (52).

1.3.3.3. Recherche d'un test de complémentation fonctionnel

Le meilleur moyen de corréler une mutation dont on suspecte qu'elle a pour conséquence la maladie observée est de mener une recherche de cette mutation chez d'autres individus sains et malades. Cependant, la démonstration formelle proviendra d'un test de complémentation fonctionnel, c'est à dire du rétablissement du phénotype sauvage après expression induite d'un allèle sauvage du gène incriminé dans une cellule, un tissu ou l'animal entier (20).

Dans le cas de la myopathie centronucléaire du Labrador, disposer d'un tel test nécessite de mettre en évidence une déficience musculaire quantifiable, et si possible très bien localisée, permettant à terme de faire exprimer *in vivo* une protéine sauvage dont l'effet de sauvetage sur le fonctionnement musculaire pourrait être évalué par la mesure d'un paramètre simple (20).

L'évaluation du tonus des muscles squelettiques est possible, mais la complémentation fonctionnelle d'un seul muscle représente déjà un enjeu expérimental important en thérapie génique et elle ne modifierait certainement pas la posture générale de l'animal.

On peut alors se demander si des fibres musculaires striées n'appartenant pas aux muscles squelettiques, et dont l'étude fonctionnelle serait éventuellement plus simple, sont atteintes par la myopathie centronucléaire. Aucune étude n'a démontré d'atteinte des fibres musculaires striées en dehors des muscles squelettiques. Cependant, la présence de mégaoesophages chez quelques chiens malades, et le fait qu'il existe une part importante de fibres musculaires striées dans l'oesophage des chiens confortent cette hypothèse.

Dans cette étude, nous avons voulu explorer l'atteinte éventuelle du sphincter urétral. Il nous a semblé intéressant de l'étudier pour différentes raisons. Ce dernier présente en effet chez le Chien une musculature striée importante et relativement localisée. De plus, on connaît bien sa structure histologique et sa physiologie. Son exploration fonctionnelle est assez aisée. Elle repose sur la fonction plutôt que sur des critères histologiques par exemple. Nous avons d'emblée privilégié l'approche physiologique en mesurant *in vivo* le tonus urétral des chiens.

2. L'urètre de la chienne : physiologie et évaluation fonctionnelle

2.1. Structure et innervation du bas appareil urinaire de la chienne

Le bas appareil urinaire a une double fonction : il doit assurer la miction, mais également, entre les mictions, la continence urinaire. Pour répondre à ces impératifs, ses organes sont dotés de structures contractiles et sont soumis à un contrôle permettant leur fonctionnement ainsi que leur coordination.

2.1.1. Structure du bas appareil urinaire de la chienne

Le bas appareil urinaire comprend la vessie qui se prolonge caudalement par le col vésical, structure de transition vers l'urètre, celui-ci se terminant par le méat urinaire.

2.1.1.1. Anatomie

2.1.1.1.1. Anatomie de la vessie

La vessie est l'organe de stockage de l'urine.

2.1.1.1.1.1. Conformation extérieure et topographie

La position normale de la vessie est intra-abdominale, mais peut toutefois varier en fonction de son état de réplétion.

Sa forme est ovoïde, à grand axe antéro-postérieur. La vessie est constituée d'un pôle crânial, d'un corps (recevant dorsalement les deux urètres) et d'un col, en continuité avec l'urètre (20, 43).

2.1.1.1.1.2. Dimensions et variations physiologiques

Les dimensions de la vessie varient évidemment en fonction du format du chien, et surtout en fonction de son état de réplétion.

Pour un chien de format moyen (environ 12 kg), la vessie vide présente un diamètre approximatif de 2cm pour une longueur de 2 à 4 cm. Le diamètre maximal de cette même vessie en état de réplétion peut atteindre 18 cm (20).

2.1.1.1.1.3. Structure de la paroi vésicale

La paroi vésicale est constituée d'une séreuse, d'une musculuse nommée détrusor, et d'une muqueuse constituée d'un épithélium pluristratifié pavimenteux ou urothelium. Cet épithélium a une épaisseur au niveau de la vessie de 3 à 5 couches de cellules et participe ainsi à la distension de l'organe lors du stockage de l'urine. La musculuse se compose de trois couches musculaires lisses très intriquées : 2couches longitudinales, interne et externe, et une couche circulaire. A la jonction vésico-urétrale, toutes les fibres prennent une orientation circulaire ou oblique, entrant dans la composition du système sphinctérien (4, 17, 43, 50).

2.1.1.1.1.4. Cas particulier du trigone vésical

La jonction vessie-urètre correspond au col vésical, dont la structure est indiscernable du détrusor, mais dont le rôle physiologique est fondamental dans la fonction sphinctérienne. La musculature lisse qui la compose, se prolongeant dans l'urètre, se situe dans la vessie, sur la face dorsale.

Une zone triangulaire peut être délimitée par les deux ostiums urétéraux et l'abouchement de l'urètre à la vessie : le trigone vésical. La distinction entre le trigone superficiel et le trigone est

parfois réalisée. Ils peuvent en effet être différenciés par la population de récepteurs présents (20, 43).

2.1.1.1.2. Anatomie de l'urètre de la chienne

L'urètre forme un conduit du col vésical au méat urinaire, se comportant comme un canal à parois élastiques.

2.1.1.1.2.1. Conformation extérieure et topographie

Chez la femelle l'urètre est très court et entièrement intrapelvien. Il débute au col vésical et s'abouche distalement sur le plancher du vestibule, au niveau du tubercule situé en avant du clitoris, à 4 ou 5 centimètres de la commissure ventrale de la vulve, chez une chienne de taille moyenne (20).

2.1.1.1.2.2. Dimensions et variations physiologiques

La longueur de l'urètre de la chienne varie peu, pouvant aller d'environ 6 à 10 centimètres selon le format de l'animal. Le diamètre de l'urètre, variant peu le long du segment urétral, est évalué à environ 0.5 centimètres. La lumière urétrale peut être obstruée de manière physiologique par des plis longitudinaux en dehors des mictions.

2.1.1.1.2.3. Structure de la paroi urétrale

La paroi urétrale se compose d'une séreuse, d'une musculuse à composantes lisses et striées, d'une sous muqueuse richement vascularisée (notion de « plexus vasculaire »), comportant des nodules lymphatiques, et d'une muqueuse, constituée d'un épithélium pavimenteux stratifié.

La musculuse est divisée en une couche musculaire striée, formant distalement le sphincter externe de l'urètre, et une couche musculaire lisse, prolongement de la musculuse vésicale avec laquelle elle forme le sphincter interne de l'urètre.

Cette nomenclature de « sphincter interne » et de « sphincter externe » est néanmoins discutable. En effet, contrairement à d'autres espèces, aucun véritable sphincter différenciable du reste de la musculuse, n'a pu être mise en évidence. Il existe en effet une continuité entre les fibres

musculaires de la vessie et de l'urètre. L'organisation circulaire des fibres lisses proximales et des fibres striées distales permet tout de même d'assurer la fonction sphinctérienne (2, 50).

La disposition des fibres musculaires lisses rappelle celle observée au niveau de la paroi vésicale : deux couches longitudinales obliques interne et externe et une couche moyenne de fibres circulaires. La couche circulaire est la plus importante. Les fibres musculaires lisses diminuent progressivement en allant vers le méat urinaire au profit des fibres musculaires striées (3, 4, 17, 43, 50).

La vessie apparaît anatomiquement comme l'organe responsable du stockage de l'urine, l'urètre comme une structure permettant l'exonération urinaire et son contrôle. La vessie et l'urètre contribuent à une réelle unité fonctionnelle : l'appareil vésico-sphinctérien qui assure les mécanismes de continence et de mictions.

2.1.1.2. Histologie et morphométrie du bas appareil urinaire de la chienne

L'étude des différentes composantes tissulaires de la vessie et de l'urètre de la chienne et de leur importance relative permet de mieux comprendre le fonctionnement de l'appareil vésico-sphinctérien.

2.1.1.2.1. Analyse histologique de l'urètre et de la vessie de la chienne

La lumière urétrale est bordée par un épithélium transitionnel qui s'épaissit progressivement (2 à 3 couches cellulaires au niveau de l'urètre) dans le col vésical, puis dans le corps de la vessie (3 à 5 couches cellulaires). Au niveau du méat urinaire, cet épithélium transitionnel s'amincit et devient un épithélium stratifié squameux, similaire à celui observé dans le vestibule.

Autour de l'épithélium urétral s'organise une sous-muqueuse épaisse riche en fibres de collagène (sans orientation particulière) et en fibres élastiques très nombreuses (obliques) ; le plexus vasculaire traverse cette sous-muqueuse. Il est cependant nettement moins présent au niveau du col vésical et complètement absent du corps de la vessie. Ce plexus vasculaire correspond à un ensemble de sinus veineux, chacun bordé par une couche de cellules endothéliales entourées de fibres élastiques et de collagène.

Les fibres musculaires lisses apparaissent très imbriquées avec le tissu conjonctif et le plexus vasculaire.

La musculature lisse est épaisse dans la paroi urétrale et vésicale.

La musculature lisse du corps de la vessie est composée de couches interne et externe de faisceaux musculaires obliques, avec entre elles, une couche épaisse dont les fibres présentent une orientation essentiellement circulaire. (D'après OSBORNE (1995), il s'agirait plus d'un maillage complexe sans véritables couches distinctes, où les fibres musculaires seraient majoritairement obliques à l'axe de la vessie et ne s'organiseraient en couches qu'à partir du col).

La musculature lisse du col vésical et de l'urètre proximal est également composée de trois couches. La couche externe devient fine puis discontinue dans le tiers proximal de l'urètre, la couche interne disparaît presque complètement dans l'urètre. Quelques faisceaux isolés persistent dans le tiers proximal de l'urètre. La couche musculaire principale est la couche moyenne dont les fibres ont une orientation circulaire et sont en continuité avec celles de la couche moyenne de la vessie. Ces dernières représentent également la très grande majorité des fibres du col vésical.

Le muscle lisse de l'urètre montre ensuite une forte prédominance de la musculature lisse circulaire, en continuité avec la couche circulaire des fibres vésicales. Plus distalement, les fibres musculaires lisses, plus rares, prennent une orientation oblique, la musculature lisse urétrale longitudinale est inconstante

. Le sphincter lisse constitue une unité fonctionnelle dotée d'une innervation propre, même si sa délimitation précise au niveau anatomique ou histologique s'avère délicate.

L'étude de l'orientation des fibres musculaires lisses s'avère délicate, au niveau de la préparation tissulaire en particulier : d'autres travaux semblent montrer une orientation moins oblique, mais plus longitudinale d'une partie de la musculature lisse urétrale.

La musculature striée de l'urètre ou musculus urethralis apparaît en position ventrale sous la forme de fibres à orientation transverse entre le tiers proximal et le tiers moyen de l'urètre et augmente progressivement dans les deux tiers distaux de l'urètre. Les fibres entourent l'urètre à partir du tiers moyen. Elles sont localisées au contact de la surface « abaxiale » de la musculature

lisse, pour la remplacer au niveau de l'urètre terminal, en encerclant l'urètre et le vagin (2, 3, 4, 16, 17, 20, 43, 50).

2.1.1.2.2. Analyse morphométrique de l'urètre et de la vessie chez la chienne

L'étude morphométrique revient à diviser les prélèvements vessie-urètre de chiennes saines en segments de longueur équivalente, puis de pratiquer des sections transverses. Les préparations tissulaires font alors l'objet d'une détermination des volumes relatifs des composantes histologiques: musculature lisse, musculature striée, épithélium, plexus vasculaire, fibres élastiques (du tissu conjonctif), et lumière urétrale (diamètre). Ces travaux ont été réalisés par CULLEN *et al* (1981) (17). (Voir figure 4)

Le tissu conjonctif contribue majoritairement au volume de la paroi urétrale, viennent ensuite par ordre décroissant la musculature, l'épithélium, puis les vaisseaux sanguins et les nerfs.

Dans l'urètre proximal, le tissu conjonctif constitue environ 70% du volume pariétal (dont 1,5% de fibres élastiques), devant la musculature lisse qui représente environ 25% puis l'épithélium, seulement 2%.

Dans l'urètre moyen, la distribution tissulaire est similaire, avec en plus la présence de la musculature striée, représentant environ 8% du volume global de la paroi.

Dans l'urètre distal, le volume relatif de la musculature striée (environ 22%) dépasse même celui de la musculature lisse, ne représentant plus qu'environ 11% du volume pariétal. Le volume musculaire total de l'urètre distal est d'ailleurs supérieur proportionnellement à celui de l'urètre proximal.

Le plexus vasculaire (ou stratum cavernosum) a une importance variable selon l'animal, sous l'influence de la perfusion tissulaire et de la distension vasculaire, dépendant de nombreux facteurs. L'importance fonctionnelle et le rôle physiologique du stratum cavernosum restent des sujets à approfondir : la contribution de l'état de réplétion des sinus veineux aux variations de la lumière urétrale est parfois avancée. Le volume du plexus vasculaire semble stable tout au long de l'urètre (avec une localisation préférentielle dans sa moitié proximale), peu important dans le col vésical et quasi-inexistant dans le corps de la vessie. En outre, dans le dernier quart distal de l'urètre, des connections directes s'établissent entre de petites artères et le plexus vasculaire, suggérant la

capacité érectile de ce tissu. Cette découverte soulève l'importance du plexus vasculaire en tant que constituant majeur de la continence urinaire.

Le volume de l'épithélium comme le diamètre de la lumière sont réguliers le long de l'urètre ; l'épithélium semble juste plus épais dans la zone du col vésical.

Au plan histologique, le col vésical apparaît comme une zone de transition entre le corps de la vessie et l'urètre proximal : les volumes relatifs de l'épithélium et de la musculature lisse du col sont supérieurs à ceux de l'urètre (et inférieurs à ceux de la vessie), les volumes du tissu conjonctif et des fibres élastiques sont eux inférieurs à ceux de l'urètre (mais supérieurs à ceux de la vessie).

En conclusion, la musculature lisse représente en volume environ la moitié de la paroi du corps de la vessie, le tiers de la paroi du col vésical, le quart de la paroi de l'urètre proximal et est quasi-absente de l'urètre terminal. La musculature striée est présente dans les deux tiers distaux de l'urètre mais concentrée principalement sur le quart distal. Le volume musculaire total (lisse + strié) représente environ un tiers du volume de la paroi. Au niveau de l'urètre terminal, le muscle strié urétral entoure l'urètre et le vagin.

Une grande variabilité morphologique de l'urètre a pu être observée chez la chienne selon les individus, avec une limite assez incertaine entre la vessie et l'urètre.

Des différences morphologiques entre l'urètre de chienne et celui de la femme peuvent être notées: la musculature striée prédomine dans le quart distal de l'urètre de chienne, alors qu'elle est surtout présente à mi-urètre chez la femme. Les couches musculaires de la vessie s'arrêtent au niveau de l'orifice urétral interne et sont distinctes de la musculature lisse urétrale chez la femme. Enfin, il n'existe pas de continuité entre la musculature striée urétrale et celle du vagin (2, 4, 17, 50).

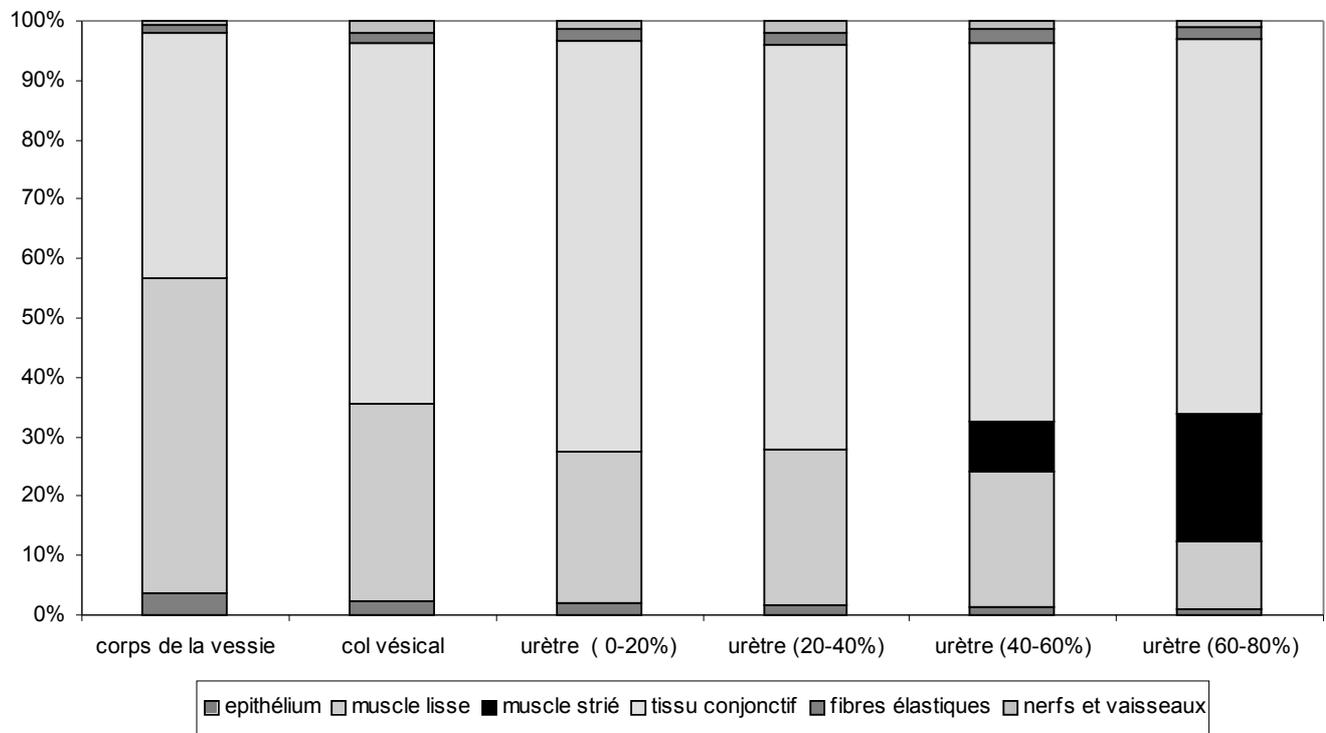


Figure 4 : Structure de la paroi de la vessie et de l'urètre chez la chienne (représentation des volumes relatifs des constituants tissulaires). D'après CULLEN *et al* (17).

