



HAL
open science

Développement d'outils d'évaluation d'un modèle pré-clinique de dystrophie musculaire de Duchenne, le chien GRMD.

Inès Barthélémy

► **To cite this version:**

Inès Barthélémy. Développement d'outils d'évaluation d'un modèle pré-clinique de dystrophie musculaire de Duchenne, le chien GRMD.. Biologie animale. Université Paris-Est, 2010. Français. NNT : 2010PEST0012 . tel-00630718

HAL Id: tel-00630718

<https://theses.hal.science/tel-00630718>

Submitted on 10 Oct 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS EST

Ecole doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé – SVS 402

Doctorat en physiopathologie

Inès BARTHELEMY

**Développement d'outils
d'évaluation d'un modèle pré-
clinique de Dystrophie
Musculaire de Duchenne, le chien
GRMD.**

Thèse dirigée par le Pr Stéphane BLOT

Soutenue le 17/12/2010

Rapporteurs : Pr Stefan Matecki – Pr Eric Viguiet

Examineurs : Dr Patrick Dreyfus – Pr Bijan Galeh

Développement d'outils d'évaluation d'un modèle pré-clinique de Dystrophie Musculaire de Duchenne, le chien GRMD.

Résumé

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) touche un garçon sur 3500, contraint à l'usage du fauteuil roulant à l'âge de 10 ans, et entraîne le décès à une vingtaine d'années. Cette maladie demeure incurable, et les pistes thérapeutiques envisagées nécessitent d'être validées en amont, dans les modèles murins, puis au stade pré-clinique, dans les modèles canins.

L'un d'eux, le chien GRMD (Golden Retriever Muscular Dystrophy), est le plus largement utilisé, et présente l'intérêt de partager, avec le patient qu'il modélise, de nombreuses similitudes génotypiques et phénotypiques. Les différentes fonctions touchées doivent donc pouvoir faire l'objet de mesures objectives et quantitatives, à l'aide d'outils dédiés. Par ailleurs, une problématique inhérente à l'utilisation de ce modèle est sa grande variabilité sur le plan phénotypique.

L'objectif du travail mené ici a été de développer des outils d'évaluation du chien GRMD, afin de mieux connaître et maîtriser cette hétérogénéité clinique.

La mesure de force de flexion du tarse a permis de démontrer que la force tétanique maximale pouvait être utilisée comme indice d'évaluation à différents stades de la maladie, sans que le déficit de force musculaire puisse être relié à l'atteinte motrice globale. De plus, la relaxation s'est avérée altérée chez les chiens GRMD, en corrélation avec leur atteinte motrice.

La locomotion, évaluée par accélérométrie tri-dimensionnelle, a pu montrer des altérations multiples, mesurées par différentes variables. Certaines variables sont altérées de manière précoce, tandis que d'autres anomalies s'installent durant les premiers mois, traduisant l'aggravation de la fonction locomotrice.

La dysfonction respiratoire, évaluée par spirométrie en respiration de Tidal, et cinématique diaphragmatique sur images radioscopiques, a également pu être objectivée par différents indices. Une moindre mobilité diaphragmatique, une rétraction caudale du diaphragme, et un effondrement du débit expiratoire en fin d'expiration, s'installent au cours des premiers mois.

Afin de contrôler l'hétérogénéité clinique ainsi mesurée, une recherche de marqueurs prédictifs de l'évolution clinique a été menée. Différents indices histologiques et cliniques ont été évalués sur leur valeur pronostique à un stade précoce. La fréquence des cycles locomoteurs à 2 mois et le défaut de relaxation à 4 mois se sont avérés prédictifs de formes accélérées.

Enfin, les différents outils mis en place ont été évalués dans le cadre du suivi d'animaux au cours d'un essai thérapeutique, qui a, de plus, permis de disposer d'une population de référence sous traitement immunosuppresseur. Une amélioration fonctionnelle des animaux traités a pu être démontrée par nombre des indices mesurés.

Ces résultats démontrent que les outils développés sont utilisables au cours d'essais pré-cliniques, et permettent, malgré l'hétérogénéité clinique qu'ils mesurent, de démontrer un bénéfice fonctionnel. Plus largement, ces données permettent d'optimiser l'utilisation pré-clinique du modèle GRMD.

Mots-clés

Modèle animal, DMD, chien GRMD, évaluation fonctionnelle, force musculaire, locomotion, fonction respiratoire, marqueur prédictif, cyclosporine, corticostéroïde.

Development of evaluation tools for a preclinical model of Duchenne Muscular Dystrophy, the GRMD dog.

Abstract

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) affects one boy over 3500 at birth. The affected individuals are wheelchair-bound at about 10 years, and death occurs in the early twenties. DMD remains incurable, and therapeutic strategies need to be validated in murine models, and, subsequently, at the preclinical stage, in canine models.

Among the existing canine models, the GRMD (Golden Retriever Muscular Dystrophy) dog is the most widely used. The strong genotypic and phenotypic similarities it shares with DMD patients make this model of great interest. The many affected functions must therefore be reliably measured using dedicated tools, providing objective and quantitative evaluation. Moreover, the wide phenotypic heterogeneity peculiar to this model may compromise its use in preclinical studies.

The aim of the present work was to develop evaluation tools for the GRMD dog, in order to better know and handle this clinical variability.

The measurement of the contraction force generated by tarsal flexion has shown that the maximal tetanic force could be used as an evaluation index, at different stages of the disease. However, no correlation with the global motor impairment could be found. Conversely, the relaxation has shown to be altered in GRMD dogs, and correlated with the motor impairment.

The locomotion was evaluated using three-dimensional accelerometry. This method allowed the measurement of several variables, some of which being early impaired, and some others being altered in a more progressive fashion, reflecting the degradation of the locomotor function.

The respiratory impairment has been evaluated by diaphragmatic kinematics using radiosopic acquisitions and by Tidal-breathing spirometry. The diaphragm was shown to be

less mobile, and to be caudally displaced. The end-expiration flows were decreased. These abnormalities progressed during the first months.

In order to better handle the clinical heterogeneity, some markers able to predict the clinical evolution were looked for. The prognostic value of many histological and clinical indexes at an early stage has been evaluated. The stride frequency at the age of 2 months, as well as the relaxation impairment at the age of 4 months succeeded in predicting severe accelerated forms.

Finally, the developed tools have been tested in the context of a clinical follow-up during a therapeutic trial. This trial also aimed to provide a reference-group of GRMD dogs treated with immunosuppressive drugs. Several indexes have demonstrated a clinical improvement of the treated animals.

These results show that the developed tools are useable during preclinical trials and allow to quantitatively highlight a functional improvement, despite the clinical heterogeneity. More widely, these data will lead to an optimization of the preclinical use of GRMD dogs.

Keywords

Animal model, DMD, GRMD dog, functional evaluation, muscle force, locomotion, respiratory function, predictive marker, cyclosporin, corticosteroid.

Laboratoire d'accueil

UPR de neurobiologie

« Modélisation thérapeutique en neurologie : myologie et biothérapies
des myopathies canines »

Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

7 Avenue du Général de Gaulle

94700 Maisons-Alfort

Remerciements

Merci...

A l'Association Française contre les Myopathies, qui a financé ce travail,

A toute l'équipe de neurobio, sans laquelle ce travail n'aurait pas existé, et en particulier...

A Stéphane Blot pour m'avoir confié ce travail,

A Angélique, Aurore, Dimitri, Emilie, Ingrid, Olivier, et tous les animaliers qui sont passés par là, pour leurs soins quotidiens aux chiens, et les nombreuses surveillances d'anesthésie...

A Pablo, pour avoir pris le relai au chenil, et pour les scores cliniques

A tous les habitués du cabinet de psychothérapie-confiance-refaisage de monde, alias le bureau...ils se reconnaîtront

A Isa, pour son amitié, et ses valcherades

A Jean-Laurent, pour son amitié, ses conseils, ses idées, nos discussions, les fou-rires

A Xavier, qui a fait la plus grosse erreur de sa vie en me cédant une moitié de bureau, il y a quelques années déjà... d'avoir supporté mon bazar et mon caractère, pour les jeux de mots idiots, pour son amitié... mais aussi pour son aide à la réalisation de ce travail et pour la participation de Spirou

A tous les stagiaires qui sont passés par là... Camille, Anne-Juliette, Damien... et une mention spéciale pour Romain, qui a brillamment travaillé sur l'indice de masse corporelle (ça, c'est pour faire bien !), et surtout pour être lui-même !

A Julien Bombray, pour son investissement dans l'élaboration du second module de force

A Jean-Yves Hogrel, pour m'avoir confié ce petit boîtier rouge il y a trois ans maintenant, pour m'avoir encadrée sur l'accélérométrie, pour m'avoir donné la confiance de me lancer dans l'écriture et dans les stats...

A Eric Barrey, pour ses conseils et sa contribution au travail sur l'accélérométrie

A Aurélien et Jean-Laurent, pour les manip de reproductibilité

A l'association Handi'chiens, et à tous les étudiants qui ont joué le jeu, et sont venus faire marcher leurs chiens, et en particulier Anne-Juliette et Cayak, Damien et Caïd, et Coralie et Chips.

A tous les adoptants de nos toutous, pour leur avoir offert la vie de famille qu'ils méritent, et en particulier :

A M.Romero et Aurore, pour avoir été au rendez-vous de manière assidue pour les tests sur Denver et Dam, même si ces données ne figurent finalement pas ici...

A la famille Ledoux pour avoir si bien accueilli Cliff,

A Perrine, pour avoir permis à Ckan, Cbof, Crock et Dzastre d'avoir une vraie belle vie de chien.

A Damien Péral de la société Noesis, pour le développement des macros dans Visilog

A Mireille Dubord, Bodovoahangy Andriatiana, Priscille Hertault, pour les centaines d'analyses biochimiques annuelles...

A Sébastien Perrot, Albert Duché, et Christine Ficheux, pour nous avoir initiés aux joies de la cyclosporinémie

A Anne Hulin, pour les dosages de cyclosporine, sa disponibilité et ses conseils

A Karine Reynaud, pour la participation de Gingko, Rocco et Bidule, et pour avoir œuvré pour l'acquisition du microscope Apotome

A l'équipe du CERCA, pour sa participation à l'essor de nos colonies

A toute l'équipe du CEDS, Nathalie, Franck, Cécile, David, M&Mme Carré, et tous les autres...pour leur travail et la production de chiens GRMD pendant ces dernières années, qui a permis que ce travail puisse avoir lieu, avec un nombre suffisant de chiens. Un remerciement spécial à Nathalie, pour sa disponibilité, son efficacité et sa complicité.

A ma famille, qui a supporté mes longues phases de silence pendant ces quatre années...

A Hélène, pour nos 27 ans de complicité...

A Hervé, pour m'avoir supportée, à tous les sens du terme, ces quatre années, pour m'avoir nourrie (et parfois blanchie !), pour avoir compris mon attachement à ce travail et aux chiens, pour m'aimer telle que je suis.

A tous les chiens GRMD, avec lesquels j'ai réalisé ce travail, à nos longues soirées de marche dans le couloir, au terrible attachement qui nous a liés...: Thothos, gros Jajax, T-Falou, Cocobs, Cloclo, Clown, Cki, Ckoi, Charly, Charlot, Cyanure, C-cool, Cbidon, Cballot, C.eds, Bxente, Bjork, Becker, Dickens, Lulule, Einstein, Eiffel, Eaudvy, Ctrop, Ctar, Eop, Eole, Exon, Extra, Excel, Dspé, Dsir, Dmo, Dièse, Discret, Disco, Dhioptry, Crapule E.T., Dalton, Dlire, Dlice, Luluge, Dk, Didon, Dalton, Foifois-belles-chaussettes, Dbrouille, Dchou, Dmon, Ebam, Ebim, Eboum, Evian, Eject, Ehouaf, Celsius, Clim, Clappy, Cush-cush, Cvite, Dodoc, et ma boule Doodoole...,

Mais aussi à tous les autres dont j'ai croisé le chemin : Babac, Crylou, Virgule, Virage, Virgile, T-Fou, Tsar, Sam, Rouble, Titeuf, Kéké, Scoubidou, Umberto, Uzel, Usky, Uky, Akan, Cacalou, Gugus, Varus, Vrille, Vampire, Vaccin, Valium, Vicking, Viko, Velvet, Vrac, Vulcano, Adhoc, Adonf, Voltaire, Vlan-vlan, V-spa, Archibald, Aramis, Attila, Abricot, Acajou, Afgan, Aéro, Agard, Airbus, Angus, Ben, Beeeper, Claxou, Clyde, Cerise, César, Céréale, Cto, Enigme, Enzyme, Sasat, Apache, Avery, Avrel, Azor, Azur, Bled, Byblos, Bypass, Bouly, Bozo, Bud, Buky, Bull, C-chouette, Cobalt, Cparti, Cyclone, Cyrano, Daisy, Dguste, Drop Droopy, Eclair, Eclat, Ecran, Endros, Endy, Faface, Kuli, Ektor, Eyelander, Ebay, Edin, Eurêka, Eden, Dédé, Nana, Ewine, Ewok, Ethilon, Embo, Emince, Email, Emg, Fémur, Fêtard, Fedex, Loulou, Nono, Fyndus, Furtif, Fusible....

Vous êtes chacun une petite pierre à l'édifice immense de la guérison. Pour cela, nous devons nous efforcer de nous souvenir de chacun de vous...

A Salam, Nénette, et les autres...

Doc tips his hat to dogs as he drives by and the dogs look up and smile at him.

John Steinbeck, *Cannery Row*

ὥς οἱ μὲν τοιαῦτα πρὸς ἀλλήλους ἀγόρευον:
ἄν δὲ κύων κεφαλὴν τε καὶ οὐᾶτα κείμενος ἔσχεν,
Ἄργος, Ὀδυσσεύς ταλασίφρονος, ὃν ῥά ποτ' αὐτὸς
θρέψε μὲν, οὐδ' ἀπόνητο, πάρος δ' εἰς Ἴλιον ἱρὴν
ῥέχετο. τὸν δὲ πάροιθεν ἀγίνεσκον νέοι ἄνδρες
αἴγας ἐπ' ἀγροτέρας ἠδὲ πρόκας ἠδὲ λαγούς:
δὴ τότε κεῖτ' ἀπόθεστος ἀποιχομένοιο ἄνακτος,
ἐν πολλῇ κόπρῳ, ἣ οἱ προπάροιθε θυράων
ἡμιόνων τε βοῶν τε ἄλις κέχυτ', ὄφρ' ἄν ἄγοιεν
δμῶες Ὀδυσσεύς τέμενος μέγα κοπρήσοντες:
ἔνθα κύων κεῖτ' Ἄργος, ἐνίπλειος κυνοραιστέων.
δὴ τότε γ', ὡς ἐνόησεν Ὀδυσσεύς ἐγγυὲς ἔοντα,
οὐρῆ μὲν ῥ' ὃ γ' ἔσηνε καὶ οὐᾶτα κάββαλεν ἄμφω,
ἄσσον δ' οὐκέτ' ἔπειτα δυνήσατο οἷο ἄνακτος
ἐλθέμεν: αὐτὰρ ὁ νόσφιν ἰδὼν ἀπομόρξατο δάκρυ,
ῥεῖα λαθῶν Εὐμαιῶν, [...]
Ἄργον δ' αἴ κατὰ μοῖρ' ἔλαβεν μέλανος θανάτοιο,
αὐτίκ' ἰδόντ' Ὀδυσσεύς ἐεικοστῷ ἐνιαυτῷ.

Homère, *Ὀδυσσεύς, Chant XVII*

Table des matières

Table des abréviations.....	24
Introduction.....	26
Annexe 1 : grille de score clinique utilisée pour l'évaluation des chiens GRMD.....	41
Chapitre I : mise au point d'outils d'évaluation fonctionnelle	42
I. Evaluation de la force musculaire isométrique.....	43
A. Introduction	43
B. Etude sur le module de première génération.....	47
1) Matériels et Méthode	47
<i>a) Présentation du dispositif de mesure</i>	<i>47</i>
Figure 1 : Module de mesure de force de première génération : présentation du dispositif.....	48
<i>b) Préparation et positionnement de l'animal</i>	<i>48</i>
Préparation de l'animal	48
Positionnement de l'animal	49
Stimulation supramaximale du nerf fibulaire.....	49
Positionnement des électrodes.....	50
Figure 2 : Présentation du module de première génération : photographie légendée d'un chien en place dans le dispositif	50
Mise au point et recherche de l'intensité de stimulation supramaximale	51
Protocole de stimulation	51
<i>c) Traitement des données.....</i>	<i>52</i>
- Le niveau de potentiation musculaire	52
- La force téτανique mesurée au cours des différentes séquences	52
- La fatigue musculaire au cours des différentes séquences.....	52
<i>d) Animaux</i>	<i>53</i>
Etude de répétabilité des mesures.....	53
Etude de comparaison des chiens GRMD aux chiens sains, à différents âges	53
Etude à 4 mois	53
Etude à 6 mois	53
Etude à 12 mois	53
Tableau 1 : Animaux inclus dans l'étude de mesure de force sur le module de première génération .	54
<i>e) Analyse statistique.....</i>	<i>55</i>
Evaluation de la répétabilité des mesures	55
Evaluation des différences chiens sains-chiens GRMD.....	55
Evaluation de l'effet de l'âge sur les différentes variables.....	55
2) Résultats.....	56
<i>a) Etude de répétabilité</i>	<i>56</i>
Tableau 2 : Evaluation de la force musculaire sur le module de première génération – étude de répétabilité	56
<i>b) Etude des caractéristiques de force musculaire du chien GRMD, par comparaison au chien sain.....</i>	<i>57</i>
Etude à 4 mois.....	57
Force téτανique	57
Tableau 3 : Résultats des mesures de forces téτανiques et de l'analyse statistique à 4 mois	58
Figure 3 : Force téτανique maximale à 4 mois, mesurée avec le module de première génération : comparaison entre chiens sains et GRMD.....	59
Fatigue musculaire.....	60
Tableau 4 : Résultats des mesures de fatigue, et de l'analyse statistique à 4 mois.....	61

Figure 4 : Fatigue à la quatrième séquence, mesurée avec le module de première génération à 4 mois : comparaison entre chiens sains et GRMD	62
Potentiation musculaire	62
Tableau 5 : Résultats des mesures de potentiation musculaire, et de l'analyse statistique à 4 mois ..	63
Figure 5 : Potentiation musculaire au cours de la première séquence de secousses à 4 mois, mesurée avec le module de première génération : comparaison entre chiens sains et GRMD	64
Etude à 6 mois	65
Force tétanique	65
Tableau 6 : Résultats des mesures de forces tétaniques et de l'analyse statistique à 6 mois	66
Figure 6 : Force tétanique maximale à 6 mois, mesurée avec le module de première génération : comparaison entre chiens sains et GRMD	67
Fatigue musculaire.....	68
Tableau 7 : Résultats des mesures de fatigue, et de l'analyse statistique à 6 mois.....	68
Figure 7 : Fatigue à la quatrième séquence, mesurée avec le module de première génération à 6 mois : comparaison entre chiens sains et GRMD	69
Potentiation musculaire	69
Tableau 8 : Résultats des mesures de potentiation musculaire, et de l'analyse statistique à 6 mois ..	70
Figure 8 : Potentiation musculaire au cours de la première séquence de secousses à 6 mois, mesurée avec le module de première génération : comparaison entre chiens sains et GRMD	71
Etude à 12 mois	71
Force tétanique	71
Tableau 9 : Résultats des mesures de forces tétaniques et de l'analyse statistique à 12 mois	72
Figure 9 : Force tétanique maximale à 12 mois, mesurée avec le module de première génération : comparaison entre chiens sains et GRMD	73
Fatigue musculaire.....	74
Tableau 10 : Résultats des mesures de fatigue, et de l'analyse statistique à 12 mois.....	74
Figure 10 : Fatigue à la quatrième séquence, mesurée avec le module de première génération à 12 mois : comparaison entre chiens sains et GRMD	75
Potentiation musculaire	75
Tableau 11 : Résultats des mesures de potentiation musculaire, et de l'analyse statistique à 12 mois	76
Figure 11 : Potentiation musculaire au cours de la première séquence de secousses à 12 mois, mesurée avec le module de première génération : comparaison entre chiens sains et GRMD	77
<i>c) Evaluation de l'effet de l'âge sur les différentes variables</i>	77
Tableau 12 : Effet de l'âge sur les valeurs de force tétanique absolues et relatives, mesurées avec le module de première génération.....	78
3) Bilan sur le module de première génération	79
Figure 12 : Déficit staturo-pondéral chez le chien GRMD : illustration par courbes de poids, de taille et d'indice de masse corporelle	82
C. Etude sur le module de seconde génération	83
1) Matériel et méthode.....	83
<i>a) Présentation du dispositif de mesure</i>	83
Figure 13 : Module de mesure de force de deuxième génération : présentation du dispositif.	84
<i>b) Préparation et positionnement de l'animal</i>	84
Figure 14 : Photo du membre du chien en place dans le module de deuxième génération	85
<i>b) Traitement des données</i>	86
- Le niveau de potentiation musculaire	86
- La force tétanique mesurée au cours des différentes séquences	86
- La fatigue musculaire au cours des différentes séquences	87
- Le niveau de contraction résiduelle post-tétanique	87
Figure 15 : Analyse des tracés de force tétanique : mesure des différentes variables.....	88
<i>c) Animaux</i>	89
Etude de répétabilité des mesures	89
Etude de comparaison des valeurs obtenues entre les deux modules	89
Etude de comparaison des chiens GRMD aux chiens sains, à différents âges	89
Etude à 4 mois	89
Etude à 6 mois	89
Etude à 9 mois	89
Tableau 13 : Animaux inclus dans l'étude de mesure de force sur le module de seconde génération	91

d) <i>Analyse statistique</i>	92
Evaluation de la répétabilité de la mesure	92
Evaluation des différences de mesure entre les deux modules	92
Evaluation des différences chiens sains-chiens GRMD	92
Evaluation de la corrélation des différentes variables au score clinique moteur des chiens GRMD	92
Evaluation de l'effet de l'âge sur les différentes variables	92
2) Résultats	93
a) <i>Etude de répétabilité des mesures</i>	93
Tableau 14 : Evaluation de la répétabilité des mesures sur le module de seconde génération – résultats de l'analyse statistique.....	94
b) <i>Etude de comparaison des valeurs obtenues entre les deux modules</i>	95
Tableau 15 : Etude de comparaison des valeurs obtenues sur les deux générations de modules – résultats de l'analyse statistique.....	95
Figure 16 : Comparaison des valeurs de force de secousse et de tétanos obtenues sur quatre chiens évalués sur les deux générations de modules	96
c) <i>Etude des caractéristiques de force musculaire du chien GRMD, par comparaison au chien sain, à différents âges</i>	97
Etude à 4 mois	97
Force tétanique	97
Tableau 16 : Résultats des mesures de forces tétaniques et de l'analyse statistique à 4 mois	98
Figure 17 : Force tétanique maximale à 4 mois, mesurée avec le module de deuxième génération : comparaison entre chiens sains et GRMD	99
Fatigue musculaire.....	100
Tableau 17 : Résultats des mesures de fatigue, et de l'analyse statistique à 4 mois.....	101
Figure 18 : Fatigue à la quatrième séquence, mesurée avec le module de deuxième génération à 4 mois : comparaison entre chiens sains et GRMD	102
Potentiation musculaire	102
Tableau 18 : Résultats des mesures de potentiation musculaire, et de l'analyse statistique à 4 mois	103
Figure 19 : Potentiation musculaire au cours de la première séquence de secousses à 4 mois, mesurée avec le module de deuxième génération : comparaison entre chiens sains et GRMD	104
Relaxation musculaire	104
Tableau 19 : Résultats des mesures de niveaux de relaxation à 100 ms et de contraction résiduelle post-tétaniques et de l'analyse statistique à 4 mois.....	105
Figure 20 : Niveaux de relaxation à 100 ms et de contraction résiduelle post-tétaniques à 4 mois : comparaison entre chiens sains et GRMD	107
Etude à 6 mois	108
Force tétanique	108
Tableau 20 : Résultats des mesures de force tétanique et de l'analyse statistique à 6 mois.....	109
Figure 21 : Force tétanique maximale à 6 mois, mesurée avec le module de deuxième génération : comparaison entre chiens sains et GRMD	110
Fatigue musculaire.....	111
Tableau 21 : Résultats des mesures de fatigue, et de l'analyse statistique à 6 mois.....	112
Figure 22 : Fatigue à la quatrième séquence, mesurée avec le module de deuxième génération à 6 mois : comparaison entre chiens sains et GRMD	113
Potentiation musculaire	113
Tableau 22 : Résultats des mesures de potentiation musculaire, et de l'analyse statistique à 6 mois	114
Figure 23 : Potentiation musculaire au cours de la première séquence de secousses à 6 mois, mesurée avec le module de deuxième génération : comparaison entre chiens sains et GRMD	115
Relaxation musculaire	115
Tableau 23 : Résultats des mesures de niveaux de relaxation à 100 ms et de contraction résiduelle post-tétaniques et de l'analyse statistique à 6 mois.....	116
Figure 24 : Niveaux de relaxation à 100 ms et de contraction résiduelle post-tétaniques à 6 mois : comparaison entre chiens sains et GRMD	117
Figure 25 : Corrélation entre score clinique moteur et niveau de contraction résiduelle post-tétanique à 6 mois : illustration par droite de régression.....	118
Etude à 9 mois	119
Force tétanique	119

Tableau 24 : Résultats des mesures de forces téaniques et de l'analyse statistique à 9 mois	119
Figure 26 : Force téanique maximale à 9 mois, mesurée avec le module de deuxième génération : comparaison entre chiens sains et GRMD	121
Fatigue musculaire.....	122
Tableau 25 : Résultats des mesures de fatigue, et de l'analyse statistique à 9 mois.....	122
Figure 27 : Fatigue à la quatrième séquence, mesurée avec le module de deuxième génération à 9 mois : comparaison entre chiens sains et GRMD	123
Potentiation musculaire	124
Tableau 26 : Résultats des mesures de potentiation musculaire, et de l'analyse statistique à 9 mois	124
Figure 28 : Potentiation musculaire au cours de la première séquence de secousses à 9 mois, mesurée avec le module de deuxième génération : comparaison entre chiens sains et GRMD	125
Relaxation musculaire	125
Tableau 27 : Résultats des mesures de niveaux de relaxation à 100 ms et de contraction résiduelle post-tétaniques et de l'analyse statistique à 9 mois.....	126
Figure 29 : Niveaux de relaxation à 100 ms et de contraction résiduelle post-tétaniques à 9 mois : comparaison entre chiens sains et GRMD	127
<i>d) Etude de l'effet de l'âge sur les différentes variables.....</i>	<i>128</i>
Tableau 28 : Effet de l'âge (4 à 9 mois) sur les principales variables étudiées, mesurées avec le module de deuxième génération.....	128
D. Discussion	129
II. Evaluation de la locomotion.....	136
A. Introduction	136
B. Evaluation de la locomotion chez des animaux adultes cliniquement stables 142	142
1) Matériel et Méthode	142
a) <i>Matériel.....</i>	<i>142</i>
b) <i>Variables calculées</i>	<i>142</i>
La vitesse (exprimée en m/s).....	143
La fréquence des cycles locomoteurs (exprimée en s ⁻¹)	143
La longueur de foulée (exprimée en m)	143
La régularité (sans unité).....	143
La puissance totale (exprimée en W/kg).....	144
Puissance relative dans chaque axe (exprimée en %)	144
La force relative (exprimée en N/kg)	144
c) <i>Déroulement du test</i>	<i>144</i>
Figure 1 : Accélérométrie – positionnement du dispositif sur l'animal et axes de mesure des accélérations (A, B), taille du boîtier en comparaison de l'extrémité distale du membre antérieur d'un chien adulte (C).....	146
d) <i>Méthode.....</i>	<i>146</i>
Evaluation de la répétabilité de la méthode de mesure.....	146
Animaux	146
Tableau 1 : Accélérométrie - Animaux inclus dans l'étude de répétabilité.....	147
Déroulement de l'étude	147
Analyse des données.....	148
Analyse statistique.....	148
Evaluation de la reproductibilité inter-opérateurs de la méthode	148
Animaux	148
Tableau 2 : Accélérométrie – Animaux inclus dans l'étude de reproductibilité inter-opérateurs.	149
Déroulement de l'étude	149
Analyse des données.....	149
Analyse statistique.....	150
Evaluation de la pertinence des différentes variables pour la caractérisation de la locomotion du chien GRMD	150
Animaux	150
Tableau 3 : Accélérométrie – Animaux inclus dans l'étude d'évaluation de la pertinence des différentes variables pour la caractérisation locomotrice du chien GRMD	151
Tableau 4 : Accélérométrie – Chiens adultes atteints de myopathie centronucléaire	152
Déroulement de l'étude	152
Analyse des données.....	152

Analyse statistique.....	152
2) Résultats	153
a) Répétabilité de la méthode de mesure	153
b) Reproductibilité inter-opérateur de la méthode de mesure	153
Tableau 5 : Accélérométrie – résultats de l'étude de reproductibilité inter-opérateurs.....	155
c) Evaluation de la pertinence des différentes variables pour la caractérisation de la locomotion du chien GRMD.....	158
Résultats de l'analyse de variance : étude de l'effet groupe (Sain vs GRMD).....	158
Tableau 6 : Accélérométrie – pertinence des différentes variables pour la caractérisation de la locomotion du chien GRMD : résultats de l'analyse de variance (effet groupe sain vs GRMD).....	159
La vitesse, normalisée par la hauteur au garrot	160
Figure 3 : Accélérométrie – pertinence des différentes variables pour la caractérisation de la locomotion du chien GRMD : valeurs de vitesse normalisée par la hauteur au garrot, obtenues pour les individus sains en comparaison des individus GRMD.....	160
La fréquence des cycles locomoteurs	161
Figure 4 : Accélérométrie – pertinence des différentes variables pour la caractérisation de la locomotion du chien GRMD : valeurs de fréquence de cycle locomoteur, obtenues pour les individus sains en comparaison des individus GRMD.....	161
La longueur des foulées, normalisée par la hauteur au garrot	162
Figure 5 : Accélérométrie – pertinence des différentes variables pour la caractérisation de la locomotion du chien GRMD : valeurs de longueur de foulée, normalisée par la hauteur au garrot, obtenues pour les individus sains en comparaison des individus GRMD.....	162
La régularité	163
Figure 6 : Accélérométrie – pertinence des différentes variables pour la caractérisation de la locomotion du chien GRMD : valeurs de régularité obtenues pour les individus sains, en comparaison des individus GRMD.....	163
La puissance totale	164
Figure 7 : Accélérométrie – pertinence des différentes variables pour la caractérisation de la locomotion du chien GRMD : valeurs de puissance totale obtenues pour les individus sains, en comparaison des individus GRMD.....	164
La puissance dorso-ventrale normalisée par la puissance totale.....	165
Figure 8 : Accélérométrie – pertinence des différentes variables pour la caractérisation de la locomotion du chien GRMD : valeurs de puissance dorso-ventrale relative obtenues pour les individus sains, en comparaison des individus GRMD.....	165
La puissance cranio-caudale normalisée par la puissance totale	166
Figure 9 : Accélérométrie – pertinence des différentes variables pour la caractérisation de la locomotion du chien GRMD : valeurs de puissance cranio-caudale relative obtenues pour les individus sains, en comparaison des individus GRMD.....	166
La puissance médio-latérale, normalisée par la puissance totale,.....	167
Figure 10 : Accélérométrie – pertinence des différentes variables pour la caractérisation de la locomotion du chien GRMD : valeurs de puissance médio-latérale relative obtenues pour les individus sains, en comparaison des individus GRMD.....	167
Figure 11 : Accélérométrie - pertinence des différentes variables pour la caractérisation de la locomotion du chien GRMD : illustration de la perte globale de puissance, et de sa redistribution vers l'axe medio-latéral chez le chien GRMD.	168
La force relative.....	169
Figure 12 : Accélérométrie – pertinence des différentes variables pour la caractérisation de la locomotion du chien GRMD : valeurs de force relative obtenues pour les individus sains, en comparaison des individus GRMD.	169
Etude de corrélation des variables étudiées avec le score clinique moteur	170
Tableau 7 : Accélérométrie – pertinence des différentes variables pour la caractérisation de la locomotion du chien GRMD : résultats de l'analyse de corrélation avec le score clinique moteur.....	170
Figure 13 : Accélérométrie – scores cliniques moteurs des chiens GRMD adultes (A) – corrélation avec la vitesse (B), la puissance totale (C) et la longueur des foulées (D) : illustration par droites de régression.....	171
Analyse multivariée par analyse en composantes principales (ACP)	171
Figure 14 : Accélérométrie – analyse en composantes principales : projection des individus (A) et des variables (B) sur le plan d'ACP.....	173

Figure 15 : Accélérométrie – analyse en composantes principales : valeurs de distance euclidienne au centre de gravité de la population normale, des individus GRMD, en comparaison des chiens sains.

..... 174

Evaluation de la spécificité des anomalies locomotrices détectées chez les chiens GRMD . 175

Figure 16 : Accélérométrie – spécificité des caractéristiques de marche mises en évidence chez le chien GRMD – comparaison avec un groupe de chiens CNM, des valeurs obtenues pour la fréquence des cycles, la longueur des foulées rapportée à la hauteur au garrot, la régularité, la puissance totale, et les puissances relatives dans les trois axes..... 176

Figure 17 : Accélérométrie – spécificité des caractéristiques de marche mises en évidence chez le chien GRMD – projection des chiens CNM comme individus supplémentaires sur le plan d'ACP défini par les chiens GRMD et sains adultes. 177

C. Evaluation de la locomotion chez de jeunes animaux en cours d'évolution

clinique 178

1) Matériel et méthodes 178

a) *Matériel*..... 178

b) *Variables calculées* 178

c) *Déroulement du test* 178

d) *Méthode*..... 178

Animaux 178

Tableau 8 : Accélérométrie –suivi longitudinal – Animaux inclus dans l'étude, synthèse des tests réalisés et des allures utilisées..... 180

Déroulement de l'étude 181

Analyse des données 181

Analyse statistique..... 181

2) Résultats 182

a) *Déroulement des tests – évolution clinique des chiens* 182

Figure 18 : Accélérométrie – suivi longitudinal – évolution des scores cliniques moteurs chez les chiens GRMD 183

b) *Evolution des différentes variables de locomotion avec l'âge et l'évolution de la maladie*..... 183

Tableau 9 : Accélérométrie – suivi longitudinal : résultats de l'analyse de variance. 185

Evolution des différentes variables avec l'âge chez les chiens sains..... 188

La vitesse, normalisée par la hauteur au garrot 188

La fréquence des cycles locomoteurs 188

La longueur des foulées, normalisée par la hauteur au garrot, 188

Figure 19 : Accélérométrie – suivi longitudinal – corrélations entre la hauteur au garrot et la vitesse (A), et la hauteur au garrot et la longueur des foulées (B) chez les chiens sains. Illustration par droites de régression. 189

Evolution des différentes variables avec l'âge et l'évolution de la maladie chez les chiens

GRMD 189

La vitesse, normalisée par la hauteur au garrot 190

Figure 20 : Accélérométrie – suivi longitudinal – évolution de la vitesse, normalisée par la hauteur au garrot chez les chiens GRMD en comparaison des chiens sains 190

La fréquence des cycles..... 191

Figure 21 : Accélérométrie – suivi longitudinal – évolution de la fréquence des cycles locomoteurs chez les chiens GRMD en comparaison des chiens sains 191

La longueur des foulées, rapportée à la hauteur au garrot, 192

Figure 22 : Accélérométrie – suivi longitudinal – évolution de la longueur des foulées, normalisée par la hauteur au garrot chez les chiens GRMD en comparaison des chiens sains..... 192

La régularité 193

Figure 23 : Accélérométrie – suivi longitudinal – évolution de la régularité chez les chiens GRMD en comparaison des chiens sains 193

La puissance totale 194

Figure 24 : Accélérométrie – suivi longitudinal – évolution de la puissance totale chez les chiens GRMD en comparaison des chiens sains 194

Les puissances relatives dans les trois axes 195

Figure 25 : Accélérométrie – suivi longitudinal – évolution de la puissance médio-latérale relative chez les chiens GRMD en comparaison des chiens sains 195

Figure 26 : Accélérométrie – suivi longitudinal – évolution de la puissance dorso-ventrale relative chez les chiens GRMD en comparaison des chiens sains	196
La force relative.....	197
Figure 27 : Accélérométrie – suivi longitudinal – évolution de la force relative chez les chiens GRMD en comparaison des chiens sains	197
Utilisation de l'ACP et de la distance euclidienne au centre de gravité des chiens sains comme index global de locomotion	198
Figure 28 : Accélérométrie – suivi longitudinal – évolution des chiens GRMD sur le plan d'ACP calculé pour les adultes	199
Figure 29 : Accélérométrie – suivi longitudinal - évolution de la distance euclidienne au centre de gravité de la population normale, chez les chiens GRMD en comparaison des chiens sains	200
Corrélation des différentes variables au score clinique moteur	201
Tableau 10 : Accélérométrie – suivi longitudinal – coefficients de corrélation au score clinique moteur obtenus pour les différentes variables.....	201
Capacité comparée des différentes variables à expliquer la dispersion de la population ...	202
Figure 30 : Accélérométrie – suivi longitudinal – évolution des coefficients de variation des différentes variables avec l'âge chez les chiens GRMD	202
D. Discussion	203
Tableau 11: Comparaison des données obtenues dans cette étude chez les chiens adultes aux données existant dans la bibliographie	205
Annexe 1 : Atlas de tracés dorso-ventraux- types chez les chiens sains et GRMD.216	
A. Allures rencontrées chez les chiens sains.....	216
<i>Trot</i> :.....	216
<i>Galop circulaire</i>	216
B. Allures rencontrées chez les chiens GRMD	217
<i>Trot</i> :.....	217
<i>Galop en bonds</i> :	217
<i>Pas</i> :.....	218
C. Exemples de modifications possibles des tracés dorso-ventraux	219
<i>Boiterie</i> :.....	219
<i>Rotation du dispositif de mesure</i> :.....	219
III. Evaluation de la fonction respiratoire	221
A. Introduction	221
B. Evaluation de la fonction respiratoire chez des animaux adultes.....	226
1) Matériels et méthodes.....	226
a) <i>Cinématique diaphragmatique</i>	226
Déroulement du test	226
Figure 1 : Cinématique diaphragmatique – positionnement de l'animal durant le test.	228
Analyse des images et calcul des variables	228
Analyse des mouvements du diaphragme.....	228
Figure 2 : Mesure de la distance parcourue par le diaphragme : analyse des images radioscopiques, schématisée en quatre étapes	230
Mesure de l'index de rétraction du diaphragme	231
Figure 3 : Rétraction caudale du diaphragme illustrée par comparaison de clichés radiographiques de profil d'un chien sain et d'un chien GRMD adultes.	231
Figure 4 : Mesure de l'index de rétraction du diaphragme : analyse des images radioscopiques schématisée en deux étapes.....	232
Etude de répétabilité	233
Animaux	233
Tableau 1 : Cinématique diaphragmatique - animaux inclus dans l'étude de répétabilité.....	233
Analyse statistique.....	233
Etude de validation de l'intérêt des variables étudiées chez le chien GRMD	234
Animaux	234
Tableau 2 : animaux inclus dans l'étude de validation de la cinématique diaphragmatique chez le chien GRMD	234
Analyse statistique.....	235
b) <i>Spirométrie</i>	235

Déroulement du test	235
Figure 5 : Spirométrie – photographie d'un chien en cours de test.	236
Variables calculées à partir des courbes débit-volume	236
Variables expiratoires :	237
Variables inspiratoires :	237
Variables descriptives globales :	237
Figure 6 : Spirométrie – courbe débit-volume type – principales variables calculées, schématisées sur un exemple de courbe.	239
Etude de répétabilité	240
Animaux	240
Tableau 3 : animaux inclus dans l'étude de répétabilité – spirométrie	240
Analyse statistique	240
Etude de corrélation à la taille de l'animal	240
Animaux	240
Tableau 4 : animaux inclus dans l'étude de corrélation à la taille de l'animal – spirométrie.....	241
Analyse statistique	241
Etude de validation de variables d'intérêt chez le chien GRMD	241
Animaux	241
Tableau 5 : Etude de validation de variables d'intérêt chez le chien GRMD – spirométrie	243
Analyse statistique	244
Etude de l'influence de lésions de bronchopneumonie sur les variables de spirométrie	244
Animaux	244
Analyse statistique	244
Etude de corrélation avec les variables de cinématique diaphragmatique	244
Animaux	244
Analyse statistique	244
2) Résultats	245
a) <i>Cinématique diaphragmatique</i>	245
Etude de répétabilité	245
Etude de validation de l'intérêt des variables étudiées chez le chien GRMD	245
Tableau 6 : Cinématique diaphragmatique – résultats.....	246
Distance parcourue par le diaphragme	247
Figure 5 : Cinématique diaphragmatique – intérêt des variables chez le chien GRMD – Valeurs de distance parcourue par le diaphragme au cours d'un cycle respiratoire, obtenues chez les chiens GRMD, en comparaison des chiens sains.	247
Index de rétraction diaphragmatique	248
Figure 6 : Cinématique diaphragmatique – intérêt des variables chez le chien GRMD – Valeurs d'angle de rétraction diaphragmatique, obtenues chez les chiens GRMD, en comparaison des chiens sains.	248
Evaluation de l'effet de l'âge et de la présence d'une hernie hiatale sur la mobilité et l'index de rétraction du diaphragme	249
c) <i>Spirométrie</i>	249
Etude de répétabilité	249
Etude de corrélations des différentes variables à la taille de l'animal	249
Tableau 7 : Spirométrie – résultats de l'étude de répétabilité et de corrélation des variables à la taille des animaux.	251
Figure 7 : Spirométrie – corrélation des variables calculées avec la taille de l'animal. Illustration par droites de régression.	252
Etude de validation des variables d'intérêt chez le chien GRMD	253
Les principaux résultats obtenus sont résumés dans le tableau 8.	253
Tableau 8 : Spirométrie – validation des variables d'intérêt chez le chien GRMD – résultats de l'analyse statistique	254
Le débit expiratoire à 75 % du volume expiré.....	255
Figure 8 : Spirométrie – validation de variables d'intérêt pour les chiens GRMD – Débit expiratoire à 75 % du volume expiré.	255
Le rapport du débit inspiratoire sur le débit expiratoire de pointe.....	257
Figure 9 : Spirométrie – validation de variables d'intérêt pour le chien GRMD – Ratio du débit inspiratoire sur le débit expiratoire de pointe.....	257
Le rapport du débit expiratoire à 75% du volume expiré sur le débit expiratoire de pointe... ..	258

Figure 10 : Spirométrie – validation de variables d'intérêt pour le chien GRMD – Ratio du débit expiratoire à 75 % du volume expiré sur le débit expiratoire de pointe.	258
Le rapport du débit expiratoire à 75 % du volume expiré sur le débit expiratoire à 25% du volume expiré (DE75/DE25).....	259
Figure 11 : Spirométrie – validation de variables d'intérêt pour le chien GRMD – Ratio du débit expiratoire à 75 %, sur le débit expiratoire à 25 % du volume expiré.	259
Figure 12 : Spirométrie – identification de variables d'intérêt chez le chien GRMD. Illustration des anomalies observées par un exemple de courbe débit-volume, et par un graphe représentant les débits expiratoires à 25, 50 et 75 % du volume expiré, normalisés par le débit expiratoire de pointe, pour chaque individu étudié.....	261
Evaluation de l'effet de l'âge et de la présence d'une hernie hiatale sur les variables étudiées.	263
Etude de l'influence de lésions de bronchopneumonie sur les variables de spirométrie.....	263
Etude de corrélation avec les variables de cinématique diaphragmatique.....	263
Figure 13 : Cinématique diaphragmatique et Spirométrie – Analyse en composantes principales. ...	265
Figure 14 : Cinématique diaphragmatique et spirométrie – analyse en composantes principales – index respiratoire obtenu chez les chiens GRMD, en comparaison des chiens sains.....	266
C. Evaluation de la fonction respiratoire chez de jeunes animaux en cours d'évolution clinique	267
1) Matériels et méthode	267
a) <i>Cinématique diaphragmatique</i>	267
Déroulement des tests.....	267
Analyse des images et calcul des variables	267
Animaux	267
Déroulement de l'étude	267
Tableau 9 : Cinématique diaphragmatique – animaux inclus dans l'étude longitudinale	268
Analyse statistique.....	269
b) <i>Spirométrie</i>	269
Déroulement des tests.....	269
Variables calculées à partir des courbes débit-volume	269
Animaux	269
Déroulement de l'étude	269
Tableau 10 : Spirométrie – animaux inclus dans le suivi longitudinal	270
Analyse statistique.....	271
2) Résultats	271
a) <i>Cinématique diaphragmatique</i>	271
Distance parcourue par le diaphragme	272
Tableau 11 : Cinématique diaphragmatique – distance parcourue par le diaphragme : suivi longitudinal – résultats de l'analyse statistique.....	273
Figure 15 : Cinématique diaphragmatique – évolution de la distance parcourue par le diaphragme avec l'âge chez les chiens GRMD, en comparaison des chiens sains.	274
Index de rétraction caudale du diaphragme	275
Tableau 12 : Cinématique diaphragmatique – index de rétraction diaphragmatique : suivi longitudinal – résultats de l'analyse statistique.....	275
Figure 16 : Cinématique diaphragmatique – évolution de l'index de rétraction diaphragmatique avec l'âge chez les chiens GRMD, en comparaison des chiens sains.	276
b) <i>Spirométrie</i>	277
Le débit inspiratoire de pointe normalisé par le débit expiratoire de pointe (DIP/DEP) ...	278
Tableau 13 : Spirométrie – suivi longitudinal – résultats de l'analyse statistique pour le ratio DIP/DEP	278
Figure 17 : Spirométrie – Evolution du débit inspiratoire de pointe, normalisé par le débit expiratoire de pointe chez les chiens GRMD, en comparaison des chiens sains.....	279
Le débit expiratoire à 50 % du volume expiré, normalisé par le débit expiratoire de pointe (DE50/DEP)	280
Tableau 14 : Spirométrie – suivi longitudinal – résultats de l'analyse statistique pour le ratio DE50/DEP	280
Figure 18 : Spirométrie – évolution du débit expiratoire à 50 % du volume expiré, normalisé par le débit expiratoire de pointe avec l'âge chez les chiens GRMD en comparaison des chiens sains.	281

Le débit expiratoire à 75 % du volume expiré, normalisé par le débit expiratoire de pointe (DE75/DEP)	282
Tableau 15 : Spirométrie – suivi longitudinal – résultats de l’analyse statistique pour le ratio DE75/DEP	282
Figure 19 : Spirométrie – évolution du débit expiratoire à 75 % du volume expiré, normalisé par le débit expiratoire de pointe avec l’âge chez les chiens GRMD en comparaison des chiens sains.	283
Etude de corrélation entre variables.....	284
Tableau 16 : Corrélations entre variables de cinématique diaphragmatique et de spirométrie. Résultats des coefficients de corrélation de Pearson.	284
Analyse en composantes principales – index respiratoire.....	285
Tableau 17 : Index respiratoire – résultats de l’analyse statistique chez les chiens en cours d’évolution, de 2 à 5 mois.	285
Figure 20 : Analyse en composantes principales – projection des chiens en croissance – évolution de l’index respiratoire entre 2 et 5 mois.	286
D. Discussion.....	287
Figure 21 : Fonction respiratoire du chien GRMD – mécanismes hypothétiques mis en jeu	292
Chapitre 2 : Identification de marqueurs prédictifs de l’évolution clinique des chiens GRMD.....	297
I. Introduction	297
II. Matériel et Méthodes.....	299
A. Recherche de marqueurs prédictifs histologiques.....	299
1) Animaux.....	299
Tableau 1 : Animaux inclus dans l’étude de recherche de marqueurs prédictifs histologiques.....	300
2) Procédure chirurgicale	301
3) Traitement et analyse des biopsies	301
a) <i>Congélation, stockage et coupe des biopsies</i>	<i>301</i>
b) <i>Quantification lésionnelle globale sur coupes colorées à l’Hématéine-Eosine</i>	<i>301</i>
Figure 1 : Quantification des éléments pathologiques, sur coupes colorées à l’hématéine et éosine : présentation de la grille d’annotation.....	302
c) <i>Quantification des fibres surchargées en calcium sur coupes colorées au rouge Alizarine S.</i>	<i>303</i>
Figure 2 : Evaluation de la proportion de fibres surchargées en calcium, par coloration au rouge Alizarine S.....	304
d) <i>Quantification du tissu conjonctif sur coupes colorées au rouge Sirius, contre-coloré au Fast Green.....</i>	<i>304</i>
Figure 3 : Quantification du tissu conjonctif sur coupes colorées au rouge Sirius et fast green : analyse d’image automatisée	305
e) <i>Quantification et caractérisation de l’infiltrat mononucléé par marquages immunohistochimiques</i>	<i>306</i>
Figure 4 : Quantification de l’infiltrat mononucléé : double marquage immunohistochimique en peroxydase	306
B. Recherche de marqueurs prédictifs cliniques.....	308
1) Evaluation du score clinique moteur en tant que marqueur prédictif.....	308
a) <i>Animaux.....</i>	<i>308</i>
b) <i>Méthode.....</i>	<i>308</i>
Tableau 2 : Animaux inclus dans l’étude de la valeur prédictive du score clinique moteur	309
2) Evaluation des anomalies locomotrices en tant que marqueurs prédictifs.....	310
a) <i>Animaux.....</i>	<i>310</i>
b) <i>Méthode.....</i>	<i>310</i>
Tableau 3 : Animaux inclus dans l’étude d’évaluation des anomalies locomotrices en tant que marqueurs prédictifs	311
3) Evaluation des anomalies de relaxation en tant que marqueurs prédictifs.....	312
a) <i>Animaux.....</i>	<i>312</i>

b) <i>Méthode</i>	312
Tableau 4 : Animaux inclus dans l'étude d'évaluation des anomalies de relaxation en tant que marqueurs prédictifs	313
C. Analyse statistique	313
II. Résultats	314
A. Recherche de marqueurs prédictifs histologiques	314
1) Quantification lésionnelle globale	314
2) Quantification des fibres surchargées en calcium.....	314
3) Quantification du tissu conjonctif	315
4) Quantification de l'infiltrat mononucléé.....	315
Tableau 5 : Recherche de marqueurs prédictifs histologiques : résultats de l'analyse statistique	316
Figure 5 : Recherche de marqueurs prédictifs histologiques : résultats comparés des chiens selon leur évolution clinique, sur 10 marqueurs.....	318
B. Recherche de marqueurs prédictifs cliniques	320
1) Evaluation du score clinique moteur en tant que marqueur prédictif	320
Tableau 6 : Evaluation du score clinique moteur en tant que marqueur prédictif : résultats de l'analyse statistique.....	320
Figure 6 : Valeur prédictive du score clinique moteur illustrée par un graphe	321
2) Evaluation des anomalies locomotrices en tant que marqueurs prédictifs.....	321
Tableau 7 : Anomalies locomotrices : recherche de marqueurs prédictifs - résultats de l'analyse statistique.....	323
Figure 7 : Valeur prédictive de la fréquence des cycles, de la vitesse et de la puissance totale illustrée par des graphes.....	324
3) Evaluation des anomalies de relaxation en tant que marqueurs prédictifs	325
Tableau 8 : Anomalies de la relaxation : recherche de marqueurs prédictifs - résultats de l'analyse statistique.....	325
Figure 8 : Valeur prédictive des trois indices de relaxation, illustrée par des graphes.	327
IV. Discussion	328
Chapitre 3 : Etude des effets d'un traitement immunosuppresseur chez le chien GRMD	333
I. Introduction	333
II. Matériel et méthode	335
A. Immunosuppression par une association de prednisolone et de cyclosporine	336
B. Suivis clinique et biochimique	337
1) Suivi clinique	337
2) Suivi biochimique	337
C. Quantification de la pathologie musculaire par étude de biopsies du muscle tibial crânial	337
1) Procédure chirurgicale	337
2) Traitement et analyse des biopsies.....	338
a) <i>Congélation, stockage et coupe des biopsies</i>	338
b) <i>Quantification lésionnelle globale sur coupes colorées à l'Hématéine-Eosine</i>	338
c) <i>Quantification des fibres surchargées en calcium sur coupes colorées au rouge Alizarine S.</i>	338
d) <i>Quantification du tissu conjonctif sur coupes colorées au rouge Sirius, et contre-colorées au Fast Green.</i>	339
e) <i>Quantification des fibres de type I, par marquage immunohistochimique de la myosine lente</i>	339
f) <i>Quantification des fibres révertantes, par marquage immunohistochimique de la dystrophine</i>	340
g) <i>Quantification et caractérisation de l'infiltrat mononucléé par marquages immunohistochimiques</i>	340

D. Mesure de la force musculaire	341
E. Evaluation de l'atteinte motrice globale par réalisation de scores cliniques	341
F. Evaluation de la locomotion par accélérométrie.....	342
G. Evaluation de la fonction respiratoire par cinématique diaphragmatique et spirométrie	342
H. Analyse statistique.....	343
Tableau 1 : Animaux inclus et méthodes d'évaluation utilisées	344
Figure 1 : Protocole schématisé sous forme d'un diagramme de gantt.....	345
III. Résultats	345
A. Suivis clinique et biochimique	345
1) Suivi clinique	345
Figure 2 : Complications cliniques et effets secondaires illustrés par quelques photos.	347
2) Suivi biochimique	348
Figure 3 : Evolution des valeurs de concentration sérique en créatine kinases avec l'âge chez les chiens traités, en comparaison de chiens GRMD non traités.	349
B. Quantification de la pathologie musculaire par étude de biopsies du muscle tibial crânial.....	349
1) Quantification lésionnelle globale	349
Figure 4 : Quantification lésionnelle chez les chiens GRMD traités, en comparaison de chiens GRMD témoins.	351
2) Quantification des fibres surchargées en calcium.....	352
Figure 5 : Quantification des surcharges calciques chez les chiens traités, en comparaison de chiens GRMD non traités.	353
3) Quantification du tissu conjonctif.....	354
Figure 6 : Proportion de tissu conjonctif, chez les chiens traités en comparaison de chiens GRMD non traités.....	354
4) Quantification des fibres de type I.....	355
Figure 7 : Proportion de fibres de type I : comparaison entre chiens traités et chiens GRMD témoins	356
5) Quantification des fibres révertantes	356
Figure 8 : Proportion de fibres révertantes chez les chiens traités, en comparaison de chiens GRMD non traités.	357
6) Quantification de l'infiltrat mononucléé.....	358
Figure 9 : Quantification des cellules mononucléées CD11b+, CD8+ et CD4+ chez les chiens traités, en comparaison de chiens GRMD témoins.	359
C. Mesure de la force musculaire	360
1) Force tétanique maximale	360
Figure 10 : Force tétanique maximale relative à 4, 6 et 9 mois chez les chiens GRMD traités en comparaison des chiens sains et GRMD témoins, mesurée avec le module de première génération.	361
Figure 11 : Force tétanique maximale relative mesurée à 4 et 6 mois sur le module de seconde génération, chez les chiens traités, en comparaison des chiens sains, et GRMD témoins.....	363
2) Fatigue.....	364
Figure 12 : Fatigue musculaire chez les chiens GRMD traités, en comparaison des chiens sains et GRMD témoins.	365
3) Relaxation	366
Figure 13 : Relaxation à 4 et 6 mois chez les chiens GRMD traités, en comparaison des chiens sains et GRMD témoins.	368
D. Evaluation de l'atteinte motrice globale par réalisation de scores cliniques	369
Figure 14 : Evolution du score clinique moteur chez les chiens traités, en comparaison des chiens GRMD témoins	370
E. Evaluation de la locomotion par accélérométrie	370
Figure 15 : Evolution des animaux traités sur le plan d'ACP de référence, et de la distance les séparant des chiens sains du même âge.....	372
Figure 16 : Evolution des différentes variables d'accélérométrie avec l'âge chez les chiens GRMD traités.....	376

F. Evaluation de la fonction respiratoire par cinématique diaphragmatique et spirométrie	377
Figure 17 : Evaluation de la fonction respiratoire chez deux chiens traités : évolution des animaux sur le plan d'ACP	378
Figure 18 : Evolution des deux variables de cinématique diaphragmatique, et des trois principales variables de spirométrie, chez les chiens GRMD traités.....	380
IV. Discussion	381
Conclusion	389
Annexe 1 : Utilisation du chien GRMD dans des essais pré-cliniques : tailles d'échantillons nécessaires, en fonction des variables utilisées, et de l'effet fonctionnel attendu.	392
Annexe 2 : Utilisation du chien GRMD dans des essais pré-cliniques : tailles d'échantillons nécessaires, en fonction des variables utilisées, et de l'effet fonctionnel attendu, après sélection des chiens suivant un marqueur prédictif.....	394
Annexe 3 : Utilisation du chien GRMD immunosupprimé (CsA + prednisolone) dans des essais pré-cliniques : tailles d'échantillons nécessaires, en fonction des variables utilisées, et de l'effet fonctionnel attendu.....	395
Références bibliographiques.....	397
Publications – Congrès	417

Table des abréviations

AAV : adeno-associated virus (virus adéno-associé)

ACP : analyse en composantes principales

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

ANOVA : Analysis of variance (analyse de variance)

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ASAT : Aspartate amino-transférase

CK : créatine kinase

CNM : centronuclear myopathy (myopathie centronucléaire)

CV : coefficient de variation

CXMD : Canine X-linked muscular dystrophy (dystrophie musculaire canine liée à l'X)

CXMDJ : CXMD in Japan (CXMD, colonie japonaise)

DAB : diaminobenzidine

DMD : Dystrophie musculaire de Duchenne

ET : écart-type

GRMD : Golden retriever muscular dystrophy (dystrophie musculaire du golden retriever)

HFMD : Hypertrophic feline muscular dystrophy (dystrophie musculaire hypertrophique féline)

HG : hauteur au garrot

HRP : Horseradish peroxidase (peroxydase de raifort)

kb : kilobase

LRMD : Labrador retriever muscular dystrophy (dystrophie musculaire du Labrador retriever)

mdx : muscular dystrophy X-linked (dystrophie musculaire liée à l'X)

MFM : motor function measure (mesure de fonction motrice)

MRC : medical research council

NFAT : Nuclear factor of activated T-cells (facteur nucléaire des cellules T activées)

nNOS : neuronal nitric oxide (NO) synthase

MHCs : Myosin heavy chain slow (chaîne lourde de la myosine lente)

Moy : moyenne

ROC : receiver operating characteristic

RT-PCR : Reverse transcriptase-polymerase chain reaction

RyR1 : Ryanodine receptor 1 (récepteur 1 à la ryanodine)

SERCA : Sarco-endoplasmic reticulum calcium ATPase

XLDCM : X-linked dilated cardiomyopathy (cardiomyopathie dilatée liée à l'X)

Introduction

Un garçon sur 3500 naît, chaque année, dans le monde, atteint de la dystrophie musculaire de Duchenne. Connue depuis l'antiquité, et décrite sur le plan clinique et histologique par Edward Meryon en 1852, puis par Duchenne de Boulogne en 1861, le gène et la protéine en cause n'ont été découverts qu'en 1986 et 1987 respectivement (Hoffman et al. 1987, Monaco et al. 1986). Il s'agit de la maladie génétique la plus fréquente après la mucoviscidose (Emery 1993).

Les jeunes garçons atteints de cette myopathie montrent tout d'abord un retard à l'apprentissage de la marche (Desguerre et al. 2009a, Emery 1993), associé ou non à un retard de développement mental. Dans la petite enfance, ces patients chutent fréquemment, présentent des difficultés pour courir, monter des marches ou se relever (Bushby et al. 2010a, Desguerre et al. 2009a, Emery 1993, Yiu and Kornberg 2008). Ces anomalies du développement moteur constituent, dans la plupart des cas, le motif de consultation des parents, sauf dans les formes les plus prononcées, dans lesquelles le retard de développement mental peut conduire à un diagnostic précoce (Desguerre et al. 2009a). Dans les formes moins prononcées, le diagnostic intervient généralement vers l'âge de 5 ans (Bushby et al. 2010a). Ce diagnostic est basé sur des signes cliniques évocateurs. Une stratégie de relever particulière, liée à la faiblesse musculaire des membres inférieurs, consistant à prendre appui avec les mains sur le sol, puis sur les cuisses, et nommée signe de Gowers, doit faire suspecter une DMD chez un jeune garçon qui présente par ailleurs une démarche « chaloupée ». Secondairement, une démarche sur les orteils peut également être observée (Bushby et al. 2010a) (Emery 1993). Une élévation des créatine kinases (CK) sériques ou des aspartate amino transférases (ASAT) renforce classiquement la suspicion de DMD, avant la confirmation du diagnostic, par biopsie musculaire ou test génétique (Bushby et al. 2010a).

Durant les dix premières années, des contractures se développent, ainsi qu'une lordose lombaire lorsque le patient se tient debout. Parmi ces contractures, les plus classiques sont celles touchant le tendon d'Achille, mais aussi la flexion du genou, et la flexion et l'abduction des hanches (Bushby et al. 2010b). La gestion de ces contractures, par kinésithérapie et/ou interventions chirurgicales, a permis de retarder l'âge de perte de la marche de 1 à 3 ans (Bushby et al. 2010b). Cette maladie contraint en effet le patient à l'usage permanent du fauteuil roulant, entre 9.3 (Eagle et al. 2002) et 12 ans (Yiu and Kornberg 2008).

Le passage au fauteuil roulant accélère la progression de scolioses (Yiu and Kornberg 2008), présentes chez 90 % des patients (Bushby et al. 2010b). Ces scolioses constituent elles-mêmes un facteur aggravant la dysfonction respiratoire. La dystrophie musculaire de Duchenne touchant en effet l'ensemble de la musculature striée, les muscles impliqués dans la fonction respiratoire sont également touchés. Cette dysfonction se manifeste tout d'abord par des hypoventilations à hypercapnies nocturnes, et une toux inefficace. La capacité vitale forcée, indice spirométrique permettant le suivi de la fonction respiratoire des patients, diminue progressivement de 8 à 12 % par an à partir de l'âge de 10 ans (Phillips et al. 2001, Yiu and Kornberg 2008). Le suivi régulier des patients sur le plan respiratoire conduit à la mise en place de dispositifs de soutien de celle-ci. Ainsi, ventilation nocturne non invasive, assistance à la toux, ou techniques de recrutement de volume pulmonaire sont progressivement instaurées. A un stade très avancé, une trachéostomie peut s'avérer nécessaire, afin de pallier l'inefficacité de la toux, et de permettre de désencombrer plus aisément les voies respiratoires. Les complications infectieuses respiratoires sont également fréquentes, en raison de cette faiblesse de toux, et des zones d'atélectasie qui se forment. Des fausses déglutitions, chez des patients qui présentent des difficultés à s'alimenter, peuvent également être à l'origine d'infections pulmonaires. Ces dysphagies, liées à des difficultés de mastication et de déglutition, peuvent nécessiter la mise en place d'une gastrostomie, et l'alimentation par ce biais (Martigne et al. 2010).

La prise en charge médicale de plus en plus perfectionnée des patients atteints de DMD, notamment sur le plan respiratoire, a conduit à un allongement de l'espérance de vie moyenne de ces patients de 14.4 ans en 1960 à 25.3 ans ces dernières années (Eagle et al. 2002). L'ensemble de ces progrès a abouti à modifier les causes de mortalité : la cardiomyopathie induite par la DMD est devenue une cause majeure du décès des patients (Bushby et al. 2010b), concernant 10 à 50 % d'entre eux (van Bockel et al. 2009). Il s'agit d'une cardiomyopathie dilatée, souvent accompagnée d'arythmies, présente chez tous les patients âgés de plus de 18 ans (van Bockel et al. 2009).

Cette myopathie invalidante, et responsable d'un décès précoce, est causée par des mutations dans le plus grand gène connu, celui de la dystrophine. Son locus se situe sur le chromosome X, en Xp21. La transmission est donc liée au sexe, et il s'agit d'une maladie récessive. C'est pourquoi la très grande majorité des patients sont des garçons. La très grande taille de ce gène est à l'origine de la fréquence élevée de mutations, et donc de l'incidence de cette maladie. Le

gène de la dystrophine, qui comporte 79 exons, code pour la protéine du même nom, issue de la traduction d'un volumineux ARNm de 14 kb. La dystrophine, avec ses 3685 acides aminés, et son poids moléculaire de 427 kDa (Koenig et al. 1988), est une protéine cytoplasmique, qui se localise à la membrane des fibres musculaires (Bonilla et al. 1988, Zubrzycka-Gaarn et al. 1988).

Le déficit en dystrophine, s'il induit un tableau clinique essentiellement musculaire, est également responsable de retards mentaux et de troubles de l'électrorétinogramme, chez certains patients (Desguerre et al. 2009a). Le gène de la dystrophine est en effet transcrit de manière spécifique dans différents tissu, dont le tissu nerveux et la rétine, dans lesquels sont exprimées des isoformes de différentes tailles (Chelly et al. 1988). Suivant la localisation de la mutation en cause sur le gène, les patients myopathes exprimeront, ou non, ces isoformes dans les tissus non-musculaires. Ceci explique en partie l'hétérogénéité clinique existant, entre formes motrices pures et formes prononcées, avec atteinte du développement mental (Desguerre et al. 2009a). Cependant, chez tous les patients atteints de DMD, la dystrophine n'est pas exprimée dans les fibres musculaires, exception faite de rares fibres qui parviennent à exprimer une protéine de plus petite taille, dite révertante.

Le rôle précis de la dystrophine n'est pas connu de manière exacte. Très tôt, un rôle structurel (Koenig et al. 1988), de stabilisation de la membrane durant la contraction lui a été attribué (Petrof et al. 1993). En effet, cette protéine relie le cytosquelette à un complexe protéique transmembranaire, lui-même relié à la laminine extra-cellulaire. Cette position de maillon, ainsi que les lésions histologiques dites dystrophiques, qui sont à l'origine de son nom, et qui évoquent une fragilité membranaire, ont justifié cette hypothèse. Ce rôle mécanique n'est cependant pas le seul mécanisme pathogénique impliqué.

Ainsi, une surcharge cytoplasmique en calcium est observée dans les fibres musculaires déficientes en dystrophine (Bodensteiner and Engel 1978), et une mauvaise régulation du calcium intracellulaire dans ces mêmes fibres est connue de longue date (Wood et al. 1978). L'élévation du calcium intracellulaire, suite à une contraction, conduirait à activer les protéases et à induire la destruction de la fibre musculaire. Cette élévation serait liée à une perméabilité anormale des canaux calcium, qu'ils soient membranaires, tels que les canaux sensibles à l'étirement, ou du réticulum sarcoplasmique (Allen et al. 2010, Bellinger et al. 2009).

Une autre hypothèse concerne le rôle pathogénique de l'absence de nNOS correctement localisée. Cette protéine co-localise avec la dystrophine dans un contexte physiologique. La

localisation correcte de la nNOS serait dépendante de la dystrophine. En son absence, la nNOS n'est plus exprimée sous la membrane, et la transcription de son gène est régulée négativement (Le et al. 2010). Lors d'un exercice musculaire, la nNOS libère du NO dans le milieu extracellulaire, induisant une vasodilatation. En l'absence de cette protéine correctement localisée, la vasoconstriction est maintenue durant la contraction, conduisant à une ischémie, contribuant à la pathogénie de la DMD (Sander et al. 2000).

Enfin, un rôle actif du système immunitaire dans la pathogénie de la DMD a été mis en évidence, et une composante auto-immune évoquée (Gorospe et al. 1994, Pinto-Mariz et al. 2010, Spencer and Tidball 2001).

L'ensemble de ces mécanismes pathogéniques conduit à un tableau histologique montrant initialement des lésions de fibres hypercontractées et nécrotiques, et des fibres en régénération. Puis, les capacités de régénération diminuant, une métaplasie adipeuse et une fibrose s'installent (Emery 1993).

Malgré une meilleure connaissance des mécanismes pathogéniques impliqués, il n'existe à ce jour aucune solution thérapeutique pour la DMD. Seuls les stéroïdes ont montré leur efficacité, et permettent de ralentir l'évolution de la maladie (Wong and Christopher 2002). Néanmoins, les axes thérapeutiques envisagés sont nombreux, et peuvent être subdivisés en deux grandes catégories.

Le premier grand axe thérapeutique consiste à rétablir une expression de dystrophine dans les fibres musculaires des patients.

Dans cet objectif, des greffes de cellules souches à potentiel myogénique, issues de donneurs sains, ont été envisagées (Dell'Agnola et al. 2004, Miller et al. 1997, Sampaolesi et al. 2006), mais nécessitent une immunosuppression. L'administration d'un plasmide codant pour la dystrophine complète, administré par voie intraveineuse sous pression ou électrotransfert a également été réalisée (Pichavant et al. 2010a, Romero et al. 2004). Aucune réponse immune contre la dystrophine n'a été observée, mais les résultats n'ont pas été concluants et une administration par voie systémique serait difficilement envisageable. Un obstacle à l'élaboration de stratégies thérapeutiques est la taille de l'ADNc de la dystrophine. Ses 14 kb sont incompatibles avec son inclusion dans le génome d'un vecteur viral, et donc la correction de cellules de patients *ex vivo*, ou l'élaboration de vecteurs portant l'ADNc complet.