2.1.1.2.3. Histochimie et morphométrie des structures assurant la continence urinaire.

La chienne présente un long sphincter lisse (du col vésical à mi-urètre), progressivement remplacé, caudalement, par le muscle strié.

Il existe des corrélations entre l'activité d'un muscle strié et sa composition en fibres musculaires et notamment en fibres de type I. Les études histochimiques permettent ainsi de mieux comprendre le rôle du sphincter strié. Classiquement, les fibres striées sont regroupées en fibres de type I et II. Les fibres de type I, résistantes à la fatigue, assurent une contraction spastique lente et possèdent un métabolisme aérobie. Les fibres striées de type II permettent une contraction spastique rapide ; il est possible de distinguer deux sous-types principaux : les fibres IIA qui sont peu fatigables avec une activité aérobie/anaérobie et les IIB, plus rapide, qui sont fatigables avec une activité anaérobie. Cependant, d'après AUGSBURGER *et al* (1994), ces dernières semblent inexistantes chez le Chien. En revanche, elles seraient remplacées par une sous-population spécifique à l'espèce canine, les fibres IIS ayant une activité aérobie/anaérobie. Il est aisé de distinguer les fibres de type I des fibres de types II, en mettant en évidence l'activité ATPasique de l'actomyosine myofibrillaire ; cependant, pour différencier les sous-types IIA et IIS, cette technique de coloration n'est pas efficace. Ainsi les différents auteurs ne s'accordent pas quant à la distinction de ces sous-populations. Le problème réside dans la méthodologie et le fait que tous n'ont pas recours aux mêmes techniques de coloration.

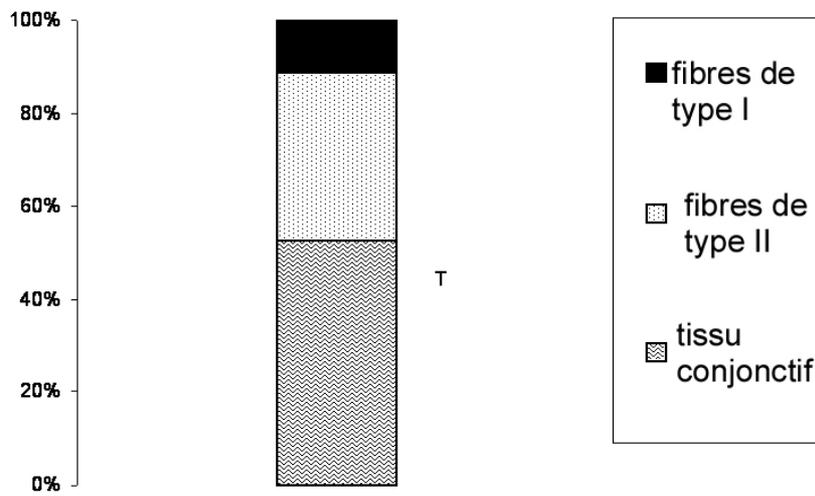


Figure 5 : Volume moyen (en % du total) des constituants du muscle strié D'après AUGSBURGER et CRUZ-ORIVE (2).

La proportion relative en nombre comme en volume de chaque type de fibres dans l'urètre de la chienne montre une prédominance des fibres de type II. En effet, deux études mettent en évidence de trois à cinq fois plus de fibres de type II. (2, 13). Le muscle strié n'est donc pas adapté pour maintenir une contraction sur de longues périodes, mais est plus adéquat lors de contraction intermittente et de courte durée, ce qui assure une continence urinaire essentielle en cas d'urgence, dans les situations de stress, lorsque les autres facteurs de continence urinaire ont été dépassés. (Voir figure 5)

La tunique musculaire située entre ces deux formations oblitère la lumière urétrale en dehors des mictions, avec la contribution des différents composants tissulaires (dont les fibres élastiques du tissu conjonctif et le plexus vasculaire) de l'urètre. Tous ces mécanismes constituent un facteur important de la continence urinaire. Les fibres élastiques, particulièrement uniformes et développées, sont présentes sur toute la longueur de l'urètre.

Les muscles striés pelviens et notamment le muscle releveur de l'anus ont également un rôle important dans la continence urinaire. Ils peuvent exercer une pression sur l'urètre augmentant ainsi la pression intra-urétrale. Une analyse histochimique du muscle élévateur de l'anus révèle une prédominance des fibres de type II (environ 70%). Comme le sphincter strié, ce dernier semble donc plus adapté à une continence d'urgence à court terme et par intermittence. Cependant, une étude comparative entre les propriétés contractiles des fibres striées du sphincter externe et du muscle releveur de l'anus met en évidence une contraction plus rapide des fibres striées urétrales. De plus, les fibres du muscle releveur de l'anus montrent un meilleur maintien de leur contraction. Celui-ci semble donc assurer une continence à plus long terme que le sphincter strié.

La résistance urétrale se révèle être maximale dans la zone où la musculature striée s'ajoute à la musculature lisse. Les sphincters urétraux correspondent en effet davantage à des entités fonctionnelles qu'à de réelles structures anatomiques bien délimitées. De plus, tous les constituants de la paroi urétrale (tissu conjonctif et plexus vasculaire en particulier) jouent un rôle dans le fonctionnement sphinctérien de l'urètre.

La continence urinaire semble dépendre essentiellement, comme nous allons le voir un peu plus tard, d'une composante passive par la présence des fibres élastiques et du plexus vasculaire tout au long de l'urètre et d'une composante active, représentée par des actions très complémentaires de la musculature lisse et de la musculature striée : une action régulière et durable de la musculature lisse

formant une couche épaisse dans la moitié proximale de l'urètre et un fonctionnement rapide mais intermittent de la musculature striée dans l'urètre distal (2, 13, 20, 50, 41, 16).

2.1.2. *Innervation du bas appareil urinaire de la chienne*

L'appareil vésico-sphinctérien reçoit une innervation riche et complexe. Elle associe une innervation autonome sympathique et parasympathique pour le muscle lisse, une innervation somatique motrice destinée aux muscles striés et une innervation sensitive. Des mécanismes de contrôle volontaire et involontaire sont donc impliqués dans le fonctionnement urétral. En outre, une phase normale de remplissage vésical suivie d'une vidange nécessite une parfaite coordination entre les différents constituants du bas appareil urinaire. (voir figure 6)

2.1.2.1. Innervation périphérique

L'innervation périphérique comporte une innervation sensitive (ou centripète) et une innervation motrice (ou centrifuge).

2.1.2.1.1. Innervation sensitive

Elle renseigne les centres sur l'état de l'appareil vésico-sphinctérien. La sensibilité proprioceptive (tension et contraction) est perçue par des récepteurs annexés aux muscles lisses. Ils sont sensibles à l'étirement et donc à la quantité d'urine stockée dans la vessie. Ils permettent ainsi la miction en renseignant les centres sur le degré de remplissage vésical. Leurs influx sont transmis par les nerfs pelviens vers la corne dorsale de la moelle sacrée. Le reste de la sensibilité (douleur et température pour la vessie, douleur température et flux pour l'urètre) est captée par des récepteurs sous-muqueux essentiellement concentrés dans la région du col et du trigone. Les influx sont transmis par les nerfs hypogastriques vers la corne dorsale de la moelle dorsolombaire où ils font synapse.

Les récepteurs sont pour la plupart des terminaisons nerveuses libres, quelques récepteurs encapsulés et des corpuscules de Pacini. Il n'existe pas de corrélation entre les types de récepteurs et la spécialisation fonctionnelle.

Certaines voies s'arrêtent dans les centres réflexes; d'autres poursuivent leur course jusqu'aux centres supérieurs où la sensibilité est perçue consciemment. Les perceptions conscientes au niveau de l'urètre sont la distension pariétale, le flux, la température et la douleur (19, 42).

2.1.2.1.2. Innervation motrice

L'innervation motrice est composée d'une innervation végétative qui regroupe une composante sympathique mise en jeu lors du remplissage vésical et une composante parasympathique sollicitée au cours de la vidange, et d'une innervation somatique.

2.1.2.1.2.1. Innervation végétative

L'innervation végétative de l'urètre et de la vessie partage ses origines avec l'ensemble des viscères pelviens. Elle est issue de la moelle lombaire et sacrée.

2.1.2.1.2.1.1. Les fibres sympathiques

Elles sont issues de centres médullaires localisés entre L1 et L4. Après un relais au niveau du ganglion mésentérique caudal, les fibres sympathiques forment les nerfs hypogastriques. Ils innervent le détrusor et le muscle lisse urétral au niveau du trigone et du col vésical (sphincter urétral lisse) par l'intermédiaire du plexus hypogastrique ou de ganglions juxta-viscéraux. Ils font également relais au niveau du plexus ganglionnaire pelvien (ganglion parasympathique), assurant ainsi l'inhibition de l'activité parasympathique pendant la phase de remplissage.

L'interaction entre les nerfs hypogastriques et l'effecteur musculaire lisse vésical ou urétral s'établit par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques: des récepteurs β -adrénergiques au niveau du détrusor et des récepteurs α 1-adrénergiques pour le col vésical et l'urètre proximal. Le neuromédiateur est la noradrénaline.

Ainsi, une stimulation des nerfs hypogastriques aura comme effet un relâchement du détrusor, un renforcement de la contraction du sphincter lisse urétral et une inhibition de l'activité parasympathique. Tout ceci favorise donc le remplissage de la vessie (1, 18, 19, 20, 42).

2.1.2.1.2.1.2. Les fibres parasympathiques

L'innervation parasympathique du système vésico-sphinctérien a pour origine les neurones parasympathiques de la moelle épinière sacrée. Les fibres pré-ganglionnaires quittent la moelle par

les racines ventrales S2, S3, et S4, suivent le trajet du nerf honteux interne et du nerf anal avant de donner les nerfs pelviens. Elles traversent sans relais le plexus hypogastrique. Ces fibres qui font relais au niveau de ganglions pelviens intra-muraux à l'intérieur même de la paroi vésicale innervent le détrusor et le sphincter urétral interne par l'intermédiaire de récepteurs cholinergiques.

Ce système est antagoniste de l'action sympathique. En effet, la stimulation des nerfs pelviens provoque la contraction du détrusor, le relâchement du sphincter interne et l'inhibition de l'activité sympathique locale, facilitant ainsi la vidange. Le neuromédiateur de cette réponse est l'acétylcholine; une action probable d'un médiateur purinergique, tel l'adénosine triphosphate (A.T.P.) est probable. Le monoxyde d'azote a récemment été identifié comme un médiateur important du relâchement du muscle lisse urétral.

La notion d'interdépendance des systèmes orthosympathique et parasymphathique dans les parois de la vessie et de l'urètre est d'acquisition récente. Divers travaux ont permis de mettre en évidence des neurones courts connectant des fibres sympathiques et parasymphathiques, ainsi que des relais ganglionnaires autonomes qui assurent localement une véritable autorégulation de l'activité vésico-sphinctérienne. De plus, il existe d'autres neuromédiateurs du système neurovégétatifs qui n'ont pas été clairement identifiés. Des contractions et des relâchements non adrénérgiques non cholinergiques ont notamment été mis en évidence (1, 18, 19, 20, 42).

2.1.2.1.2.2. Innervation somatique

Les fibres somatiques innervent le sphincter strié urétral. Les corps cellulaires des motoneurones sont situés dans la corne ventrale de la moelle sacrée au niveau de centres médullaires situés entre S1 et S2, avec des contributions des segments L7 et S3. Elles forment les nerfs honteux internes qui innervent le sphincter strié et les muscles périnéaux.

La stimulation de ces fibres, par l'intermédiaire de l'acétylcholine sur les plaques motrices (récepteurs nicotiques), entraîne la contraction du muscle strié, renforçant la continence vésicale. La contraction des muscles périnéaux facilite le rôle du sphincter urétral pour la continence, en faisant pression sur l'urètre.

L'innervation du sphincter strié par le nerf pelvien a souvent été discutée. Des travaux récents ont montré par des dissections de nerf pelvien de chiens, que des branches de ce dernier pénètrent le

muscle à angle droit; mais en réalité, elles ne font que traverser le muscle strié et vont innover des fibres musculaires lisses plus internes (16, 19, 42, 20).

2.1.2.1.2.3. Les terminaisons nerveuses intra-pariétales

L'innervation neurovégétative de la vessie passe par le plexus hypogastrique, les fibres nerveuses atteignant la séreuse vésicale près des uretères. A partir de là, ces fibres prennent une direction crâniale et traversent obliquement la tunique musculaire. Les filets nerveux suivent un trajet sinueux et les fibres qu'ils renferment sont elles-mêmes spiralées, ce qui procure à l'ensemble une grande capacité d'extension. Les terminaisons ultimes des nerfs se propagent entre les faisceaux musculaires et s'achèvent sur les ganglions intra-muraux et les cellules musculaires.

La distribution des récepteurs vésicaux et urétraux confirme en partie les données des travaux concernant l'innervation intrinsèque : présence de récepteurs cholinergiques de type muscarinique dans le détrusor, d'adrénorécepteurs de type α dans l'urètre et le col vésical, de récepteurs cholinergiques nicotiques et de récepteurs α -adrénergiques dans le sphincter strié urétral. La réalité est en fait plus complexe, puisque ces différents récepteurs, et d'autres moins connus sont trouvés dans toutes les régions vésico-urétrales et que leurs proportions relatives, ainsi que leur réactivité, peuvent être modifiées par différents facteurs (20, 23, 18).

L'activité vésico-sphinctérienne est donc principalement sous contrôle du système neurovégétatif autonome qui innerve l'ensemble détrusor-sphincter lisse. Cette activité est modulée par le contrôle volontaire de l'activité du sphincter urétral strié, par l'intermédiaire du nerf honteux interne. L'alternance régulière des phases de continence urinaire et de miction nécessite par conséquent une parfaite synchronisation entre le détrusor et les sphincters urétraux.

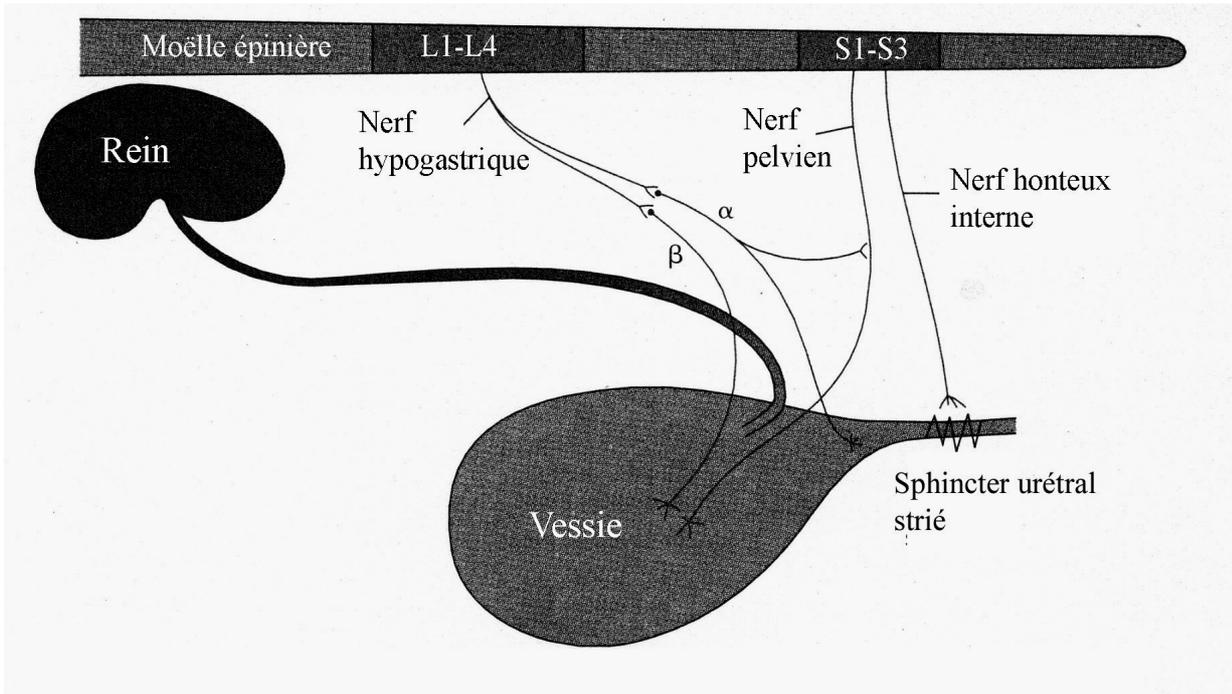


Figure 6 : Innervation du bas appareil urinaire du Chien. D'après COUTO (15).

2.1.2.2. Le contrôle central de l'activité vésico-sphinctérienne

Tous les étages du névraxe sont impliqués dans le contrôle neurologique du cycle mictionnel.

2.1.2.2.1. Les centres médullaires

Les centres médullaires autonomes occupent la colonne intermedio-latérale de la moelle de T11 à L2 pour le sympathique et de S2 à S4 pour le parasympathique. Chez le chiot, la miction est un acte réflexe mettant exclusivement en jeu l'activité médullaire : la mère déclenche une miction « automatique » par léchage de la région périnéale du chiot. Vers l'âge de 3 à 4 semaines, le contrôle spinal de la miction s'efface normalement pour laisser place à un contrôle bulbo-protubérantiel.