En réponse à cette problématique, deux types de solutions ont été trouvées. La première est basée sur la constatation selon laquelle certaines parties de la protéine peuvent être

supprimées sans nuire à sa fonction, tandis que certaines zones sont, au contraire, indispensables (Chamberlain et al. 1997). Ainsi, des constructions ont été créées, retenant ces portions nécessaires au maintien d'une fonctionnalité, mais permettant de réduire la taille de l'ADNc, et de l'inclure dans un vecteur. L'ADNc des mini- et micro-dystrophines a ainsi été employé intégré dans un plasmide (Pichavant et al. 2010b), dans des vecteurs AAV (Kornegay et al. 2010), ou lentiviraux, afin de corriger des cellules de patients *ex vivo* (Pichavant et al. 2010b, Sampaolesi et al. 2006).

La deuxième solution, permettant de s'affranchir de la problématique liée à la taille de l'ADNc de la dystrophine est, elle, basée sur la constatation que les patients sont capables, dans quelques rares fibres musculaires, d'exprimer une dystrophine, par un mécanisme dit de saut d'exon, et permettant de rétablir le cadre de lecture. L'objectif est d'induire et de diriger ce phénomène, rare à l'état physiologique, afin qu'il prenne d'une ampleur suffisante pour apporter un bénéfice. A l'aide de séquences antisens très spécifiques, il est possible de masquer sélectivement des sites d'épissage, afin de conduire le spliceosome à épisser le ou les exons nécessaires à un retour en phase (Goyenvalle et al. 2004). L'ARNm ainsi produit peut donc être traduit en une protéine, nommée quasi-dystrophine, plus petite mais fonctionnelle, si la mutation le permet. Seuls 8 % des patients ne pourraient pas bénéficier de cette stratégie (artsma-Rus et al. 2004). Ces séquences antisens peuvent être utilisées sous forme d'oligonucléotides pharmacologiquement modifiés, pour permettre leur entrée dans les cellules (Kinali et al. 2009, van Deutekom et al. 2007). Leur petite taille rend possible leur inclusion dans le génome d'un AAV (Goyenvalle et al. 2004) ou d'un lentivirus, afin de corriger des cellules *ex vivo* (Benchaouir et al. 2007).

Lointaines cousines des stratégies de saut d'exon thérapeutiques, certaines thérapies pharmacologiques ont également été testées. Certains antibiotiques, de la famille des aminoglycosides, tels que la gentamicine, ont la propriété de favoriser la translecture des codons stops. Lorsque la mutation conduit à un codon stop, qui induit à un arrêt prématuré de la traduction, ces antibiotiques, mais également des molécules optimisées sur le plan pharmacologiques, peuvent permettre d'outrepasser ce codon stop et de produire de la dystrophine (Hamed 2006, Malik et al. 2010).

Ces stratégies visant à rétablir l'expression de dystrophine posent cependant le problème de la réponse immunitaire anti-dystrophine. La présence de fibres révertantes chez la majorité des patients a conduit à considérer que cette protéine raccourcie était connue de l'organisme. Il s'agit d'ailleurs de l'un des arguments en faveur de la stratégie du saut d'exon thérapeutique. Néanmoins, une récente étude remet en question ces éléments, puisque la démonstration

d'une réponse immune contre les fibres révertantes a été faite, rendant les patients plus réactifs face à une expression iatrogène de dystrophine (Mendell et al. 2010).

Le deuxième grand groupe de stratégies thérapeutiques n'est pas touché par cette problématique puisqu'il n'a pas pour objectif de faire exprimer la protéine manquante.

Dans cette seconde catégorie figurent essentiellement des thérapies de type pharmacologique, intervenant sur les mécanismes pathogéniques impliqués, ou offrant des solutions alternatives à l'expression d'une dystrophine fonctionnelle. Dans ce grand groupe peuvent être citées les stratégies de surexpression de l'utrophine, analogue de la dystrophine, qui, au cours du développement, est exprimée sous la membrane des fibres musculaires, mais est, plus tard, restreinte aux plaques motrices. Sa surexpression par des stratégies pharmacologiques (activation de la voie calcineurine-NFAT, ou donneurs de NO) (Miura and Jasmin 2006), ou géniques (Cerletti et al. 2003), doit permettre d'assurer une partie de la fonctionnalité de la dystrophine.

L'atrophie musculaire et la diminution progressive du pool de cellules satellites chez les patients atteints de DMD ont conduit à envisager l'inhibition de l'action de la myostatine en tant qu'axe thérapeutique. La myostatine est une hormone régulant négativement la croissance musculaire. Les animaux déficients en myostatine montrent une hypertrophie musculaire marquée (Mosher et al. 2007). Le blocage de cette hormone, par un anticorps spécifique (Bogdanovich et al. 2002), ou un récepteur soluble (Morine et al. 2010), a pour objectif d'augmenter la masse musculaire, et/ou les capacités de régénération (Chakkalakal et al. 2005).

La fibrose a également été envisagée comme cible thérapeutique. Des antifibrotiques, tels que l'halofuginone, ont été proposés (Turgeman et al. 2008).

Un apport de Glutamine, un acide aminé non essentiel essentiellement produit et stocké par le tissu musculaire, et dont la synthèse est réduite chez le patient atteint de DMD, a par ailleurs été proposé (Mok et al. 2009).

Une autre voie pharmacologique vise à traiter les surcharges calciques, responsables de la cascade protéolytique intervenant dans la pathogénie de la DMD. Ont été envisagés des antagonistes calciques (Phillips and Quinlivan 2008), et, plus récemment, des molécules stabilisatrices du récepteur à la ryanodine RyR1, permettant de réduire les fuites calciques par ce canal (Bellinger et al. 2009).

Malgré les nombreuses voies thérapeutiques identifiées, peu ont cependant déjà atteint le stade de l'essai clinique (Hamed 2006, Kinali et al. 2009, Malik et al. 2010, Miller et al. 1997, Mok et al. 2009, Torrente et al. 2007, van Deutekom et al. 2007).

Dans le cadre de l'identification d'axes thérapeutiques et de leur évaluation en amont des essais cliniques, différents modèles animaux de DMD existent et sont, pour certains, largement utilisés (Banks and Chamberlain 2008, Willmann et al. 2009). Trois espèces de mammifères ont spontanément développé cette maladie, et leur mutation a été conservée pour l'établissement de colonies.

La première de ces espèces, et la plus largement utilisée, est l'espèce murine. En particulier, le modèle spontané *mdx* (X-linked muscular dystrophy), décrit sur le plan phénotypique avant même la découverte du gène de la dystrophine, a pu être identifié comme un modèle probable de DMD, en raison des lésions musculaires dystrophiques, de l'élévation des CK, et du mode de transmission, lié à l'X (Bulfield et al. 1984). Une mutation ponctuelle dans l'exon 23 du gène de la dystrophine a permis de confirmer que le modèle *mdx* était un modèle génétique de DMD (Sicinski et al. 1989). Par ailleurs, d'un point de vue histologique, les muscles de la souris *mdx* montrent un phénotype dystrophique avec nécrose et régénération. Une importante vague de nécrose est observée à l'âge de trois semaines, puis s'ensuivent des cycles de nécrose-régénération, si bien qu'à l'âge de huit semaines, la grande majorité des fibres sont déjà centronucléées (témoin de régénération). Leur proportion atteint 80 à 90% des fibres à 26 semaines (Pastoret and Sebillé 1995b, Torres and Duchén 1987).

Une dysfonction musculaire peut être mise en évidence par mesure de force, notamment après contractions excentriques (Quinlan et al. 1992, Sacco et al. 1992). Une dysfonction respiratoire et une cardiomyopathie dilatée ont également pu être quantifiées (Ishizaki et al. 2008, Quinlan et al. 2004). Cependant, ce modèle diffère en plusieurs points de la DMD. D'une part, les souris mutées montrent très peu de signes cliniques. Ceux-ci se limitent en effet à un décès un peu plus précoce que les souris sauvages (91 semaines vs 108 semaines) et à des difficultés à se déplacer pour s'alimenter mais qui ne surviennent que relativement tardivement (78 semaines) (Pastoret and Sebillé 1995a). Par ailleurs, la fibrose et l'infiltration adipocytaire majeures observées dans le muscle dystrophique humain sont très peu visibles, voire absentes, chez la souris (Bulfield et al. 1984, Cullen and Jaros 1988), à l'exception du diaphragme (Stedman et al. 1991).

La souris *mdx* présente donc les avantages d'être de petite taille, facile d'entretien, de manipulation et d'obtention et d'être un modèle génétique vrai de DMD avec des lésions musculaires présentes et des altérations fonctionnelles mesurables. Ces avantages en font un modèle largement utilisé dans une première étape de validation *in vivo* des biothérapies. Ses limites sont sa petite taille, bien éloignée de celle de l'enfant DMD, les difficultés d'une évaluation clinique chez cet animal étant donné le peu de symptômes présents, et son tableau lésionnel musculaire qui diffère de celui du patient DMD.

Des modèles combinant la mutation *mdx* avec d'autres mutations ont été créés, afin d'obtenir des souris présentant une atteinte histologique et clinique plus proche de celle des patients atteints de DMD. Néanmoins, le contexte génétique et moléculaire s'en trouve alors modifié (Willmann et al. 2009).

Le chat déficient en dystrophine a cela en commun avec la souris *mdx* qu'il présente une atteinte clinique modérée. Le modèle félin de DMD est un modèle spontané également, nommé HFMD (hypertrophic feline muscular dystrophy), en raison des hypertrophies musculaires que les chats atteints arborent. La macroglossie peut être telle que l'animal ne peut plus déglutir. Le chat dystrophique présente une discrète raideur dans la démarche, parfois des difficultés à sauter, ou une fatigue à l'effort, mais reste actif physiquement (Carpenter et al. 1989, Gaschen et al. 1992) et peut dépasser l'âge de 10 ans. Son atteinte cardiaque est en revanche précoce et très marquée (Chetboul et al. 2006). Contrairement au patient, il s'agit d'une cardiomyopathie hypertrophique. La concentration sérique en CK est très augmentée, et majorée par un stress ou un exercice physique. Certains chats, peuvent par ailleurs, suite à un stress, développer une rhabdomyolyse aiguë, qui peut conduire à un décès brutal de ces animaux (Gaschen et al. 1998).

L'examen histopathologique du tissu musculaire chez ces animaux met en évidence un phénotype dystrophique avec nécroses et régénérations, mais, comme chez la souris *mdx*, peu de fibrose, à l'exception du diaphragme (Gaschen and Burgunder 2001). Des foyers de calcification sont fréquemment observés, sans que leur origine soit réellement déterminée. La taille des fibres musculaires est significativement augmentée chez ce chat, qui présente donc une hypertrophie musculaire vraie (Gaschen et al. 1992).

La mutation des chats HFMD touche, comme chez les patients atteints de DMD, le gène de la dystrophine. Cependant, il s'agit d'une délétion incluant le promoteur musculaire du gène. L'isoforme musculaire ne peut donc plus être produite. Néanmoins, les promoteurs d'autres

isoformes de 427 kDa sont épargnés par cette délétion. Le chat HFMD exprime donc une faible quantité d'isoforme neuronale, sous la membrane de ses fibres musculaires (Winand et al. 1994). Ceci peut constituer une voie d'explication à la faible atteinte clinique motrice de ces animaux. En revanche, les cardiomyocytes ne sont pas capables de stimuler le promoteur de l'isoforme neuronale. Dans le tissu cardiaque, la dystrophine est donc totalement absente. Le modèle HFMD peut donc, par ces aspects moléculaires, être considéré comme un modèle de cardiomyopathie dilatée liée à l'X (XLDCM), dystrophinopathie épargnant les patients sur le plan moteur mais entraînant un phénotype de cardiomyopathie, selon les mêmes mécanismes moléculaires (Neri et al. 2007). Toutefois, le fait que la cardiomyopathie observée dans ce modèle ne soit pas de même nature en fait un modèle imparfait, de même que sa sensibilité au stress, et les difficultés inhérentes à sa manipulation qui en découlent.

La troisième espèce de mammifère dans laquelle un modèle de DMD a été identifié est l'espèce canine. Des cas spontanés de dystrophies musculaires canines liées à l'X (CXMD) ont été décrits dans de nombreuses races. Le premier cas a été identifié dans un pedigree de terriers irlandais, bien avant la découverte du gène de la dystrophine, en raison d'un phénotype clinique et histologique et d'un mode de transmission évoquant la DMD (Wentink et al. 1972). Depuis, de nombreux cas ont été ainsi suspectés, sans confirmation du déficit en dystrophine, dans des races aussi diverses que le samoyède (Prethuis and Nordstoga 1993), le groenendael (Van Ham et al. 1993), ou l'épagneul breton (Van Ham et al. 1995). Certains cas ont été davantage documentés, et l'absence de dystrophine démontrée par immunomarquage et/ou western blot, chez le Schnauzer nain (Paola et al. 1993), le Spitz (Jones et al. 2004), le rat terrier (Wetterman et al. 2000), le braque de Weimar (Baltzer et al. 2007), le grand basset griffon vendéen (Klarenbeek et al. 2007), le labrador retriever (Bergman et al. 2002). Enfin, la mutation en cause a été identifiée totalement ou partiellement, chez le pointer allemand (Schatzberg et al. 1999), le labrador retriever (Barthelemy et al. 2007a, Blot et al. 2002), le cavalier King Charles (Walmsley et al. 2010), le corgi (Smith et al. 2010), et le golden retriever (Sharp et al. 1992).

Ce dernier a été décrit sur le plan clinique, histologique et moléculaire il y a une vingtaine d'années (Cooper et al. 1988, Kornegay et al. 1988a, Sharp et al. 1992, Valentine et al. 1990), et une colonie a été créée et est désormais utilisée dans plusieurs centres dans le monde. Ce modèle a été baptisé GRMD pour Golden Retriever Muscular Dystrophy. Dans une unité de recherche japonaise, la mutation a été transférée, par croisements dirigés, sur le fond

génétique du beagle, et les animaux de cette colonie, des beagles portants la mutation GRMD, ont été nommés CXMDJ (pour CXMD japonais) (Shimatsu et al. 2003).

Le chien GRMD est le mieux décrit sur le plan clinique, mais il partage les principales manifestations de la maladie avec les autres animaux décrits. L'évolution clinique du chien GRMD est proche de celle de l'enfant DMD. Jusqu'à l'âge de six semaines, seuls un retard de croissance et une élévation des CK peuvent permettre de distinguer cliniquement un chiot dystrophique d'un chiot normal. Cependant, certains animaux présentent une forme dite néonatale fulminante, fatale dans les dix premiers jours de vie (Valentine et al. 1988). Cette manifestation clinique, propre au modèle GRMD, est liée à une nécrose aiguë des muscles les plus sollicités par l'animal et en particulier la langue (tétée), le diaphragme (respiration), et les muscles des membres impliqués dans la reptation (Nguyen et al. 2002, Valentine and Cooper 1991).

Chez les animaux échappant à cette forme néonatale, les premiers signes cliniques apparaissent entre six et neuf semaines et sont limités à une raideur débutante de la démarche, avec une course dite en « saut de lapin », les deux postérieurs avançant simultanément. Entre neuf et douze semaines, les premiers signes de rétractions musculo-tendineuses peuvent apparaître, et le chien GRMD peut devenir palmigrade et plantigrade. Peu à peu, des ankyloses articulaires parfois prononcées se mettent en place. Une stabilisation clinique survient entre six mois et un an. Contrairement à l'enfant atteint de DMD, le chien GRMD ne perd en général pas l'usage de la marche, sans doute en liaison avec la quadrupédie (Valentine et al. 1988).

Outre l'atteinte locomotrice, ce modèle développe également une dysphagie, se manifestant par des troubles de la déglutition, liés à une macroglossie parfois majeure, et à une dysfonction pharyngée (Valentine et al. 1988). Les régurgitations sont fréquentes, et sont à relier au développement de mégaoesophages. Des hernies hiatales peuvent également être identifiées (Kornegay et al. 1988b). Sur le plan respiratoire, le chien GRMD présente également des signes de dyspnée, tels que respiration discordante, ou polypnée après un exercice modéré (Valentine et al. 1988).

Enfin, les animaux les plus âgés développent une cardiomyopathie dilatée, qui peut conduire à une insuffisance cardiaque, elle-même responsable du décès, chez les animaux survivant jusqu'à 5 ou 6 ans (Valentine et al. 1988). Les autres animaux décèdent prématurément des conséquences de leur dysphagie ou de complications telles que des bronchopneumonies par fausse déglutition. La survie de ces animaux est donc fortement altérée : 25 % d'entre eux

décèdent avant l'âge de 9 mois, 50 % avant 18 mois, et trois chiens sur quatre sont décédés avant l'âge de 3 ans et 3 mois (Blot et al., données non publiées)

Sur le plan électromyographique, les chiens GRMD, comme les patients atteints de DMD, présentent une activité spontanée sous forme de décharges pseudomyotoniques (Kornegay et al. 1988b)

Le déficit en dystrophine, responsable du tableau clinique du chien GRMD, est lié à une mutation ponctuelle dans le gène de la dystrophine, substituant une adénine par une guanine, dans le site accepteur d'épissage de l'intron 6 (Sharp et al. 1992), créant ainsi un site de restriction Sau96I exploité dans le test génétique de référence (Bartlett et al. 1996). Cette mutation induit le saut de l'exon 7, conduisant à un décalage du cadre de lecture. Une faible quantité d'ARNm délété de son exon 7 est présente, mais la traduction de celui-ci en protéine est impossible en raison du décalage du cadre de lecture (Sharp et al. 1992). Si le marquage immunohistochimique montre que la dystrophine est absente de la majorité des fibres musculaires, des fibres révertantes peuvent être identifiées dans ce modèle, comme chez les patients. La proportion de ces dernières a été évaluée dans le muscle sartorius, dans lequel elle est de 0 à 0.002 % (Dell'Agnola et al. 2004) et peut atteindre 0,3% (Kornegay et al. 2003). Par RT-PCR, il a pu être établi que la dystrophine révertante chez le GRMD est issue de deux types de transcrits, l'un ayant bénéficié d'un saut des exons 3 à 9 l'autre des exons 5 à 12, ce qui permet, dans les deux cas, de rétablir le cadre de lecture et la synthèse d'une protéine d'environ 390 kDa (Schatzberg et al. 1998). Si cette protéine tronquée comporte les domaines indispensables à la fonctionnalité de la dystrophine, elle ne constitue pas un obstacle à la mise en œuvre et à l'évaluation d'essais de biothérapies chez le modèle GRMD, de par la faible prévalence des fibres l'exprimant.

Les caractéristiques histopathologiques musculaires du chien GRMD sont très similaires à celles du patient atteint de DMD. Après d'intenses cycles de nécrose et régénération chez le jeune, une fibrose importante s'installe peu à peu dans tous les groupes musculaires (Valentine et al. 1990). Des fibres hypercontractées sont fréquemment observées chez le jeune (jusqu'à 19% à quinze jours) et régulièrement chez l'adulte (4%). Les centralisations nucléaires sont bien moins courantes que chez le modèle murin *mdx*, n'atteignant que 12% chez le chien de 6 mois, et ne dépassant qu'exceptionnellement 1% dans le quadriceps fémoral du chien adulte (Cozzi et al. 2001).

Cette description du chien GRMD démontre qu'il s'agit du modèle le plus proche, sur le plan phénotypique, du patient atteint de DMD. Ces importantes similitudes sur le plan clinique et histologique, ainsi que sa taille, proche de celle d'un enfant, en font un modèle de choix pour l'évaluation pré-clinique de stratégies thérapeutiques préalablement validées chez la souris *mdx*. Les questions de voies d'administration et de bénéfice fonctionnel peuvent être posées dans ce modèle, avec davantage de pertinence que dans le modèle murin. Quelques uns des axes thérapeutiques évoqués plus haut ont d'ailleurs déjà fait l'objet d'essais pré-cliniques dans ce modèle (Cerletti et al. 2003, Dell'Agnola et al. 2004, Kerkis et al. 2008, Kornegay et al. 2010, Sampaolesi et al. 2006).

S'il constitue le modèle le plus fidèle de DMD, il présente néanmoins quelques défauts qui lui valent des critiques, et une remise en question de son intérêt dans le cadre d'essais pré-cliniques. Outre le fait qu'il s'agit d'un modèle coûteux, difficile d'obtention et de maintien, le principal reproche fait aux chiens GRMD est leur grande variabilité inter-individuelle (Banks and Chamberlain 2008, Willmann et al. 2009). En effet, si le tableau clinique précédemment décrit est présent chez tous les chiens GRMD, l'intensité de ces signes cliniques est éminemment variable d'un animal à l'autre (Valentine et al. 1988) : certains animaux évoluent très rapidement et nécessitent d'être euthanasiés avant l'âge de six mois, tandis que d'autres montrent une locomotion remarquablement préservée et une dysphagie peu marquée à l'âge de six ans, tous les intermédiaires existant (Ambrosio et al. 2008, Ambrosio et al. 2009). Cette variabilité inter-individuelle peut constituer un obstacle majeur à l'évaluation d'un éventuel bénéfice thérapeutique, et contraindre à devoir utiliser un nombre très important d'animaux pour démontrer un effet (Banks and Chamberlain 2008, Willmann et al. 2009).

Ces critiques, faites à l'encontre de ce modèle, sont également liées au fait que peu de méthodes d'évaluation fonctionnelle quantitative de ce modèle existent. Or, une connaissance quantifiée de l'hétérogénéité phénotypique pourrait permettre de contrôler celle-ci, et de déterminer de manière fiable le nombre d'individus à évaluer pour espérer démontrer un bénéfice donné, sur une fonction donnée.

Quelques indices ont toutefois déjà été démontrés comme pertinents pour l'évaluation des chiens GRMD, et quatre grands types d'outils développés.

Une évaluation non-invasive des lésions musculaires de chiens GRMD de 2 mois par imagerie par résonance magnétique (Thibaud et al. 2007) a démontré que les animaux malades montraient un signal en mode T2 augmenté, en proportion du signal en mode T1, traduisant

probablement les nécroses, œdèmes et inflammations présents à ce jeune âge. Le signal T2 s'est par ailleurs avéré hétérogène, traduisant la distribution également hétérogène des lésions au sein d'un muscle donné. Ceci souligne d'ailleurs la supériorité de cette méthode d'évaluation sur une analyse histologique réalisée à partir d'un fragment de biopsie, dont les résultats peuvent ne pas être un reflet fidèle de l'état lésionnel du muscle dans sa globalité. Enfin, l'augmentation relative du signal après injection de gadolinium, est majorée chez les chiens GRMD, ce qui est à mettre en relation avec les zones de nécrose, et le développement de la fibrose, ces deux types de lésion libérant un espace propice à la diffusion de l'agent de contraste dans le tissu musculaire. Cette technique d'imagerie, et les indices développés, permettent de disposer d'une évaluation quantitative des lésions musculaires, de manière non invasive.

Un outil d'évaluation de la fonction musculaire a par ailleurs été développé, permettant la mesure de la force musculaire des chiens GRMD *in vivo* (Kornegay et al. 1999). Les fléchisseurs et extenseurs du tarse ont été évalués à différents âges. La faiblesse de ces deux muscles a été mise en évidence pour les deux groupes musculaires. Cependant, la diminution de la force avec l'âge s'est avérée plus clairement marquée pour les extenseurs, traduisant l'atteinte plus prononcée de ce groupe musculaire. Cet outil permet de quantifier un déficit fonctionnel chez le chien GRMD, et son utilisation pourrait être envisagée dans le cadre d'essais pré-cliniques, qu'il s'agisse d'administrations locales, ou systémiques.

La cardiomyopathie du chien GRMD a par ailleurs fait l'objet d'une évaluation quantifiée par échocardiographie et doppler tissulaire (Chetboul et al. 2004a, Chetboul et al. 2004b). Outre la chute de fraction de raccourcissement, qui peut être observée en échocardiographie conventionnelle chez des chiens âgés de plus d'un an, le doppler tissulaire permet de mettre en évidence une dysfonction myocardique précoce. Notamment, un indice a été évalué : le gradient de vitesse myocardique, défini comme la différence des vitesses endo- et épicaudiques, normalisée par l'épaisseur de la paroi du ventricule gauche. A l'âge de 6 mois, cet indice est significativement diminué (Chetboul et al. 2004b). Ces indices permettent de quantifier la dysfonction myocardique, y compris de manière précoce, ce qui peut permettre d'évaluer l'efficacité de stratégies thérapeutiques sur le plan cardiaque, chez de jeunes animaux.

La dernière méthode d'évaluation développée est une grille de score clinique (Cordazzo M.-C. 2007, Thibaud et al. 2007). Cette grille, qui figure en Annexe 1 de cette introduction, comprend 17 items, répartis en deux parties. La première partie, qui a pour objectif d'évaluer la dysphagie et la dysfonction respiratoire, contient 6 items. La seconde partie, orientée vers

l'évaluation de la fonction motrice, comprend 11 items. Chacun des items peut se voir attribuer une note comprise entre 0 et 2 (demi-points compris), 0 représentant la situation normale, et 2 la situation la plus critique. Les chiens présentant le score le plus élevé sont donc les plus touchés. Un opérateur formé à l'usage de la grille note le chien à tester, soit à l'issue de simples observations, soit après avoir demandé un exercice simple à l'animal, en fonction des items. Il s'agit donc d'une méthode semi-quantitative, qui conserve une part de subjectivité. Malgré cela, ce type de méthode est très répandu pour l'évaluation des patients atteints de DMD (Vuillerot et al. 2010), et les diverses équipes travaillant avec des chiens GRMD se sont également créé une grille d'évaluation du même type (Kerkis et al. 2008, Shimatsu et al. 2003). L'engouement pour ce type de méthode d'évaluation, bien qu'imparfaite, traduit un besoin d'outils d'évaluation simples de mise en œuvre, et capables de mettre en évidence la dysfonction, notamment motrice et respiratoire du chien GRMD.

Le travail présenté ci-après a pour objectif de répondre à un besoin d'outils pertinents, objectifs, simples d'utilisation et non invasifs, permettant de quantifier les différentes fonctions touchées chez le chien GRMD, en complément de ceux déjà mis en place.

Dans un premier chapitre, trois outils d'évaluation fonctionnelle seront proposés, et évalués. En premier lieu, sera abordée l'évaluation de la force musculaire, certes déjà validée chez le chien GRMD, mais sans que l'évaluation de certaines propriétés contractiles telles que la relaxation musculaire n'ait pu être réalisée de manière fiable. Dans une seconde partie, une méthode d'évaluation de la locomotion par accélérométrie tri-axiale sera proposée, et évaluée, chez des chiens adultes stabilisés, puis chez des chiens en cours d'évolution clinique. Enfin, le troisième volet évaluera la pertinence de deux outils d'évaluation de la fonction respiratoire, chez des chiens adultes, puis en cours d'évolution clinique : la cinématique diaphragmatique par analyse d'images radioscopiques d'une part, et la spirométrie en respiration physiologique d'autre part. Pour chacune des méthodes évaluées, la pertinence des différents indices obtenus sera évaluée par comparaison des valeurs obtenues chez les chiens GRMD à celles mesurées chez leurs témoins sains. Un indice pertinent doit permettre une distinction franche des deux populations.

Faisant suite à cette première partie, deux autres chapitres permettront d'une part d'offrir une première application aux outils développés, et d'autre part de proposer d'autres outils d'optimisation de l'utilisation du chien GRMD, au cours d'essais pré-cliniques. Le premier de ces deux chapitres a pour objectif de tenter d'identifier des marqueurs prédictifs de l'évolution

clinique des chiens GRMD. La valeur prédictive des indices identifiés dans le premier chapitre sera notamment évaluée, et les éventuels facteurs prédictifs identifiés permettront de rationaliser l'utilisation des chiens GRMD dans les essais pré-cliniques, et de répondre à la problématique de la variabilité phénotypique. Le dernier chapitre de ce travail permettra d'éprouver les différents outils mis en place en situation d'essai thérapeutique, au travers d'un suivi longitudinal de chiens placés sous protocole d'immunosuppression. En parallèle, ce travail fournira une population témoin immunosupprimée, mesurée à l'aide des différents outils mis au point, qui constituera un référentiel disponible pour des chiens inclus dans un essai pré-clinique nécessitant une immunosuppression.

L'ensemble de ce travail devra donc fournir des outils, permettant d'optimiser l'utilisation du chien GRMD au cours d'essais pré-cliniques, et de maîtriser l'hétérogénéité clinique de ces animaux, qui représentent le meilleur modèle phénotypique de DMD.

Annexe 1 : grille de score clinique utilisée pour l'évaluation des chiens GRMD

Laboratoire de Neurobiologie / UETM (version 2.1.1 janvier 2008)
Quantification des signes cliniques sur chiens dystrophiques (GRMD, LRMD)

Chien ID :

Date de l'examen :

Protocole :

Opérateur :

n° vidéo :

CRITERES	0	0,5	1	1,5	2	note
Dysphagie	Aucune difficulté à s'alimenter, repas rapide, croquettes	Croquettes + pâtée	Allongement du temps (plusieurs heures), a/d, fortol	Difficulté à avaler aliment	Incapacité à avaler aliment (sonde de gastrostomie)	
Ptyalisme	Absent	Salive au fond de la gueule (hors repas)	Ptyalisme intermittent (pendant repas)	Ptyalisme hors des repas	Ptyalisme prononcé/permanent	
Base de la langue	Normale	Fermeté ou hypertrophie	Fermeté + hypertrophie palpable, sans déformation	Fermeté + hypertrophie + déformation légère	Fermeté + hypertrophie + forte déformation	
Ouverture buccale	Pas d'ankylose, angle proche de 70°	70° < angle < 60°	Ankylose débutante 60° < angle < 45°	45° < Angle < 30°	Angle < 30° ou malocclusion avec défaut de fermeture	
Activité générale	Animal joueur, vient vers les gens		Activité diminuée, isolement, déplacement lent		Animal en décubitus latéral	
Respiration	Normale	Discordance	Discordance + polypnée après stimulation	Discordance + polypnée au repos + ronflement	Discordance + polypnée au repos + cyanose des muqueuses / orthopnée	
Ss-total /12						
Ecartement des doigts	Serrés en appui = normale	Faiblement écartés sur 2 pattes ou 6 EID	Faiblement écartés sur 4 pattes ou 12 EID	Fortement écartés sur 2 pattes ou 6 EID	Fortement écartés sur 4 pattes ou 12 EID	
Palmigradie	Absence (angle sol-carpe = 90°)	90° < angle < 45°	Modérée (angle = 45°)	Angle < 45°	Prononcée (angle = 0°)	
Plantigradie	Absence (angle sol-carpe = 90°)	90° < angle < 45°	Modérée (angle = 45°)	Angle < 45°	Prononcée (angle = 0°)	
Démarche	Normale	Démarche souple, Bunny hopping lors de la course	Raideur généralisée débutante, Bunny hopping constant	Raideur généralisée prononcée	Démarche impossible	
Transfert de poids	Absent		Postérieurs sous l'abdomen ou antérieurs sous le thorax		Poids placé sur l'avant	
Sautillement	Normal (> 10 foulées)	Possible (5 à 10 foulées) mais difficile	Réduit (chute au bout de 4-5 foulées)	1 à 2 foulées	Impossible	
Fermeté des muscles proximaux	Normale à la palpation	Fermeté débutante localisée	Fermeté débutante généralisée	Fermeté prononcée localisée	Fermeté prononcée généralisée	
Rétractions musculo-Tendineuses	Absentes	Raideur cervicale	Ankylose débutante généralisée	> 6 articulations fortement ankylosées	Ankylose prononcée généralisée	
Réflexes patellaires	Présents vifs		Présents diminués		Absents	
Relevé (déc. latéral)	Normal (1 seconde)	Légèrement ralenti (2-3s)	Ralenti (1 seule tentative mais laborieuse)	Plusieurs tentatives avant relevé	Impossible	
Franchisst obstacle	Normal	Possible mais obstacle touché	Réduit/limité/ralenti	Chute ou franchissement incomplet	Impossible	
Ss-total/22						
Total /34						

Chapitre I : mise au point d'outils d'évaluation fonctionnelle

I. Evaluation de la force musculaire isométrique

A. Introduction

La fonction première d'un muscle est de générer de la force. En cas d'atteinte fonctionnelle musculaire, cette capacité à générer de la force est logiquement altérée. Toute thérapie visant à apporter un bénéfice fonctionnel à un muscle lésé devra donc permettre un gain de force musculaire. C'est pourquoi, la mesure de la force musculaire représente un élément central dans l'évaluation fonctionnelle des patients atteints de DMD ou d'autres maladies neuromusculaires, dans le cadre d'essais thérapeutiques ou, plus simplement, de leur suivi clinique.

Chez les patients atteints de DMD, les différents essais ou études cliniques publiés comprennent quasi-systématiquement une évaluation de la force musculaire (Connolly et al. 2002, Kirschner et al. 2010, Miller et al. 1997, Torrente et al. 2007). Outre la forte signification que revêt un gain de force musculaire chez ces patients suite à un traitement, ces tests présentent l'avantage de pouvoir être réalisés à tous les stades de la maladie, y compris après perte de la locomotion, ce qui n'est pas le cas des études de marche par exemple.

Deux grands types d'outils ont été développés et sont utilisés chez ces patients. Le premier est un outil semi-quantitatif, le testing musculaire manuel. Il s'agit pour l'opérateur d'évaluer, selon une échelle donnée, la résistance qu'il doit opposer à un mouvement demandé au patient (Hogrel et al. 2006). L'échelle la plus fréquemment utilisée est l'échelle MRC (medical research council). Chez les patients atteints de DMD, ce test est très largement répandu (Bonifati et al. 2000, Desguerre et al. 2009a, Kirschner et al. 2010, Parreira et al. 2007). Il présente l'avantage de nécessiter un coût d'équipement nul, ce qui facilite le déroulement d'études réalisées dans de nombreux centres (Kirschner et al. 2010). Néanmoins, il n'en reste pas moins un test subjectif (Hogrel et al. 2006, Mattar and Sobreira 2008).

Des tests quantitatifs sont également disponibles et utilisés chez les patients (Connolly et al. 2002, Edwards et al. 1987, Torrente et al. 2007). Des dispositifs de mesure adaptés aux différents groupes musculaires à évaluer ont été mis au point. Ainsi, chez les patients atteints de DMD, ont été évaluées les forces de flexion-extension du genou (Connolly et al. 2002), de la cheville (Miller et al. 1997, Sharma et al. 1995), ou encore de préhension de la main

(Mattar and Sobreira 2008). Dans le cadre d'essais cliniques d'administrations locales, la fonction évaluée est adaptée au(x) muscle(s) traité(s), (Miller et al. 1997, Torrente et al. 2007), ce qui peut parfois conduire à la mise au point de dispositifs très spécifiques d'un muscle donné (Torrente et al. 2007). Quel que soit l'outil considéré, c'est la force maximale volontaire qui est le plus souvent évaluée. Un effort de contraction maximal est demandé au patient, et la force générée par cette contraction maximale est enregistrée. Parfois, une stimulation du nerf moteur est également réalisée afin d'assurer une contraction réellement maximale, ou de contrôler la qualité de l'effort volontaire réalisé (Miller et al. 1997, Sharma et al. 1993). D'autres paramètres d'intérêt, tels que la fatigue, la relaxation (Edwards et al. 1987), ou la potentiation post-tétanique (Botelho et al. 1960), ont également été identifiés chez les patients atteints de DMD. Les altérations de ces paramètres de fonction musculaire observées chez les patients seront abordées plus en détail dans le cadre de la discussion (I.D)) Ces paramètres restent cependant moins souvent évalués que la force musculaire elle-même.

L'évaluation de modèles animaux ne peut de toute évidence pas faire appel à la volonté de l'individu considéré. Chez les modèles murins de maladies neuromusculaires, et notamment chez la souris *mdx*, les mesures de force sont très développées et constituent le principal outil d'évaluation fonctionnelle *in vivo* (Baltgalvis et al. 2009, Bellinger et al. 2009, Huebner et al. 2008). Deux grands types d'évaluation sont employés. Le premier est une évaluation sur animal vigile, tirant profit d'une caractéristique comportementale de ces petits rongeurs, qui est le réflexe d'agrippement. L'opérateur laisse la souris s'agripper à un support relié à un capteur de force, puis exerce une traction sur la queue de celle-ci, jusqu'à ce qu'elle cède (Maurissen et al. 2003). La force maximale d'agrippement peut ainsi être enregistrée. Ce test est réalisable sur les membres antérieurs et postérieurs, et a permis de démontrer que la force d'agrippement chez la souris *mdx* est diminuée, autorisant l'emploi de ce paramètre dans des études d'évaluation thérapeutique menées dans ce modèle (Spurney et al. 2009). Cependant, ce test, très utilisé (Bellinger et al. 2009, Huebner et al. 2008), conduit à des résultats qui peuvent être très influencés par de multiples facteurs (Maurissen et al. 2003). Ceci peut contribuer à rendre ce test de force d'agrippement difficilement reproductible et comparable d'une étude à une autre.

Le second grand type d'évaluation est la mesure de la force tétanique *in vivo*. Une contraction maximale est ici obtenue par stimulation électrique du nerf moteur. Les mesures sont réalisées le plus souvent après isolement du tendon, qui est ensuite relié à un capteur de force (Baltgalvis et al. 2009, Quinlan et al. 1992, Sacco et al. 1992). Quelques études ont également démontré qu'un enregistrement de la force musculaire de flexion ou d'extension du tarse

moins invasif, sans isoler de tendon, pouvait être réalisé chez le rat et la souris, à l'aide de dynamomètres dédiés (Baligand et al. 2010, Cutlip et al. 1997). Chez la souris *mdx*, la force tétanique générée est inférieure à celle de souris saines (Quinlan et al. 1992).

Considérant la place prépondérante occupée par les mesures de force, au cours des essais cliniques sur patients atteints de DMD d'une part, et en recherche d'amont sur les souris *mdx* d'autre part, et étant donnée la position intermédiaire pré-clinique occupée par le chien GRMD, la mesure de force musculaire s'impose en tant que critère d'évaluation de ce modèle. Le développement et la maîtrise de ce type de mesures chez ces animaux apparaît donc nécessaire, tant dans l'objectif de démontrer un effet fonctionnel après une administration locale, qu'un effet à l'échelle systémique.

Lorsque ce travail a débuté, quelques études avaient déjà été menées sur la mesure de force chez le chien GRMD. Dans une première étude, la force du muscle long péronier a été évaluée après isolement de son tendon, chez des chiens âgés de 3 et 6 mois (Kornegay et al. 1994). Une diminution de la force tétanique a été démontrée à l'âge de 3 mois, mais cette modification n'était plus présente à l'âge de 6 mois. Un défaut de relaxation de ce muscle a également été mis en évidence. Une seconde étude, menée par la même équipe, s'est, cette fois, penchée sur une méthode de mesure de force moins invasive, sans isolement d'un tendon (Kornegay et al. 1999). Un statif dédié à la mesure de force de flexion et d'extension du tarse a été mis au point, et des mesures effectuées à différents âges (3, 4.5, 6 et 12 mois). La force tétanique des chiens GRMD a été démontrée comme étant diminuée à tous les âges considérés, que ce soit en flexion ou en extension. Cependant, la fonction de flexion s'est montrée davantage altérée en phase précoce de la maladie qu'en phase plus tardive, tandis que le profil d'évolution de la force d'extension semblait différent, l'écart avec les valeurs obtenues chez les animaux sains se creusant progressivement.

Une preuve de concept de la faisabilité et de l'intérêt des mesures de force de flexion et d'extension du tarse dans le modèle GRMD était donc faite. Il n'en restait pas moins qu'un travail de mise au point d'un dispositif de mesure du même type, et de collection de données sur la colonie GRMD française était nécessaire. Par ailleurs, des propriétés telles que fatigue ou relaxation musculaires, qui n'avaient pas fait l'objet d'une analyse approfondie dans l'étude sur la flexion-extension du tarse, restaient à explorer. Enfin, dans le cadre d'essais thérapeutiques, la question de la pertinence des différents paramètres évalués sur le plan de leur signification clinique restait à résoudre. Ainsi, il restait à déterminer si les données obtenues sur un groupe musculaire donné pouvaient être extrapolées à l'individu entier, c'est-à-dire traduire de manière quantifiée l'état clinique de l'animal lors de la mesure.

De par leur utilisation fréquente chez les patients (Miller et al. 1997) (Sharma et al. 1995) et la souris (Quinlan et al. 1992, Sacco et al. 1992), et en raison de leur accessibilité pour d'éventuelles injections intra-musculaires (notamment le muscle tibial crânial), les muscles crâniens de la jambe ont été choisis pour cette mesure. C'est donc la force de contraction des muscles innervés par le nerf fibulaire qui a été évaluée ici, c'est-à-dire la force de flexion du tarse et d'extension des doigts du membre postérieur. L'étude présentée ici a été menée en deux temps : tout d'abord, un travail effectué, avec un premier dispositif de mesure, qui a permis d'étudier la force tétranique, la potentiation et la fatigue musculaires. Ce premier dispositif a montré quelques limites, auxquelles des corrections ont été proposées dans un statif de deuxième génération, dont l'utilisation est exposée dans la deuxième partie de ce chapitre. Dans cette seconde partie de l'étude, la force tétranique, la potentiation et la fatigue musculaire, ainsi que les propriétés de relaxation ont pu être évaluées, à différents âges chez les chiens GRMD. La question de la pertinence clinique de ces différents indices a été étudiée, par évaluation de la corrélation des valeurs obtenues avec le score clinique moteur des animaux.

B. Etude sur le module de première génération

1) Matériels et Méthode

a) Présentation du dispositif de mesure

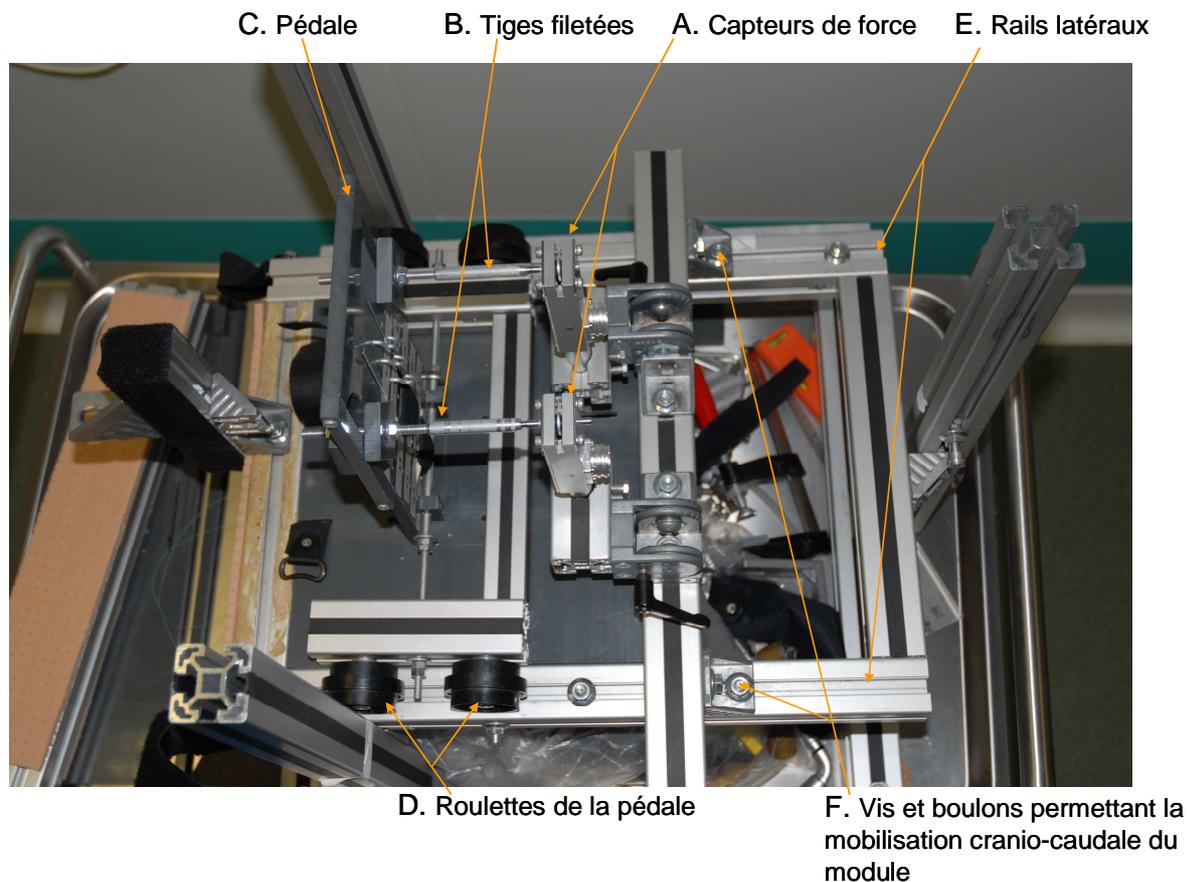
Le statif de mesure de force utilisé dans cette première partie du travail avait été développé en collaboration avec le département de bioingénierie de l'institut polytechnique de Milan (Paolo Mogno), dans le cadre de l'étude des effets fonctionnels de greffes de mésoangioblastes (Sampaolesi et al. 2006).

Le dispositif de mesure lui-même était intégré dans un statif, permettant le positionnement du membre postérieur de l'animal. Deux capteurs de force (Grass, FT10) (Fig 1, A) permettaient de mesurer la force générée par les fléchisseurs du tarse et extenseurs des doigts. Ces capteurs à jauges de contraintes pouvaient être utilisés avec des ressorts de différentes résistances. Ici, un ressort permettant une plage de mesure étendue de 0.5 à 10000 g a été employé. Ces deux capteurs étaient montés verticalement et en parallèle, reliés, par des tiges filetées horizontales (Fig 1, B) d'une longueur de 85 mm, à la plaque sur laquelle la force de contraction était exercée, ou pédale (Fig 1, C). Ces tiges filetées étaient elles-mêmes attachées à la plaque, dans sa partie haute (le plus souvent au dessus des doigts des animaux), via un système de boulons vissés manuellement au début de chaque test.

La pédale était montée sur deux roulettes (Fig 1, D) coulissant dans des rails latéraux (Fig 1, E). La pédale était donc mobile durant la contraction, davantage dans sa partie basse que dans sa partie haute, elle-même relativement fixe, car bloquée par la liaison aux tiges filetées.

Le groupe capteurs-tiges filetées-pédale pouvait être rapproché de l'animal ou, au contraire, en être reculé, en fonction du gabarit du chien testé, par desserrage de boulons (Fig 1, F) situés au niveau de deux rails latéraux (Fig 1, E) permettant le mouvement du module d'enregistrement dans l'axe cranio-caudal.

Figure 1 : Module de mesure de force de première génération :
présentation du dispositif.



Photographie légendée du dispositif, vu de haut. Durant le test, le module était positionné sur la table d'examen, le chien était positionné côté gauche de l'image (voir figure 2).

Le signal électrique généré par chaque capteur était ensuite amplifié et filtré à 3 Hz par des amplificateurs Grass, puis transféré à une unité d'acquisition de type iWorx 214, permettant le transfert des données en temps réel via USB sur le PC, dans le logiciel d'acquisition Labscribe ® (iWorx).

b) Préparation et positionnement de l'animal

Préparation de l'animal

Les chiens étaient placés sous anesthésie générale. Après induction au propofol, administré par voie intra-veineuse, à raison de 6.5 mg/kg, les animaux étaient intubés, puis placés sous

dioxygène, véhiculant 2 à 3 % d'isoflurane. Ce pourcentage était modulé en fonction de la profondeur d'anesthésie constatée. Durant l'anesthésie, les paramètres suivants étaient contrôlés : fréquence cardiaque, saturation en O₂, pression partielle en CO₂ expiré, température rectale.

Positionnement de l'animal

Les chiens étaient placés en décubitus dorsal, et rapprochés du statif d'enregistrement, de manière à ce que le membre postérieur à enregistrer puisse être placé dans le dispositif. Concrètement, la jambe du chien (segment tibial) a été placée sur la plaque horizontale du statif, les articulations du genou et de la cheville formant un angle de 90°. Afin de maintenir une contraction isométrique, les segments proximaux et distaux au genou et au tarse ont été maintenus dans une position standardisée. Ainsi, la cuisse de l'animal a été plaquée contre le statif, à l'aide d'une bande velcro large et les mouvements latéraux et/ou crâniens ont été prévenus par la mise en place d'équerres métalliques, placées telles un écran autour de cette articulation. Médialement au genou et à la cuisse, un montant métallique permettait de limiter les mouvements médiaux. Ce montant était fixé à un rail, permettant sa mobilisation médio-latérale, de manière à modifier sa position suivant le membre à tester (droit ou gauche). Le segment métatarso-phalangien a été positionné verticalement, sur la plaque reliée aux capteurs de force. Deux bandes velcro, positionnées respectivement autour des métatarses, juste distalement au tarse, et au niveau de l'articulation métatarso-phalangienne, ont permis le maintien de ce segment à la plaque. Une fois le membre en place, la verticalité de la plaque reliée aux capteurs a été contrôlée à l'aide d'un niveau à bulle, puis éventuellement corrigée par déplacement du chariot supportant cette plaque, dans l'axe cranio-caudal. Après obtention d'une verticalité correcte, la position du chariot était conservée par serrage de l'ensemble des boulons le fixant aux rails latéraux. Le positionnement du chien dans le dispositif est illustré dans la figure 2.

Avant et après chaque test, les capteurs ont été calibrés, membre en place dans le dispositif, par suspension à la pédale, d'une masse de 1 kg.

Stimulation supramaximale du nerf fibulaire

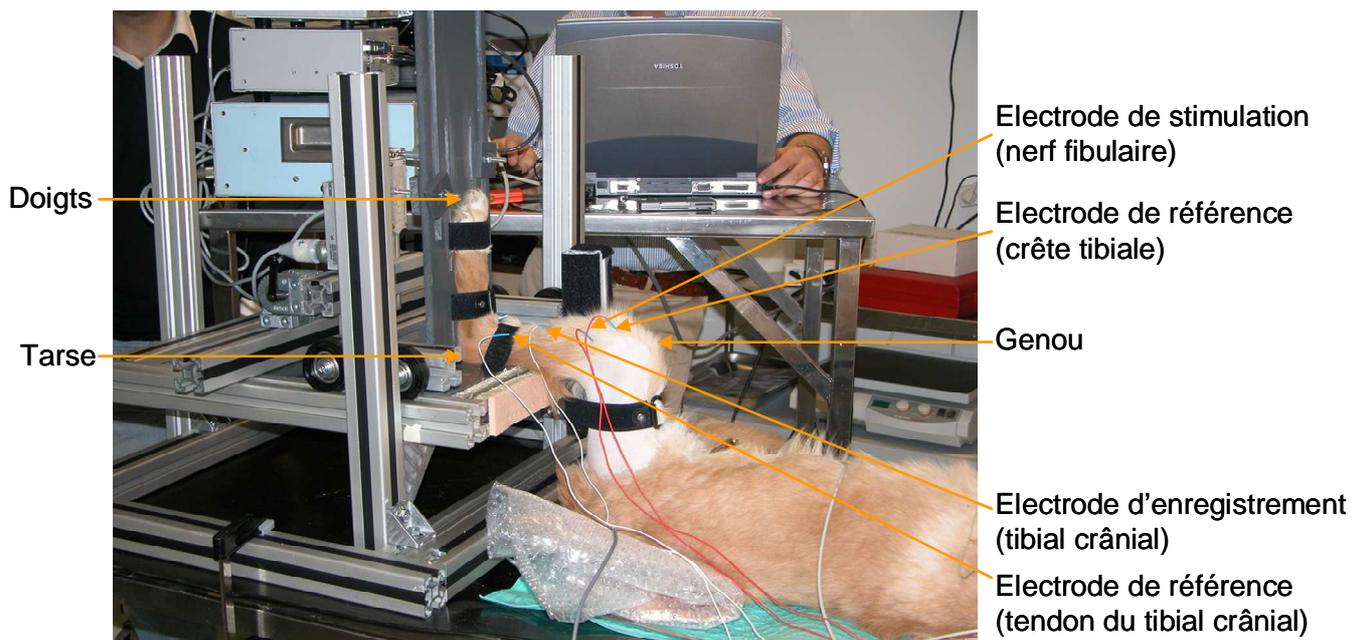
Mesurer la force téτανique maximale des muscles de la loge antérieure de la jambe du chien impose d'obtenir une contraction totale des muscles concernés. Celle-ci a été obtenue par stimulation supramaximale du nerf fibulaire, entraînant une contraction des muscles tibial

crânial, long extenseur des doigts, extenseur latéral des doigts, et long péronier. Une flexion du tarse, et une extension de l'articulation métatarso-phalangienne est alors obtenue.

Positionnement des électrodes

La stimulation percutanée du nerf fibulaire a été réalisée par une paire d'électrodes monopolaires. L'électrode de stimulation a été positionnée sur le nerf, après palpation transcutanée de celui-ci, au niveau du col de la fibula. L'électrode de référence était positionnée à proximité, en regard du plateau tibial (figure 2). Les potentiels d'action composés ont été enregistrés simultanément aux stimulations, de manière à contrôler l'efficacité de celles-ci. Dans ce but, une paire d'électrodes monopolaires a été insérée dans l'espace sous-cutané, en surface du muscle tibial crânial. L'électrode d'enregistrement était positionnée en zone proximale du muscle, au niveau du corps charnu, et l'électrode de référence en regard du tendon (figure 2). Enfin, une éventuelle contraction des muscles antagonistes (loge postérieure, extenseurs du tarse-fléchisseurs des doigts), a été contrôlée via une électrode concentrique positionnée dans le chef latéral du muscle gastrocnémien, et permettant de constater l'éventuelle survenue d'une activité électrique. Stimulation et enregistrement des potentiels composés ont été réalisées via un moniteur d'électromyographie Nicolet ®, et le logiciel dédié, Viking ®.

Figure 2 : Présentation du module de première génération : photographie légendée d'un chien en place dans le dispositif



Mise au point et recherche de l'intensité de stimulation
supramaximale

Préalablement à l'enregistrement de force proprement dit, une phase de mise au point était nécessaire, afin d'obtenir les conditions optimales de stimulation, et de déterminer l'intensité de stimulation nécessaire. Une fois l'animal et les électrodes en place, quelques secousses (Twitch) étaient tout d'abord réalisées, à 40V et à 0.2 Hz, afin de contrôler le bon positionnement de l'électrode de stimulation. La résistance étant de 4000 Ohms, 40V correspondaient à 10 mA. Si des potentiels d'action composés étaient enregistrés et qu'une contraction des muscles considérés était bien visible, la phase de mise au point continuait, à partir de stimulations téaniques. Les stimulations téaniques utilisées ici, d'une durée de 2 s, ont été réalisées à 50 Hz (100 stimulations). Cette fréquence, faible en comparaison de celles employées chez l'Homme (Edwards et al. 1987), la souris (Quinlan et al. 1992), ou le rat (Shin et al. 2008), est néanmoins une valeur classiquement utilisée chez le chien (Kornegay et al. 1999), et a permis l'obtention d'une fusion téanique. Le niveau de stimulation permettant d'obtenir la meilleure force téanique, ainsi que les potentiels d'action composés de la meilleure amplitude était alors déterminé, en commençant par une stimulation à 40V (10 mA), puis en diminuant, et en augmentant cette valeur. Dans cette phase de mise au point, les stimulations téaniques étaient espacées d'au moins une minute. Une fois le niveau optimal de stimulation obtenu, une valeur correspondant à au moins 150 % de celui-ci était retenue, afin d'obtenir des conditions de stimulation supramaximale. Un minimum de deux minutes de repos était alors respecté avant le début de l'enregistrement proprement dit.

Protocole de stimulation

Deux trains de 150 secousses, à 5 Hz (durée 30 secondes), espacés d'une minute ont tout d'abord été effectués, afin d'évaluer le niveau de potentiation musculaire.

Des stimulations téaniques, à 50 Hz, et d'une durée de 2 s ont ensuite été effectuées, afin d'évaluer le niveau de force téanique maximale, ainsi que la fatigue musculaire. Dans cette optique, les stimulations téaniques ont été effectuées en quatre séquences, en augmentant progressivement la fréquence des contractions, selon le protocole suivant :

- Séquence 1 : 6 stimulations espacées d'une minute,
- Séquence 2 : 10 stimulations espacées de 30 secondes,
- Séquence 3 : 12 stimulations espacées de 15 secondes,
- Séquence 4 : 40 stimulations espacées de 3 secondes.

Le protocole d'enregistrement en lui-même était d'une durée de vingt minutes environ. Néanmoins, le temps de mise au point représentait environ la même durée, à laquelle s'ajoutaient les temps d'anesthésie, de positionnement et de calibration des capteurs. Un test comprenant la mesure de force des deux postérieurs avait donc une durée d'environ 3 heures.

c) Traitement des données

A partir des tracés obtenus dans le logiciel Labscribe, les données suivantes ont été mesurées, dans ce même logiciel, et analysées :

- *Le niveau de potentiation musculaire*

La valeur de cette variable a été obtenue par le calcul du pourcentage d'augmentation de la force entre la première secousse et la dernière de chacune des séquences de secousses en trains de 30 secondes, à 5 Hz.

- *La force tétanique maximale*

Cette variable a été calculée en moyennant la valeur de force tétanique obtenue lors de la première séquence de stimulations tétaniques. Il s'agit donc de la valeur moyenne de la force générée par six contractions tétaniques espacées d'une minute.

- *La force tétanique mesurée au cours des différentes séquences*

De la même façon que pour la force tétanique maximale, une moyenne des valeurs de force tétanique obtenues après chaque stimulation, et pour chacune des trois autres séquences a été calculée. Pour la dernière séquence, seuls les tétanos 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 et 40 ont été mesurés.

- *La fatigue musculaire au cours des différentes séquences*

La valeur de cette variable a été obtenue en calculant ce que représentait le dernier tétanos de la séquence considérée, en pourcentage du premier.

Les données de force brute, en kilogrammes, issues des deux capteurs ont tout d'abord été converties en Newtons, par multiplication de la valeur obtenue en kg par la valeur de l'accélération de la pesanteur, soit 9.81 m/s^2 . Les valeurs ainsi obtenues pour chaque capteur

ont été additionnées puis divisées par deux afin d'obtenir une moyenne. La valeur ainsi obtenue correspond à la **force tétanique absolue**, exprimée en N.

Afin de tenir compte des différences de taille entre animaux de différents âges, mais aussi entre chiens sains et GRMD, la valeur de force tétanique absolue a été normalisée par la valeur de masse corporelle de l'animal. La variable ainsi obtenue correspond à la **force tétanique relative**, exprimée en N/kg.

d) Animaux

Etude de répétabilité des mesures

Deux chiens mâles golden retriever sains adultes (âges respectifs au premier test : 12.33 et 12.57 mois) ont été testés trois fois, à un intervalle compris entre 15 et 22 jours (moyenne : 18.3 jours, écart-type : 3.0 jours).

Etude de comparaison des chiens GRMD aux chiens sains, à différents âges

Etude à 4 mois

Quatre chiens mâles golden retriever sains, et huit chiens mâles GRMD ont été évalués à l'âge de 4 mois (moyenne d'âge chiens sains : 4.22 mois, écart-type : 0.15 mois ; moyenne d'âge chiens GRMD : 4.26 mois, écart-type : 0.13 mois) (Tableau 1).

Etude à 6 mois

Trois chiens mâles golden retriever sains et cinq chiens mâles GRMD ont été évalués à l'âge de 6 mois (moyenne d'âge chiens sains : 6.09 mois, écart-type : 0.07 mois ; moyenne d'âge chiens GRMD : 6.11 mois, écart-type : 0.17 mois) (Tableau 1)

Etude à 12 mois

Trois chiens mâles golden retriever sains et deux chiens mâles GRMD ont été évalués à l'âge de 12 mois (moyenne d'âge chiens sains : 12.44 mois, écart-type : 0.12 mois ; moyenne d'âge chiens GRMD : 12.30 mois, écart-type : 0 mois) (Tableau 1)

Une étude à 9 mois était initialement prévue, mais seuls deux chiens GRMD ont pu être recrutés (moyenne d'âge 8.6 mois, écart-type : 0 mois).

Tableau 1 : Animaux inclus dans l'étude de mesure de force sur le module de première génération

Nom	Symbole (graphes)	Statut	Test 4 mois	Test 6 mois	Test 9 mois	Test 12 mois
Cbof	✖	Sain	X			
Ckan	◆	Sain	X			
Crash	✕	Sain	X	X		X
Crock	-	Sain	X	X		X
Cliff	●	Sain		X		X
Becker	◆	GRMD	X			
Bjork	■	GRMD	X	X		
Bxente	●	GRMD	X	X		
C.eds	✕	GRMD	X	X		
Cballot	▲	GRMD	X			
Cbidon	+	GRMD	X			
C-cool	-	GRMD	X			
Cyanure	✖	GRMD	X			
Charlot	✕	GRMD		X	X	X
Charly	-	GRMD		X	X	X

A droite du nom de chaque animal figure le symbole qui lui est propre et sera utilisé dans les graphes. Pour chacune des classes d'âge étudiées, une croix est présente si le test a été réalisé. Si aucun test n'est disponible à un âge donné pour un animal donné, la case correspondante est grisée.

e) Analyse statistique

Chaque test a généré des données sur le postérieur gauche et le postérieur droit. Ces données, obtenues sur le même animal, ont été considérées comme liées, et toutes les analyses effectuées ont pris en compte cette liaison, en la traitant en tant qu'effet intra dans une ANOVA à mesures répétées.

Evaluation de la répétabilité des mesures

Une ANOVA à mesures répétées, avec deux effets intra (côté gauche ou droit, et jour de test) a été effectuée, afin de déterminer s'il existait une différence significative entre tests sur les mêmes animaux.

Evaluation des différences chiens sains-chiens GRMD

Des ANOVA à mesures répétées avec le côté (gauche/droit) en tant qu'effet intra et le statut clinique (sain versus GRMD) en tant qu'effet inter ont été effectuées pour chaque tranche d'âge (4, 6 et 12 mois), sur chacune des variables préalablement énoncées, afin de déterminer l'effet de l'atteinte musculaire sur ces différents paramètres.

De la même façon, l'effet côté testé (gauche versus droite) a été examiné afin de déterminer si les deux membres postérieurs d'un même chien pouvaient être comparés.

Evaluation de l'effet de l'âge sur les différentes variables

Quelques animaux ont pu subir des enregistrements à différents âges (voir tableau 1). Ainsi, l'effet âge a été évalué par une ANOVA à mesures répétées à deux effets intra (côté et âge) :

- Sur deux chiens sains à 4, 6 et 12 mois
- Sur trois chiens sains à 6 et 12 mois
- Sur deux chiens GRMD à 6, 9 et 12 mois
- Sur trois chiens GRMD à 4 et 6 mois

Pour l'ensemble des tests effectués, l'hypothèse nulle a été rejetée si $p < 0.05$.

2) Résultats

a) Etude de répétabilité

Un effet jour significatif a été démontré pour les forces tétaniques absolues et relatives durant la séquence 4 ($p = 0.0261$ et $p = 0.0427$, respectivement).

Aucune autre différence significative liée au jour de test n'a été mise en évidence par l'ANOVA à mesures répétées.

Néanmoins, l'un des deux animaux, Crock, montre des coefficients de variation relativement élevés. Ainsi, le coefficient de variation de sa force tétanique maximale absolue est de 16.2 % pour le postérieur gauche, et de 20.0 % pour le postérieur droit, tandis que ces valeurs sont seulement de 6.8 et 3 % pour Crash. Toutefois, si ces coefficients de variation restent relativement faibles pour les valeurs de force tétanique, ils atteignent des valeurs très élevées pour d'autres variables, telles que fatigue ou potentiation musculaires, plus sujettes à variations d'un test à l'autre (tableau 2).

Tableau 2 : Evaluation de la force musculaire sur le module de première génération – étude de répétabilité

	FTM	FT ₂	FT ₃	FT ₄	Fatigue ₄	Potentiation ₁
Effet jour (p =)	0.7406	0.7526	0.1474	0.0427		0.3788
CV (%) (écart-type)	11.5 (8.0)	12.4 (7.7)	14.9 (6.8)	14.3 (8.3)	59.7 (17.5)	31.8 (11.8)

Dans ce tableau figurent les résultats de l'ANOVA à mesures répétées et les coefficients de variations obtenus pour les trois tests répétés sur les deux chiens, pour les principales variables étudiées. Abréviations : FTM : force tétanique maximale, FT₂ : force tétanique moyenne durant la deuxième séquence, FT₃ : force tétanique moyenne durant la troisième séquence, FT₄ : force tétanique moyenne durant la quatrième séquence, Fatigue₄ : fatigue au cours de la quatrième séquence, Potentiation₁ : potentiation musculaire au cours du premier train de secousses. Les valeurs de force tétaniques considérées dans ce tableau sont relatives.

b) Etude des caractéristiques de force musculaire du chien GRMD, par comparaison au chien sain.

Etude à 4 mois

Force tétanique

A l'âge de quatre mois, la force tétanique absolue mesurée au cours des quatre séquences est significativement ($p < 0.01$) inférieure chez les chiens GRMD, à toutes les séquences.

La force tétanique relative est également significativement inférieure chez les chiens GRMD, même si la normalisation par la masse corporelle réduit l'écart entre les deux populations.

La force tétanique maximale absolue, pour le postérieur gauche par exemple, s'élève en moyenne à 3.35 N (écart-type : 1.37 N) chez les chiens GRMD, soit un peu plus d'un tiers de la valeur moyenne, qui est de 9.67 N (écart-type : 2.86 N) chez les chiens sains. En valeur relative, cette même force tétanique maximale atteint une moyenne de 0.31 N/kg (écart-type : 0.10 N/kg) chez les chiens GRMD, soit cette fois un peu plus de la moitié de celle mesurée chez les chiens sains (moyenne : 0.59 N/kg, écart-type 0.17 N/kg). Cette différence entre les deux populations, ainsi que l'effet de la normalisation par la masse corporelle du chien sont illustrés dans les graphes de la figure 3.

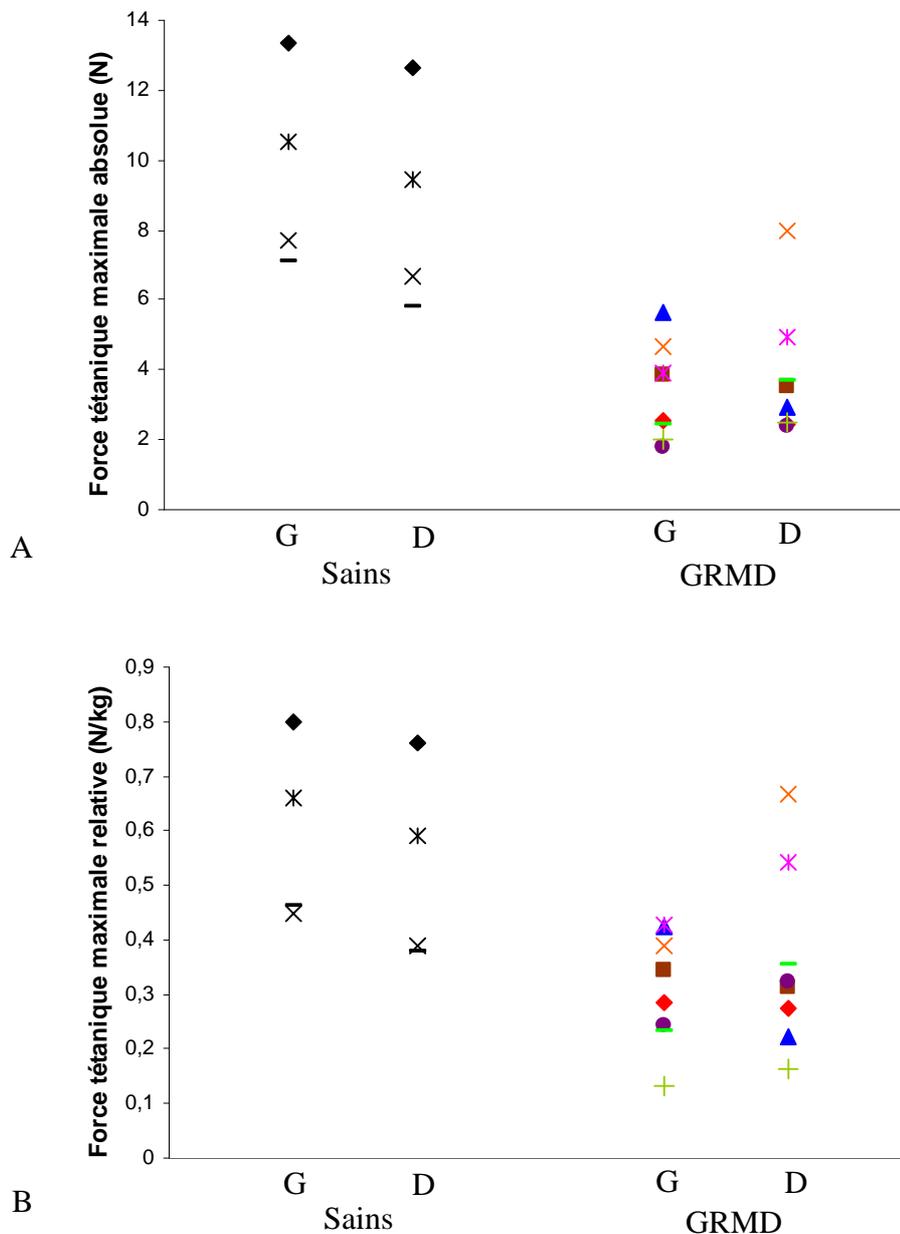
Ces graphes permettent également de comprendre l'effet significatif du côté sur la valeur de force tétanique maximale ($p = 0.0041$ pour la force absolue, $p = 0.0060$ pour la force relative) chez les chiens sains (tableau 3). En effet, les quatre animaux étudiés montrent une force tétanique gauche supérieure à la droite. Néanmoins, les graphes de la figure 3 permettent également de constater que d'importantes variations existent également entre postérieurs gauche et droit chez les chiens GRMD. Ainsi, certains animaux, tels que C.eds ou encore Cballot, présentent des valeurs qui varient quasiment du simple au double en fonction du côté. Cette différence échappe néanmoins au test statistique puisqu'elle n'est pas systématiquement en faveur du même côté d'un chien à l'autre.