Le centre somatique est situé dans la corne antérieure aux niveaux S2, S3, S4. Les afférences font synapse avec des interneurons ou des projections neuronales, situés à la base de la corne dorsale. Les interneurons participent aux réflexes médullaires et les axones des projections neuronales forment les voies ascendantes vers le cerveau. Les interneurons et les projections neuronales décussent, activant ainsi les neurones efférents de façon bilatérale. Des réflexes spinaux ont été décrits, mettant en jeu les voies sympathiques, parasympathiques et motrices.

Le circuit nerveux de la miction normale est un réflexe médullaire sujet à une grande variété d'influences provenant des centres supérieurs et modulées à différents niveaux. Il est intégré au niveau du tronc cérébral dans la formation réticulée qui assure la coordination entre la contraction du détrusor et le relâchement du système sphinctérien.

2.1.2.2.2. Les centres encéphaliques

Les voies ascendantes de la perception consciente font relais au niveau thalamique : la voie spinothalamique transmet la sensation de plénitude vésicale, de douleur et de température. La tension au niveau du sphincter et des muscles périnéaux est transmise par une voie directe par les faisceaux graciles et cunéiformes.

Le contrôle volontaire de la vidange est assuré par le cortex cérébral, le centre mictionnel du tronc cérébral, et le cervelet. Les centres corticaux exercent donc un contrôle volontaire de la miction (inhibition ou déclenchement). La circonvolution frontale supérieure contrôle le détrusor. Les formations réticulées du tronc cérébral sont essentielles au déroulement normal d'une miction

en assurant la coordination entre le détrusor et les sphincters. Le cervelet, qui module l'activité motrice initiée dans d'autres zones du système nerveux central, reçoit des afférences sensibles issues du détrusor et des muscles striés de l'appareil sphinctérien par les faisceaux spinocérébelleux et permet d'adapter la distension vésicale au degré de remplissage de la vessie.

Au cours de la miction volontaire, des messages issus des centres corticaux inhibent les réflexes spinaux permettant de retenir les urines dans la vessie et activent le système parasympathique jusque-là maintenu quiescent. Cette activation des nerfs parasympathiques est organisée au niveau d'une voie spino-bulbo-spinale qui passe par le centre mictionnel du tronc cérébral. L'information transmise par les voies sensorielles fait relais dans la substance grise périaqueducule qui transmet des informations au centre de la miction du pont, activant la voie parasympathique et inhibant les motoneurones sphinctériens. Cette voie spino-bulbo-spinale est modulée par les centres corticaux, diencephaliques et du tronc cérébral (15, 18, 19, 42).

L'innervation du bas appareil urinaire dépend donc essentiellement du système neurovégétatif, organisé autour de la complémentarité étroite entre les systèmes nerveux orthosympathique et parasympathique. L'innervation somatique permet de moduler l'activité du système neurovégétatif. L'organisation neurologique complexe du système vésico-sphinctérien permet, comme nous allons le voir, un parfait synchronisme dans la physiologie urinaire, basée sur des mictions efficaces et contrôlées, ainsi que sur une continence urinaire assurée.

2.1.3. Fonctionnement du bas appareil urinaire chez le Chien

Le système vésico-sphinctérien a une double fonction : une fonction de réservoir pour l'accumulation de l'urine dans la vessie, et une fonction contractile pour l'évacuation de l'urine par l'urètre. Le fonctionnement du bas appareil urinaire est ainsi dominé par l'alternance régulière des phases de mictions et des phases de continence urinaire.

2.1.3.1. Le cycle de fonctionnement vésico-urétral

Le cycle de fonctionnement vésico-urétral comprend plusieurs phases :

—l'écoulement de l'urine des uretères vers la vessie

—lorsque le volume vésical optimum est atteint, les neurones afférents transmettent des influx à la moelle et au cerveau (perception du besoin d'uriner)

—le cerveau renvoie une réponse adaptée, à savoir le déclenchement de la miction

—les influx efférents descendent par la moelle épinière et les voies efférentes jusqu'au détrusor, entraînant sa contraction

—la contraction du détrusor s'associe à un relâchement du col vésical, alors que des influx nerveux synchrones lèvent simultanément le tonus urétral

La mise en jeu de l'activité vésico-sphinctérienne rythme l'alternance des phases de remplissage et de vidange de la vessie (20).

2.1.3.2. Le remplissage vésical ou phase de continence urinaire

L'urine s'écoule en permanence dans la vessie où elle s'accumule. La première fonction de cet organe est donc de permettre cette accumulation sans élimination permanente. C'est la phase de continence urinaire. Elle comprend un temps de continence passive (pression intra-vésicale faible), suivi d'un temps de continence active (participation des centres nerveux supérieurs). La première phase correspond au remplissage isobare de la lumière vésicale possible grâce à la grande compliance de la vessie. Cette phase s'arrête quand le volume d'urine exerce une pression telle sur la paroi vésicale, que la tension de cette dernière nécessite la mise en jeu de ses propriétés élastiques. Dès lors, la pression intra-vésicale augmente avec le volume d'urine recueillie et la continence nécessite une augmentation de pression urétrale liée à l'activité des sphincters urétraux.

2.1.3.2.1. Continence passive : premier temps du remplissage vésical

La phase passive du remplissage vésical s'effectue à pression intra-vésicale basse et quasi-constante (environ 10 cm H₂O). Cela empêche l'élévation de pression rétrograde qui viendrait perturber le fonctionnement rénal et facilite la continence. Les sphincters lisse et strié sont fermés. Le détrusor se distend progressivement sous l'effet du sympathique et d'une inhibition du

parasympathique d'origine centrale. La pression intra-vésicale basse et l'augmentation progressive de la pression urétrale sont ainsi sous la dépendance d'un réflexe végétatif pour le tonus musculaire lisse (rôle du système orthosympathique sous contrôle inhibiteur supra-médullaire). La stimulation de la musculature striée urétrale converge dans le même sens. Lors de cette phase, le sphincter urétral strié n'apparaît pas essentiel à la continence urinaire.

Une adaptation du tonus des fibres musculaires lisses du détrusor lors de son étirement permet d'obtenir une augmentation du volume vésical avec une pression stable. Initialement, la faible augmentation de la pression intra-vésicale malgré des volumes importants d'urine contenue était expliquée par un mécanisme réflexe de l'innervation extrinsèque. En réalité, cela est dû aux propriétés spécifiques du détrusor, dont les cellules musculaires peuvent, par exemple, changer de longueur sans modifier leur tension.

Le remplissage progressif de la vessie s'accompagne d'une diminution de l'épaisseur de la paroi vésicale, grâce à l'étirement des cellules musculaires (de plusieurs fois la longueur initiale) ainsi que des couches même de cellules (épithélium pavimenteux) (15, 20, 43).

2.1.3.2.2. Continence active : second temps du remplissage vésical

Cette phase est une période plus courte que la précédente, avec la perception consciente du besoin d'uriner.

La phase active du remplissage vésical survient lorsque la distension vésicale chez la chienne saine déclenche la sensation de besoin. Cette phase est caractérisée par l'augmentation de la pression intra-vésicale et par une élévation du tonus du sphincter urétral strié. La sollicitation importante du sphincter strié, contracté volontairement (avec participation du sphincter anal et des muscles releveurs du périnée) permet la continence urinaire en s'opposant à la forte pression vésicale. Lorsque les conditions d'une miction appropriée sont réunies, la vidange de la vessie peut avoir lieu.

Lors de cette phase du remplissage vésical, le rôle de la contraction sympathique de la musculature lisse et de la contraction somatique de la musculature striée de l'urètre est essentiel. La phase de continence active fait intervenir les mêmes réflexes que ceux détaillés dans la continence passive, mais également les centres supérieurs, les centres lombo-sacrés et des réflexes courts supplémentaires pour le maintien du tonus urétral (15, 20, 43).

2.1.3.3. La vidange vésicale: phase mictionnelle.

La vidange vésicale est assurée par la mise en jeu du réflexe mictionnel, qui doit être absolument suivi du maintien des mécanismes déclenchés pour une exonération urinaire complète. La vessie se comporte comme une pompe repoussant l'urine sous haute pression vers l'urètre ouvert, présentant alors une résistance minimale. La contraction vésicale est le processus essentiel de la phase mictionnelle en permettant l'évacuation de l'urine par l'urètre. De plus, la contraction du détrusor raccourcit la portion crâniale de l'urètre, facilitant l'ouverture du sphincter interne.

2.1.3.3.1. Déclenchement de la miction avec le réflexe mictionnel

La vidange vésicale est caractérisée par le synchronisme entre la contraction du détrusor et l'ouverture des sphincters urétraux, puis par le maintien de cet équilibre pendant toute la durée de l'exonération des urines.

Cette phase est dominée par l'activité du système parasympathique, responsable de la contraction efficace du détrusor par stimulation des récepteurs muscariniques de la paroi vésicale. La contraction du détrusor doit être associée au relâchement orthosympathique de la musculature lisse urétrale et au relâchement somatique de la musculature striée de l'urètre.

Lorsque la pression intra-vésicale atteint environ 20 cm H₂O, la sensation de besoin est transmise aux centres supérieurs ; il peut en résulter une levée de l'inhibition des centres médullaires, dont l'activité automatique se traduit par une contraction du détrusor, débutant par la région du trigone (stimulation des nerfs pelviens), une ouverture du sphincter lisse (inhibition des nerfs hypogastriques) et un relâchement synergique du sphincter strié (inhibition des nerfs honteux).

La contraction du détrusor est active et puissante, caractérisée par une activité électromyographique majoritaire au niveau du col vésical. Le détrusor se caractérise ici par une capacité particulière de la musculature lisse à se contracter efficacement pour des valeurs de volumes vésicaux très différents : la force de contraction apparaît maximale pour des volumes allant de 25 à 75% de la capacité de la vessie.

Le déclenchement de la miction peut être modifié par divers facteurs, qui n'interviennent en fait que pour régler le niveau du seuil de déclenchement de la miction. Une miction volontaire peut être obtenue en l'absence de besoin par une facilitation des centres médullaires, une contraction des

muscles abdominaux et diaphragmatiques, et un relâchement des muscles périnéaux. De même, en dehors de l'inhibition passive et inconsciente lors de la phase de collection, la miction peut être interrompue volontairement par un réflexe vésico-inhibiteur, dont le point de départ est une contraction volontaire puissante du plancher pelvien et du sphincter strié (15, 20, 43).

2.1.3.3.2. Maintien du réflexe mictionnel

La distension vésicale est à l'origine des stimuli qui déclenchent la miction. Ces derniers baissent quand la vessie se vide, et la miction doit donc être maintenue par d'autres mécanismes pour permettre une exonération complète de l'urine. Une décharge parasympathique permet le maintien du réflexe mictionnel en prolongeant la contraction vésicale et le relâchement des sphincters urétraux.

D'autres mécanismes assurent également une vidange complète de la vessie.

—la mise en jeu de réflexes enchaînés

—le passage de l'urine dans l'urètre entraîne la contraction du muscle vésical et le relâchement du sphincter externe

—les récepteurs sensibles à la distension de la vessie ont une sensibilité accrue par la contraction vésicale.

Des circuits courts, liant les systèmes parasympathique, sympathique et somatique facilitent la coordination vésico-sphinctérienne pendant le maintien de la miction. De plus, le contrôle volontaire de la miction se traduit par des influences facilitatrices des centres pyramidaux sur les centres parasympathiques et par des influences inhibitrices sur les centres somatiques.

La contraction du détrusor maintient donc le stimulus qui a assuré son déclenchement, permettant la vidange complète de la vessie. Quand la vessie est vide, l'arrêt de l'écoulement de l'urine dans l'urètre entraîne la fin du réflexe mictionnel.

La fin de la miction est marquée par le relâchement vésical et le retour de la pression urétrale à sa valeur de clôture (15, 20, 43).

2.2. Evaluation de l'activité urétrale par la profilométrie

2.2.1. *Principes de la profilométrie urétrale (voir figure 7)*

Le profil de pression urétrale est la mesure de la pression de la lumière urétrale du col vésical au méat urinaire, par la mise en place et le retrait progressif d'une sonde urétrale. L'objectif de cette mesure est de donner une représentation qualitative et quantitative des forces occlusives actives de l'urètre assurées par l'appareil sphinctérien. Cette technique d'exploration fonctionnelle a été utilisée expérimentalement dès 1882 chez le Chien et l'homme. Son utilisation récente en médecine vétérinaire est surtout liée à son grand intérêt diagnostique dans les troubles du tractus urinaire. Le graphe obtenu permet de déterminer et de mesurer les zones de résistance maximale et minimale de l'urètre et donc d'explorer spécifiquement le fonctionnement sphinctérien. Dans le cadre de cette étude sur l'atteinte possible du sphincter urinaire strié par la myopathie centronucléaire, nous avons donc eu recours à cet examen pour comparer le tonus urétral de chiennes atteintes de myopathie avec celui de chiennes témoins. Cependant il ne donne pas d'informations sur l'activité urétrale lors de la contraction du détrusor et du réflexe de miction. En outre, contrairement à l'urétromanométrie pratiquée chez l'Homme, il s'agit de mesures réalisées uniquement en statique (14, 22, 35, 45).

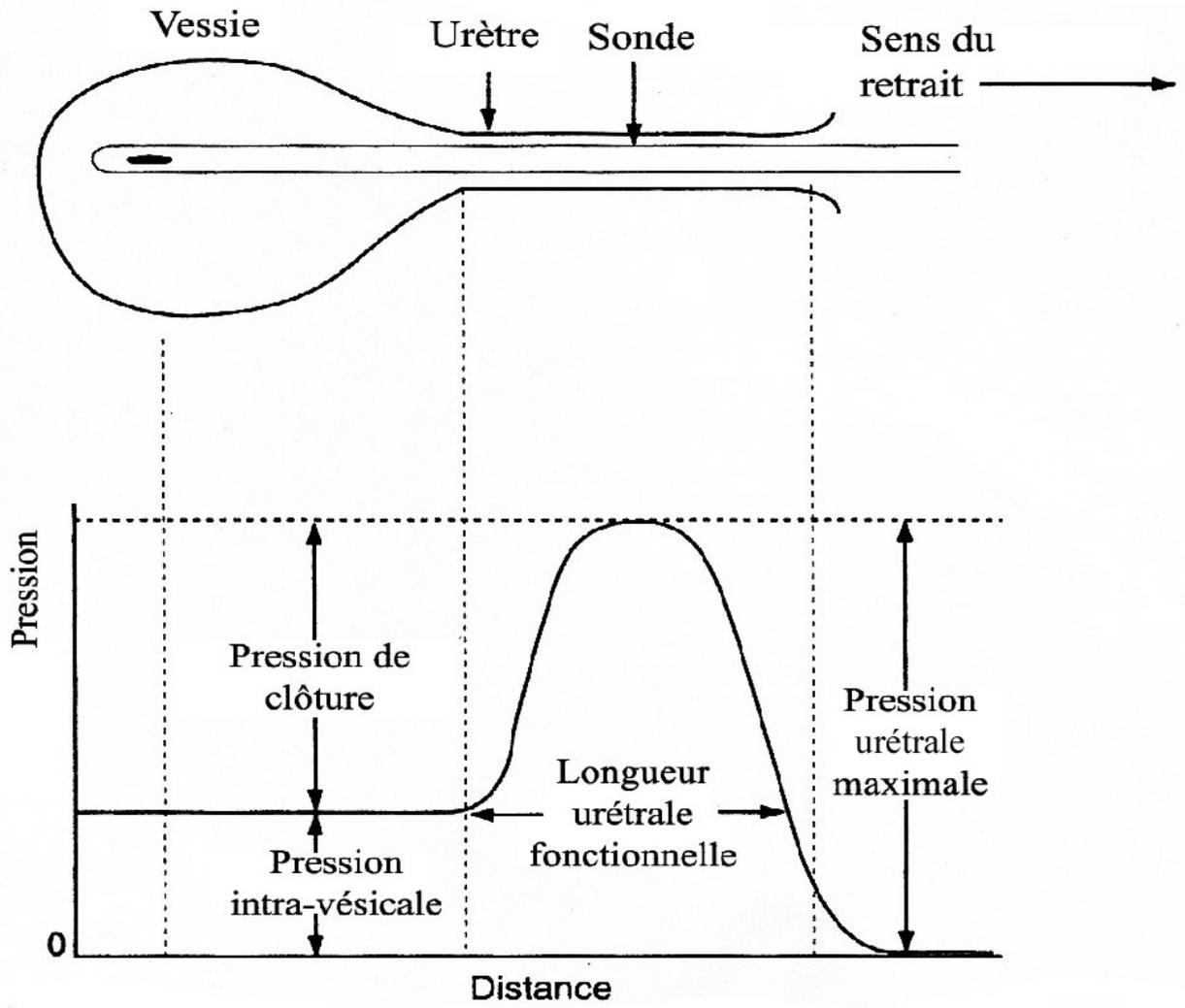


Figure 7 : Schéma d'un profil de pression urétrale : la sonde urinaire (en haut), lors du retrait, enregistre la pression le long de l'urètre (en bas). D'après GOOKIN *et al* (22).

2.2.2. *Lecture et interprétation des profils de pression urétrale*

Le tracé de profil de pression urétrale est réalisé après vidange de la vessie. On enregistre la pression urétrale en retirant la sonde à vitesse lente et constante (5cm/min) ce qui permet des mesures simples de longueur urétrale. Ces mesures sont reportées sur l'axe des abscisses en centimètres. L'axe des ordonnées correspond aux valeurs de pression mesurées par la sonde en centimètre d'eau.