Tableau 3 : Résultats des mesures de forces tétaniques et de l'analyse statistique à 4 mois

	Séquence 1				Séquence 2				Séquence 3				Séquence 4			
	FTa (N)		FTr (N/kg)		FTa (N)		FTr (N/kg)		FTa (N)		FTr (N/kg)		FTa (N)		FTr (N/kg)	
	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D
Moy (ET) Sains	9.67 (2.86)	8.65 (3.09)	0.59 (0.17)	0.53 (0.18)	9.48 (2.64)	8.46 (3.26)	0.58 (0.16)	0.52 (0.20)	9.12 (2.06)	8.34 (3.15)	0.56 (0.12)	0.51 (0.18)	7.85 (1.10)	7.80 (3.01)	0.48 (0.08)	0.48 (0.17)
Moy (ET) GRMD	3.35 (1.37)	3.79 (1.90)	0.31 (0.10)	0.36 (0.17)	3.23 (1.26)	3.70 (1.83)	0.30 (0.09)	0.35 (0.16)	3.00 (1.12)	3.45 (1.77)	0.28 (0.08)	0.32 (0.16)	2.20 (0.87)	2.76 (1.53)	0.20 (0.07)	0.26 (0.13)
P (statut)	0.0011		0.0235		0.0011		0.0213		0.0005		0.0110		<0.0001		0.0012	
P (côté) GRMD	0.4825		0.3693		0.4298		0.3265		0.4192		0.3343		0.2778		0.2163	
P (côté) sain	0.0041		0.0060		0.0796		0.0886		0.3335		0.3264		0.9786		0.9470	

Pour chaque séquence et chaque côté (droit ou gauche), sont indiquées la moyenne et l'écart-type dans chaque population, pour la force tétanique relative et absolue. Les résultats de l'analyse statistique sont donnés pour l'effet groupe (GRMD vs Sain), et l'effet côté (droite vs gauche) dans chacune des deux populations. Abréviations : FTa : force tétanique absolue, FTr : force tétanique relative, G : gauche, D : droite, Moy : moyenne, ET : écart-type. Les résultats significatifs figurent en gras.

Figure 3 : Force tétanique maximale à 4 mois, mesurée avec le module de première génération : comparaison entre chiens sains et GRMD



A : Valeurs de force maximale tétanique absolue (N) obtenues chez les chiens sains et GRMD B : Valeurs de force maximale tétanique relative (N/kg), obtenues chez les chiens sains et GRMD. Sur les deux graphes, les chiens sains sont représentés sur la gauche (symboles noirs), et les chiens GRMD sur la droite (symboles de couleur). Pour chaque population, sont représentées les valeurs obtenues pour le postérieur gauche (G), et pour le postérieur droit (D). Les symboles utilisés correspondent chacun à un animal et cette correspondance figure dans le tableau 1.

Fatigue musculaire

Chez les chiens sains comme chez les chiens GRMD, la fatigue mesurée aux cours des trois premières séquences est faible (tableau 4). Cependant, la fatigue au cours de la troisième séquence est, bien que minime, significativement supérieure ($p = 0.0467$) chez les chiens GRMD (moyenne postérieur gauche : 6.9 %, écart-type 4.4 %), en comparaison des chiens sains (moyenne postérieur gauche : 1.7 %, écart-type 5.1 %). Durant la quatrième séquence, la fatigue s'accroît dans les deux groupes, mais davantage chez les chiens GRMD ($p = 0.0314$), chez lesquels la fatigue moyenne est de 2 (gauche) à 5 fois (droite) celle des chiens sains.

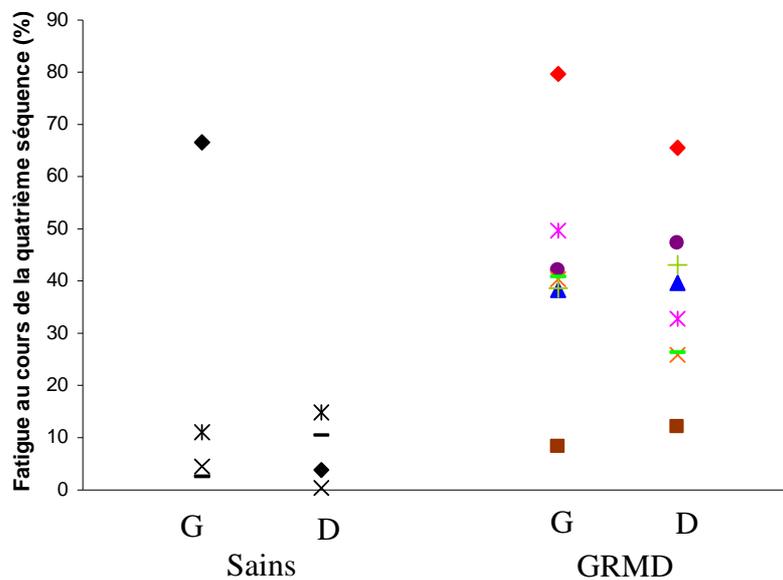
Le graphe de la figure 4 illustre cette différence entre chiens sains et GRMD. Néanmoins, il montre que certains chiens sains développent une fatigue importante, comparable à celle de certains chiens GRMD. Par ailleurs, si l'ANOVA à mesures répétées n'a pas détecté de différence entre postérieurs gauche et droit, que ce soit chez les chiens sains ou GRMD, le graphe montre que les différences gauche-droite chez les chiens GRMD existent mais sont faibles, tandis qu'elles atteignent des niveaux considérables chez certains chiens sains, comme par exemple chez le chien Ckan. Ces résultats sont à moduler car les contractions, très fortes et répétées chez les chiens sains, peuvent être responsables d'un glissement de l'électrode de stimulation au cours de la dernière séquence, entraînant artificiellement une fatigue sur le membre considéré.

Tableau 4 : Résultats des mesures de fatigue, et de l'analyse statistique à 4 mois

	Fatigue séquence 1 (%)		Fatigue séquence 2 (%)		Fatigue séquence 3 (%)		Fatigue séquence 4 (%)	
	G	D	G	D	G	D	G	D
Moy (ET) Sains	0.8 (2.6)	1.7 (5.3)	1.2 (3.7)	3.4 (7.2)	1.7 (5.1)	1.8 (4.5)	21.2 (30.6)	7.3 (6.5)
Moy (ET) GRMD	3.0 (3.6)	2.1 (3.7)	3.4 (3.7)	3.3 (1.2)	6.9 (4.4)	5.3 (3.2)	42.2 (19.3)	36.6 (16.3)
P (statut)	0.4783		0.4234		0.0467		0.0314	
P (côté) GRMD	0.5771		0.9481		0.2468		0.1542	
P (côté) sain	0.8134		0.7014		0.9787		0.4625	

Pour chaque séquence et chaque côté (droit ou gauche), sont indiquées la moyenne de fatigue et l'écart-type dans chaque population. Les résultats de l'analyse statistique sont donnés pour l'effet groupe (GRMD vs Sain), et l'effet côté (droite vs gauche) dans chacune des deux populations. Abréviations : G : gauche, D : droite, Moy : moyenne, ET : écart-type. Les résultats significatifs figurent en gras.

Figure 4 : Fatigue à la quatrième séquence, mesurée avec le module de première génération à 4 mois : comparaison entre chiens sains et GRMD



Les chiens sains sont représentés sur la gauche (symboles noirs), et les chiens GRMD sur la droite (symboles de couleur). Pour chaque population, sont représentées les valeurs de fatigue obtenues pour le postérieur gauche (G), et pour le postérieur droit (D), au cours de la dernière séquence de stimulations. Les symboles utilisés correspondent chacun à un animal et cette correspondance figure dans le tableau 1.

Potentiation musculaire

La potentiation musculaire au cours des trains de secousses s'est avérée présente chez tous les animaux testés, même si le très faible niveau de force de secousse détecté (quelques grammes) chez certains chiens GRMD a parfois rendu très difficile la mesure de celle-ci sur les tracés. Ainsi, ce paramètre n'a pas pu être évalué sur le postérieur gauche de Bxente et le postérieur droit de Bjork.

Le niveau de potentiation musculaire au cours de la première séquence de secousses est plus faible chez les chiens GRMD (moyenne postérieur gauche : 49.5 %, écart-type 27.5 %) que chez les chiens sains (moyenne postérieur gauche : 85.4 %, écart-type : 19.8 %), mais de manière non significative ($p = 0.0578$) (Tableau 5).

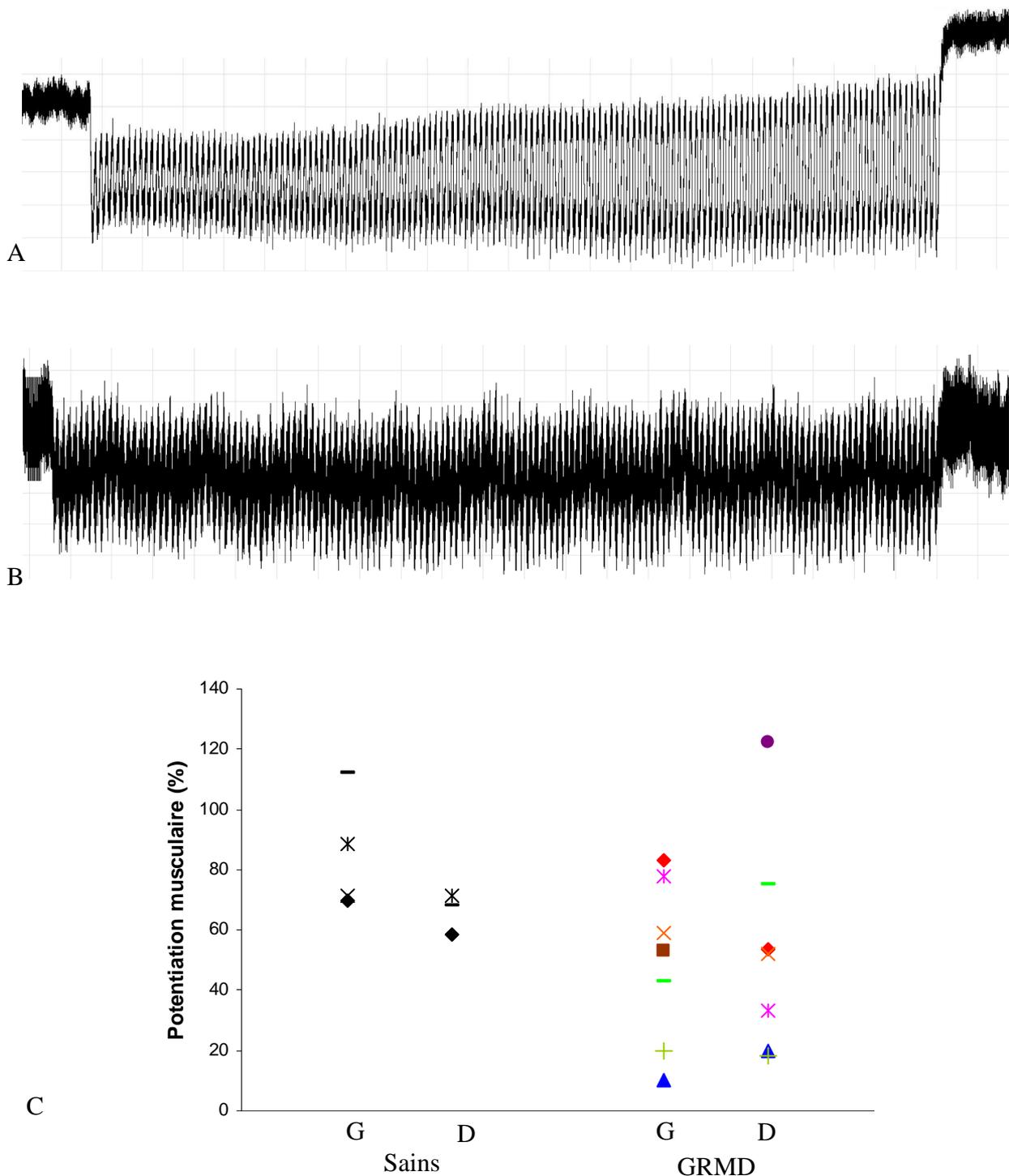
Aucun effet du côté sur les résultats de la mesure de potentiation musculaire n'a été mis en évidence, même si le graphe de la figure 5 illustre que des disparités entre postérieurs gauche et droit peuvent exister chez certains animaux, essentiellement GRMD.

Tableau 5 : Résultats des mesures de potentiation musculaire, et de l'analyse statistique à 4 mois

	Potentiation séquence 1 (%)		Potentiation séquence 2 (%)	
	G	D	G	D
Moy (ET) Sains	85.4 (19.8)	65.8 (6.7)	46.7 (12.6)	40.2 (12.7)
Moy (ET) GRMD	49.5 (27.5)	53.5 (36.4)	48.7 (33.7)	28.3 (25.7)
p (statut)	0.0578		0.5316	
p (côté) GRMD	0.5695		0.1685	
p (côté) sain	0.1360		0.3915	

Pour chacune des deux séquences et chaque côté (droit ou gauche), sont indiquées la moyenne de potentiation et l'écart-type dans chaque population. Les résultats de l'analyse statistique sont donnés pour l'effet groupe (GRMD vs Sain), et l'effet côté (droite vs gauche) dans chacune des deux populations. Abréviations : G : gauche, D : droite, Moy : moyenne, ET : écart-type.

Figure 5 : Potentiation musculaire au cours de la première séquence de secousses à 4 mois, mesurée avec le module de première génération : comparaison entre chiens sains et GRMD



A : première séquence de secousses : exemple d'un tracé chez un chien sain, noter la forte potentiation B : exemple d'un tracé chez un chien GRMD, noter la potentiation plus discrète. C : Les chiens sains sont représentés sur la gauche (symboles noirs), et les

chiens GRMD sur la droite (symboles de couleur). Pour chaque population, sont représentées les valeurs de potentiation au cours de la première séquence de secousses, obtenues pour le postérieur gauche (G), et pour le postérieur droit (D). Les symboles utilisés correspondent chacun à un animal et cette correspondance figure dans le tableau 1.

Etude à 6 mois

Force tétanique

A l'âge de 6 mois, la force tétanique mesurée chez les chiens GRMD au cours des différentes séquences reste significativement inférieure à celle mesurée chez les chiens sains, que ce soit en valeur absolue ($p < 0.0001$) ou, dans une moindre mesure, en valeur relative ($p < 0.01$) (Tableau 6). Le graphe A de la figure 6 montre que les deux populations sont nettement séparées par la valeur de force tétanique maximale absolue : la moyenne chez les chiens GRMD s'élève en effet à 4.56 N pour le postérieur gauche (écart-type : 1.16 N), soit un tiers environ de celle mesurée chez les chiens sains (13.12 N, écart-type : 0.65 N). Comme cela a été noté à l'âge de 4 mois, cette différence se trouve minimisée par la normalisation par la masse corporelle, puisque la force tétanique maximale relative moyenne chez les chiens GRMD, d'une valeur de 0.37 N/kg (écart-type 0.09 N/kg), ne représente plus qu'un peu plus de la moitié de la valeur moyenne mesurée chez les chiens sains (0.63 N/kg, écart-type : 0.04 N/kg). Ces rapports correspondent, à peu de chose près, à ceux observés à 4 mois. Cependant, partant d'un ratio de force absolue entre chiens sains et chiens GRMD quasi identique aux deux âges (2.88), ce même ratio, calculé avec les valeurs de force relative, est inférieur à 6 mois (1.7 à 6 mois, versus 1.9 à 4 mois).

Les graphes de la figure 6 illustrent l'effet de cette normalisation : les valeurs de force tétanique relative ne montrent aucune superposition entre les deux populations, tandis que certaines valeurs relatives de chiens GRMD se superposent à celles des individus sains.

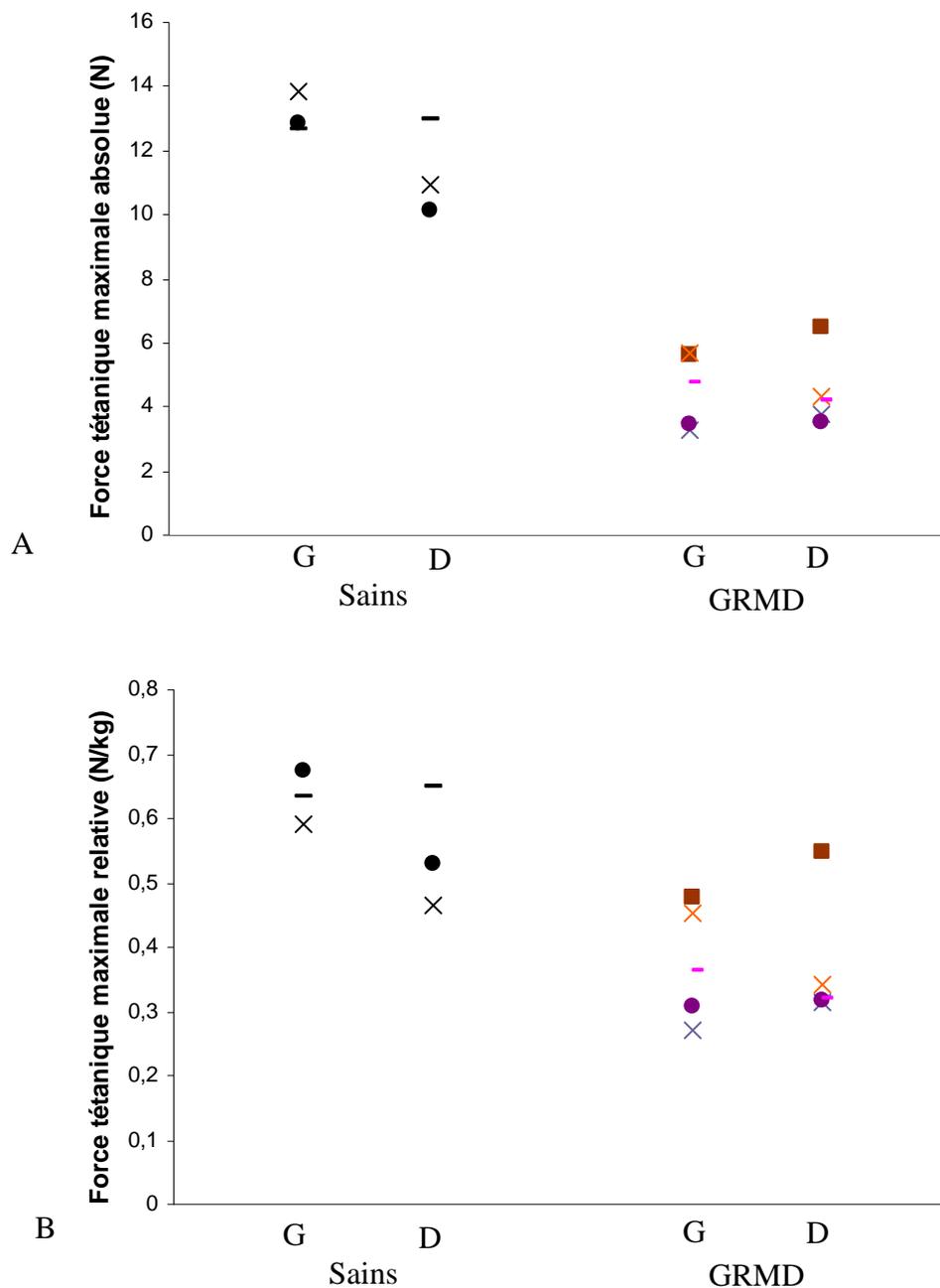
Enfin, aucun effet du côté testé n'a été mis en évidence par l'ANOVA à mesures répétées (tableau 6).

Tableau 6 : Résultats des mesures de forces tétaniques et de l'analyse statistique à 6 mois

	Séquence 1				Séquence 2				Séquence 3				Séquence 4			
	FTa (N)		FTr (N/kg)		FTa (N)		FTr (N/kg)		FTa (N)		FTr (N/kg)		FTa (N)		FTr (N/kg)	
	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D
Moy (ET) Sains	13.12 (0.65)	11.32 (1.46)	0.63 (0.04)	0.55 (0.09)	12.98 (0.60)	11.18 (1.43)	0.63 (0.04)	0.54 (0.09)	12.49 (0.61)	10.80 (1.32)	0.60 (0.04)	0.52 (0.09)	11.15 (0.95)	9.53 (1.37)	0.54 (0.02)	0.46 (0.07)
Moy (ET) GRMD	4.56 (1.16)	4.45 (1.16)	0.37 (0.09)	0.37 (0.10)	4.36 (0.95)	4.25 (1.16)	0.36 (0.07)	0.35 (0.10)	3.98 (0.98)	4.02 (1.01)	0.33 (0.08)	0.33 (0.09)	3.05 (1.22)	3.35 (0.88)	0.25 (0.10)	0.28 (0.08)
P (statut)	<0.0001		0.0092		<0.0001		0.0065		<0.0001		0.0054		<0.0001		0.0039	
P (côté) GRMD	0.7987		0.8426		0.7605		0.8090		0.8676		0.8032		0.4823		0.4462	
P (côté) sain	0.2299		0.2344		0.1918		0.1942		0.1967		0.1955		0.2524		0.2599	

Pour chaque séquence et chaque côté (droit ou gauche), sont indiquées la moyenne et l'écart-type dans chaque population, pour la force tétanique relative et absolue. Les résultats de l'analyse statistique sont donnés pour l'effet groupe (GRMD vs Sain), et l'effet côté (droite vs gauche) dans chacune des deux populations. Abréviations : FTa : force tétanique absolue, FTr : force tétanique relative, G : gauche, D : droite, Moy : moyenne, ET : écart-type. Les résultats significatifs figurent en gras.

Figure 6 : Force tétanique maximale à 6 mois, mesurée avec le module de première génération : comparaison entre chiens sains et GRMD



A : Valeurs de force maximale tétanique absolue (N) obtenues chez les chiens sains et GRMD B : Valeurs de force maximale tétanique relative (N/kg), obtenues chez les chiens sains et GRMD. Sur les deux graphes, les chiens sains sont représentés sur la gauche (symboles noirs), et les chiens GRMD sur la droite (symboles de couleur). Pour chaque population, sont représentées les valeurs obtenues pour le postérieur gauche (G), et pour le postérieur droit (D). Les symboles utilisés correspondent chacun à un animal et cette correspondance figure dans le tableau 1.

Fatigue musculaire

Suivant la même tendance qu'à l'âge de 4 mois, la fatigue au cours des trois premières séquences est faible à inexistante, dans les deux populations (tableau 7). Au cours de la quatrième séquence, la fatigue augmente, également dans les deux populations, et la différence entre chiens sains et chiens GRMD n'est, à cet âge, pas significative.

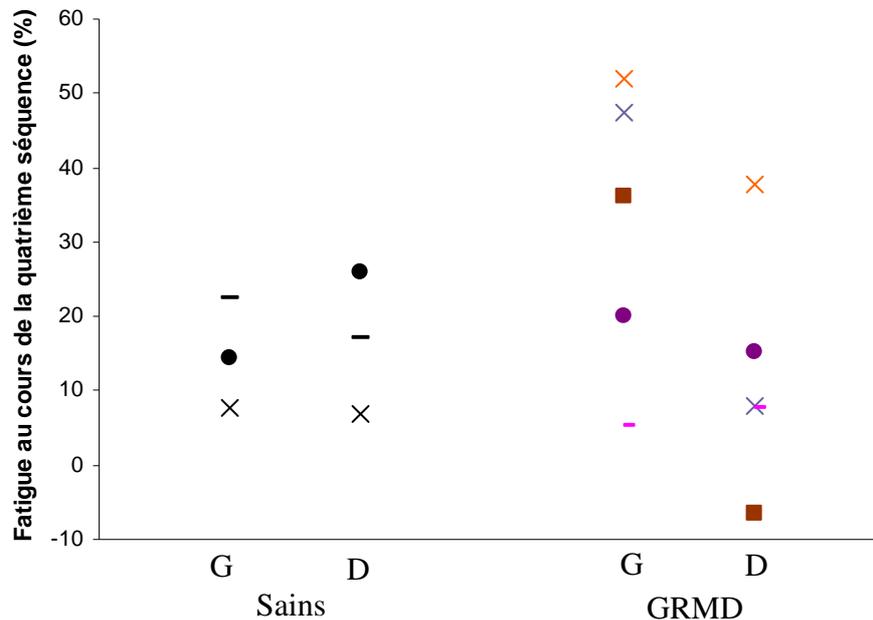
Le graphe de la figure 7 montre la très nette superposition existant entre les deux populations, pour la fatigue au cours de la dernière séquence de stimulations téaniques. Il permet également de constater que, chez certains animaux GRMD (C.eds ou Charlot par exemple), la différence de fatigue entre le postérieur gauche et le postérieur droit est majeure. Cette asymétrie n'aboutit cependant pas à un effet significatif du côté ($p = 0.0961$).

Tableau 7 : Résultats des mesures de fatigue, et de l'analyse statistique à 6 mois

	Fatigue séquence 1 (%)		Fatigue séquence 2 (%)		Fatigue séquence 3 (%)		Fatigue séquence 4 (%)	
	G	D	G	D	G	D	G	D
Moy (ET) Sains	-1.4 (1.7)	-0.8 (1.2)	1.7 (0.4)	1.8 (0.9)	1.5 (1.0)	0.2 (0.5)	14.9 (7.55)	16.6 (9.6)
Moy (ET) GRMD	-2.2 (4.4)	3.1 (3.1)	4.9 (10.6)	2.3 (4.6)	6.6 (13.8)	1.3 (3.7)	32.1 (19.4)	12.5 (16.6)
P (statut)	0.5213		0.6899		0.5667		0.5057	
P (côté) GRMD	0.0043		0.4012		0.3282		0.0961	
P (côté) sain	0.4376		0.9415		0.2551		0.7690	

Pour chaque séquence et chaque côté (droit ou gauche), sont indiquées la moyenne de fatigue et l'écart-type dans chaque population. Les résultats de l'analyse statistique sont donnés pour l'effet groupe (GRMD vs Sain), et l'effet côté (droite vs gauche) dans chacune des deux populations. Abréviations : G : gauche, D : droite, Moy : moyenne, ET : écart-type. Les résultats significatifs figurent en gras.

Figure 7 : Fatigue à la quatrième séquence, mesurée avec le module de première génération à 6 mois : comparaison entre chiens sains et GRMD



Les chiens sains sont représentés sur la gauche (symboles noirs), et les chiens GRMD sur la droite (symboles de couleur). Pour chaque population, sont représentées les valeurs de fatigue obtenues pour le postérieur gauche (G), et pour le postérieur droit (D), au cours de la dernière séquence de stimulations. Les symboles utilisés correspondent chacun à un animal et cette correspondance figure dans le tableau 1.

Potentiation musculaire

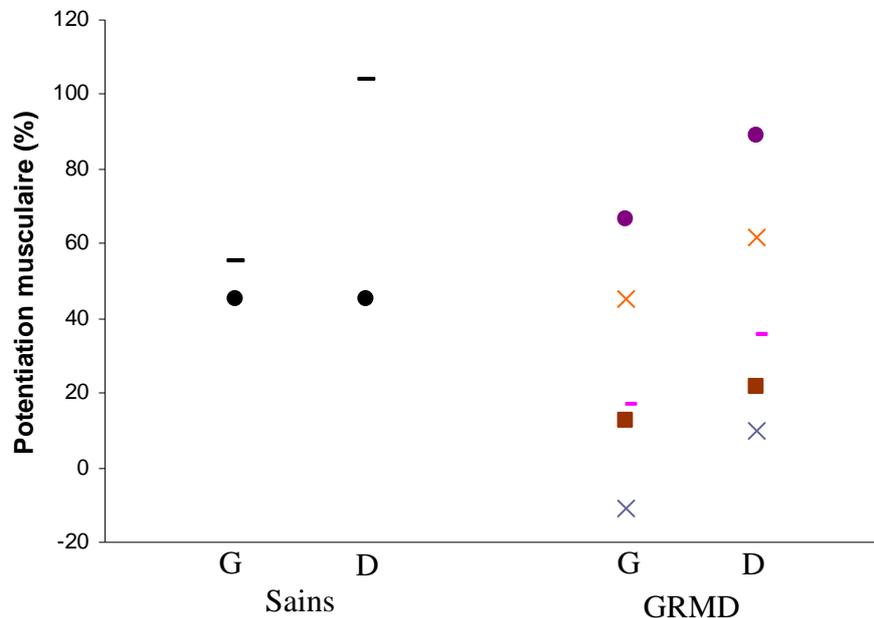
Le niveau de potentiation musculaire décrit à 6 mois est discrètement inférieur chez les chiens GRMD, comme le montrent les résultats figurant dans le tableau 8, ainsi que le graphe de la figure 8. Néanmoins, ces différences ne sont pas significatives. Un effet du côté sur la valeur de potentiation au cours de la première séquence de secousses a été mis en évidence par l'ANOVA à mesures répétées, chez les chiens GRMD ($p = 0.0018$). Le graphe de la figure 8 montre qu'en effet, les 5 chiens testés ont une meilleure potentiation à droite qu'à gauche.

Tableau 8 : Résultats des mesures de potentiation musculaire, et de l'analyse statistique à 6 mois

	Potentiatiion séquence 1 (%)		Potentiatiion séquence 2 (%)	
	G	D	G	D
Moy (ET) Sains	33.6 (29.6)	49.7 (52.0)	26.8 (23.2)	26.8 (27.3)
Moy (ET) GRMD	26.0 (30.3)	43.5 (31.8)	23.3 (26.8)	22.1 (21.1)
p (statut)	0.7925		0.7197	
p (côté) GRMD	0.0018		0.9115	
p (côté) sain	0.4247		0.9996	

Pour chacune des deux séquences et chaque côté (droit ou gauche), sont indiquées la moyenne de potentiation et l'écart-type dans chaque population. Les résultats de l'analyse statistique sont donnés pour l'effet groupe (GRMD vs Sain), et l'effet côté (droite vs gauche) dans chacune des deux populations. Les résultats significatifs figurent en gras. Abréviations : G : gauche, D : droite, Moy : moyenne, ET : écart-type.

Figure 8 : Potentiation musculaire au cours de la première séquence de secousses à 6 mois, mesurée avec le module de première génération : comparaison entre chiens sains et GRMD



Les chiens sains sont représentés sur la gauche (symboles noirs), et les chiens GRMD sur la droite (symboles de couleur). Pour chaque population, sont représentées les valeurs de potentiation au cours de la première séquence de secousses, obtenues pour le postérieur gauche (G), et pour le postérieur droit (D). Les symboles utilisés correspondent chacun à un animal et cette correspondance figure dans le tableau 1.

Etude à 12 mois

Force tétanique

Les deux animaux GRMD testés à l'âge de 12 mois montrent des valeurs de force tétanique relative et absolue significativement ($p < 0.05$) inférieures à celles mesurées chez les trois chiens sains. Les faibles niveaux de significativité (tableau 9) peuvent être expliqués par le petit nombre d'individus. Les graphes de la figure 9 montrent que les deux chiens GRMD ont une force tétanique maximale absolue effondrée, à un tiers de celle des chiens sains. Leur force relative est également nettement distinguable de celle des animaux sains, bien que la différence entre les deux groupes soit, une fois encore, atténuée par la normalisation.

Un effet significatif du côté testé a été identifié chez les chiens GRMD pour la force tétanique relative au cours de la première séquence, et la force absolue au cours de la seconde séquence.

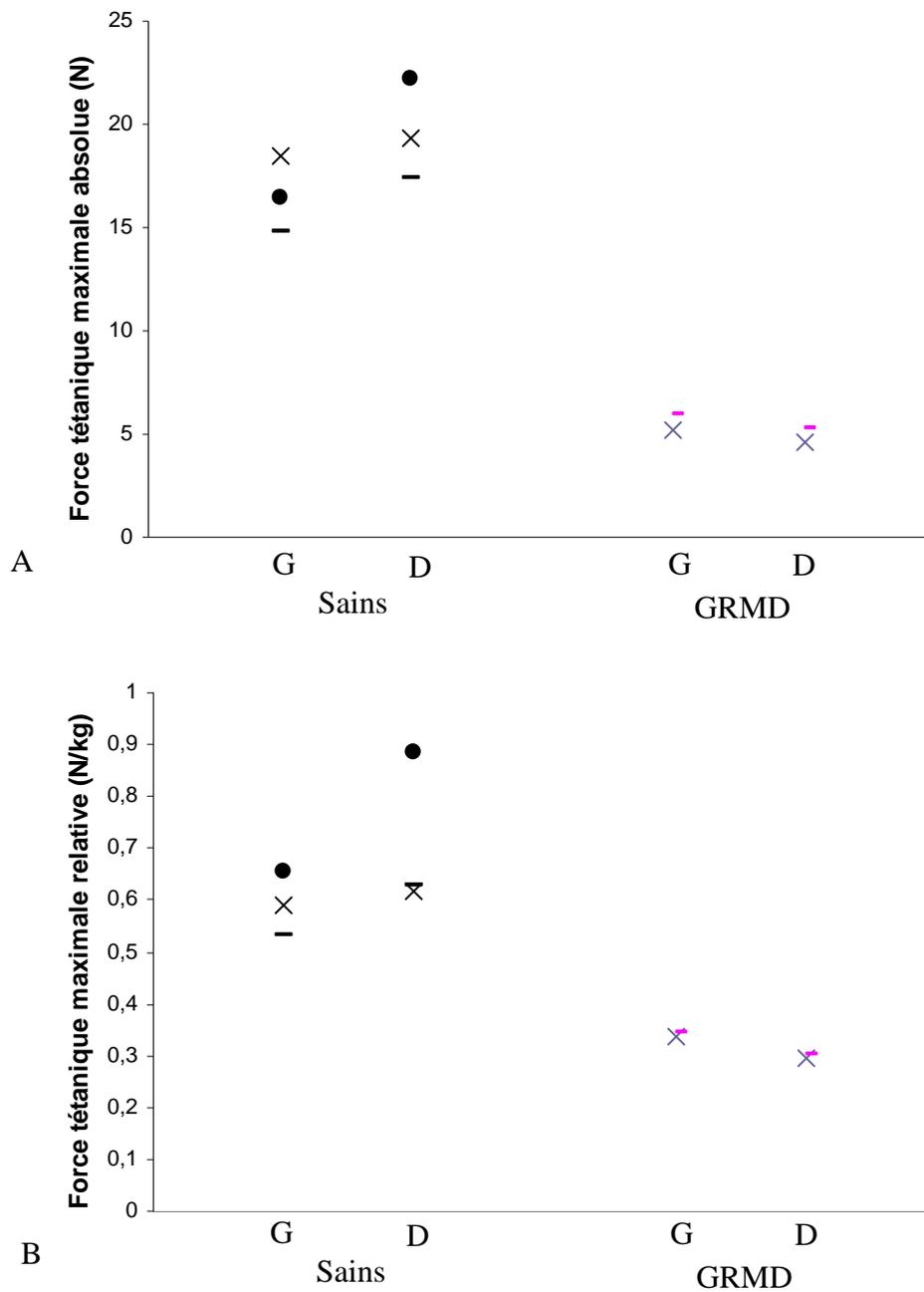
Une différence significative entre gauche et droite a également été mise en évidence, dans les deux groupes, pour la force tétanique absolue et relative au cours de la quatrième séquence de stimulations (tableau 9).

Tableau 9 : Résultats des mesures de forces tétaniques et de l'analyse statistique à 12 mois

	Séquence 1				Séquence 2				Séquence 3				Séquence 4			
	FTa (N)		FTr (N/kg)		FTa (N)		FTr (N/kg)		FTa (N)		FTr (N/kg)		FTa (N)		FTr (N/kg)	
	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D
Moy (ET) Sains	16.53 (1.83)	19.63 (2.45)	0.59 (0.06)	0.71 (0.15)	16.43 (1.19)	19.73 (2.02)	0.59 (0.06)	0.71 (0.14)	15.89 (1.00)	19.24 (1.96)	0.57 (0.074)	0.70 (0.14)	14.35 (0.39)	16.32 (0.42)	0.52 (0.07)	0.59 (0.07)
Moy (ET) GRMD	5.62 (0.54)	4.95 (0.45)	0.34 (0.01)	0.30 (0.00)	5.55 (0.57)	4.89 (0.59)	0.34 (0.01)	0.29 (0.01)	3.89 (1.33)	4.10 (0.96)	0.24 (0.10)	0.25 (0.08)	3.65 (1.00)	3.87 (1.00)	0.22 (0.08)	0.24 (0.08)
P (statut)	0.0224		0.0228		0.0109		0.0203		0.0073		0.0203		0.0077		0.0172	
P (côté) GRMD	0.0608		0.0255		0.0165		0.0519		0.5656		0.5734		0.0017		0.0373	
P (côté) sain	0.1658		0.1881		0.0990		0.1257		0.0752		0.1004		0.0199		0.0209	

Pour chaque séquence et chaque côté (droit ou gauche), sont indiquées la moyenne et l'écart-type dans chaque population, pour la force tétanique relative et absolue. Les résultats de l'analyse statistique sont donnés pour l'effet groupe (GRMD vs Sain), et l'effet côté (droite vs gauche) dans chacune des deux populations. Abréviations : FTa : force tétanique absolue, FTr : force tétanique relative, G : gauche, D : droite, Moy : moyenne, ET : écart-type. Les résultats significatifs figurent en gras.

Figure 9 : Force tétanique maximale à 12 mois, mesurée avec le module de première génération : comparaison entre chiens sains et GRMD



A : Valeurs de force maximale tétanique absolue (N) obtenues chez les chiens sains et GRMD B : Valeurs de force maximale tétanique relative (N/kg), obtenues chez les chiens sains et GRMD. Sur les deux graphes, les chiens sains sont représentés sur la gauche (symboles noirs), et les chiens GRMD sur la droite (symboles de couleur). Pour chaque population, sont représentées les valeurs obtenues pour le postérieur gauche (G), et pour le postérieur droit (D). Les symboles utilisés correspondent chacun à un animal et cette correspondance figure dans le tableau 1.

Fatigue musculaire

Le groupe de trois chiens sains âgés de douze mois montre un comportement de fatigue musculaire similaire à ce qui a été décrit précédemment à 4 et 6 mois : une fatigue très faible au cours des trois premières séquences, et accrue durant la quatrième et dernière série de stimulations téaniques. *A contrario*, les deux chiens GRMD montrent une fatigue très modérée, même durant cette dernière séquence. Si la différence entre les deux populations n'est pas significative ($p = 0.2147$), le graphe de la figure 10 montre que les deux chiens GRMD se situent dans les valeurs basses de fatigue des animaux sains du même âge.

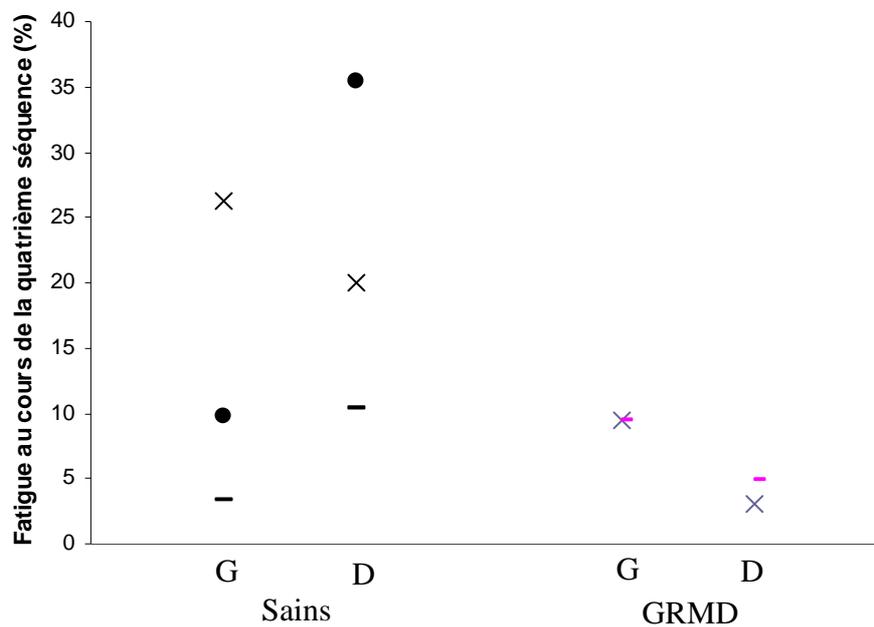
Aucun effet du côté testé n'a été mis en évidence (tableau 10).

Tableau 10 : Résultats des mesures de fatigue, et de l'analyse statistique à 12 mois

	Fatigue séquence 1 (%)		Fatigue séquence 2 (%)		Fatigue séquence 3 (%)		Fatigue séquence 4 (%)	
	G	D	G	D	G	D	G	D
Moy (ET) Sains	-2.5 (5.2)	-2.6 (2.3)	2.6 (2.1)	1.4 (1.4)	1.6 (2.6)	0.9 (2.0)	13.1 (11.9)	22.0 (12.6)
Moy (ET) GRMD	-8.3 (9.0)	-1.0 (1.5)	5.0 (2.8)	-62.8 (83.3)	-0.5 (2.6)	-0.7 (5.0)	9.5 (0.07)	4.0 (1.3)
P (statut)	0.6243		0.2420		0.3361		0.2147	
P (côté) GRMD	0.3991		0.4654		0.9749		0.1146	
P (côté) sain	0.9800		0.37435		0.6338		0.4410	

Pour chaque séquence et chaque côté (droit ou gauche), sont indiquées la moyenne de fatigue et l'écart-type dans chaque population. Les résultats de l'analyse statistique sont donnés pour l'effet groupe (GRMD vs Sain), et l'effet côté (droite vs gauche) dans chacune des deux populations. Abréviations : G : gauche, D : droite, Moy : moyenne, ET : écart-type. Les résultats significatifs figurent en gras.

Figure 10 : Fatigue à la quatrième séquence, mesurée avec le module de première génération à 12 mois : comparaison entre chiens sains et GRMD



Les chiens sains sont représentés sur la gauche (symboles noirs), et les chiens GRMD sur la droite (symboles de couleur). Pour chaque population, sont représentées les valeurs de fatigue obtenues pour le postérieur gauche (G), et pour le postérieur droit (D), au cours de la dernière séquence de stimulations. Les symboles utilisés correspondent chacun à un animal et cette correspondance figure dans le tableau 1.

Potentiation musculaire

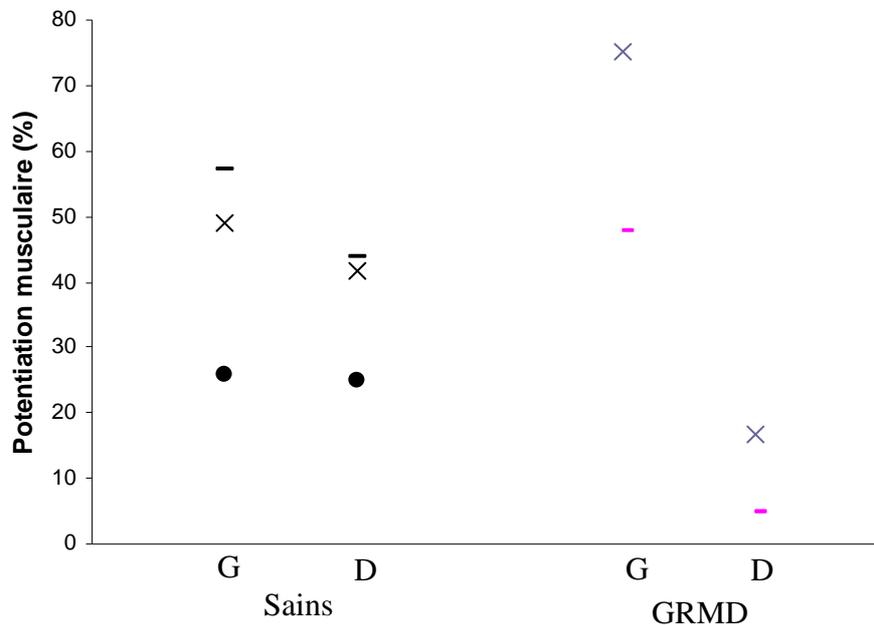
Aucun effet significatif du groupe (sain versus GRMD) n'a été mis en évidence, sur les valeurs de potentiation musculaire au cours des deux séquences de secousses (Tableau 11). Le graphe de la figure 11 montre en effet que la potentiation est forte pour les deux postérieurs gauches testés, et très faible au contraire pour les deux membres controlatéraux. Ceci peut en partie s'expliquer par les difficultés rencontrées à mesurer la force des secousses sur le postérieur droit de l'un des deux chiens GRMD (Charlot), les secousses étant quasiment indistingables de la ligne de base sur le tracé.

Tableau 11 : Résultats des mesures de potentiation musculaire, et de l'analyse statistique à 12 mois

	Potentiati�n séquence 1 (%)		Potentiati�n séquence 2 (%)	
	G	D	G	D
Moy (ET) Sains	44.1 (16.3)	36.8 (10.3)	25.8 (14.8)	16.3 (11.6)
Moy (ET) GRMD	61.4 (19.2)	10.7 (8.4)	69.9 (30.8)	-4.5 (13.8)
p (statut)	0.7437		0.3450	
p (côté) GRMD	0.0951		0.2552	
p (côté) sain	0.1855		0.1994	

Pour chacune des deux séquences et chaque côté (droit ou gauche), sont indiquées la moyenne de potentiati n et l'écart-type dans chaque population. Les résultats de l'analyse statistique sont donnés pour l'effet groupe (GRMD vs Sain), et l'effet côté (droite vs gauche) dans chacune des deux populations. Abréviations : G : gauche, D : droite, Moy : moyenne, ET :  cart-type.

Figure 11 : Potentiation musculaire au cours de la première séquence de secousses à 12 mois, mesurée avec le module de première génération : comparaison entre chiens sains et GRMD



Les chiens sains sont représentés sur la gauche (symboles noirs), et les chiens GRMD sur la droite (symboles de couleur). Pour chaque population, sont représentées les valeurs de potentiation au cours de la première séquence de secousses, obtenues pour le postérieur gauche (G), et pour le postérieur droit (D). Les symboles utilisés correspondent chacun à un animal et cette correspondance figure dans le tableau 1.

c) Evaluation de l'effet de l'âge sur les différentes variables

Les effets de l'âge sur l'évolution des différentes variables ont été évalués dans quatre groupes d'animaux ayant subi plusieurs tests à des âges différents :

- Deux chiens sains testés à 4, 6 et 12 mois
- Trois chiens sains testés à 6 et 12 mois
- Deux chiens GRMD testés à 6, 9 et 12 mois
- Trois chiens GRMD testés à 4 et 6 mois

Les seuls effets significatifs de l'âge qui ont pu être détectés concernent les valeurs de force tétanique, absolue ou relative. Les variables de fatigue ou de potentiation musculaire mesurées ne sont donc pas significativement influencées par l'âge des animaux.

Dans le tableau 12 figurent les résultats de l'analyse statistique évaluant l'effet de l'âge sur les valeurs de force tétanique relatives et absolues. Il apparaît que les deux groupes de chiens sains montrent une augmentation significative de leur force tétanique absolue, mesurée durant les 4 séquences, avec l'âge. Cette nette augmentation disparaît après normalisation par la masse corporelle, ce qui permet probablement d'expliquer le gain de force tétanique avec l'âge par la croissance musculaire.

Chez les chiens GRMD, l'évolution avec l'âge est moins claire. Les trois chiens évalués à 4 et à 6 mois montrent une augmentation de force tétanique absolue, mais non significative (tableau 12). Chez ces animaux, la normalisation par la masse corporelle a pour effet de creuser l'écart existant entre les deux valeurs de force tétanique, conduisant à un effet significatif de l'âge sur la force tétanique relative, qui est significativement plus importante à 6 mois. A l'inverse de cela, les deux chiens GRMD testés à 6, 9 puis 12 mois montrent une augmentation significative de leur force tétanique absolue, tandis que la force tétanique relative n'est pas influencée par l'âge de manière significative.

Tableau 12 : Effet de l'âge sur les valeurs de force tétanique absolues et relatives, mesurées avec le module de première génération.

Statut	Période considérée	Effet âge (p =)							
		FTa ₁	FTr ₁	FTa ₂	FTr ₂	FTa ₃	FTr ₃	FTa ₄	FTr ₄
Sains	6 – 12 mois	0.0493	0.4570	0.0369	0.3852	0.0357	0.3558	0.0147	0.2652
Sains	4, 6, 12 mois	0.0224	0.1264	0.0109	0.1146	0.0074	0.1231	0.0077	0.1568
GRMD	6, 9, 12 mois	0.0149	0.1363	0.0252	0.1257	0.3100	0.3731	0.2803	0.4151
GRMD	4, 6 mois	0.5345	0.0251	0.6921	0.0319	0.7986	0.0405	0.8730	0.0628

Pour chacun des quatre groupes d'animaux testés, sont consignés dans ce tableau les résultats du test statistique évaluant l'effet de l'âge sur les forces tétaniques absolues et relatives mesurées au cours des quatre séquences de stimulation. Les résultats significatifs figurent en gras. Abréviations : FTa_{1, 2, 3, 4} : force tétanique absolue au cours de la séquence n°1, 2, 3 ou 4, FTr_{1, 2, 3, 4} : force tétanique relative au cours de la de la séquence n°1, 2, 3 ou 4.

3) Bilan sur le module de première génération

Les données obtenues à l'issue des tests effectués sur le module de première génération ont permis de démontrer que la force tétanique maximale de flexion du tarse et d'extension des doigts était diminuée chez les chiens GRMD, que ce soit en valeur absolue ou relative, aux âges de 4, 6 et 12 mois. Ce paramètre a d'ailleurs été utilisé, en parallèle de cette étude de validation, au cours d'essais thérapeutiques, tels que greffes de mésoangioblastes (Sampaolesi et al. 2006) ou saut d'exon thérapeutique (Barthelemy et al. 2007b), permettant la démonstration d'un bénéfice fonctionnel, en s'appuyant également sur la comparabilité droite-gauche validée ici. D'autres indices, tels que potentiation musculaire ou fatigue ont également pu être investigués grâce aux tests réalisés sur ce module. Ces deux paramètres n'ont permis de différencier les chiens GRMD des animaux sains qu'à 4 mois, âge auquel les individus malades montrent une fatigue supérieure, et une potentiation moindre.

Les données de force tétanique maximale déjà publiées chez le chien GRMD, et acquises sur un module de force de conception proche, suivent les mêmes tendances (Kornegay et al. 1999). Quelques différences peuvent cependant être notées sur les valeurs brutes obtenues : globalement, les valeurs de force absolue et relative obtenues ici sont systématiquement plus faibles que celles publiées par J.N. Kornegay *et al.* Ainsi, par exemple, les données publiées font état d'une force absolue moyenne de 5.89 N (écart-type : 2.30 N) chez des chiens GRMD de 6 mois, tandis que cette même variable atteint ici une moyenne de 4.51 N (écart-type : 1.09 N). Chez les chiens sains, cette différence est également importante : 16.33 N (écart-type 3.88 N) versus 12.22 (écart-type : 1.41 N). Il est par ailleurs probable que ces différences ne soient pas liées à des écarts de gabarit, puisque les valeurs de force relative suivent la même tendance.

Si ce module présente de nombreuses qualités, et notamment celle de fournir des mesures répétables, et de permettre une mesure de la force musculaire chez les chiens GRMD, il s'est toutefois avéré perfectible sur quelques points, pratiques d'une part, et mécaniques d'autre part.

Tout d'abord, ce statif s'est montré peu pratique d'utilisation. En effet, les réglages préalables au test, liés au positionnement de l'animal dans le statif, pouvaient parfois être très fastidieux, et chronophages. Au temps de positionnement et d'adaptation du statif à la taille de l'animal, s'ajoutait le temps de calibration des capteurs, procédure nécessaire lors de tous les tests, car la liaison capteurs-pédale se trouvait *de facto* modifiée pour chaque membre testé, en raison de la conception du bâti (liaison tiges filetées – boulons). Les anesthésies générales réalisées

pour ces tests duraient donc trois heures environ, dont beaucoup de temps de préparation, en comparaison du test proprement dit. Limiter le temps d'examen s'est donc avéré nécessaire, tant pour la faisabilité du test lui-même que pour les animaux GRMD, dont la tolérance à l'anesthésie générale n'est pas optimale.

La deuxième problématique soulevée par ce module est sa conception mécanique. Le premier point critique est celui de la position des capteurs. L'axe de mesure de ceux-ci est dirigé vers la partie haute de la pédale. Or la très grande majorité des chiens évalués présentaient une taille de segment métatarso-phalangien telle que cet axe était situé au dessus des doigts. Il est donc très probable que la force mesurée par les capteurs ait été sous-estimée, et probablement davantage chez les chiens de petite taille. Ainsi, il est possible que les difficultés rencontrées pour mesurer la tension générée par les secousses chez des chiens GRMD de petit gabarit soient liées à une perte d'information plutôt qu'à un manque de sensibilité des capteurs. La conception de la pédale a, elle aussi, sans doute, contribué à cette perte d'information. En effet, le déplacement autorisé par les roulettes durant la contraction entraîne une torsion contribuant également à distribuer la force produite dans un autre axe que celui des capteurs. De surcroît, la présence de ces roulettes et d'une pédale mobile n'est pas en adéquation avec la notion de mesure de force isométrique. Enfin, ce système de pédale sur roulettes introduit dans le système des forces de frottement et, peut-être, une inertie du système qui pourrait de ce fait rencontrer des difficultés à revenir en place après une contraction. L'existence d'une « mémoire » du système a été suspectée suite à l'observation de certains tracés dont le niveau post-tétanique ne ré-atteignait pas celui de la ligne de base pré-tétanique. Toutefois, un défaut de relaxation a été mis en évidence sur le muscle long péronier du chien GRMD (Kornegay et al. 1994), et pourrait également être à l'origine de ce type de tracés. La relaxation musculaire post-tétanique pourrait être évaluée dans un système de mesure sans forces de frottement, liées à l'autorisation d'un mouvement durant la contraction.

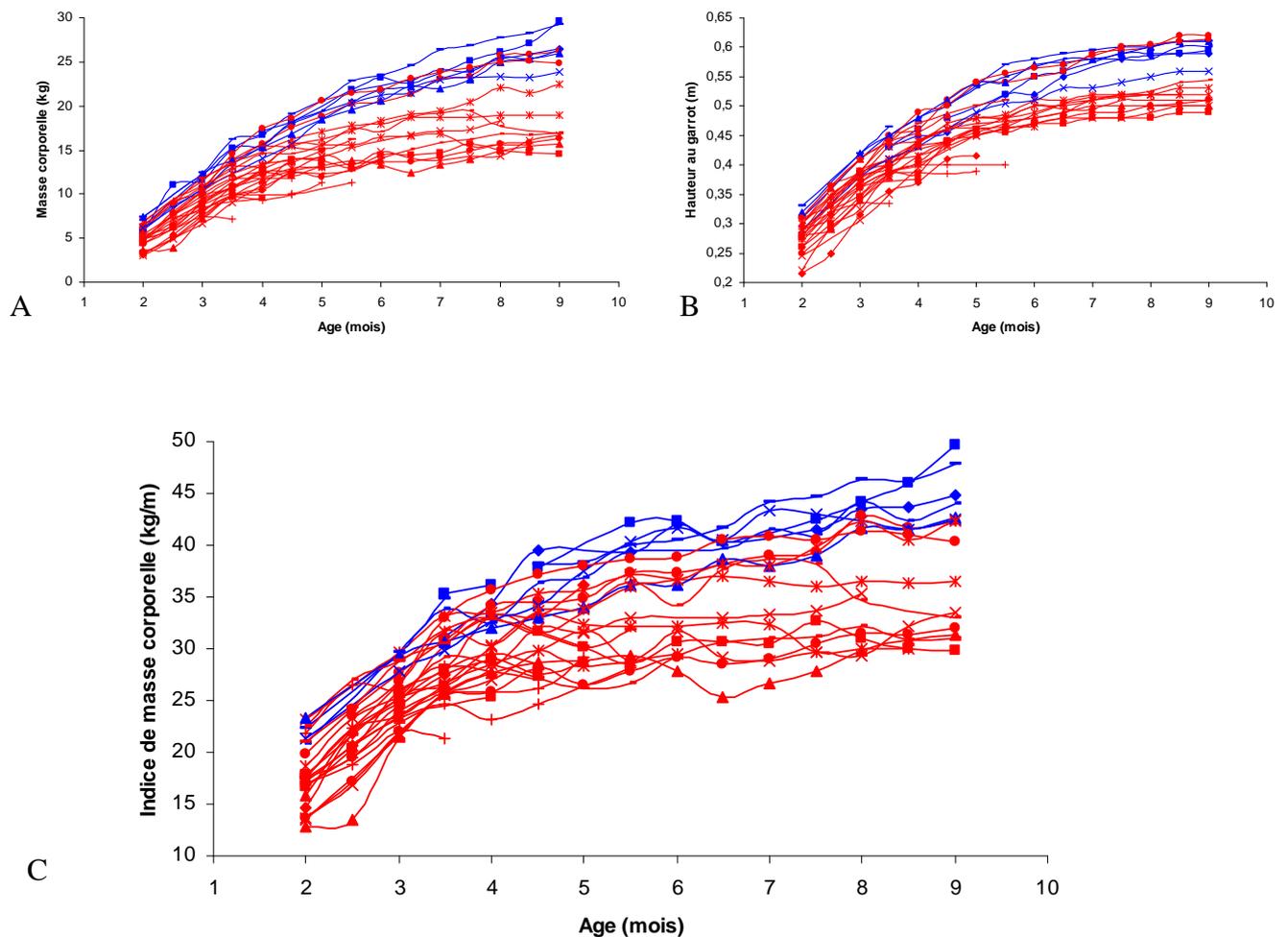
Toutes ces imperfections notées à l'usage de ce module de première génération ont conduit à l'élaboration d'un module de deuxième génération, menée en collaboration avec des étudiants de l'IFMA (Institut Français de Mécanique Avancée). La partie C. de ce chapitre traite des données obtenues avec ce statif.

Dans cette seconde partie du travail, une question méthodologique concernant le calcul de la force tétanique relative a également été soulevée. La normalisation de la force absolue par la masse corporelle est loin d'être un choix parfait, comme mentionné dans la littérature (Kornegay et al. 1999). La masse corporelle est, certes, une donnée facilement disponible et reflétant globalement le gabarit de l'animal. De plus, étant donné que les chiens GRMD

présentent généralement un retard statural en comparaison de leurs frères sains, il est évident qu'une normalisation par un indicateur de la taille de l'animal évalué est nécessaire, afin de ne pas introduire de différence simplement liée à la taille des animaux dans les résultats. Cependant, si les chiens GRMD sont plus petits et donc moins lourds que les chiens sains (figure 12), la différence de masse est plus importante que la différence de taille, en liaison avec l'atrophie musculaire, mais également avec l'état de maigreur fréquent chez ces animaux, lié à la dysphagie d'une part, et à des besoins énergétiques accrus d'autre part (données non publiées). A l'âge de 6 mois par exemple, les chiens GRMD sont très significativement plus légers ($p = 0.0007$), et, dans une moindre mesure, plus petits ($p = 0.0097$), comme en témoigne leur indice de masse corporelle (calculé en normalisant la masse corporelle par la hauteur au garrot), très significativement diminué ($p = 0.0008$) (figure 12). Il apparaît donc clairement qu'une normalisation par la masse corporelle présente le risque de minorer un écart avec les chiens sains, dans le cas d'une variable plus faible, telle que la force tétanique, ou au contraire de le majorer dans le cas d'une variable augmentée. Chez les patients, de nombreux indices staturaux ont été évalués, suivant leur capacité à prédire la force musculaire volontaire. Il a été clairement établi que des indices globaux tels que la masse corporelle ou la taille sont d'assez médiocre valeur dans ce domaine (Bamman et al. 2000), contrairement à d'autres mesures, plus indicatives de la taille du muscle testé, telles que circonférence du membre à un site anatomique particulier, longueur du membre (Li et al. 2010), ou volume du muscle (Bamman et al. 2000, Blazevich et al. 2009).

Ces éléments de méthodologie ont été pris en compte dans la partie C. : dans cette deuxième partie du travail, une force relative a été calculée en normalisant la force absolue par la longueur de la jambe (segment tibial) du chien testé.

Figure 12 : Déficit staturo-pondéral chez le chien GRMD : illustration par courbes de poids, de taille et d'indice de masse corporelle



A : évolution de la masse corporelle entre 2 et 9 mois chez des chiens GRMD (courbes rouges), en comparaison des chiens sains (courbes bleues) B : évolution de la hauteur au garrot entre 2 et 9 mois chez des chiens GRMD (courbes rouges), en comparaison des chiens sains (courbes bleues) C : évolution de l'indice de masse corporelle, calculé en rapportant la masse corporelle par la hauteur au garrot, entre 2 et 9 mois chez des chiens GRMD (courbes rouges), en comparaison des chiens sains (courbes bleues). Ces graphes montrent que les chiens GRMD sont plus petits et plus légers que les chiens sains, mais que leur indice de masse corporelle est également plus faible, ce qui indique schématiquement qu'ils sont « plus légers que petits ».

C. Etude sur le module de seconde génération

1) Matériel et méthode

a) Présentation du dispositif de mesure

Ont été choisis pour ce module des capteurs HBM ® PW6D. Ils différaient de ceux inclus dans le premier module puisqu'il s'agissait de capteurs de pesage dynamique à point d'appui central, dont l'intervalle de mesure était compris entre 0.5 et 3000 g. Le dispositif de mesure était donc constitué d'une pédale, fixe cette fois (figure 13, A.), assimilable à une balance très précise, de fréquence d'acquisition élevée. Les deux pesons étaient en effet fixés juste derrière la plaque verticale faisant office de pédale (figure 13, B.). Le montage des deux capteurs permettait d'obtenir une valeur de masse identique quel que soit l'endroit de la pédale où était appliquée la force, par simple moyennage des valeurs délivrées par les deux capteurs.

Le système ainsi conçu permettait donc de solutionner les problématiques soulevées précédemment. La perte d'information suspectée, probablement plus importante chez des animaux de petite taille, liée à la position haute des capteurs sur le premier module, devait être solutionnée par un montage indépendant du site d'exercice de la force. La pédale fixe et directement liée aux capteurs devait permettre de faire disparaître les forces de frottement, ainsi que les forces de torsion exercées sur les capteurs dans le premier module.

Les défauts d'ordre pratique constatés à l'usage du module de première génération ont également fait l'objet de corrections dans ce second statif. L'ensemble pédale-capteurs a été monté sur un chariot (figure 13, C.) relié à une glissière, dirigée dans l'axe cranio-caudal (figure 13, D.). D'un quart de tour de vis bouton (figure 13, E), l'opérateur était donc en mesure de déplacer puis de fixer l'ensemble à la position adéquate en fonction de la taille de l'animal considéré (longueur du tibia). L'ensemble glissière-chariot était lui-même mobile dans l'axe vertical, par un système de crémaillère (figure 13, F.) relié à une manivelle (figure 13, G), et bloquée par des freins à vis bouton (figure 13, H.), permettant une adaptation rapide de la hauteur de la pédale à la taille de l'animal à tester (longueur du fémur). Enfin, le contrôle d'éventuels mouvements médio-latéraux du genou et de la cuisse a été également simplifié, par l'utilisation d'un bras métallique insérable dans un système de fixation par vis bouton, situé sous la glissière horizontale, et porteur d'une attelle en aluminium flexible recouvert de mousse, permettant de créer simplement pour chaque animal un moule autour de la partie crâniale de la cuisse et de l'articulation du genou (figure 13, I.).

L'ensemble du statif a été fixé sur un chariot, monté sur roulettes à frein, et aisément positionnable en bout de table d'examen, afin d'éviter d'avoir à positionner le module sur cette même table. Ceci a permis un gain de temps et de place.

Comme dans le système précédent, les deux capteurs étaient reliés à des amplificateurs (Grass), puis à un système d'acquisition (iWorx 214). Les données ont été acquises dans le logiciel Labscribe.

Figure 13 : Module de mesure de force de deuxième génération : présentation du dispositif.

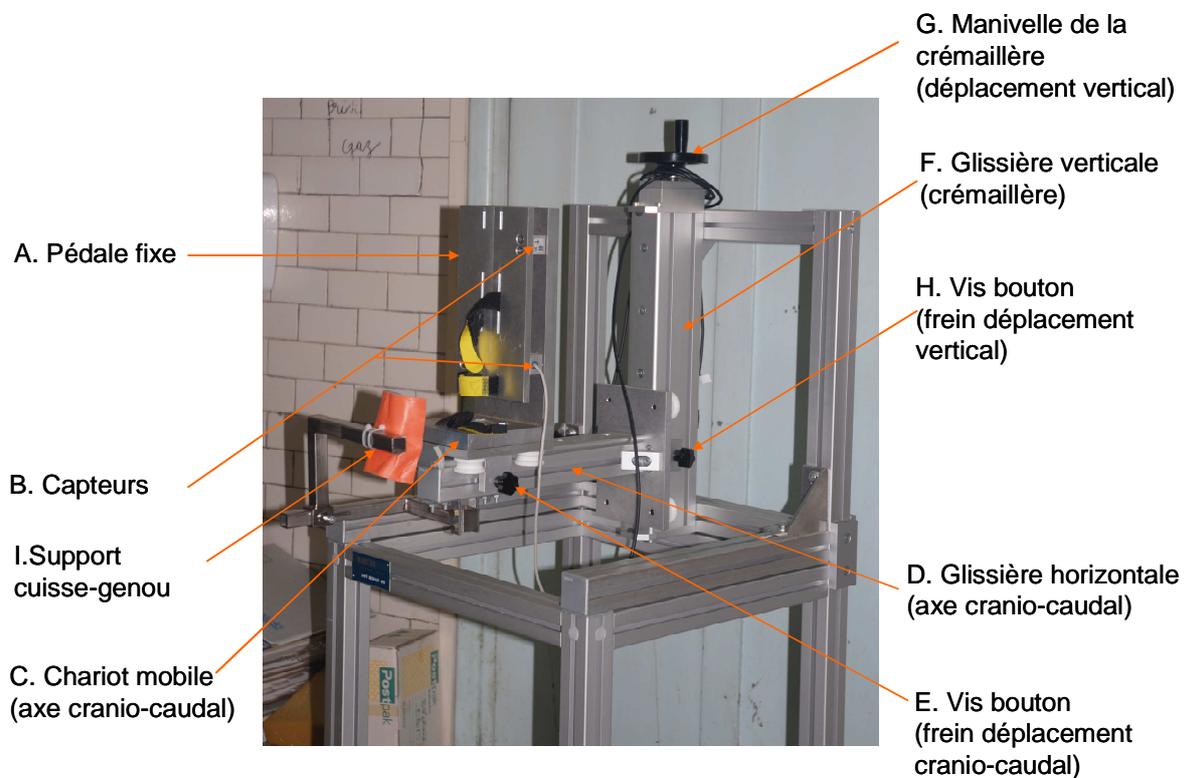


Photo légendée du module de deuxième génération, vu de trois-quarts.

b) Préparation et positionnement de l'animal

De la même façon que dans la procédure énoncée pour le premier module, le chien était placé sous anesthésie générale, en décubitus dorsal. Les articulations du genou et du tarse formant un angle d'environ 90°, le segment métatarso-phalangien était fixé à la pédale par serrage de bandes velcro non élastiques, l'une sur les métatarses, juste distalement au tarse, et l'autre au

niveau de l'articulation métatarso-palangienne. Une bande velcro, située au niveau des tendons des muscles de la jambe, était également serrée de manière à maintenir la position du segment tibial durant la contraction. Le moule en attelle flexible était ajusté autour de la cuisse et du genou, afin d'éviter d'éventuels mouvements parasites. Cette installation est illustrée par la photo de la figure 14.

Figure 14 : Photo du membre du chien en place dans le module de deuxième génération



Les capteurs n'étant jamais désolidarisés de la pédale, la calibration à chaque test s'est avérée ne plus être nécessaire. Une vérification régulière de la valeur indiquée par les capteurs était simplement effectuée.

Les modifications apportées dans ce module de seconde génération ont, comme cela était attendu, permis de réduire le temps d'examen de 3 à 2 heures, par un gain de temps sur le positionnement de l'animal et sur la calibration du système.

Les procédures de stimulation du nerf fibulaire, d'obtention d'une stimulation supramaximale, et le protocole de stimulation employé n'ont pas été modifiées dans cette étude. Tous ces

aspects étaient donc identiques à ceux énoncés plus haut pour le module de première génération.