Les différentes mesures accessibles directement sur ce tracé sont la pression intra-vésicale et la pression en tout point de l'urètre ainsi que la longueur parcourue par la sonde. A partir de ces mesures, on peut calculer les paramètres caractérisant le tracé de profil de pression urétrale (voir figure 8) :

—La pression maximale de clôture (PC) : pression urétrale maximale diminuée de la pression vésicale, elle représente le tonus urétral maximal s'opposant au passage de l'urine

—La longueur urétrale fonctionnelle (LUF) : longueur d'urètre dans laquelle la pression est supérieure à la pression vésicale, elle représente la distance entre l'extrémité proximale du sphincter interne et l'extrémité distale du sphincter externe

—La zone de clôture (ZC) : Distance entre le début de l'urètre et la zone où la pression urétrale est maximale, elle représente la portion efficace de l'urètre contre la passage de l'urine

—L'aire sous la courbe (AC) : Intégration de la pression urétrale diminuée de la pression vésicale en fonction de la distance parcourue par la sonde du début à la fin de l'urètre, elle représente le tonus urétral sur toute la longueur fonctionnelle de l'urètre

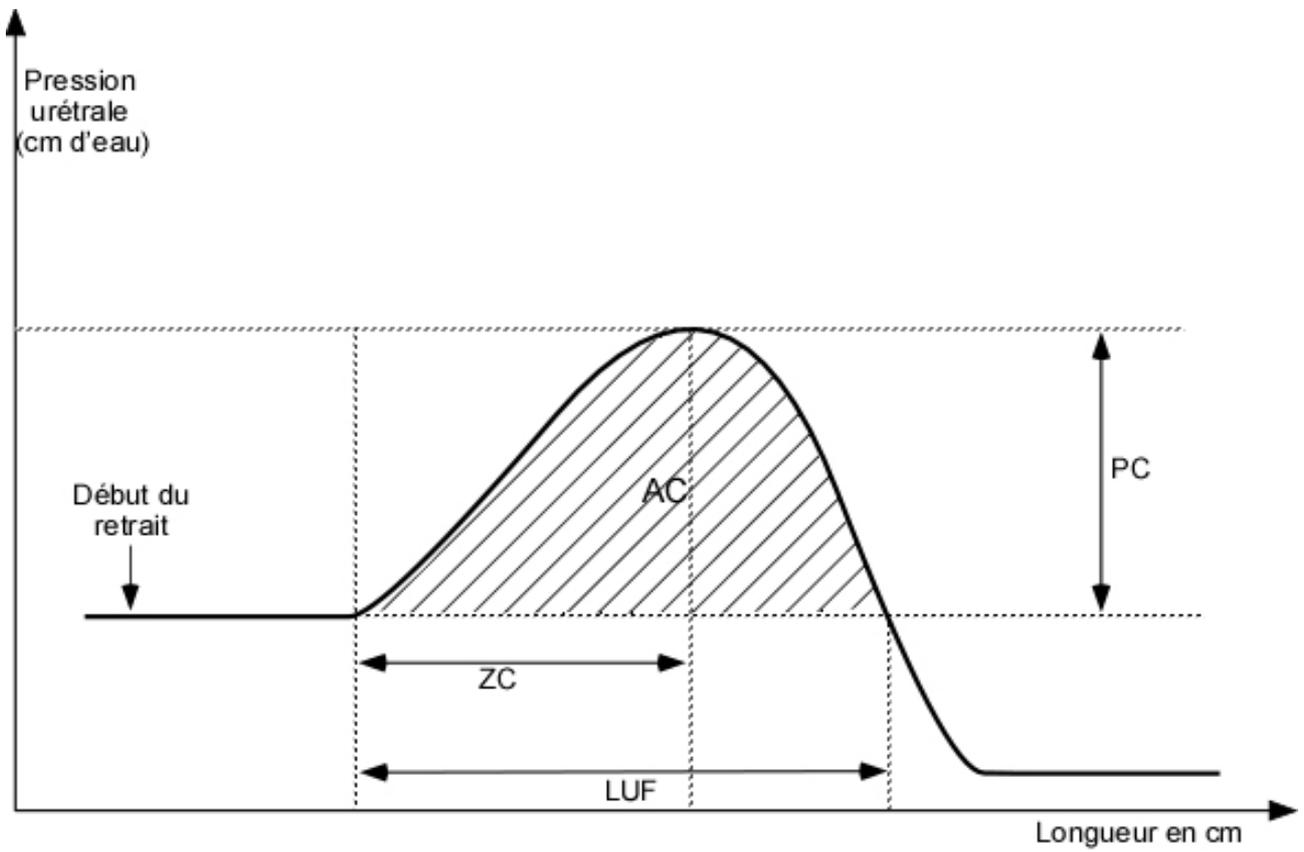


Figure 8 : Paramètres caractérisant le profil de pression urétrale

2.2.3. Relation entre le profil de pression urétrale de la chienne et l'anatomie de l'urètre (voir figure 9)

Il est intéressant de comparer la forme du profil de pression urétrale avec les données sur l'anatomie et l'histologie de l'urètre pour mieux comprendre le rôle de chaque structure dans la continence.

Les profils obtenus chez la chienne ont une forme parabolique avec une pression maximale à mi-urètre quand la musculature striée s'ajoute à la musculature lisse. On ne retrouve donc pas d'unité fonctionnelle distincte correspondant aux sphincters interne ou externe. Dans la première moitié de l'urètre, la pression augmente alors que la part de la musculature lisse dans la paroi urétrale est constante; de même, dans la deuxième moitié, la pression diminue alors que la part de la musculature striée augmente.

Les autres structures de la paroi urétrale (tissu conjonctif, plexus vasculaire, fibres élastiques) ont un rôle important dans la continence urinaire. Il existe en particulier une part importante de fibres élastiques dans la paroi urétrale. Elles sont présentes de façon uniforme sur toute la longueur de l'urètre. Elles procurent une pression de base régulière sur l'ensemble de la courbe.

L'importance de la musculature lisse est illustrée par son volume et son tonus dans la première moitié de l'urètre et par la chute rapide de pression en son absence dans la deuxième moitié. La musculature striée permet de renforcer la musculature lisse à mi-urètre pour atteindre la pression maximale de clôture (4, 22, 45).

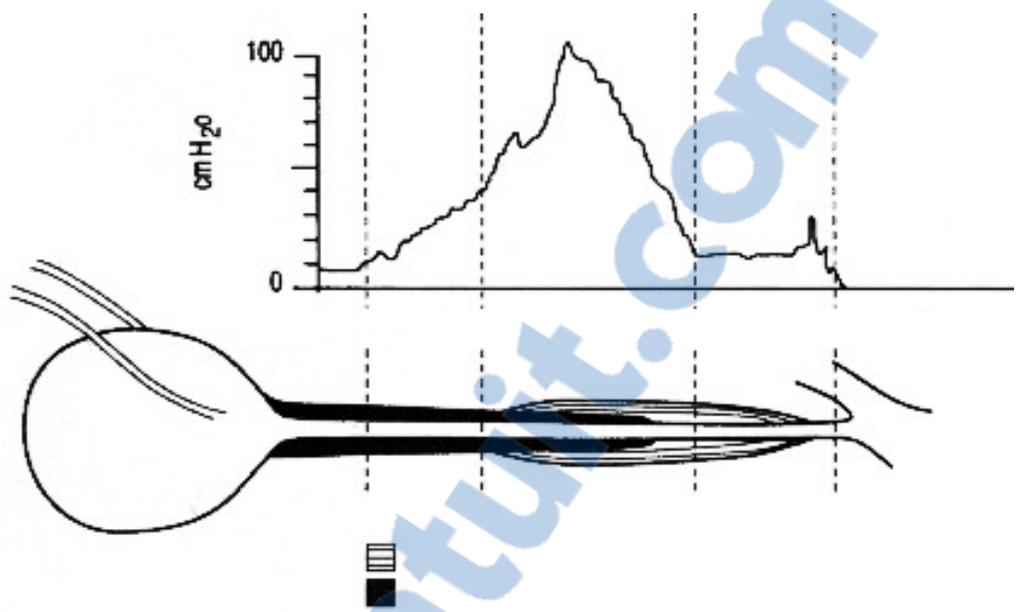


Figure 9 : Profil de pression urétrale en relation avec les structures anatomiques chez la chienne.
D'après GOOKIN *et al* (22).

2.2.4. Relation entre le profil de pression urétrale et le fonctionnement sphinctérien

Le système neurovégétatif sympathique joue un rôle prépondérant dans la tension de la paroi urétrale et contribue ainsi au tracé du profil de pression urétrale, en particulier dans la moitié proximale du tracé. Cette composante sympathique compte pour environ 40-45% du maintien de la pression urétrale totale.

La composante non nerveuse, dont notamment le tissu conjonctif et le plexus vasculaire, est la deuxième composante chez la femelle. La composante somatique vient ensuite. La contribution du système neurovégétatif parasympathique au tonus urétral semble minime.

Les contributions aux valeurs élevées de pression urétrale des deux composantes nerveuses sympathique et somatique ne sont pas maximales au même niveau ; la zone de contribution maximale sympathique se situant toujours proximale à la zone de contribution maximale somatique. Le pic de pression prend ainsi un aspect large (4, 20, 22, 45).

Le sphincter urétral lisse prédomine dans la clôture fonctionnelle de l'urètre, le sphincter urétral strié remplissant davantage un rôle de dernier barrage volontaire à l'écoulement de l'urine.

2.3. Influence du cycle sexuel de la chienne sur le profil de pression urétral

2.3.1. Sécrétions hormonales au cours du cycle sexuel de la chienne (voir figure 10)

La chienne présente une activité sexuelle cyclique tout au long de sa vie, sans ménopause. La puberté intervient deux à trois mois après l'atteinte du poids adulte (6 mois chez les petites races, 18 à 24 mois chez les grandes races). La chienne fait partie des espèces monœstriennes à ovulation multiple. Elle présente en moyenne deux périodes œstrales par an séparées par un interœstrus de trois à dix mois (variations de la durée de l'interœstrus selon les races mais constante pour une même chienne).

On distingue différentes phases dans le cycle sexuel de la chienne :

—Le pro-œstrus : Il correspond à la phase de maturation folliculaire et à l'imprégnation œstrogénique. La sécrétion de progestérone est minimale. La durée moyenne est de 9 jours, mais elle peut aller de 2 à 17 jours.

—L'œstrus : Il correspond à la période d'ovulation. Cette période dure en moyenne 9 jours, avec une variation possible de 3 à 21 jours. On distingue une phase pré-ovulatoire et une phase post-ovulatoire. Avant l'ovulation, la concentration sanguine en œstrogènes décroît et retombe à des valeurs basales. Survient alors le pic de LH. L'ovulation de la chienne survient entre 0 et 96 heures après le pic de LH.. La progestéronémie augmente progressivement avant l'ovulation : cette lutéinisation pré-ovulatoire est une des particularités essentielles de la physiologie sexuelle de la chienne. Après ovulation, la formation du corps jaune s'accompagne d'une augmentation importante de la progestéronémie, des taux supérieurs à 15 ng/ml sont enregistrés huit jours après le pic de LH.

—Le metœstrus : Il correspond à la période d'activité du corps jaune. Cette période dure en moyenne de 2 à 3 mois. Il est intéressant de noter que, contrairement à d'autres espèces, la période d'activité du corps jaune chez la chienne est la même qu'il y ait fécondation ou non, et qu'elle correspond donc à la période de gestation. Le corps jaune sécrète donc de la progestérone à des taux très importants que la chienne soit gestante ou non. En cas de gestation, la progestéronémie sera simplement plus élevée. Le maximum est atteint 10 à 25 jours après le pic de LH (20 à 50 ng/ml). Puis le corps jaune régresse et parallèlement la concentration plasmatique de progestérone diminue. Si la chienne n'est pas gestante, la décroissance est progressive, alors que si la chienne est gestante, il se produit une chute brutale de la progestéronémie deux jours avant la parturition. La phase post-ovulatoire de l'œstrus et le metœstrus constituent la phase lutéale, elle est longue chez la chienne, peu modifiée en l'absence de gestation.

—L'anœstrus : L' anœstrus est la période durant laquelle les ovaires et les organes génitaux sont au repos. Cette période dure de 2 à 5 mois jusqu'à ce que le pro-œstrus arrive. La progestéronémie est minimale puisque inférieure à 1 ng/ml. Le taux plasmatique d'œstrogènes est aussi à son niveau basal.

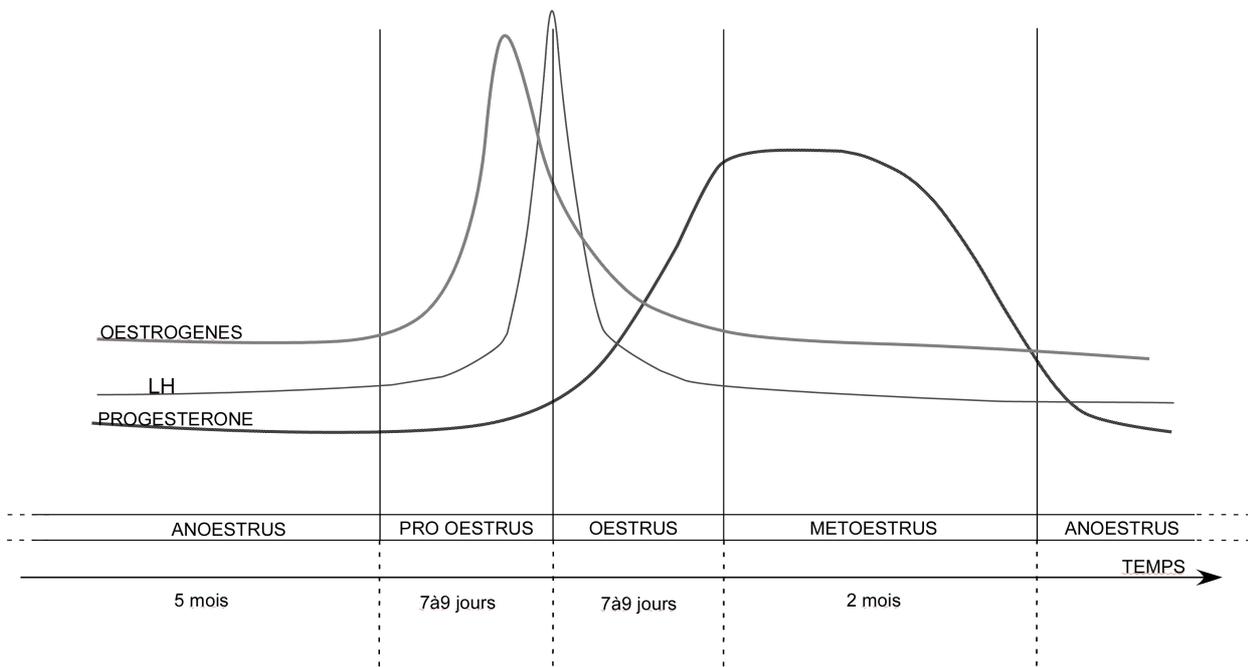


Figure 10 : Le cycle sexuel de la chienne

2.3.2. *Influence hormonale sur le sphincter strié*

2.3.2.1. Les récepteurs aux hormones sexuelles du système vésico-sphinctérien

Le bas appareil urinaire est considéré comme un organe cible des hormones sexuelles et a fait l'objet, chez la femme surtout, de nombreuses recherches quant à l'existence et à la localisation des récepteurs aux hormones sexuelles.

On a ainsi pu mettre en évidence chez la femme la présence de récepteurs avec une forte affinité pour l'œstradiol dans l'urètre, et dans la vessie en moindre concentration. Les récepteurs aux œstrogènes sont également présents au niveau des muscles du plancher pelvien (élément important dans le maintien de la continence chez la femme), et au niveau du cerveau (rôle dans le déclenchement et dans le contrôle de la miction). De même, des récepteurs à la progestérone ont été mis en évidence dans tous les tissus cibles des œstrogènes et donc au niveau de l'urètre, mais leur expression est inconstante et dépend du statut œstrogénique (6, 24, 25, 26, 27).

2.3.2.2. Rôle des œstrogènes

Chez la femme, le rôle des œstrogènes est bien documenté. L'administration chez celle-ci d'œstrogènes se traduit par une augmentation de la pression urétrale. Ils jouent un rôle trophique sur la muqueuse urétrale et vaginale, et sur le sphincter urétral lisse. Ils potentialisent la stimulation α -adrénergique du sphincter urétral lisse (en modulant la sensibilité et la densité des récepteurs α -adrénergiques). Ils accroissent l'activité cellulaire et stimulent la synthèse collagénique dans le tissu. De plus, la vascularisation et le flux sanguin sont œstrogéno-dépendants. Ils favorisent ainsi la continence urinaire.

Chez la chienne, on suspecte fortement depuis plus de vingt ans que l'incontinence urinaire répondant à l'œstrogénothérapie et l'incompétence sphinctérienne sont des séquelles de l'ovariectomie ou de l'ovario-hystérectomie. AUGSBURGER ET CRUZ-OLIVE (3), en comparant des urètres de chiennes ovario-hystérectomisées et des urètres de chiennes intactes nullipares, ont montré que la castration entraîne une diminution de la masse musculaire lisse et de la masse de tissu conjonctif au niveau de l'urètre de la chienne. Les chiennes castrées présentent également au niveau de l'urètre un plexus vasculaire avec un volume plus important. Ces résultats impliquent que la castration chez la chienne a pour séquelle un affaiblissement de la paroi urétrale, et confirment le

rôle trophique des œstrogènes sur la muqueuse urétrale et le sphincter lisse (déjà mis en évidence chez la femme) (3, 40).

2.3.2.3. Rôle de la progestérone

Le rôle de la progestérone est très bien documenté chez la femme au cours de la grossesse. La progestérone antagonise l'action des œstrogènes en diminuant l'expression des récepteurs des œstrogènes, et elle potentialise la stimulation β -adrénergique.

L'apparition d'une incontinence urinaire chez la femme enceinte est une constatation courante. Ces incontinenances sont le plus souvent passagères et se résolvent généralement spontanément entre l'accouchement et la reprise des cycles. L'étiologie de ce type d'incontinence est longtemps restée floue. On a évoqué entre autres des troubles statiques (par compression de l'utérus gravide sur la vessie), une hypotonie des muscles pelviens et une irritabilité vésicale due à une infection latente.