La longueur du segment tibial (jambe) du chien testé a été mesurée systématiquement, membre en place dans le module, afin de disposer d'un indice anatomique de taille de l'animal.

b) Traitement des données

Le logiciel Labscribe a été utilisé pour le traitement des données. Afin de simplifier le recueil de celles-ci, une ligne supplémentaire a été créée dans la fenêtre d'acquisition, permettant d'obtenir en temps réel la moyenne du signal des deux capteurs. Ceci a permis un gain de temps sur l'analyse, puisque celle-ci était alors réduite à des mesures sur une seule trace au lieu de deux.

Les variables suivantes ont été extraites et analysées :

- *Le niveau de potentiation musculaire*

La valeur de cette variable a été obtenue par le calcul du pourcentage d'augmentation de la force entre la première et la dernière secousse de chacune des séquences de secousses en trains de 30 secondes, à 5 Hz.

- *La force tétonique maximale*

Cette variable a été calculée en moyennant la valeur de force tétonique obtenue lors de la première séquence de stimulations tétoniques. Il s'agit donc de la valeur moyenne de la force générée par six contractions tétoniques espacées d'une minute.

- *La force tétonique mesurée au cours des différentes séquences*

De la même façon que pour la force tétonique maximale, une moyenne des valeurs de force tétonique obtenues après chaque stimulation, et pour chacune des trois autres séquences a été calculée. Pour la dernière séquence, seuls les tétonos 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 et 40 ont été mesurés.

Les données brutes de force tétonique en kilogramme ont été converties en Newtons par multiplication par la valeur de l'accélération de la pesanteur terrestre, soit 9.81 m/s^2 ; la valeur

ainsi obtenue correspondant à la **force tétanique absolue**. Cette dernière a été normalisée, soit par la masse corporelle de l'individu (en kg), soit par la longueur de son segment tibial dans le module (en m), permettant alors d'obtenir deux valeurs de **force tétanique relative**, l'une en N/kg, l'autre en N/m.

- La fatigue musculaire au cours des différentes séquences

La valeur de cette variable a été obtenue en calculant ce que représentait le dernier tétanos de la séquence considérée, en pourcentage du premier.

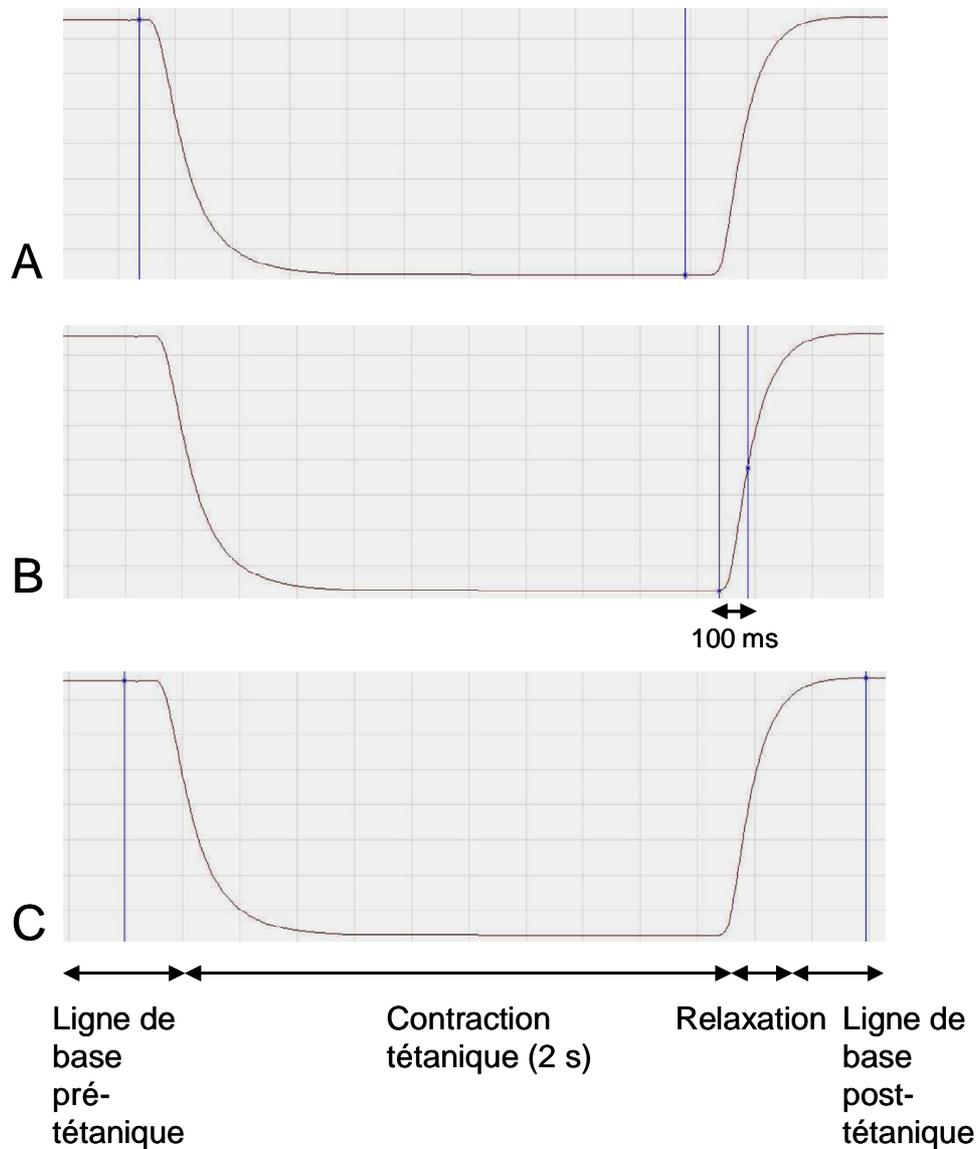
- Le niveau de relaxation post-tétanique à 100 ms

La valeur de cette variable a été obtenue en mesurant la différence entre la tension générée en fin de tétanos et celle générée 100 ms après la fin de celui-ci (durant la phase de relaxation). Ce niveau de relaxation à 100 ms a été exprimé soit en pourcentage de la force tétanique maximale, soit en pourcentage du niveau de relaxation post-tétanique. Ce niveau de relaxation à 100 ms a été mesuré pour chacun des tétanos de la première séquence, et la moyenne des six valeurs a été utilisée pour l'analyse. L'objectif de cette variable était de disposer d'un indice de vitesse de relaxation.

- Le niveau de contraction résiduelle post-tétanique

Cette variable a été calculée en mesurant le différentiel de tension entre le niveau de base pré-tétanique et le niveau de base post-tétanique. Elle a été exprimée en pourcentage de la force tétanique. Ce niveau de contraction résiduelle post-tétanique a été mesuré pour chacun des tétanos de la première séquence, et la moyenne des six valeurs a été utilisée pour l'analyse. L'objectif de cette variable était de disposer d'un indice du degré de relaxation post-tétanique.

Figure 15 : Analyse des tracés de force tétranique : mesure des différentes variables.



Exemple d'un tracé de téтанos (courbe noire) (copie d'écran de Labscribe). Les curseurs utilisés pour l'analyse sont les deux droites bleues. A : mesure de la valeur de force tétranique, B : mesure de la valeur de relaxation à 100 ms, C : mesure de la valeur de niveau de relaxation post-tétanique.

c) Animaux

Etude de répétabilité des mesures

Trois chiens mâles beagle sains et deux chiens GRMD (un mâle et une femelle GRMD) adultes (âge moyen chiens sains au premier test : 31.6 mois, écart-type : 0.03 mois ; âge moyen chiens GRMD au premier test : 11.7 mois, écart-type : 0.57 mois) ont été évalués, trois fois dans un intervalle de temps restreint (20 jours pour les chiens sains, et respectivement 20 et 9 jours pour les deux chiens GRMD).

Etude de comparaison des valeurs obtenues entre les deux modules

Deux chiens mâles golden retriever sains et deux chiens mâles GRMD, tous âgés de 4 mois ont été évalués sur le module de première génération, puis, sept jours plus tard, sur celui de seconde génération.

Etude de comparaison des chiens GRMD aux chiens sains, à différents âges

Etude à 4 mois

Quatre chiens mâles golden retriever sains, et 30 chiens mâles GRMD ont été évalués à l'âge de 4 mois (moyenne d'âge chiens sains : 4.22 mois, écart-type : 0.17 mois ; moyenne d'âge chiens GRMD : 4.13 mois, écart-type : 0.11 mois) (Tableau 13).

Etude à 6 mois

Quatre chiens mâles golden retriever sains et 11 chiens mâles GRMD ont été évalués à l'âge de 6 mois (moyenne d'âge chiens sains : 6.14 mois, écart-type : 0.09 mois ; moyenne d'âge chiens GRMD : 6.17 mois, écart-type : 0.11 mois) (Tableau 13)

Etude à 9 mois

Quatre chiens mâles golden retriever sains et 9 chiens mâles GRMD ont été évalués à l'âge de 9 mois (moyenne d'âge chiens sains : 9.19 mois, écart-type : 0.05 mois ; moyenne d'âge chiens GRMD : 9.40 mois, écart-type : 0.15 mois) (Tableau 13)

Une étude à 12 mois était initialement prévue, mais les résultats n'en seront pas présentés d'une part car seuls trois chiens GRMD ont pu être testés à cet âge, et d'autre part en raison de problèmes techniques de saturation du signal, qui seront évoqués plus en détail dans les résultats.

Les quatre chiens sains inclus à 4 mois ont pu être testés aux temps suivants, de manière à disposer de données longitudinales. Tous les chiens GRMD non impliqués dans un protocole thérapeutique durant la période de l'étude ont été inclus à l'âge de quatre mois, d'où le nombre important d'individus testés. Tous n'ont pas pu être examinés aux temps suivants, soit en raison de leur décès, soit d'une inclusion dans un protocole thérapeutique entre 4 et 6 mois. Tous les tests ont été effectués par le même opérateur.

Tableau 13 : Animaux inclus dans l'étude de mesure de force sur le module de seconde génération

Nom	Symbole (graphes)	Statut	Test à 4 mois	Test à 6 mois	Test à 9 mois
Dzer	△	Sain	X	X	X
Dzastre	○	Sain	X	X	X
Ckan	◆	Sain	X	X	X
Cbof	✖	Sain	X	X	X
Dickens	◆	GRMD	X		
Ercule	▲	GRMD	X		
Einstein	✖	GRMD	X		
Eiffel	+	GRMD	X		
Eaudvy	-	GRMD	X		
Ctrop	●	GRMD	X		
Ctar	✖	GRMD	X		
Eop	●	GRMD	X		
Eole	◆	GRMD	X		
Exon	◆	GRMD	X		
Extra	+	GRMD	X		
Excel	✖	GRMD	X		
Dspé	×	GRMD	X		
Dsir	▲	GRMD	X		
Dmo	◆	GRMD	X		
Dièse	▲	GRMD	X		
Discret	✖	GRMD	X		
Disco	×	GRMD	X		
E.T.	×	GRMD	X	X	
Dalton	◆	GRMD	X	X	
Dlire	-	GRMD	X	X	
Dmon	■	GRMD	X	X	X
Dluge	-	GRMD	X	X	X
Dlice	+	GRMD	X	X	X
Dk	●	GRMD	X	X	X
Didon	✖	GRMD	X	X	X
Dfois	×	GRMD	X	X	X
Cballot	▲	GRMD	X		X
Cbidon	+	GRMD	X	X	X
Dbrouille	■	GRMD	X	X	X

A droite du nom de chaque animal figure le symbole qui lui est propre et sera utilisé dans les graphes. Pour chacune des classes d'âge étudiées, une croix est

présente si le test a été réalisé. Si aucun test n'est disponible à un âge donné pour un animal donné, la case correspondante est grisée.

d) Analyse statistique

Evaluation de la répétabilité de la mesure

Une ANOVA à mesures répétées, avec deux effets intra (côté gauche ou droit, et jour de test) a été effectuée, afin de déterminer s'il existe une différence significative entre tests sur les mêmes animaux, sains ou GRMD.

Evaluation des différences de mesure entre les deux modules

Une ANOVA à mesures répétées à deux effets intra (côté, module) a été effectuée sur les valeurs de la première secousse et de la force tétanique maximale relative (N/kg), afin de déterminer s'il existe une différence significative entre les valeurs obtenues sur les deux générations de module.

Evaluation des différences chiens sains-chiens GRMD

Des ANOVA à mesures répétées avec le côté (gauche/droit) en tant qu'effet intra et le statut clinique (sain versus GRMD) en tant qu'effet inter ont été effectuées pour chaque tranche d'âge (4, 6 et 9 mois), sur chacune des variables préalablement énoncées, afin de déterminer l'effet de l'atteinte musculaire sur ces différents paramètres.

De la même façon, l'effet côté testé (gauche versus droite) a été examiné afin de déterminer si les deux membres postérieurs d'un même chien peuvent être comparés entre eux.

Evaluation de la corrélation des différentes variables au score clinique moteur des chiens GRMD

Des coefficients de corrélation de Pearson entre les différentes variables et le score clinique moteur ont été calculés, à chaque tranche d'âge, afin de déterminer si certaines variables peuvent être corrélées au phénotype clinique.

Evaluation de l'effet de l'âge sur les différentes variables

L'effet de l'âge sur l'évolution des différentes variables a été évalué chez les quatre chiens sains et huit chiens GRMD évalués à 4, 6 et 9 mois, par une ANOVA à mesures répétées à deux effets intra (côté et âge).

Le seuil de rejet de l'hypothèse nulle a été fixé à $p = 0.05$ pour l'ensemble des tests effectués.

2) Résultats

Les tracés obtenus avec ce module de seconde génération, de très bonne qualité dans l'ensemble, ont permis une analyse aisée des tracés. La sensibilité des capteurs s'est avérée importante, nuisant même parfois à la bonne lecture des tracés, puisque la trace du pouls était visible sur les courbes, pouvant constituer une gêne dans le cas de tracés de faible amplitude. Les mouvements respiratoires ont également parfois créé des artefacts sur les tracés. Ce problème avait déjà été constaté sur le premier module, mais représente un paramètre contrôlable puisqu'il est possible de mettre le chien en apnée au moment des contractions tétaniques.

Le principal problème rencontré à l'usage de ce second module est une saturation des tracés durant les contractions tétaniques chez les chiens sains adultes, dont la force dépasse alors la capacité maximale des capteurs. Ceci a donc empêché une analyse à 12 mois, initialement prévue. C'est également pour cette raison que des chiens beagle, plus petits donc *a priori* moins forts que des chiens Golden Retriever, ont été recrutés pour l'étude de répétabilité.

Par ailleurs, il est important d'indiquer, en préambule, que les potentiels d'action musculaires composés, enregistrés au cours des différents tests, étaient d'amplitude plus faible chez les chiens GRMD que chez les chiens sains. Cette différence s'est avérée significative à 4 et à 9 mois ($p < 0.0001$ et $p = 0.0047$ respectivement). L'étude de ces potentiels, sur le plan de leur amplitude, de leur durée et de leur aspect, pourrait faire l'objet d'une étude à part entière, mais il ne s'agit pas du sujet abordé ici. Seules ces constatations sur les différences d'amplitudes seront donc abordées.

a) Etude de répétabilité des mesures

L'ANOVA à mesures répétées montre qu'il existe un effet significatif ($p < 0.05$) du test chez les chiens sains, sur la valeur de force tétanique au cours des troisième et quatrième séquences (Tableau 14). Ce même effet sur les valeurs de force tétanique au cours des deux premières

séquences frôle la significativité. Ceci est à mettre en relation avec le fait que les trois chiens sains ont présenté une force supérieure au troisième test. Néanmoins, les coefficients de variation, bien que légèrement supérieurs à ceux calculés sur les deux chiens sains testés sur le module de première génération, restent dans des échelles de valeurs acceptables, décrites chez des patients (Edwards et al. 1987), exception faite de la valeur de fatigue, qui se montre extrêmement variable (coefficient de variation moyen = 47.8 %, écart-type = 25.9 %).

Aucun effet du test sur les valeurs obtenues chez les deux chiens GRMD n'a été démontrée par l'ANOVA à mesures répétées. Toutefois, les coefficients de variation sont plus élevés que pour les trois chiens sains, ce qui suggère que la variabilité d'un test à l'autre est supérieure chez les animaux malades. Ces coefficients de variation, bien que non négligeables, restent également dans les fourchettes de valeurs publiées chez des patients atteints de DMD (Edwards et al. 1987).

Tableau 14 : Evaluation de la répétabilité des mesures sur le module de seconde génération – résultats de l'analyse statistique

	FTM	FT ₂	FT ₃	FT ₄	Fatigue ₄	Potentiation ₁
Valeur de p (sains)	0.0591	0.0603	0.0283	0.0331	0.2325	0.7085
CV (%) (écart-type) (sains)	14.8 (6.4)	15.4 (6.1)	16.3 (6.3)	20.3 (9.6)	47.8 (25.9)	29.1 (20.2)
Valeur de p (sains)	0.6342	0.6006	0.6180	0.6880	0.6085	0.7094
CV (%) (écart-type) (sains)	22.4 (16.1)	22.4 (16.5)	23.0 (17.0)	24.1 (19.4)	23.5 (12.1)	28.5 (19.4)

Dans ce tableau figurent les résultats de l'ANOVA à mesures répétées et les coefficients de variations obtenus pour les trois tests répétés sur les trois chiens sains d'une part, et les deux chiens GRMD d'autre part, pour les principales variables étudiées. Abréviations : FTM : force tétanique maximale, FT₂ : force tétanique moyenne durant la deuxième séquence, FT₃ : force tétanique moyenne durant la troisième séquence, FT₄ : force tétanique moyenne durant la quatrième séquence, Fatigue₄ : fatigue au cours de la quatrième séquence, Potentiation₁ : potentiation musculaire au cours du premier train de secousses. Les valeurs de force tétaniques considérées dans ce tableau sont les valeurs absolues. Les résultats significatifs figurent en gras.

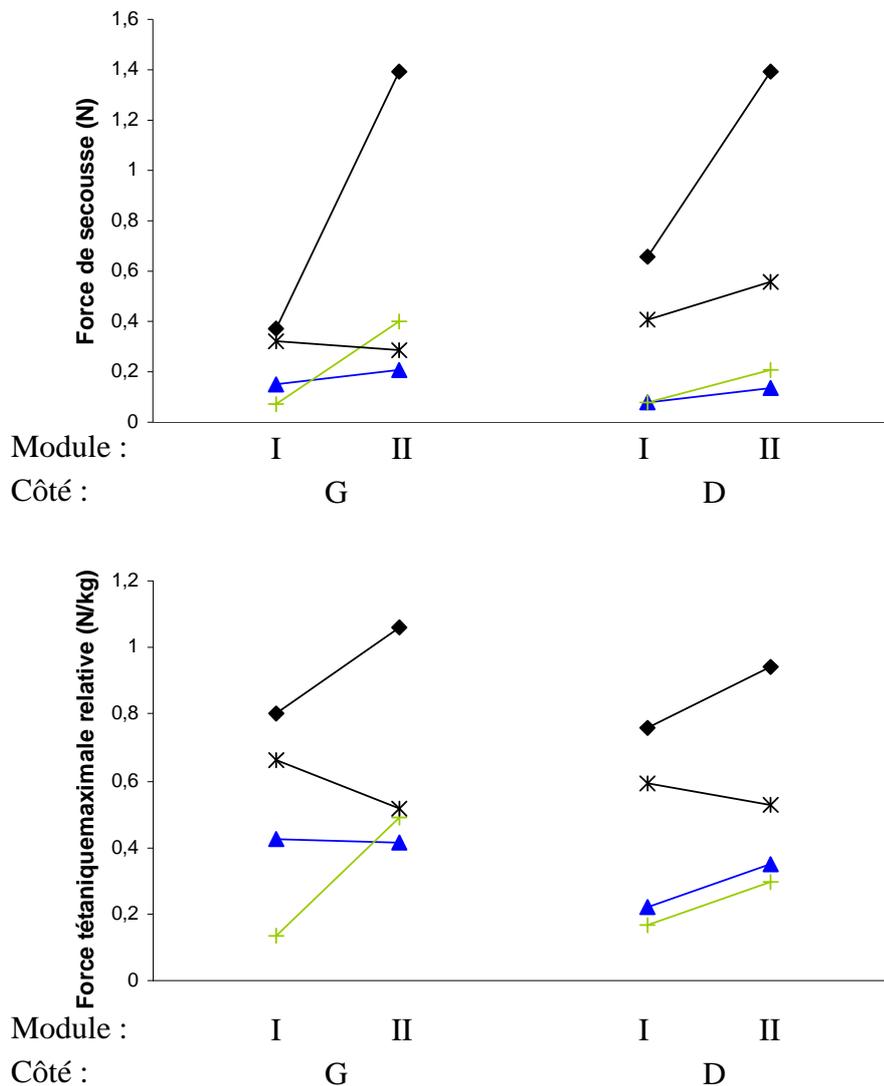
b) Etude de comparaison des valeurs obtenues entre les deux modules

Les deux chiens GRMD et sains de 4 mois évalués sur les deux modules ont globalement montré des valeurs supérieures sur le module de seconde génération, comme le montrent les moyennes figurant dans le tableau 15, ainsi que les graphes de la figure 16. Toutefois, l'ANOVA à mesures répétées n'a pas permis de détecter d'effet significatif du module sur les valeurs de force de secousse et de tétanos (Tableau 15).

Tableau 15 : Etude de comparaison des valeurs obtenues sur les deux générations de modules – résultats de l'analyse statistique.

	Première secousse (N)		Force tétanique maximale (N/kg)	
	Module I	Module II	Module I	Module II
Moyenne (écart-type) sains	0.44 (0.15)	0.91 (0.57)	0.70 (0.09)	0.76 (0.28)
Moyenne (écart-type) GRMD	0.09 (0.04)	0.24 (0.11)	0.24 (0.13)	0.39 (0.08)
Effet module sains (p =)	0.4579		0.7820	
Effet module GRMD (p =)	0.3463		0.3503	

Figure 16 : Comparaison des valeurs de force de secousse et de tétanos obtenues sur quatre chiens évalués sur les deux générations de modules



A : Valeurs comparées de force de secousse obtenues sur les deux générations de modules. B : Valeurs comparées de force tétonique relative obtenues sur les deux générations de module. Les deux chiens sains sont représentés par des symboles noirs, et les deux chiens GRMD par des symboles de couleur, suivant la correspondance indiquée dans le tableau 13. Pour chaque module (première génération : I ; seconde génération : II) sont indiquées les valeurs obtenues sur le postérieur gauche (partie gauche des graphes), et le postérieur droit (partie droite des graphes).

c) Etude des caractéristiques de force musculaire du chien GRMD, par comparaison au chien sain, à différents âges.

Etude à 4 mois

Force tétanique

Comme sur le précédent module, les valeurs de force tétanique absolue obtenues au cours des différentes séquences chez les chiens GRMD sont significativement plus faibles que chez les chiens sains. Il est néanmoins intéressant de noter que l'écart de moyenne entre les deux groupes est plus réduit que ce qui a été décrit précédemment sur le premier module. Ainsi, chez les chiens sains, la valeur moyenne de force tétanique maximale absolue est ici de 10.58 N (écart-type : 5.06 N), soit légèrement supérieure à celle obtenue avec le premier module (9.67 N, écart-type : 2.86 N). La force tétanique maximale mesurée pour les chiens GRMD représente quant à elle le double (moyenne : 6.93 N, écart-type : 3.24 N) de celle obtenue avec le premier module (moyenne : 3.35 N, écart-type : 1.37 N). Les chiens GRMD, dont la force absolue était estimée à seulement un tiers de celle d'un chien sain, est ici estimée aux deux tiers de celle-ci.

La normalisation par la masse corporelle réduisant encore ce faible écart, l'effet groupe sur la force tétanique relative exprimée en N/kg n'est plus significatif suite aux mesures obtenues sur la deuxième génération de module ($p = 0.2004$). Ces données en N/kg ne sont pas présentées dans les tableaux de résultats, dans lesquels la valeur relative en N/m a été privilégiée, pour les raisons méthodologiques énoncées plus haut (3)). La force tétanique relative, exprimée en N/m (normalisation par la longueur du segment tibial) reste d'ailleurs significativement supérieure chez les chiens sains ($p = 0.0246$ pour la force tétanique maximale). Le tableau 16 indique les résultats obtenus pour la force tétanique absolue, qui, comme sur le module de première génération, reste significativement inférieure chez les chiens GRMD ($p = 0.0206$), et pour la force tétanique relative exprimée en N/m.

Les graphes de la figure 17 illustrent ces différents aspects. Ils montrent également qu'il existe une zone importante de superposition entre les deux populations, quel que soit le paramètre considéré. La très importante dispersion de la population GRMD est également notable, et la question d'une corrélation à l'état clinique des animaux a été soulevée. Un coefficient de corrélation de Pearson a été calculé, démontrant qu'aucune corrélation n'existe

entre le score clinique moteur et les différentes valeurs de force tétanique ($p > 0.05$ pour toutes les corrélations ; $r = 0.15$, $p = 0.4393$ pour la corrélation à la force tétanique maximale relative (N/m, côté gauche)). Par ailleurs, un animal sain (Ckan) montre une force très supérieure à celle des trois autres animaux. Cet animal était le plus lourd (17.15 kg) du groupe de chiens sains (moyenne : 15,7 kg, écart-type : 1.3 kg), et celui dont le segment tibial était le plus long (24 cm, versus moyenne du groupe : 21.7 cm, écart-type : 1.8 cm). Cependant, cet écart, bien que réduit, persiste après normalisation par la masse ou la longueur de la jambe. Un autre piste d'explication serait une différence d'âge, puisqu'il s'agit, à 4.4 mois, du chien le plus âgé du groupe (moyenne : 4.2 mois, écart-type : 0.17 mois).

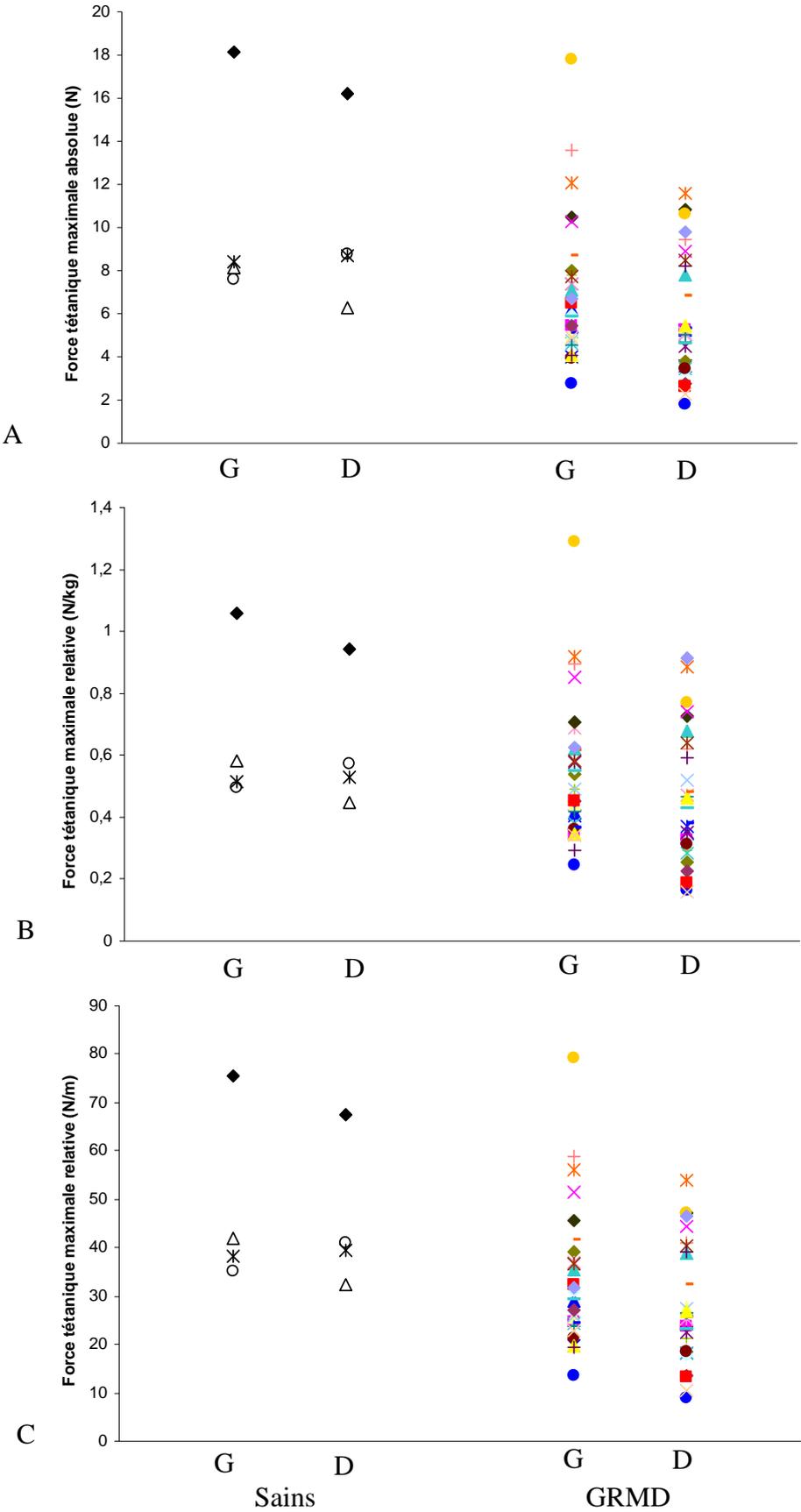
Le dernier point évalué par l'ANOVA à mesures répétées concerne l'effet du côté testé. Chez les chiens GRMD, cet effet est significatif ($p < 0.05$), quelle que soit la séquence considérée. Ceci n'est pas le cas chez les animaux sains.

Tableau 16 : Résultats des mesures de forces tétaniques et de l'analyse statistique à 4 mois

	Séquence 1				Séquence 2				Séquence 3				Séquence 4			
	FTa (N)		FTr (N/m)		FTa (N)		FTr (N/m)		FTa (N)		FTr (N/m)		FTa (N)		FTr (N/m)	
	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D
Moy (ET) Sains	10.58 (5.06)	9.98 (4.28)	47.8 (18.9)	45.0 (15.4)	10.52 (4.54)	9.76 (4.23)	47.5 (16.4)	44.0 (15.2)	10.06 (4.07)	9.48 (4.05)	45.5 (14.5)	42.7 (14.5)	8.57 (2.06)	8.15 (3.33)	39.1 (6.3)	36.8 (11.8)
Moy (ET) GRMD	6.93 (3.24)	5.84 (2.75)	33.3 (13.9)	28.1 (12.2)	6.60 (3.04)	5.52 (2.57)	31.7 (13.1)	26.6 (11.4)	3.89 (1.33)	4.10 (0.96)	29.0 (11.9)	24.8 (10.4)	4.47 (2.13)	3.78 (1.64)	21.5 (9.2)	18.2 (7.2)
P (statut)	0.0206		0.0246		0.0104		0.0116		0.0045		0.0044		0.0001		< 0.0001	
P (côté) GRMD	0.0134		0.0121		0.0117		0.0105		0.0251		0.0232		0.0397		0.0358	
P (côté) sain	0.0976		0.5084		0.0913		0.2057		0.0867		0.2878		0.0683		0.5025	

Pour chaque séquence et chaque côté (droit ou gauche), sont indiquées la moyenne et l'écart-type dans chaque population, pour la force tétanique relative (N/m) et absolue. Les résultats de l'analyse statistique sont donnés pour l'effet groupe (GRMD vs Sain), et l'effet côté (droite vs gauche) dans chacune des deux populations. Abréviations : FTa : force tétanique absolue, FTr : force tétanique relative, G : gauche, D : droite, Moy : moyenne, ET : écart-type. Les résultats significatifs figurent en gras.

Figure 17 : Force tétanique maximale à 4 mois, mesurée avec le module de deuxième génération : comparaison entre chiens sains et GRMD



A : Valeurs de force tétanique maximale absolue (N) obtenues chez les chiens sains et GRMD B : Valeurs de force tétanique maximale relative (N/kg), obtenues chez les chiens sains et GRMD. C : Valeurs de force tétanique maximale relative (N/m), obtenues chez les chiens sains et GRMD. Sur les trois graphes, les chiens sains sont représentés sur la gauche (symboles noirs), et les chiens GRMD sur la droite (symboles de couleur). Pour chaque population, sont représentées les valeurs obtenues pour le postérieur gauche (G), et pour le postérieur droit (D). Les symboles utilisés correspondent chacun à un animal et cette correspondance figure dans le tableau 13.

Fatigue musculaire

Comme précédemment décrit sur le module de première génération, la fatigue musculaire est négligeable au cours des deux premières séquences, ainsi qu'au cours de la troisième pour les chiens sains (tableau 17). Les chiens GRMD commencent à montrer une fatigue discrète, mais significativement plus importante que les chiens sains à la troisième séquence ($p = 0.0030$). Cette tendance se confirme au cours de la quatrième séquence, durant laquelle les chiens des deux groupes fatiguent très nettement, mais les chiens GRMD de manière significativement plus marquée ($p = 0.0022$). Ainsi, le niveau de fatigue au cours de cette dernière séquence de stimulations représente en moyenne, pour le postérieur gauche des chiens GRMD, le double de celle mesurée chez les chiens sains (moyenne chiens GRMD : 31.9 %, écart-type 9.0 %, moyenne chiens sains : 14.1 %, écart-type : 12.6 %). Le graphe de la figure 18 illustre cette différence et montre également que, comme pour la force tétanique maximale, il existe une nette superposition des deux populations, certains chiens GRMD montrant un niveau de fatigue normal. Une fois encore, l'importante dispersion de la population de chiens GRMD n'a pas pu être mise en relation avec le degré d'atteinte motrice, mesuré par le score clinique moteur, puisque le coefficient de corrélation de Pearson entre ces deux variables ne s'élève qu'à $r = -0.32$ ($p = 0.0989$) (fatigue au cours de la quatrième séquence, postérieur gauche).