En 1982, CAISSEL et GHADDAR ont décrit l'apparition d'une incontinence urinaire chez une jeune femme au cinquième mois de grossesse, et ont suivi son évolution à l'aide d'explorations urodynamiques qu'ils ont reliées aux dosages hormonaux effectués chez cette patiente. La grossesse entraîne une sécrétion massive de progestérone. Avant l'accouchement, alors que la progestéronémie avoisine les 50 ng/ml, ils ont constaté une diminution du tonus urétral, un raccourcissement de l'urètre fonctionnel et une baisse de la pression de clôture. En post-partum, avec la reprise du cycle (la progestéronémie est alors de l'ordre de 6 ng/ml), les paramètres précédemment mentionnés étaient à nouveau augmentés et la continence récupérée. Ils en ont conclu que l'incontinence évoluait bien en fonction du taux de progestérone. Par extrapolation, ils avaient supposé que l'imprégnation progestéronémique pouvait également être responsable d'épisodes d'incontinence aggravée dans la deuxième phase du cycle menstruel (phase lutéale). Ceci a été vérifié par la suite. Cependant, l'étiologie de ces incontinenances transitoires au cours de la grossesse reste incertaine, et on ne peut exclure les autres hypothèses. La relaxine (de par sa forte concentration au cours de la grossesse et son effet remodelant) pourrait notamment avoir un rôle non négligeable (20, 31, 12).

Le cycle sexuel de la chienne présente la particularité d'avoir une phase lutéale longue (correspondant à une pseudogestation). Durant cette phase, la progestéronémie est élevée, elle

avoisine les valeurs mesurées lors de la gestation. Comme chez la femme, on suspecte une baisse de pression urétrale due à cette forte progestéronémie.

2.3.3. Conséquences sur le profil de pression urétrale

Les paramètres des profils de pression urétrale (pression de clôture, longueur urétrale fonctionnelle et tonus vésical) tendent à diminuer lors de la phase lutéale chez les femmes présentant une incontinence urinaire. Cependant, une étude menée par SORENSON (1988) chez des femmes volontaires continentes n'a mis en évidence aucune modification significative des paramètres urodynamiques à trois moments différents du cycle menstruel. De même, les effets des œstrogènes sur les profils de pression urétrale ont été explorés : il n'y aurait que de très minimes modifications des paramètres principaux (augmentation de la pression de clôture et de la longueur urétrale fonctionnelle), et ceci même chez des femmes ayant reçu des œstrogènes à doses importantes et sur de longues périodes (48, 46, 20).

EDERY a réalisé en 2003 une étude préalable à la nôtre. Elle a montré, dans la colonie de Labradors atteints de myopathie centronucléaire de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, des effets significatifs du cycle sexuel sur les paramètres urodynamiques. Elle a notamment mis en évidence une diminution de la pression de clôture et de l'aire sous la courbe pendant la phase lutéale. Ces résultats sont à mettre en relation avec la forte imprégnation de progestérone durant cette phase. Cependant, ces travaux ont été réalisés sur un effectif restreint et ils avaient pour objectif d'explorer l'effet éventuel de la myopathie centronucléaire sur le sphincter urétral strié. Le protocole expérimental n'avait donc pas pour but de comparer des profils de pression à différents moments du cycle, et les résultats obtenus nécessitent d'être complétés par d'autres travaux spécifiques à ce sujet (20).

Ces résultats ont été pris en compte dans notre étude et en ont influencé le protocole expérimental.

Deuxième partie : Analyse fonctionnelle du tonus urétral chez les Labradors femelles *cnm* au cours de l'anœstrus

1. Présentation de l'étude

1.1. Présentation des travaux d'EDERY réalisés en 2003 (20)

En 2003, EDERY a cherché à mettre en évidence un effet de la myopathie centronucléaire sur le sphincter urinaire. Elle a réalisé une série de profils de pression urétrale sur la colonie de Labradors de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort. Trente-sept Labradors Retrievers mâles et femelles répartis en 13 chiens sains (8 mâles et 5 femelles) et 24 myopathes (8 mâles et 16 femelles) ont été soumis à l'étude. Des mesures de taux de progestérone sanguins ont été effectuées sur les femelles le jour du profil afin de confirmer la période du cycle sexuel établie par le suivi des chaleurs.

Les animaux ont dû être séparés en différents groupes (mâles, femelles en phase folliculaire, en phase lutéale et en anœstrus). Les résultats ne sont ainsi pas influencés par les différences morphologiques entre mâles et femelles ou par les modifications liées au cycle sexuel chez les femelles.

EDERY a ainsi mis en évidence une absence d'effet significatif du génotype chez les mâles (tableau 1). Concernant les femelles, aucune chienne saine n'était en phase lutéale, seules les chiennes en anœstrus et en phase folliculaire ont pu être comparées. Aucune modification significative des paramètres urodynamiques n'a pu être mise en évidence. Cependant, chez les chiennes en anœstrus, une tendance à la baisse de la pression de clôture a été notée chez les malades. Le faible nombre d'animaux n'a pas permis d'établir une différence significative, quoique la valeur de *p* ait été très proche de la significativité (tableau 2) (20).

Génotype mâles	PC (cmH2O)	LUF (cm)	AC (cm ²)
<i>Témoins</i>	77,14 ± 11,554	54,96 ± 4,04	18648,14 ± 3336,54
<i>Malades</i>	81,76 ± 10,262	57,41 ± 5,22	18373,63 ± 4095,86
	p=0,77	p=0,72	p=0,96
	NS	NS	NS

Tableau 1 : Effet de la myopathie centronucléaire du Labrador sur la pression de clôture (PC), la longueur urétrale (LUF) et l'aire sous la courbe (AC) chez les mâles. Les résultats représentent les moyennes ± l'erreur standard moyenne (20).

NS: non significatif

chiennes	PC (F)	PC (A)
<i>Témoins</i>	104,5 ± 20,50	92,33 ± 13,04
<i>Malades</i>	81,86 ± 9,90	63 ± 5,54
	p=0,3239	p=0,0509
	NS	NS

Tableau 2 : Effet de la myopathie centronucléaire du Labrador sur la pression de clôture (PC) en phase d'œstrus et de pro-œstrus (F), et en phase d'anœstrus et de fin de métœstrus (A). Les données numériques correspondent à la moyenne des pressions de clôture plus ou moins l'erreur standard moyenne (20).

NS=non significatif

1.2. Objectifs de l'étude

A la vue de ces résultats, nous avons voulu poursuivre ces travaux chez les femelles en anœstrus pour rechercher d'éventuelles modifications significatives des paramètres urodynamiques entre les deux. Dans notre étude, nous avons choisi de réaliser les profils au cours de cette phase du cycle afin de compléter les données préalablement obtenues par EDERY (2003) et de limiter au maximum l'influence hormonale.

Dans un premier temps, nous avons mesuré les taux de progestérone des femelles saines et malades de la colonie, ceci pour obtenir une première évaluation de la phase du cycle sexuel dans laquelle elles se situaient. Les cas litigieux ont été résolus par l'observation des animaux et les éléments du suivi de chaleurs. Dans un deuxième temps, nous avons réalisé une série de profils sur les femelles en anoestrus.

2. Animaux, matériel et méthodes

2.1. Animaux utilisés

2.1.1. Choix et identification des animaux

Un pedigree de Labradors retrievers atteints de myopathie centronucléaire a été développé à l'ENVA depuis 1994. Les animaux utilisés dans l'étude ont été uniquement des Labradors femelles issues de ce pedigree avec, d'une part des animaux "témoins" c'est-à-dire hétérozygotes pour le gène candidat (que nous noterons $cnm^{+/cnm}$), et d'autre part des chiens atteints de myopathie centronucléaire, homozygotes pour l'allèle délétère au locus cnm et notés $cnm^{cnm/cnm}$

Les Labradors étudiés ont été identifiés par leur numéro de tatouage ou par un numéro unique de transpondeur implanté en région sous-cutanée. Une bandelette urinaire a été réalisée avant chaque examen. Aucun animal ne présentait de signes d'inflammation ou d'infection.

Nous avons choisi de considérer les hétérozygotes comme des animaux témoins car les $cnm^{+/+}$ et les $cnm^{+/cnm}$ sont phénotypiquement identiques, au moins pour ce qui concerne la musculature striée squelettique (critères cliniques et observation de coupes histologiques de muscles biopsiés sur des chiens $cnm^{+/+}$ et $cnm^{+/cnm}$). En outre, les $cnm^{+/cnm}$ ont l'avantage par rapport à des chiens $cnm^{+/+}$ d'appartenir au même pedigree et d'être élevés dans les mêmes conditions que les malades (en chenil, alimentation et suivi clinique identiques,...). Pour les mêmes raisons, nous avons inclus deux femelles hétérozygotes d'un autre groupe de Labradors Retrievers atteints de dystrophie

musculaire du Labrador. Elles sont élevées à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort dans les mêmes conditions que la colonie *cnm*. Ceci a permis d'augmenter le nombre de femelles témoins.

Nous avons exclu les chiennes qui présentaient une progestéronémie élevée lors de la réalisation du profil pour ne garder que les chiennes en anœstrus. De même, nous avons exclu de l'étude les chiennes dont les profils présentent un nombre important d'artefacts liés à des mouvements de l'animal pendant l'examen. Pour avoir un effectif suffisant à une étude statistique, nous avons inclus quelques profils, réalisés en 2003 par EDERY, de chiennes en anœstrus et dont les profils étaient interprétables.

Au total, 20 Labradors femelles non stérilisées réparties en 7 femelles témoins et 13 femelles malades ont été intégrés dans cette étude.

Les animaux étaient âgés au moment de l'étude de 1 à 9 ans.

Les animaux inclus ici ne rentrent durant le temps de l'étude dans aucun autre protocole expérimental. Le suivi médical des animaux est assuré durant toute l'étude.

2.1.2. Dosage de la progestéronémie

Pour situer chaque chienne dans son cycle sexuel, nous avons mesuré le taux de progestérone sanguin de toutes les chiennes dans un premier temps. A partir de ces premières mesures, les femelles présentant un taux très bas (inférieur à 1 ng/ml) ont été choisies pour une série de profils une quinzaine de jours plus tard. On a contrôlé que les chiennes étaient bien en anœstrus en mesurant la progestéronémie le jour du profil (les femelles présentant alors une augmentation significative ont été exclues de l'étude). Une nouvelle série de prise de sang sur les chiennes dont nous n'avions pas encore de profil interprétable était alors prévue 2 à 3 mois plus tard ; et une nouvelle série de profils quinze jours après. Nous avons répété ce protocole jusqu'à avoir assez de profils interprétables de chiennes en anœstrus. Les prises de sang nécessaires aux dosages hormonaux ont été faites sur tube hépariné, le sérum étant prélevé le plus précocement possible après centrifugation des prélèvements. Les dosages par "Radio Immuno Assay" ont été réalisés au CERCA à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort.

2.1.3. Préparation des animaux

Comme chez l'Homme, les profils ont pu être réalisés chez les chiens sans anesthésie. La plupart

des animaux sont restés dociles et immobiles lors des mesures et n'ont montré aucun signe de douleur. Ceux qui présentaient une agitation trop importante ou des signes de douleur n'ont pas été inclus dans le protocole.

2.1.4. Traitement anti-inflammatoire et prophylaxie antiseptique

Deux injections d'amoxicilline (Duphamox LA N.D.) et de kétoprofène (Kétofen N.D.) ont été systématiquement faites par voie sous-cutanée en fin d'examen pour prévenir tout risque d'infection secondaire à l'examen et limiter l'inflammation consécutive à l'introduction de la sonde.

2.2. Profilométrie urétrale

2.2.1. Matériel utilisé

Les profils de pression urétrale sont réalisés à l'aide d'un appareil appelé "Chaîne urodynamique Vermed". Cet appareil est composé de quatre compartiments:

—L'enregistreur: à deux voies : il permet d'obtenir deux tracés de couleurs différentes (rouge et bleu) correspondant aux pressions vésicale et urétrale et enfin une troisième courbe (verte) représente le différentiel entre les deux tracés. L'opérateur choisit la vitesse du défilement.

—Les modules de mesure de pression permettant de mesurer la pression intra-vésicale d'une part et la pression urétrale d'autre part,

—Les capteurs de pression : au nombre de deux, chaque capteur de mesure de pression est en contact avec la sonde d'un côté, et avec le soluté de perfusion de l'autre côté,

—Le module d'urétro-profilométrie, équipé d'un moteur entraînant le retrait progressif de la sonde urétrale, à une vitesse choisie par l'opérateur, après sa mise en place dans les voies urinaires.

2.2.2. Description des sondes et mise en place

Les sondes urinaires utilisées sont du matériel pédiatrique, elles doivent être suffisamment souples pour ne pas être traumatisantes lors du sondage, et le matériau utilisé ne doit pas être

expansible pour la fiabilité de la mesure.

Des sondes "Porgès" (Le Plessis Robinson) en PVC à 2 voies (sondes CH/FR 6) ont été utilisées: une voie enregistre la pression vésicale et peut assurer le remplissage ou la vidange vésicale, tandis que l'autre enregistre les pressions urétrales. La voie urétrale est perfusée pour décoller l'urètre de la sonde et favoriser la mesure de pression de la lumière urétrale (2ml/mn). Le soluté de perfusion est du sérum physiologique salé isotonique stérile, utilisé à température ambiante.

2.2.3. Capteurs de pression, traitement du signal

Avant sa mise en place dans les voies urinaires, la sonde est connectée au dispositif de perfusion de la vessie et aux capteurs de pression qui assurent la mesure des pressions. Le capteur de pression est un capteur électronique caractérisé par:

—la cellule de pression, à la source d'une tension appliquée à la jauge de contrainte (membrane déformable)

—et la transmission des pressions se faisant jusqu'au capteur de pression par un système de tubulure renfermant du soluté physiologique

Deux voies sont en général reliées aux capteurs de pression. Une unité électronique correspondant à un amplificateur de signal, permet l'affichage numérique des valeurs de pression.

2.2.4. Retrait de la sonde

Le retrait de la sonde doit être fait par une machine de retrait de préférence à un retrait manuel. Le retrait est ainsi suffisamment lent pour que le temps de réponse du système ne soit pas inférieur à la vitesse des variations de pression devant être enregistrées. De plus, la mesure des longueurs sur le profil ne peut se faire que s'il existe une synchronisation dans l'échelle de temps entre la vitesse d'enregistrement et la vitesse de retrait.

2.2.5. Description du déroulement d'un profil de pression urétrale

L'animal est placé en décubitus latéral gauche sur la table d'examen. La région vulvaire est nettoyée et désinfectée à l'aide d'Hibitan (N.D.) dilué au 1:100, un speculum vaginal stérile est mis

en place. La sonde stérilisée au formol est rincée avec du sérum physiologique stérile pour éviter que les résidus de formol n'irritent les voies urinaires.

L'étalonnage de la sonde doit être pratiqué avant chaque mesure sur la sonde à l'air libre et à pression atmosphérique : la sonde, reliée à l'appareil enregistreur, est d'abord placée horizontalement à la même hauteur que la vulve de l'animal pour la mise à zéro de la pression au niveau des capteurs (correspondant à la pression atmosphérique). Après détermination du "zéro de pression" sur l'enregistreur, la sonde est introduite dans l'urètre par le méat urinaire et poussée jusqu'à la vessie.

Il est important que la vessie soit vidée intégralement pour la reproductibilité du protocole : en effet le volume vésical et la pression intra-vésicale peuvent modifier les valeurs de longueurs fonctionnelles et de pression urétrales, une vessie pleine diminuant nettement la longueur fonctionnelle urétrale par action au niveau du col vésical et pouvant induire un renforcement de la pression de clôture. La vessie est vidangée de l'urine stockée. L'urine est récupérée par aspiration manuelle et est analysée à l'aide d'une bandelette urinaire afin de vérifier l'absence de tout signe d'infection ou d'inflammation, ces deux mécanismes perturbant les paramètres normaux du profil urétral.

Une fois en place, la sonde est fixée sur le dispositif de retrait; elle est retirée à une vitesse constante de 5 centimètres par minutes et mesure ainsi la pression tout au long de l'urètre. La vitesse de défilement de l'enregistrement est identique à celle du retrait de la sonde, de façon à obtenir un profil urétral en vraie grandeur : les tracés de pression obtenus correspondent exactement en taille réelle aux structures anatomiques.

Dans la mesure où les chiennes ne présentaient pas de signe de douleur, nous avons systématiquement réalisé deux profils par chienne. Ceci a permis de choisir lors de l'interprétation le profil présentant le moins d'artefacts.

La présence des deux capteurs séparés de quelques centimètres donne deux tracés qui reflètent la pression dans l'urètre à quelques secondes d'intervalle mais les deux tracés diffèrent du fait que l'orifice distal est près du bout de la sonde où l'urètre se referme alors que l'orifice urétral est dans un système plus cylindrique et également du fait que la voie vésicale n'est pas perfusée.

2.2.6. Paramètres quantitatifs des profils obtenus

Les enregistrements des profils de pression urétrale donnent des courbes enregistrées puis traitées par un logiciel qui détermine plusieurs paramètres décrits précédemment (PC, LUF, AC ZC).

La totalité des profils de pression urétrale a fait l'objet d'une analyse approfondie afin d'étudier la localisation du pic de pression de clôtüre au sein de la longueur fonctionnelle urétrale mesurée, déterminant ainsi la région de l'urètre jouant majoritairement la fonction de sphincter, primordiale pour la continence urinaire ; et de localiser les pics de pression liés à des mouvements de la chienne.

Nous avons décidé de ne pas tenir compte des ZC car il est difficile de délimiter de façon systématique et objective les zones de clôtüre sur les profils, ce qui limite la reproductibilité de la manipulation. Nous nous limiterons donc aux trois autres paramètres mentionnés précédemment.

De plus, l'aire sous la courbe calculée par le logiciel tient compte de la pression vésicale qui augmente lors du retrait (le capteur vésical se retrouvant au niveau urétral). L'aire sous la courbe calculée est donc minorée par un facteur variable (pression urétrale). Les pics de pression liés aux mouvements des chiennes pendant l'examen sont des artefacts qui modifient également l'aire sous la courbe, voire les pics de pression et les longueurs fonctionnelles. (voir figure 11)

Pour se soustraire à ces problèmes, nous avons décidé de retravailler les courbes à l'aide d'un logiciel graphique (Canvas DENEBA System). Nous avons ainsi pu linéariser les courbes en retirant les artefacts, et recalculer les aires sous la courbe, les longueurs fonctionnelles et les pics de pression. Les données obtenues ont ainsi été interprétables et ont permis de comparer les différents profils. L'aire sous la courbe semble être le paramètre le plus représentatif de l'activité sphinctérienne car il représente une mesure d'ensemble et permet de minorer certaines erreurs. (voir figure 12)

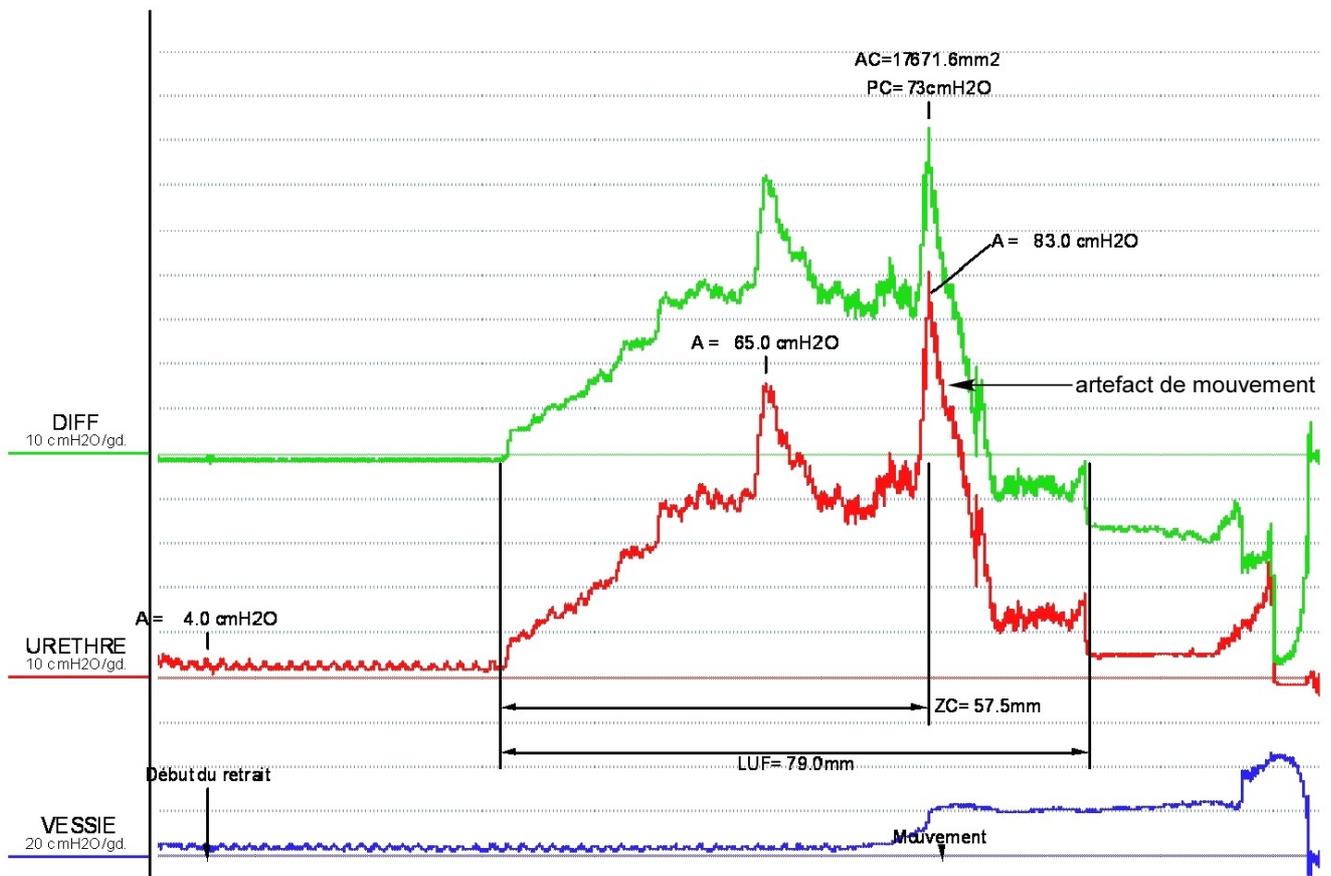


Figure 11 : Tracé brut du profil de pression urétrale de « Myo » obtenu par le logiciel, avec les valeurs des paramètres calculées par celui-ci (AC, LUF, PC, ZC) :

On observe un pic de pression dû à un artéfact de mouvement qui fausse les résultats du logiciel.

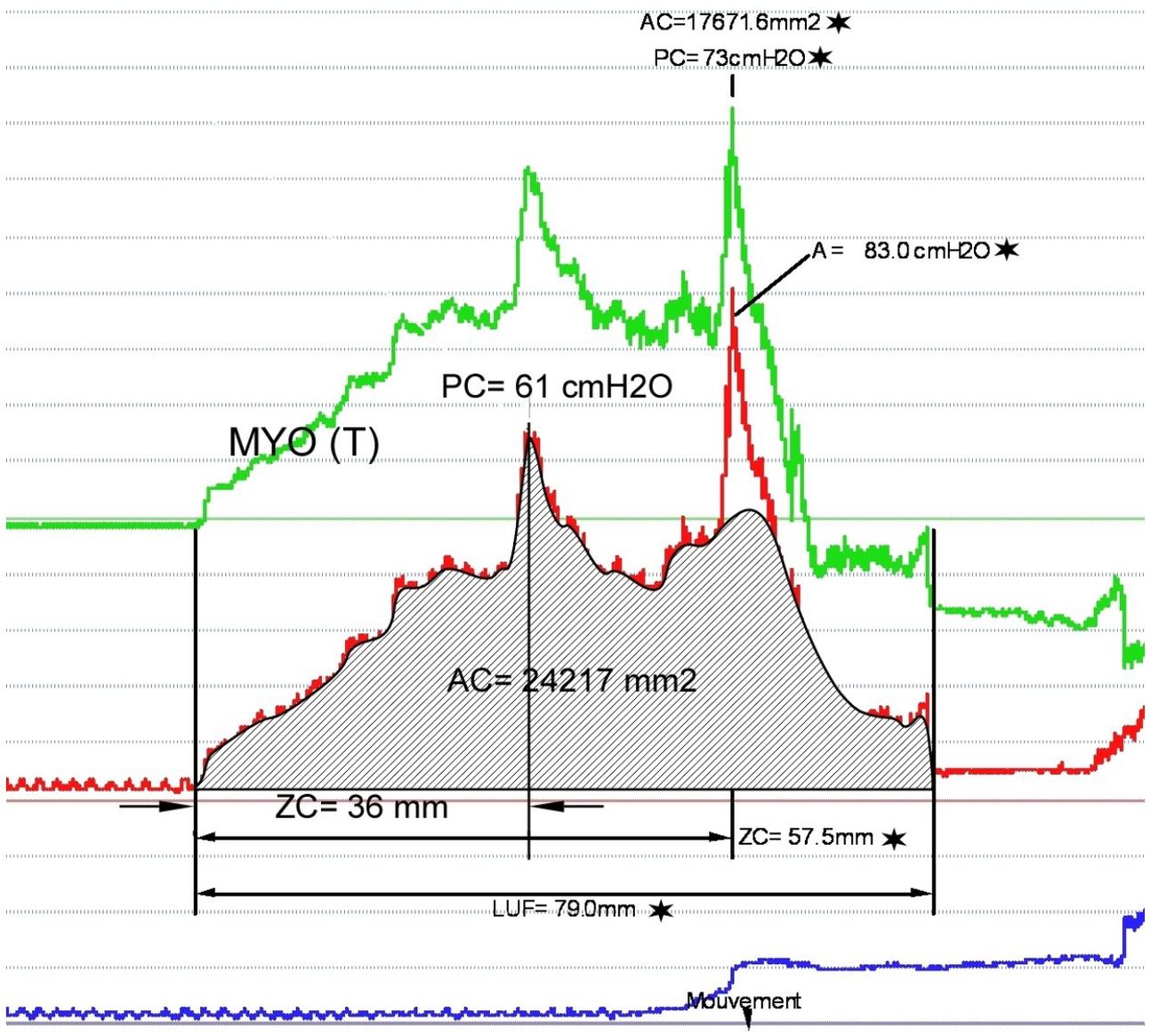


Figure 12 : Profil de pression urétrale de « *Myo* », après avoir retravaillé le tracé sous *Canvas*.

(Les valeurs avec une étoile sont celles calculées par le logiciel, les autres ont été calculées par *Canvas*)

2.3. Outils statistiques

Les données ont été analysées et comparées à l'aide du logiciel StatView (©1992-95 Abacus Concepts, Inc).

Pour avoir recours à une analyse statistique paramétrique, nous avons tout d'abord vérifié que la répartition était normale. Nous avons ensuite réalisé une étude statistique inférentielle et descriptive des trois paramètres étudiés (PC, LUF, AC) dans l'échantillon.

Une analyse de la variance a été faite à l'aide d'un test F dans un premier temps. Puis, pour mettre en évidence des écarts significatifs entre les différents groupes, nous avons utilisé un test t. Enfin, pour illustrer ces résultats, nous avons fait une étude descriptive.

3. Résultats

Tous les résultats des profils de pression urétrale utilisés dans l'étude sont présentés dans l'Annexe 1, avec le nom, l'âge, le taux de progestérone mesurée au moment du profil et le phénotype de chaque chienne.

3.1. Effet du génotype sur la pression de clôture

Les résultats expérimentaux sont représentés à la Figure 13 et dans les tableaux 3, 4, et 5. Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les malades et les témoins comme le montre le test t ($p > 0.05$). Il n'y a donc pas d'effet significatif du génotype sur la pression de clôture.

La myopathie centronucléaire étant une maladie évolutive, nous avons divisé le groupe des malades en deux classes d'âge pour parfaire ce résultat. En prenant comme limite trois ans, nous avons divisé l'échantillon en 7 jeunes (3 témoins et 4 malades), et 13 adultes (4 témoins et 9 malades) (voir Annexe 1).

En éclatant le test t par classe d'âge, il ne ressort aucune différence significative entre malades et témoins, que ce soit chez les jeunes ou chez les adultes. Ceci confirme l'absence d'effet du génotype sur la pression de clôture, quel que soit l'âge des animaux.

3.2. Effet du génotype sur la longueur urétrale fonctionnelle

Les résultats expérimentaux sont représentés à la Figure 13 et dans les tableaux 6, 7, et 8. Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les malades et les témoins comme le montre le test t ($p > 0.05$). Il n'y a donc pas d'effet significatif du génotype sur la longueur urétrale fonctionnelle.

En éclatant le test t par classe d'âge, il ne ressort aucune différence significative entre malades et témoins, que ce soit chez les jeunes ou chez les adultes. Ceci confirme l'absence d'effet du génotype, quel que soit l'âge des animaux.

3.3. Effet du génotype sur l'aire sous la courbe

Les résultats expérimentaux sont représentés à la Figure 13 et dans les tableaux 9, 10, et 11. Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les malades et les témoins comme le montre le test t ($p > 0.05$). Il n'y a donc pas d'effet significatif du génotype sur l'aire sous la courbe.

En éclatant le test t par classe d'âge, il ne ressort aucune différence significative entre malades et témoins, que ce soit chez les jeunes ou chez les adultes. Ceci confirme l'absence d'effet du génotype, quel que soit l'âge des animaux.

Test F pour PC

Variable "groupe" : Statut

Variable "groupe" : Statut

Ratio théorique = 1

	Ratio de Var.	DDL num.	DDL dén.	F	p
Malade, Témoin	2,360	12	6	2,360	,2473
Malade, Témoin	2,360	12	6	2,360	,2473

Info. du groupe pour PC

Variable "groupe" : Statut

Info. du groupe pour PC

Variable "groupe" : Statut	nombre	Moy.	Variance	Dév Std	Erreur Std
Témoin	7	65,714	262,571	16,204	6,125
Malade	15	69,615	619,756	24,895	6,905
Témoin	7	65,714	262,571	16,204	6,125

Tableau 3 : Test t réalisé entre le groupe témoin et le groupe malade pour la valeur de pression de

Test t séries non appariées pour PC

Variable "groupe" : Statut	Ratio de Var.	DDL num.	DDL dén.	F	p
Malade, Témoin	2,360	12	6	2,360	,2473

Test t séries non appariées pour PC

Ecarté par: Classe d'âge	Ecart moyen	DDL	t	p
Malade, Témoin: Total	3,901	18	,372	,7143
Malade, Témoin: A	7,375	10	,477	,6435
Malade, Témoin: Total	-1,333	5	-,078	,9411
Malade, Témoin: A	69,625	815,411	28,555	10,096
Malade, Témoin: J	470,333	400,333	20,008	11,552

Info. du groupe pour PC

Variable "groupe" : Statut

Ecarté par: Classe d'âge

Info. du groupe pour PC	Ecart moyen	DDL	t	p
Malade, Témoin: Total	619,756	24,895	6,905	
Malade, Témoin: A	69,625	815,411	28,555	10,096
Malade, Témoin: J	470,333	400,333	20,008	11,552

Tableau 4 : Test t réalisé entre le groupe témoin et le groupe malade pour la valeur de pression de

Info. du groupe pour PC	nombre	Moy.	Variance	Dév Std	Erreur Std
Témoin: Total	7	65,714	262,571	16,204	6,125
Témoin: A	4	62,250	220,917	14,863	7,432
Témoin: J	3	70,333	400,333	20,008	11,552

Malade: A	8	69,625	815,411	28,555	10,096
Malade: J	4	69,000	574,000	23,958	11,979
Témoin: Total	7	65,714	262,571	16,204	6,125
Témoin: A	4	62,250	220,917	14,863	7,432
Témoin: J	3	70,333	400,333	20,008	11,552

Tableau 5 : Statistiques descriptives de la pression de clôture (PC) en fonction des groupes malades (séparés en adultes et jeunes) et témoins (séparés en adultes et jeunes). (Moy : moyenne, Dév Std : déviation standard, Erreur Std : erreur standard)

Test F pour LUF

Variable "groupe" : Statut

Ratio théorique = 1

Variable "groupe" : Statut	DDL num.	DDL dén.	F	p	
Malade, Témoin	1,248	12	6	1,248	,7617
Ratio de Var. DDL num. DDL dén. F p					
Malade, Témoin	1,248	12	6	1,248	,7617

Info. du groupe pour LUF

Variable "groupe" : Statut

Info. du groupe pour LUF

Tableau 6 : Test de la variable "groupe" pour le statut témoin et le groupe malade pour la longueur urétrale

Variable "groupe" : Statut	Moy	Variance	Dév Std	Erreur Std	
Témoin	81,923	209,830	14,486	4,018	
Malade, Témoin	1,248	12	6	1,248	,7617

Test-t séries non appariées pour LUF

Variable "groupe" : Statut

Eclaté par: Classe d'âge

Variable "groupe" : Statut

Ecart théorique = 0

Variable "groupe" : Statut	Part moyen	DDL	t	p
Malade, Témoin: A	81,923	209,830	14,486	4,018
Malade, Témoin: Total	168,111	129,666	11,966	4,901
Malade, Témoin: J	-2,958	5	-,217	,8366

Test-t séries non appariées pour LUF

Variable "groupe" : Statut

Info. du groupe pour LUF

Variable "groupe" : Statut

Ecart théorique = 0

Eclaté par: Classe d'âge

Info. du groupe pour LUF

Tableau 7 : Test de la variable "groupe" pour le statut témoin et le groupe malade pour la longueur urétrale

Variable "groupe" : Statut	Moy	Variance	Dév Std	Erreur Std
Malade, Témoin: A	87,500	94,083	9,700	3,429
Malade, Témoin: Total	168,111	129,666	11,966	4,901
Malade, Témoin: J	78,333	244,863	15,648	9,034

A cause des valeurs manquantes des variables éclatées, les résultats globaux seront peut être différents des résultats globaux.

Variable "groupe" : Statut	Moy	Variance	Dév Std	Erreur Std	
Malade: Total	13	81,923	209,830	14,486	4,018
Malade: A	8	87,500	94,083	9,700	3,429
Malade: J	4	75,375	366,549	19,145	9,573
Témoin: Total	7	84,614	168,111	12,966	4,901
Témoin: A	4	89,325	103,943	10,195	5,098
Témoin: J	3	78,333	244,863	15,648	9,034



Tableau 8 : Statistiques descriptives de la longueur urétrale fonctionnelle (LUF) en fonction des groupes malades (séparés en adultes et jeunes) et témoins (séparés en adultes et jeunes). (Moy : moyenne, Dév Std : déviation standard, Erreur Std : erreur standard)

Tableau 11 : Statistiques descriptives de l'aire sous la courbe (AC) en fonction des groupes malades (séparés en adultes et jeunes) et témoins (séparés en adultes et jeunes). (Moy : moyenne, Dév Std : déviation standard, Erreur Std : erreur standard)

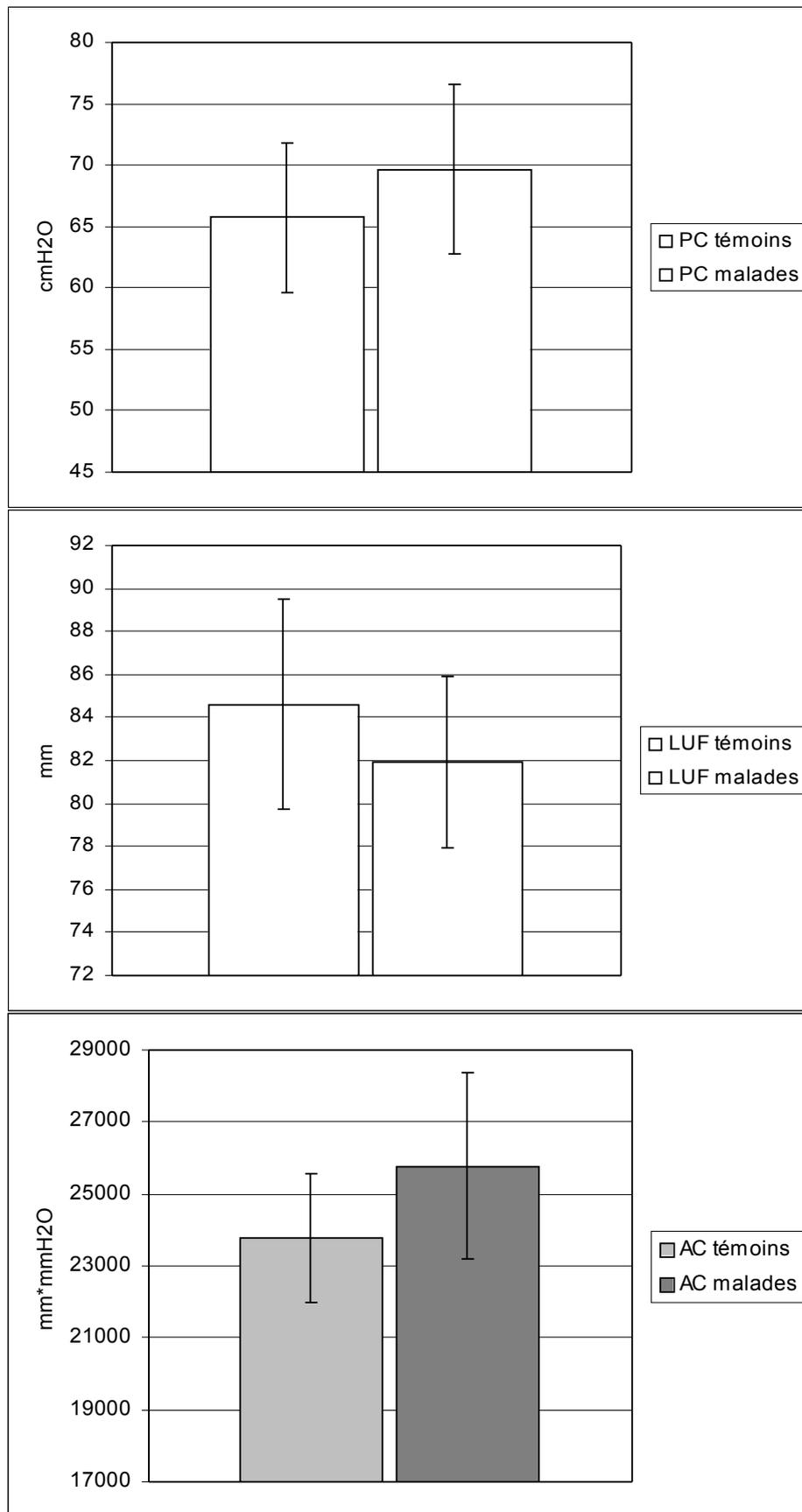


Figure 13 : Histogrammes représentant les moyennes +/- l'erreur standard moyenne de chacun des paramètres étudiés (PC, LUF, AC) pour le groupe des malades et le groupe des témoins

3.4. Modifications du profil de pression urétrale avec l'âge

A l'aide des deux classes d'âges précédemment définies, nous avons voulu tester un éventuel effet de l'âge sur le profil de pression urétrale. Les tests statistiques utilisés sont identiques à ceux de la partie précédente (test F et test t), mais leur but est de montrer des différences significatives entre adultes et jeunes (voir Tableau 12 et 13).

Aucun effet de l'âge sur les paramètres du profil de pression urétrale n'a été montré, ni chez les malades ou les témoins, ni dans l'ensemble du groupe.

Nous avons tenté de diviser le groupe de chiennes en trois classes d'âges, mais les groupes obtenus étaient trop petits pour une analyse statistique. Les résultats exploitables n'ont pas été en faveur de modifications du profil en fonction de l'âge (voir Tableau 14 et 15).

En conclusion, il ressort que les paramètres du profil de pression urétrale ne sont pas modifiés chez les femelles Labradors atteintes de myopathie centronucléaire. Le tonus urétral n'est donc pas affecté par cette maladie. Nous n'avons pas, non plus, noté de modifications chez les chiennes âgées, pourtant plus atteintes. Le sphincter urinaire des femelles en anœstrus n'est donc pas atteint par la maladie, au moins d'un point de vue fonctionnel. On peut enfin remarquer que, chez l'ensemble des chiennes (malades et témoins), on ne note aucune modification du profil de pression urétrale liée à l'âge.

	nombre	Moy.	Variance	Dév Std	Erreur Std
A	12	24783,333	51944503,152	7207,254	2080,555
J	7	26297,857	97399235,476	9869,105	3730,171

Test-t séries non appariées pour AC

Test F pour AC Variable "groupe" : Classe d'âge

Variable "groupe" : Classe d'âge

Eclaté par: Statut

Ratio théorique = 1

	Ratio de Var.	DDL num.	DDL dén.	DDI F	t	p
A, J	A: Total	11	1514,524	6	,533	,386
	A, J: Malade		-2929,375	10	-,483	,6398
	A, J: Témoin		41,417	5	,011	,9920

Info. du groupe pour AC

Variable "groupe" : Classe d'âge

	nombre	Moy.	Variance	Dév Std	Erreur Std
A	12	24783,333	51944503,152	7207,254	2080,555
J	7	26297,857	97399235,476	9869,105	3730,171

Tableau 12 : Test t réalisé entre le groupe adulte (A) et le groupe jeune (J) pour l'aire sous la

courbe (AC) et éclaté en fonction des phénotypes malade et témoin.

Test-t séries non appariées pour AC

Variable "groupe" : Classe d'âge

Eclaté par: Statut

Ratio théorique = 0

	nombre	Moy.	Variance	Dév Std	Erreur Std
A: Total	12	24783,333	51944503,152	7207,254	2080,555
A: Malade	8	25279,125	68567016,411	8280,520	2927,606
A: Témoin	4	23791,750	28506998,250	5339,195	2669,597
J: Total	7	26297,857	97399235,476	9869,105	3730,171
J: Malade	4	28208,500	167547296,333	12944,006	6472,003
J: Témoin	3	23750,333	23840833,333	4882,708	2819,033
A, J: Total		-1514,524	17	-,386	,7041
A, J: Malade		-2929,375	10	-,483	,6398
A, J: Témoin		41,417	5	,011	,9920

Info. du groupe pour AC

Variable "groupe" : Classe d'âge

Eclaté par: Statut

	nombre	Moy.	Variance	Dév Std	Erreur Std
A: Total	12	24783,333	51944503,152	7207,254	2080,555
A: Malade	8	25279,125	68567016,411	8280,520	2927,606
A: Témoin	4	23791,750	28506998,250	5339,195	2669,597
J: Total	7	26297,857	97399235,476	9869,105	3730,171
J: Malade	4	28208,500	167547296,333	12944,006	6472,003
J: Témoin	3	23750,333	23840833,333	4882,708	2819,033

Tableau 13 : Statistiques descriptives de l'aire sous la courbe (AC) en fonction des classes d'âge adulte (A) et jeune (J), divisées selon les phénotypes témoin ou malade. (Moy : moyenne, Dév Std : déviation standard, Erreur Std : erreur standard)

J	7	72,286	367,571	19,172	7,246
V	4	81,000	1496,000	38,678	19,339

Test-t séries non appariées pour PC

Variable "groupe" : T classes

Eclaté par: Statut

Ecart théorique = 0

	Ecart moyen	DDL	t	p
A, J: Total	-12,841	14	-1,704	,1105
A, J: Malade	-16,550	7	-1,636	,1458
A, J: Témoin	-8,083	5	-,619	,5632
A, V: Total	-21,556	11	-1,617	,1342
A, V: Malade	-23,800	7	-1,370	,2130
A, V: Témoin
J, V: Total	-8,714	9	-,510	,6224
J, V: Malade	-7,250	6	-,328	,7543
J, V: Témoin

Info. du groupe pour PC

Variable "groupe" : T classes

Eclaté par: Statut

	nombre	Moy.	Variance	Dév Std	Erreur Std
A: Total	9	59,444	115,778	10,760	3,587
A: Malade	5	57,200	51,700	7,190	3,216
A: Témoin	4	62,250	220,917	14,868	7,432
J: Total	7	72,286	367,571	19,172	7,246
J: Malade	4	73,750	461,583	21,484	10,742
J: Témoin	3	70,333	400,333	20,008	11,552
V: Total	4	81,000	1496,000	38,678	19,339
V: Malade	4	81,000	1496,000	38,678	19,339
V: Témoin	0

Tableau 14 : Test t réalisé entre les trois classes d'âges (jeunes (V), adulte (A), et le groupe jeune (J)) pour la pression de clôture (PC) et éclaté en fonction des phénotypes malade et témoin.

J	4	26896,000	185083171,333	13604,528	6802,264
V	4	27683,250	132393814,917	11506,251	5753,126

Test-t séries non appariées pour AC

Variable "groupe" : T classes

Eclaté par: Statut

Ecart théorique = 0

	Ecart moyen	DDL	t	p
A, J: Total	-3562,600	7	-,576	,5829
A, J: Malade	-3562,600	7	-,576	,5829
A, V: Total	-4349,850	7	-,820	,4393
A, V: Malade	-4349,850	7	-,820	,4393
J, V: Total	-787,250	6	-,088	,9325
J, V: Malade	-787,250	6	-,088	,9325

Info. du groupe pour AC

Variable "groupe" : T classes

Eclaté par: Statut

	nombre	Moy.	Variance	Dév Std	Erreur S
A: Total	5	23333,400	10187936,300	3191,855	1427,4
A: Malade	5	23333,400	10187936,300	3191,855	1427,4
J: Total	4	26896,000	185083171,333	13604,528	6802,2
J: Malade	4	26896,000	185083171,333	13604,528	6802,2
V: Total	4	27683,250	132393814,917	11506,251	5753,1
V: Malade	4	27683,250	132393814,917	11506,251	5753,1

Tableau 15 : Test t réalisé entre les trois classes d'âges (vieille (V), adulte (A), et jeune (J)) pour l'aire sous la courbe (AC) et éclaté en fonction des phénotypes malade et témoin

Troisième partie : Discussion

1. Discussion de certains choix dans le protocole expérimental

1.1. Intérêt du choix de l'anœstrus pour la réalisation des profils

Les résultats obtenus par EDERY (2003) ont montré un effet du cycle sexuel sur les paramètres urodynamiques des chiennes Labradors, indépendamment de leur génotype. Par ailleurs, il avait été montré une tendance à la diminution de la pression de clôture chez les chiennes malades avec des taux bas de progestéronémie (en anœstrus ou en fin de métœstrus; $p=0,0509$ limite de non significativité, échantillon faible). Notre objectif de ne pas se confronter au biais d'interprétation induit par le cycle et de se placer en situation optimale pour détecter une éventuelle anomalie du sphincter nous a donc conduit à restreindre notre étude, dans un premier temps, au seul anœstrus. Avec notre panel élargi et centré sur l'anœstrus, nous avons établi que le génotype n'a aucune influence sur les valeurs PC, LUF et AC.

L'anœstrus présente une activité hormonale minimale. On évite ainsi les effets des hormones sexuelles sur le tractus urinaire et notamment la baisse probable de tonus urétral pendant la phase lutéale. Il est aussi possible que la limite de significativité des résultats obtenus par EDERY (2003) provenait de ce que 3 des 4 chiennes malades classées dans la phase "anœstrus" étaient en toute fin de métœstrus. L'effet probable de la progestérone au cours de cette phase peut avoir biaisé les résultats en diminuant le tonus urétral chez ces chiennes (20).

1.2 Méthodes employées pour connaître la phase du cycle sexuel des chiennes

Les méthodes couramment employées sont le suivi de chaleur (observation de l'œstrus à l'aide du comportement et des pertes sanguines), les mesures de progestéronémie et les frottis vaginaux. On peut ainsi connaître très précisément le cycle sexuel d'une chienne. Il est à noter que les frottis vaginaux permettent de différencier l'anœstrus, le proœstrus et le début de l'œstrus, ce que ne permet pas un taux de progestérone.

Le suivi de chaleurs du pedigree expérimental de Labradors Retrievers de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort n'avait pas encore été mis en place sur toutes les chiennes au début de notre

90

étude. Nous ne pouvions donc pas nous appuyer dessus. C'est le dosage du taux de progestérone sanguin qui a donc été préféré, doublé lorsqu'elles existaient des informations de suivi. Initialement, nous avons considéré que des taux inférieurs à 1ng/ml caractérisaient une sécrétion basale et donc un probable anœstrus. Cette valeur peut sembler élevée, mais il existe de grandes variations d'une chienne à l'autre. Par ailleurs, la sécrétion basale d'une chienne varie également au cours du temps.

Nous avons classé les chiennes en anœstrus lorsqu'elles avaient un taux de progestérone basal faible confirmé par des prélèvements sanguins répétés au cours du cycle. Pour chaque chienne, nous avons refait une progestéronémie le jour du profil afin de valider que ce taux était maintenu à une faible valeur le jour du profil. Les profils des chiennes dont le taux avait augmenté ont été éliminés de l'étude.

La réalisation de frottis vaginaux aurait également permis de mieux préciser la phase du cycle sexuel des chiennes.

1.3. Intérêt de la réalisation des examens sur les animaux vigiles

Classiquement, la réalisation des explorations urodynamiques chez le Chien s'effectue avec une sédation. Chez la chienne surtout, le sondage urinaire s'avère parfois délicat sur un animal vigile, et tout mouvement de l'animal génère des artéfacts qui, lorsqu'ils sont trop nombreux, gênent l'interprétation des résultats. Malheureusement, la plupart des substances utilisables ont une incidence sur les paramètres mesurés. Toute tranquillisation induit nécessairement un abaissement de la pression urétrale par modification du tonus sphinctérien.

L'anesthésie chez les chiens myopathes est délicate car ils présentent un risque significatif de fausse route au cours de l'anesthésie en raison d'un mégacœsophage souvent présent. Il est donc indispensable de réaliser une intubation trachéale préalable, rendant l'expérience plus longue. Chez les patients humains atteints de myopathie, l'intubation est également préconisée et certains agents anesthésiques sont évités à cause des effets secondaires sévères qu'ils entraînent dans cette population à risque (11, 20).

Nous avons tiré bénéfice de la docilité de tous les animaux et réalisé l'ensemble nos tracés sans utiliser d'anesthésiques, répondant ainsi efficacement aux 2 problèmes majeurs évoqués.

1.4. Intérêt de l'utilisation du logiciel *Canvas*

Ce logiciel nous a permis de linéariser les courbes de pression urétrale et d'enlever les artefacts de mouvements observés pendant l'examen. Nous avons également pu recalculer les aires sous la courbe en ne prenant en compte que la pression urétrale (voir 2.2.6. dans la deuxième partie).

Les données ainsi obtenues sont probablement plus proches de la réalité. Cependant, la linéarisation des courbes implique une part de subjectivité de l'utilisateur. Ceci induit une marge d'erreur supplémentaire dans les résultats. Pour limiter ce biais, un seul manipulateur a réalisé toutes les mesures, en gardant le même protocole pour tous les profils.

2. Absence d'effet de la myopathie centronucléaire sur le sphincter urinaire strié

Tous les résultats de cette étude montrent une absence d'effet de la myopathie centronucléaire du Labrador Retriever sur le tonus du sphincter urinaire des chiennes. Aucune incontinence urinaire concernant des chiens atteints de myopathie centronucléaire n'a jamais été rapportée dans la littérature. De plus, les propriétaires des chiens myopathes référés à la consultation et à l'origine du pedigree n'ont jamais constaté d'incontinence. Nos résultats sont donc cohérents avec les données cliniques et bibliographique connues à ce jour.

Par ailleurs, toutes les chiennes atteintes ont montré des valeurs de pression de clôture, de longueur urétrale fonctionnelle, et d'aire sous la courbe similaires aux valeurs des témoins. La mutation hypomorphe au locus *cnm* n'a donc pas, au delà de la clinique, de répercussion quantitative sur le tonus du sphincter urétral des chiennes atteintes, au moins en période d'ancestrus. Ce résultat est à rapprocher du fonctionnement normal du sphincter urétral chez les mâles atteints (20). L'objectif initial de notre étude qui était, au delà du fonctionnement du sphincter, de quantifier de façon rigoureuse les paramètres contrôlant cette fonction est donc atteint. La modification subclinique souhaitée d'un de ces paramètres, qui devait servir à l'évaluation d'une complémentation par le gène *PTPLA* ou par des cellules exprimant ce gène, n'est pas atteint. De ce point de vue, notre étude est concluante et démontre que l'ensemble des paramètres ne diffère pas chez les animaux atteints. Au bilan, le modèle présenté du sphincter urétral ne pourra donc pas être utilisé comme test de complémentation fonctionnelle.

Concernant la fonction détaillée du sphincter, il faut cependant rappeler que la continence urinaire n'est pas le seul fait du muscle strié urétral. Il semble que le rôle d'autres structures

(sphincter lisse, plexus vasculaire, fibres élastiques, muscles releveurs de l'anوس) soit aussi à considérer. On peut émettre l'hypothèse que ces dernières compensent une éventuelle altération du muscle strié urétral. On ne peut donc pas conclure, en toute rigueur, que les fibres musculaires striées de l'urètre ne sont pas touchées par la myopathie centronucléaire. Le seul moyen de vérifier l'absence de lésions au sein des fibres musculaires striées urétrales serait de réaliser une étude histologique et histochimique de celles-ci. On pourrait alors déceler ou non les modifications typiques de la maladie (centralisations nucléaires, présence d'un halo clair périnucléaire, hypotrophie et prédominance des fibres de type I,...) et confirmer ou infirmer l'hypothèse d'une atteinte de ces fibres. Dans l'hypothèse d'une atteinte des muscles striés non squelettiques chez les chiens malades, il serait également intéressant de faire une analyse histologique d'autres fibres musculaires striées non squelettiques, et notamment des fibres de l'œsophage lors de mégaoesophages (fréquent chez les chiens malades).

3. Absence d'effet de l'âge sur le tonus urétral des chiennes

Notre étude ne met en évidence aucun effet de l'âge sur le tonus urétral. En effet, les valeurs de pression de clôture, de longueur urétrale fonctionnelle, et d'aire sous la courbe ne présentent aucune variation significative quel que soit l'âge des chiennes. Ce résultat n'est pas en accord avec les données bibliographiques, qui semblent en faveur d'une baisse de pression urétrale liée à l'âge. Une étude menée par ROSIN *et al* (45) montre notamment des différences significatives entre les jeunes et les vieilles chiennes. Ces différences sont à mettre en relation avec l'âge bien sûr, mais aussi avec le nombre de portées de chaque chienne. De plus, l'existence d'une incontinence gériatrique est reconnue chez le Chien, même si ses causes exactes ne sont pas connues (15, 22, 45).

Les effets de l'âge sur le profil de pression urétrale n'ont pas été explorés spécifiquement. Aucune étude expérimentale n'a été menée pour vérifier ces hypothèses. Toutefois, les auteurs s'accordent dans l'ensemble sur une baisse du tonus urétral avec l'âge. Ceci contredit nos résultats, ce qui pourrait s'expliquer par le petit nombre de chiennes âgées (7 au dessus de 8 ans) et l'absence de chiennes très âgées (aucune au-dessus de 10 ans) dans notre étude. Par ailleurs, notre protocole expérimental n'avait pas pour but d'étudier l'effet de l'âge sur le tonus urétral. Cependant nos résultats remettent ces idées en question. Une étude spécifique à ce sujet pourrait être initiée (15, 22, 45).

Conclusion

Après avoir fait le point sur nos connaissances actuelles de la myopathie centronucléaire canine et du bas appareil urinaire de la chienne, nous nous sommes intéressés à une éventuelle atteinte des muscles striés non squelettiques par cette maladie. Suite aux travaux d'EDERY, nous avons décidé de poursuivre l'évaluation fonctionnelle du sphincter urinaire au sein du pedigree expérimental de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort à l'aide de profils de pression urétrale.

A la vue de nos résultats, la myopathie centronucléaire du Labrador Retriever ne modifie pas le profil de pression urétrale chez les chiennes. Ceci complète les résultats d'EDERY qui ne montraient aucun effet de la myopathie sur les profils chez les mâles. On peut donc conclure à une absence d'effet de la maladie sur le tonus urétral. Le sphincter urétral ne semble donc pas atteint, au moins d'un point de vue fonctionnel. Il ne faut cependant pas oublier l'importance du rôle des autres structures de l'appareil vésico-sphinctérien dans la continence urinaire. La part relative de la musculature lisse versus striée doit également faire l'objet d'analyses complémentaires.

En particulier, il serait intéressant de pratiquer des analyses histologiques et histochimiques. On pourrait ainsi confirmer nos résultats en recherchant les lésions typiques de la myopathie centronucléaire sur les fibres musculaires striées urétrales.

En conclusion, le profil de pression urétrale ne peut pas constituer un test de complémentation fonctionnel pour une éventuelle thérapie génique de la myopathie centronucléaire, puisque aucun paramètre fonctionnel du tonus urétral n'est modifié chez les animaux atteints..

BIBLIOGRAPHIE

- 1 ANDERSSON KE. Neurotransmission and drug effects in urethral smooth muscle. *Scand. J. Urol. Nephrol. Suppl.*, 2001, **207**, 26-34.
- 2 AUGSBURGER HR, CRUZ-ORIVE LM. Morphological, histochemical and stereological analysis of the female canine M. urethralis. *Histochemistry*, 1994, **102**, 373-382.
- 3 AUGSBURGER HR, CRUZ-ORIVE LM. Stereological analysis of the urethra in sexually intact and spayed female dogs. *Acta Anat.*, 1995, **154**, 135-142.
- 4 AUGSBURGER HR, CRUZ-ORIVE LM, ARNOLD S. Morphology and stereology of the female canine urethra correlated with the urethral pressure profile. *Acta Anat.*, 1993, **148**, 197-205.
- 5 BERTINI E, BIANCALANA V, BOLINO A *et al*, Workshop report. In : *118th ENMC international workshop on advances in myotubular myopathy*. Naarden, The Netherlands, 26-28 September 2003. *Neuromuscular Disorders*, 2004, **14**, 387-396.
- 6 BLAKEMAN PJ, HILTON P, BULMER JN. Oestrogen and progesterone receptor expression in the female lower urinary tract, with reference to oestrogen status. *BJU International*, 2000, **86**, 32-38.
- 7 BLEY T, GAILLARD C, BILZER T, BRAUND KG, FAISSLER D, STEFFEN F *et al*. Genetic aspects of Labrador retriever myopathy. *Res. Vet Sci.*, 2002, **73**, (3), 231-236.
- 8 BLOT S, TIRET L, DEVILLAIRE AC, FARDEAU M, DREYFUS PA. Phenotype description of a canine centronuclear myopathy. *J. Neurol. Sci.*, 2002, **199**, s9.
- 9 BREEN M, HITTE C, LORENTZEN TD, *et al*. An integrated 4249 marker FISH/RH map of the canine genome. *BMC Genomics*, 2004, **5**, (1), 65.
- 10 BREEN M, THOMAS R, BINNS MM, CARTER NP, LANGFORD CF. Reciprocal chromosome painting reveals detailed regions of conserved synteny between the karyotypes of the domestic dog (*Canis familiaris*) and human. *Genomics*, 1999, **61**, 145-155.

- 11 BRESLIN D, REID J, HAYES A, MIRAKHUR RK. Anesthesia in myotubular (centronuclear) myopathy. *Anesthesia*, 2000, **55**, 471-474.
- 12 CAISSEL J, GHADDAR Y. Etude urodynamique d'une incontinence d'urine apparue au cinquième mois de la grossesse et persistant après l'accouchement. Rôle de la progestérone. *Ann. Urol.*, 1984, **18**, 356-360.
- 13 CHEN X, CREED KE. Histochemical and contractile properties of striated muscles of urethra and levator ani of dogs and sheep. *Neurourol Urodyn*, 2004, **23**, 702-708.
- 14 COMBRISSEON H, COTARD JP. Intérêt des épreuves urodynamiques dans le diagnostic des incontinenances urinaires chez le Chien. *Rec. Med. Vet.*, 1989, **165**(10), 839-846.
- 15 COUTO GC, NELSON RW. Disorders of micturition. In: *Small animal internal medicine*. 2nd ed., Davis: Mosby-Year book, 1998, 659-667.
- 16 CREED KE, VAN DER WERF BA. The innervation and properties of the urethral striated muscle. *Scand. J. Urol. Nephrol. Suppl.*, 2001, **207**, 8-11.
- 17 CULLEN WC, FLETCHER TF, BRADLEY WE. Histology of the canine urethra. I. Morphometry of the female urethra. *Anat. Rec.*, 1981, **199**, 177-186.
- 18 DE GROAT WC, FRASER MO, YOSHIYAMA M, SMERIN S, TAI C, CHANCELLOR MB et al. Neural control of the urethra. *Scand. J. Urol. Nephrol. Suppl.*, 2001, **207**, 35-43.
- 19 DROUPY S, BENOIT.G. Anatomie, histologie et innervation du sphincter urétral chez la femme. In: AMARENCO G., SERMENT G, editors. *L'insuffisance sphinctérienne de la femme. Actualités en urodynamiques*. Paris: Editions scientifiques et médicales Elsevier, 2000, 9-23.
- 20 EDERY E. *Analyse fonctionnelle chez le Labrador de l'effet de la myopathie centronucléaire sur le tonus urétral*. Thèse Med. Vet. Alfort, 2003, 79p
- 21 FERRER X, VITAL C, COQUET M, DELEPLANQUE B, ELLIE E, LAGUENY A, et al. Myopathie centronucléaire autosomique dominante. *Rev. Neurol.*, 1992, **148**(10), 622-630.
- 22 GOOKIN JL, STONE EA, SHARP NJ. Urinary incontinence in dogs and cats. Part I. Urethral pressure profilometry. *Comp. Cont Educ.Pract.Vet.*, 1996, **18**(4), 407-418.

- 23 HASHIMITO S, KIGOSHI S, MURAMATSU I. Neurogenic responses of urethra isolated from the dog. *European journal of pharmacology*. 1992, **213**, 117-123.
- 24 HEXTALL A. Estrogens and lower urinary tract function. *Maturitas*, 2000, **36**, 83-92.
- 25 HEXTALL A, BIDMEAD J, CARDOZO L, HOOPER R. The impact of the menstrual cycle on urinary symptoms and the results of urodynamic investigation. *BJOG*, 2001, **108**, 1193-1196.
- 26 IOSIF CS, BATRA SC. Female urethra: a target for oestrogen action. *J. Urol.*, 1983, **129**, 418-420.
- 27 IOSIF CS, BATRA SC. Progesterone receptors in the female lower urinary tract. *J. Urol.*, 1987, **138**, 1301-1304.
- 28 KINOSHITA M, CADMAN TE. Myotubular myopathy. *Arch Neurol*, 1968, **18**, 265-273.
- 29 KRAMER JW, HEGREBERG GA, BRYAN GM, MEYERS K, OTT RL. A muscle disorder of Labrador retrievers characterized by deficiency of type II muscle fibers. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1976, **169**(8), 817-820.
- 30 KRAMER JW, HEGREBERG GA, HAMILTON MJ. Inheritance of a neuromuscular disorder of Labrador retriever dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1981, **179**(4), 380-381.
- 31 KRISTIANSOON P, SAMUELSSON E, VON SCHOULTZ B, SVÄRDSUDD K. Reproductive hormones and stress urinary incontinence in pregnancy. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 2001, **80**, 1125-1130.
- 32 LAPORTE J, BLONDEAU F, BUJ-BELLO A, MANDEL JL. The myotubularin family : from genetic disease to phosphoinositide metabolism. *Trends in Genetics abbrev*, 2001, **17**, 221-228.
- 33 LAPORTE J, BEDEZ F, BOLINO A, MANDEL JL. Myotubularins, a large disease-associated family of cooperating catalytically active and inactive phosphoinositides phosphatases. *Human Molecular Genetics abbrev*, 2003, **12**, 285-292.
- 34 LAPORTE J, HU LJ, KRETZ C, MANDEL JL, KIOSCHIS P, COY JF *et al.* A gene mutated in X-linked myotubular myopathy defines a new putative tyrosine phosphatase family conserved in yeast. *Nat. Genet.*, 1996, **13**(2), 175-182.

- 35 LE NORMAND L. Principes de la mesure de la profilométrie. *In: AMARENCO G., SERMENT G, editors. L'insuffisance sphinctérienne de la femme. Actualités en urodynamiques.* Paris: Editions scientifiques et médicales Elsevier, 2000, p 109-120.
- 36 MCKERRELL RE, ANDERSON JR, HERRTAGE ME, LITTLEWOOD JD, PALMER AC. Generalised muscle weakness in the Labrador retriever. *Vet. Rec.*, 1984, **115**(11), 276.
- 37 MCKERRELL RE, BRAUND KG. Hereditary myopathy in Labrador retrievers: a morphologic study. *Vet. Pathol.*, 1986, **23**(4), 411-417.
- 38 MCKERRELL RE, BRAUND KG. Hereditary myopathy in Labrador Retrievers: clinical variations. *J. Small Anim. Pract.*, 1987, **28**, 479-489.
- 39 MELLERSH CS, LANGSTON AA, ACLAND GM, FLEMING MA, RAY K, WIEGAND NA *et al.* A linkage map of the canine genome. *Genomics*, 1997, **46**(3), 326-336.
- 40 MIODRAG A, CASTLEDEN CM, VALLANCE TR. Sex hormones and the female urinary tract. *Drugs*, 1988, **36**, 491-504.
- 41 MONSTER AW, CHAN HC, O'CONNOR D. Activity patterns of human skeletal muscles: relation to muscle fiber type composition. *Science*, 1978, **200**, 314-317.
- 42 NICKEL RF, VENKER-VAN HAAGEN AJ; Functional anatomy and neural regulation of the lower urinary tract in female dogs : a review. *Vet Quart*, 1999, **21**, 83-85.
- 43 OSBORNE CA, FLETCHER TF. Applied anatomy and physiology. *In : OSBORNE CA, FINCO DR, editors. Canine and feline nephrology and urology.* Philadelphia : Lea and Febiger, 1995, 18-27.
- 44 PALMUCCI L, DE ANGELI S, LEONE M, et al. Centronuclear myopathy: type of inheritance and clinical pattern in 268 cases. *Clin. Neuropathol.*, 1988, **7**, 194 (abstract).
- 45 ROSIN A, ROSIN E, OLIVER J. Canine urethral pressure profile. *Am. J. Vet. Res.*, 1980, **41**, 1113-1116.
- 46 RUD T. The effects of estrogens and gestagens on the urethral pressure profile in urinary continent and stress incontinent women. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.*, 1980, **59**, 265-270.

- 47 SARNAT HB. Myotubular myopathy: arrest of morphogenesis of myofibres associated with persistence of fetal vimentin and desmin. Four cases compared with fetal and neonatal muscle. *Can. J. Neurol. Sci.* 1990, **17**, 109-123.
- 48 SORENSON S, KNUDSEN UB, KIRKEBY HJ, DJURHUUS JC. Urodynamic investigations in healthy females during the menstrual cycle. *Scand. J. Urol. Nephrol. Suppl.*, 1988, **114**, 28-34.
- 49 SPIRO AJ, SHY GM, GONATAS NK. Myotubular myopathy. *Arch. Neurol.* 1968, **18**, 265-271.
- 50 STOLZENBURG JU, DORSCHNER W, POSTENJAK M *et al.* Sphincteric musculature of female canine urethra in comparison to woman including 3D reconstruction. *Cells Tissue Organs*, 2002, **170**, 151-161.
- 51 TIRET L, BLOT S, KESSLER JL, GAILLOT H, BREEN M, PANTHIER JJ. the *cnm* locus, a canine homologue of human autosomal form of centronuclear myopathy, maps to chromosome 2. *Hum. Genet.*, 2002; **113**, 197-306.
- 52 PELE M, TIRET L, KESSLER JL, BLOT S, PANTHIER JJ. SINE exonic insertion in the *PTPLA* gene leads to multiple splicing defects and segregates with the autosomal recessive centronuclear myopathy in dogs. *Hum. Mol. Genet.* 2005, **14**, 1417-1427
- 53 WALLGREN-PETTERSON C. Workshop report. 58th ENMC Workshop : Myotubular myopathy. 20-22 March, 1998, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscular disorders*, 1998, **8**, 521-525.
- 54 WALLGREN-PETTERSON C, CLARKE A, SAMSON F, FARDEAU M, DUBOWITZ V, MOSER H *et al.* The myotubular myopathies: differential diagnosis of the X linked recessive, autosomal dominant, and autosomal recessive forms and present state of DNA studies. *J. Med. Genet.* 1995, **32**, 673-679.
- 55 YANG F, O'BRIEN PCM, MILNE BS, GRAPHODATSKY AS, SOLANKY N, TRIFONOV V *et al.* A complete comparative chromosome map for the dog, red fox, and human and its integration with canine genetic maps. *Genomics*, 1999, **62**(2), 189-202.

Annexe

Annexe : Liste des chiennes et de toutes les données prises en compte au cours de l'étude. (PC : pression de clôture exprimée en centimètres d'eau, LUF : longueur urétrale fonctionnelle en millimètres, ZC : zone de clôture en millimètres, AC : aire sous la courbe en millimètres par millimètres d'eau, A : adulte, J : jeune)

NOM	date de naissance	date de réalisation du profil	classe d'âge	progestéronémie le jour du profil	PC (cmH2O)	ZC (mm)	LUF (mm)	AC (mm*mmH2O)
TEMOINS								
LOUNA	24/09/1995	28/06/2004	A	0,281	48	48,7	82,2	20167
MYO	01/05/1996	02/11/2004	A	0,174	61	36	79	24217
PERLE	08/07/1999	28/06/2004	A	1,12	83	47,3	97	31183
PRUNE	08/07/1999	25/07/2002	J	0,03	71	57,5	66,6	20517
ROSE	22/04/2000	28/06/2004	A	0,836	57	88,2	99,1	19600
TANKA	26/01/2002	25/09/2002	J	0,03	90	39,5	72,3	29367
TOPAZE	27/11/2002	28/06/2004	J	1,02	50	57,4	96,1	21367
MALADES								
LATOYA	24/09/1995	09/07/2002	A	0,07	60	36,7	73,7	23600
LILI	24/09/1995	30/06/2004	A	0,189	73	49,7	76,2	24933
LOUPIOTTE	24/09/1995	11/02/2005	A	<0,03	73	53,7	91,9	26983
MYELINE	26/04/1996	30/06/2004	A	<0,03	43	57,2	81,5	15567
MYSOLINE	01/05/1996	30/06/2004	A	0,049	135	66,7	101,6	43250
OPALE	14/06/1998	30/06/2004	A	0,331	67	46,9	88,5	24316
ORKA	14/06/1998	03/11/2004	A	0,117	48	55,4	90,3	17817
PIN UP	24/02/1999	25/09/2002	A	0,4	53	52,2	100,2	25167
PRALINE	08/07/1999	02/11/2004	A	0,126	58	56,8	96,3	25767
ULANE	27/10/2003	03/11/2004	J	0,48	90	34,6	73,4	28667
ULINE	27/10/2003	24/11/2004	J	0,381	89	42,7	74,4	45150
ULRICA	27/10/2003	02/11/2004	J	0,082	44	34,9	53,5	13850
ULTIMA	27/10/2003	02/11/2004	J	0,107	72	36,7	63,5	19917