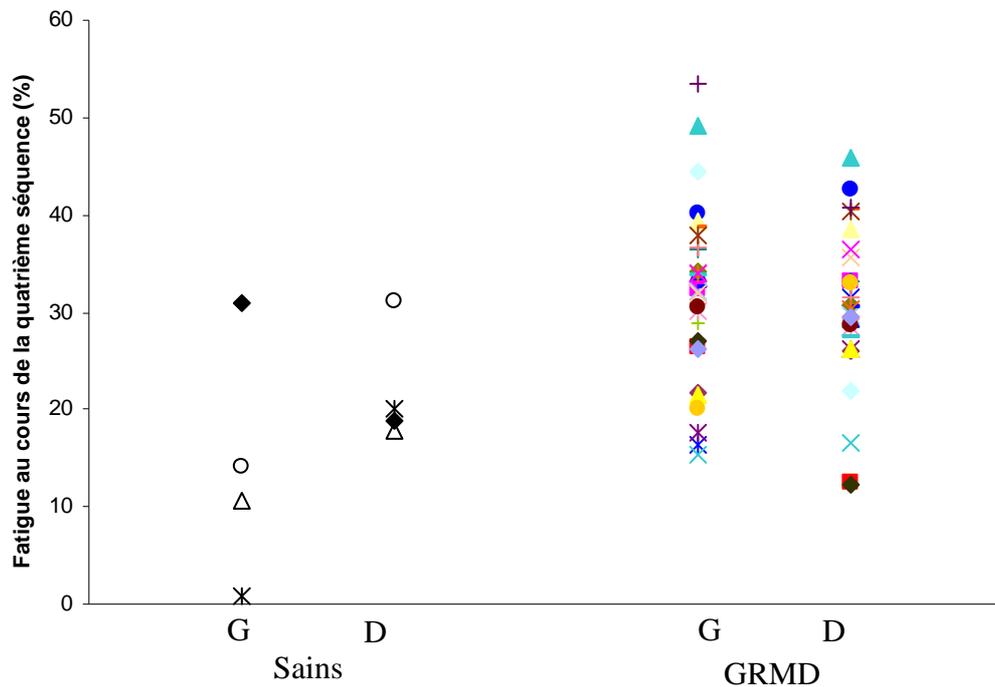
Enfin, aucun effet du côté testé n'a pu être démontré par l'ANOVA à mesures répétées, que ce soit chez les chiens sains ou chez les chiens GRMD.

Tableau 17 : Résultats des mesures de fatigue, et de l'analyse statistique à 4 mois

	Fatigue séquence 1 (%)		Fatigue séquence 2 (%)		Fatigue séquence 3 (%)		Fatigue séquence 4 (%)	
	G	D	G	D	G	D	G	D
Moy (ET) Sains	1.3 (2.0)	1.3 (2.0)	3.2 (1.9)	0.6 (1.5)	1.7 (2.1)	-0.3 (1.0)	14.1 (12.6)	22.0 (6.2)
Moy (ET) GRMD	1.6 (3.4)	2.8 (7.1)	4.6 (4.6)	4.4 (4.1)	8.1 (6.1)	6.0 (3.5)	31.9 (9.0)	30.7 (7.9)
P (statut)	0.7035		0.1568		0.0030		0.0022	
P (côté) GRMD	0.3588		0.8093		0.0707		0.4180	
P (côté) sain	0.9533		0.0817		0.0601		0.3527	

Pour chaque séquence et chaque côté (droit ou gauche), sont indiquées la moyenne de fatigue et l'écart-type dans chaque population. Les résultats de l'analyse statistique sont donnés pour l'effet groupe (GRMD vs Sain), et l'effet côté (droite vs gauche) dans chacune des deux populations. Abréviations : G : gauche, D : droite, Moy : moyenne, ET : écart-type. Les résultats significatifs figurent en gras.

Figure 18 : Fatigue à la quatrième séquence, mesurée avec le module de deuxième génération à 4 mois : comparaison entre chiens sains et GRMD



Les chiens sains sont représentés sur la gauche (symboles noirs), et les chiens GRMD sur la droite (symboles de couleur). Pour chaque population, sont représentées les valeurs de fatigue obtenues pour le postérieur gauche (G), et pour le postérieur droit (D), au cours de la dernière séquence de stimulations. Les symboles utilisés correspondent chacun à un animal et cette correspondance figure dans le tableau 13.

Potentiation musculaire

Les résultats de potentiation musculaire à l'issue des séquences de stimulations répétées de type secousse, obtenus dans les deux groupes à l'âge de 4 mois montrent qu'il existe un défaut de potentiation chez les chiens GRMD à cet âge (tableau 18). Leur niveau de potentiation au cours de la première séquence de stimulations est en effet très significativement inférieur ($p = 0.0006$). L'écart entre les deux populations est moindre au cours de la deuxième séquence, les chiens sains présentant une potentiation moins importante, car maintenant un niveau de force élevé à la première secousse, une minute après la fin du premier train. La différence entre les deux groupes reste cependant significative ($p = 0.0173$).

Ces données confirment la tendance annoncée par les résultats obtenus à 4 mois sur le premier module. Le graphe de la figure 19 montre qu'il existe de nouveau une superposition entre les

deux populations, principalement liée à un animal sain (Ckan), montrant un niveau de potentiation assez faible. L'importante dispersion de la population GRMD n'a de nouveau pas pu être mise en relation avec l'état clinique des animaux (coefficient de Pearson entre score moteur et potentiation au cours de la première séquence : $r = 0.13$; $p = 0.4959$ (postérieur gauche)).

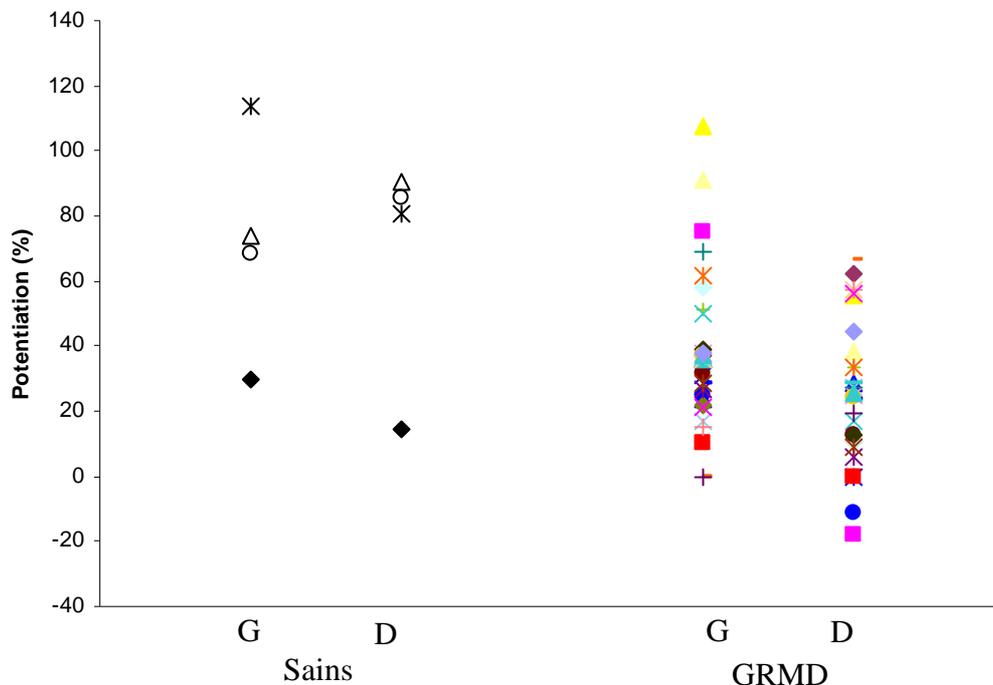
Aucun effet du côté testé n'a été mis en évidence par l'ANOVA à mesures répétées (tableau 18)

Tableau 18 : Résultats des mesures de potentiation musculaire, et de l'analyse statistique à 4 mois

	Potentiacion séquence 1 (%)		Potentiacion séquence 2 (%)	
	G	D	G	D
Moy (ET) Sains	71.3 (34.4)	67.8 (35.6)	49.1 (24.9)	40.2 (15.6)
Moy (ET) GRMD	37.9 (24.4)	26.1 (21.7)	28.0 (15.0)	24.7 (18.1)
p (statut)	0.0006		0.0173	
p (côté) GRMD	0.0546		0.3856	
p (côté) sain	0.8005		0.3140	

Pour chacune des deux séquences et chaque côté (droit ou gauche), sont indiquées la moyenne de potentiacion et l'écart-type dans chaque population. Les résultats de l'analyse statistique sont donnés pour l'effet groupe (GRMD vs Sain), et l'effet côté (droite vs gauche) dans chacune des deux populations. Abréviacions : G : gauche, D : droite, Moy : moyenne, ET : écart-type. Les différences significatives figurent en gras.

Figure 19 : Potentiation musculaire au cours de la première séquence de secousses à 4 mois, mesurée avec le module de deuxième génération : comparaison entre chiens sains et GRMD



Les chiens sains sont représentés sur la gauche (symboles noirs), et les chiens GRMD sur la droite (symboles de couleur). Pour chaque population, sont représentées les valeurs de potentiation au cours de la première séquence de secousses, obtenues pour le postérieur gauche (G), et pour le postérieur droit (D). Les symboles utilisés correspondent chacun à un animal et cette correspondance figure dans le tableau 13.

Relaxation musculaire

Comme le suggèrent les graphes de la figure 20, ainsi que les résultats de moyenne obtenus sur les trois paramètres de relaxation, le niveau de relaxation des chiens GRMD 100 ms après la fin du tétanos est inférieur à celui des chiens sains. Les animaux sains ont en effet atteint, après 100 ms, 50.0 % de relaxation en moyenne (postérieur gauche, écart-type : 2.8 %), tandis que les chiens GRMD n'en sont en moyenne qu'à 43.8 %. Cette différence, bien que non significative ($p = 0.0779$), suggère que les chiens GRMD présentent une relaxation moins rapide que les chiens sains. Lorsque ce même niveau de relaxation à 100 ms est exprimé, cette fois, en proportion du niveau de relaxation post-tétanique, la différence entre les deux groupes, bien que persistante, s'atténue (tableau 19, figure 20). Ceci peut être mis en relation

avec un niveau de contraction résiduelle post-tétanique plus important chez les chiens GRMD, sans que cette différence soit significative. Proche de la nullité chez les chiens sains, cette variable est en moyenne de quelques pourcents (moyenne : 4.38 % pour le postérieur gauche, écart-type : 7.13 %) chez les chiens GRMD, atteignant des valeurs très élevées pour certains individus (figure 20). Cette dernière observation peut d'ailleurs être faite pour les trois variables étudiées : si une grande partie des chiens GRMD étudiés montrent des valeurs normales ou subnormales (expliquant que les différences observées ne soient pas significatives), quelques individus montrent une vitesse de relaxation et un niveau de relaxation post-tétanique très diminués (figure 20). Il est intéressant de noter qu'ici, les corrélations avec le score clinique moteur, bien que peu fortes, sont significatives : la relaxation à 100 ms en pourcentage de la force tétranique est inversement corrélée au score clinique moteur ($r = -0.45$, $p = 0.0165$, pour le postérieur droit), et inversement, le niveau de contraction résiduelle post-tétanique est positivement corrélé à ce même score clinique moteur ($r = 0.51$, $p = 0.0052$). Les animaux les plus touchés à 4 mois montrent donc des propriétés de relaxation altérées.

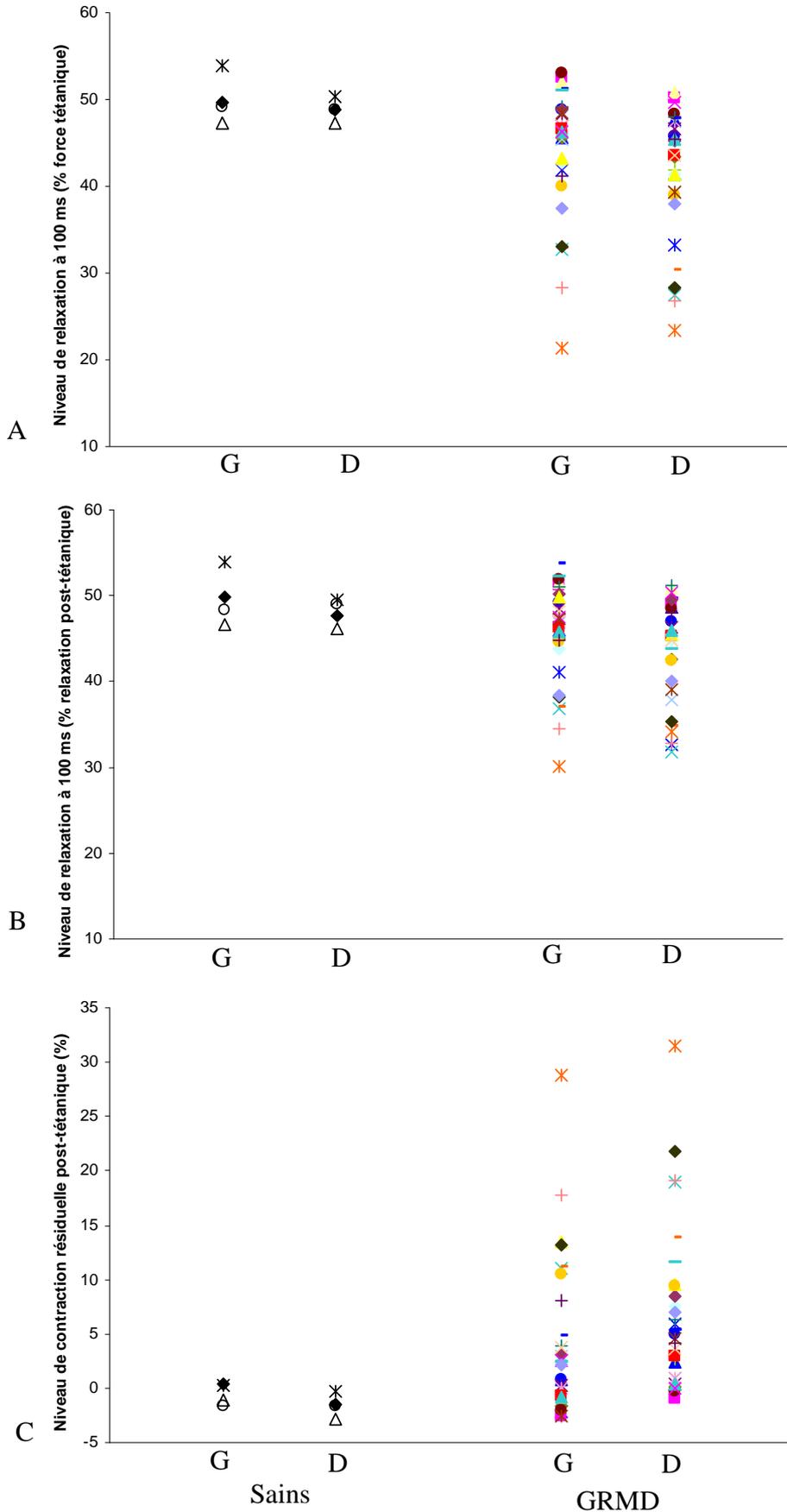
Ces mêmes animaux sont très probablement à l'origine d'un effet du côté significatif chez les chiens GRMD, comme le montrent les différences observées entre leurs postérieurs droit et gauche, illustrées dans les graphes de la figure 20.

Tableau 19 : Résultats des mesures de niveaux de relaxation à 100 ms et de contraction résiduelle post-tétaniques et de l'analyse statistique à 4 mois

	Relaxation 100 ms (% force tétranique)		Relaxation 100 ms (% niveau post-tétanique)		Niveau de contraction résiduelle post-tétanique (%)	
	G	D	G	D	G	D
Moy (ET) Sains	50.0 (2.8)	48.8 (1.2)	49.7 (3.1)	48.1 (1.5)	-0.52 (0.98)	-1.55 (1.06)
Moy (ET) GRMD	43.8 (7.6)	41.3 (7.6)	45.5 (5.8)	43.5 (6.1)	4.38 (7.13)	6.78 (7.67)
p (statut)	0.0779		0.1386		0.0791	
p (côté) GRMD	0.0004		0.0042		0.0007	
p (côté) sain	0.2418		0.2298		0.0998	

Pour chacune des variables et chaque côté (droit ou gauche), sont indiquées la moyenne et l'écart-type dans chaque population, pour la relaxation à 100 ms, exprimée en pourcentage de la force tétanique ou du niveau de relaxation post-tétanique, et le niveau de contraction résiduelle post-tétanique, exprimé en pourcentage de la force tétanique. Les résultats de l'analyse statistique sont donnés pour l'effet groupe (GRMD vs Sain), et l'effet côté (droite vs gauche) dans chacune des deux populations. Abréviations : G : gauche, D : droite, Moy : moyenne, ET : écart-type. Les résultats significatifs figurent en gras.

Figure 20 : Niveaux de relaxation à 100 ms et de contraction résiduelle post-tétaniques à 4 mois : comparaison entre chiens sains et GRMD



A : Valeurs de niveau de relaxation post-tétanique après 100 ms, en pourcentage de la force tétanique B : Valeurs de niveau de relaxation post-tétanique après 100 ms, en pourcentage du niveau de relaxation post-tétanique C : Valeurs de niveau de contraction résiduelle post-tétanique, en pourcentage de la force tétanique, obtenues chez les chiens sains et GRMD. Sur les trois graphes, les chiens sains sont représentés sur la gauche (symboles noirs), et les chiens GRMD sur la droite (symboles de couleur). Pour chaque population, sont représentées les valeurs obtenues pour le postérieur gauche (G), et pour le postérieur droit (D). Les symboles utilisés correspondent chacun à un animal et cette correspondance figure dans le tableau 13.

Etude à 6 mois

Force tétanique

A l'âge de 6 mois, les mesures de force tétanique réalisées avec le module de seconde génération montrent, comme avec le précédent, que les chiens GRMD présentent une force tétanique effondrée, en comparaison des animaux sains. Ceci est vrai pour les valeurs de force tétanique absolue, et relatives, que ce soit en N/kg ou en N/m ($p < 0.01$ pour l'ensemble des valeurs obtenues, à chacune des séquences de stimulations) (tableau 20). Comme à l'âge de 4 mois, mais de façon encore plus marquée, les valeurs moyennes obtenues dans les deux populations sur ce module sont très nettement supérieures à celles obtenues avec le précédent statif. Ainsi, la valeur moyenne obtenue chez les chiens GRMD représente quasiment le double (moyenne premier module (force tétanique maximale postérieur gauche) : 4.56 N, écart-type : 1.16 N ; moyenne second module : 7.32 N, écart-type : 3.94 N), de même que celle obtenue chez les chiens sains (moyenne premier module (force tétanique maximale postérieur gauche) : 13.12 N, écart-type : 0.65 N ; moyenne second module : 24.60 N, écart-type : 12.29 N). Par ailleurs, les deux populations décrites par les mesures obtenues sur cette seconde génération de module apparaissent beaucoup plus dispersées (figure 21), comme en témoignent les coefficients de variation s'élevant à 49.9 % pour les chiens sains (4.95 % avec le précédent module) et à 53.8 % chez les chiens GRMD (25.4 % avec le précédent module).

La dispersion de la population GRMD n'est pas corrélée à l'hétérogénéité clinique mesurée par le score clinique moteur, comme le montre le coefficient de Pearson calculé entre la force tétanique maximale relative (N/m) et le score clinique moteur ($r = -0.03$, $p = 0.9272$ (postérieur gauche)).

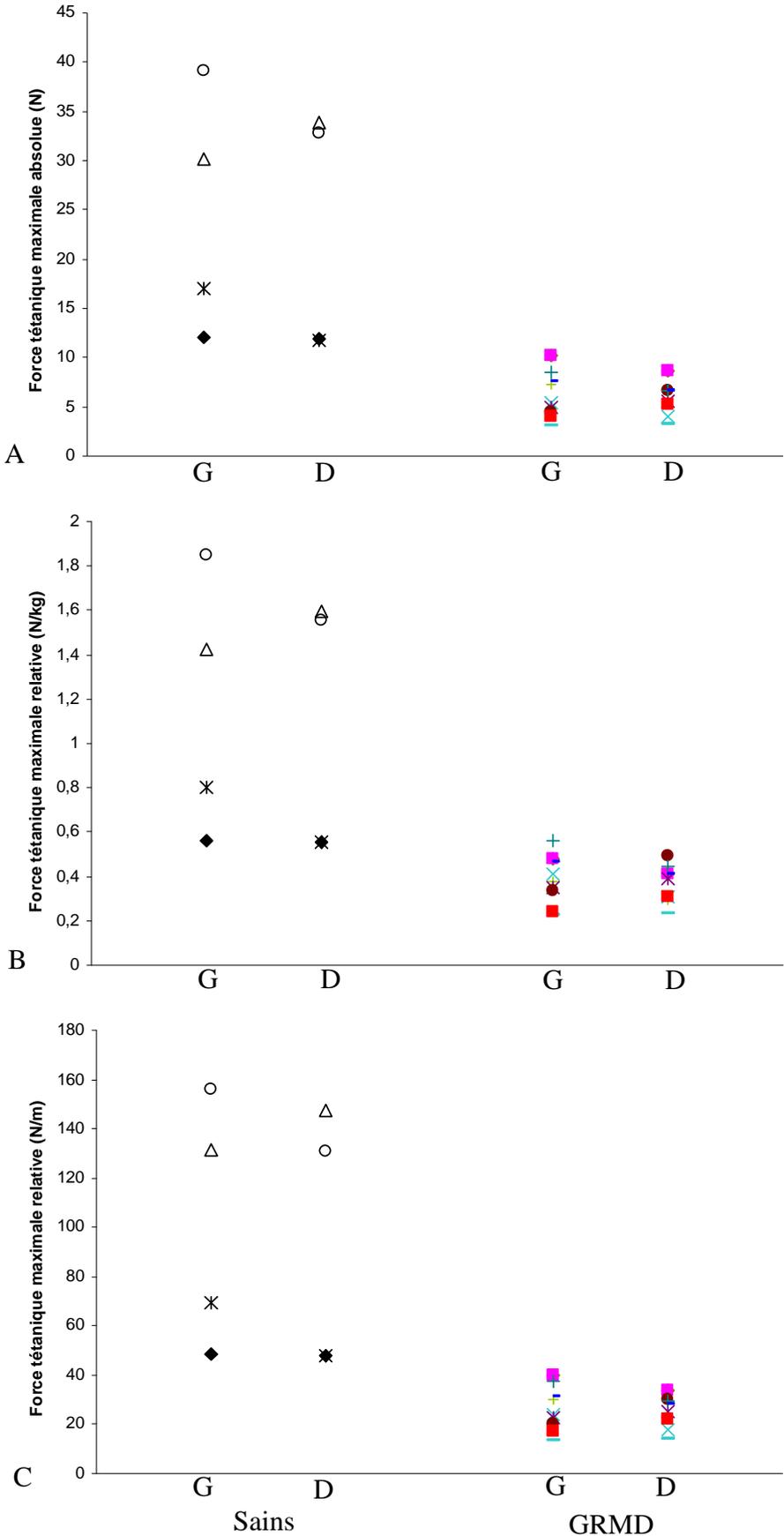
Enfin, l'effet du côté testé, significatif chez les chiens GRMD à 4 mois, n'est plus, ici, mis en évidence par l'ANOVA à mesures répétées (tableau 20).

Tableau 20 : Résultats des mesures de force tétanique et de l'analyse statistique à 6 mois

	Séquence 1				Séquence 2				Séquence 3				Séquence 4			
	FTa (N)		FTr (N/m)		FTa (N)		FTr (N/m)		FTa (N)		FTr (N/m)		FTa (N)		FTr (N/m)	
	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D
Moy (ET) Sains	24.60 (12.29)	22.57 (12.40)	101.4 (50.7)	93.4 (53.1)	23.68 (11.84)	21.60 (12.40)	97.6 (48.8)	89.5 (53.1)	22.83 (11.50)	21.09 (11.82)	94.1 (47.3)	87.4 (50.7)	19.52 (10.25)	18.83 (10.42)	80.2 (41.4)	77.9 (44.3)
Moy (ET) GRMD	7.32 (3.94)	6.61 (2.90)	31.6 (17.7)	28.5 (13.1)	7.08 (3.78)	6.33 (2.79)	30.5 (17.0)	27.4 (12.7)	6.57 (3.60)	6.00 (2.70)	28.3 (16.1)	25.9 (12.3)	5.47 (2.99)	4.98 (2.50)	23.6 (13.4)	21.6 (11.5)
P (statut)	0.0008		0.0012		0.0009		0.0013		0.0007		0.0011		0.0006		0.0009	
P (côté) GRMD	0.1584		0.1726		0.1517		0.1650		0.2824		0.2998		0.2552		0.2719	
P (côté) sain	0.4458		0.4699		0.4676		0.4933		0.5162		0.5459		0.7919		0.8330	

Pour chaque séquence et chaque côté (droit ou gauche), sont indiquées la moyenne et l'écart-type dans chaque population, pour la force tétanique relative (N/m) et absolue. Les résultats de l'analyse statistique sont donnés pour l'effet groupe (GRMD vs Sain), et l'effet côté (droite vs gauche) dans chacune des deux populations. Abréviations : FTa : force tétanique absolue, FTr : force tétanique relative, G : gauche, D : droite, Moy : moyenne, ET : écart-type. Les résultats significatifs figurent en gras.

Figure 21 : Force tétanique maximale à 6 mois, mesurée avec le module de deuxième génération : comparaison entre chiens sains et GRMD



A : Valeurs de force maximale tétanique absolue (N) obtenues chez les chiens sains et GRMD B : Valeurs de force maximale tétanique relative (N/kg), obtenues chez les chiens sains et GRMD. C : Valeurs de force maximale tétanique relative (N/m), obtenues chez les chiens sains et GRMD. Sur les trois graphes, les chiens sains sont représentés sur la gauche (symboles noirs), et les chiens GRMD sur la droite (symboles de couleur). Pour chaque population, sont représentées les valeurs obtenues pour le postérieur gauche (G), et pour le postérieur droit (D). Les symboles utilisés correspondent chacun à un animal et cette correspondance figure dans le tableau 13.

Fatigue musculaire

La fatigue musculaire, démontrée comme augmentée au cours des deux dernières séquences chez les chiens GRMD à l'âge de 4 mois, n'est, deux mois plus tard, plus significativement différente de celle des chiens sains (tableau 21). Ceci correspond à la tendance dessinée par les résultats obtenus avec le premier module. Le graphe de la figure 22 confirme une très nette superposition des deux groupes d'animaux.

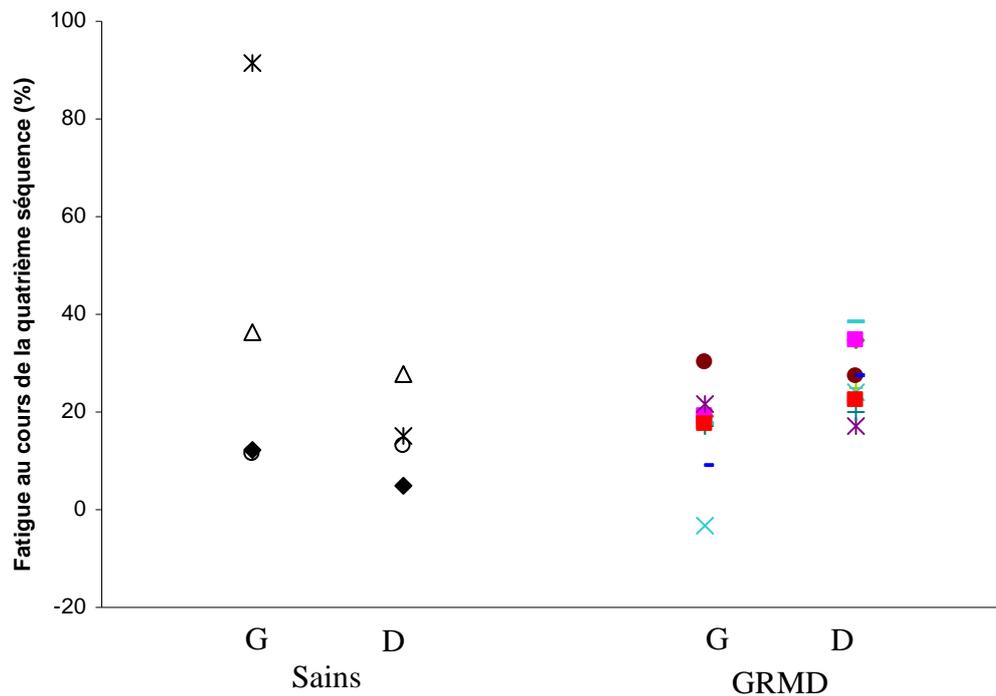
L'effet du côté testé n'est pas significatif, que ce soit dans un groupe ou dans l'autre.

Tableau 21 : Résultats des mesures de fatigue, et de l'analyse statistique à 6 mois

	Fatigue séquence 1 (%)		Fatigue séquence 2 (%)		Fatigue séquence 3 (%)		Fatigue séquence 4 (%)	
	G	D	G	D	G	D	G	D
Moy (ET) Sains	1.6 (1.1)	1.2 (0.9)	2.5 (0.4)	2.4 (0.7)	1.6 (1.3)	0.7 (0.5)	37.8 (37.4)	15.2 (9.6)
Moy (ET) GRMD	1.2 (3.4)	2.0 (5.9)	4.6 (4.7)	3.4 (8.3)	3.6 (4.5)	-0.1 (10.6)	17.7 (9.6)	24.9 (7.9)
P (statut)	0.9203		0.3829		0.8664		0.4499	
P (côté) GRMD	0.6956		0.7301		0.2411		0.0745	
P (côté) sain	0.5927		0.7019		0.1696		0.2986	

Pour chaque séquence et chaque côté (droit ou gauche), sont indiquées la moyenne de fatigue et l'écart-type dans chaque population. Les résultats de l'analyse statistique sont donnés pour l'effet groupe (GRMD vs Sain), et l'effet côté (droite vs gauche) dans chacune des deux populations. Abréviations : G : gauche, D : droite, Moy : moyenne, ET : écart-type.

Figure 22 : Fatigue à la quatrième séquence, mesurée avec le module de deuxième génération à 6 mois : comparaison entre chiens sains et GRMD



Les chiens sains sont représentés sur la gauche (symboles noirs), et les chiens GRMD sur la droite (symboles de couleur). Pour chaque population, sont représentées les valeurs de fatigue obtenues pour le postérieur gauche (G), et pour le postérieur droit (D), au cours de la dernière séquence de stimulations. Les symboles utilisés correspondent chacun à un animal et cette correspondance figure dans le tableau 13.

Potentiation musculaire

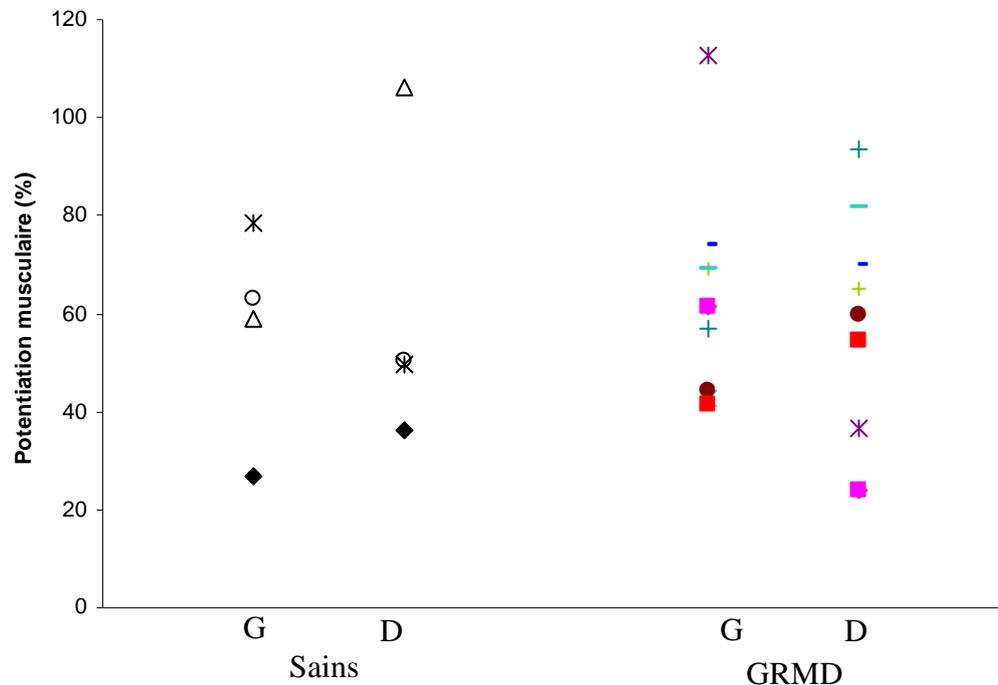
A l'image de la fatigue musculaire, la potentiation au cours des séquences de secousses, significativement diminuée à 4 mois chez les chiens GRMD, n'est plus différente de celle des chiens sains à l'âge de 6 mois (tableau 22). Le graphe de la figure 23 illustre le chevauchement des deux populations. Aucun effet du côté testé n'a été mis en évidence par l'ANOVA à mesures répétées (tableau 22).

Tableau 22 : Résultats des mesures de potentiation musculaire, et de l'analyse statistique à 6 mois

	Potentiati�n séquence 1 (%)		Potentiati�n séquence 2 (%)	
	G	D	G	D
Moy (ET) Sains	56.8 (21.8)	60.5 (31.1)	39.2 (20.9)	42.8 (26.3)
Moy (ET) GRMD	60.6 (21.5)	63.5 (26.9)	40.0 (16.2)	49.9 (21.2)
p (statut)	0.6922		0.5933	
p (côté) GRMD	0.9273		0.4678	
p (côté) sain	0.8358		0.7075	

Pour chacune des deux séquences et chaque côté (droit ou gauche), sont indiquées la moyenne de potentiati n et l'écart-type dans chaque population. Les résultats de l'analyse statistique sont donnés pour l'effet groupe (GRMD vs Sain), et l'effet côté (droite vs gauche) dans chacune des deux populations. Abréviations : G : gauche, D : droite, Moy : moyenne, ET :  cart-type.

Figure 23 : Potentiation musculaire au cours de la première séquence de secousses à 6 mois, mesurée avec le module de deuxième génération : comparaison entre chiens sains et GRMD



Les chiens sains sont représentés sur la gauche (symboles noirs), et les chiens GRMD sur la droite (symboles de couleur). Pour chaque population, sont représentées les valeurs de potentiation au cours de la première séquence de secousses, obtenues pour le postérieur gauche (G), et pour le postérieur droit (D). Les symboles utilisés correspondent chacun à un animal et cette correspondance figure dans le tableau 13.

Relaxation musculaire

Les propriétés de relaxation musculaire, mesurées par les trois variables précédemment décrites, ne sont pas significativement modifiées chez les chiens GRMD à 6 mois (tableau 23). Cependant, comme le montrent les graphes de la figure 24, quelques chiens GRMD se démarquent des autres animaux du groupe par des niveaux de relaxation à 100 ms (en pourcentage de la force tétanique) diminués, et des niveaux de contraction résiduelle augmentés. Ces mêmes animaux présentent des valeurs de niveau de relaxation à 100 ms, exprimé en pourcentage de la relaxation post-tétanique, normales, ce qui indique qu'ils présentent davantage un défaut de relaxation post-tétanique qu'un ralentissement de la relaxation, du moins dans la phase précoce. De manière intéressante, ces deux variables, modifiées chez quelques animaux seulement, sont fortement corrélées à leur score clinique

moteur : une corrélation inverse avec le temps de relaxation à 100 ms en pourcentage de la force tétanique ($r = -0.85$, $p = 0.0018$ pour le postérieur droit) et une corrélation positive forte avec la contraction résiduelle post-tétanique ($r = 0.95$, $p < 0.0001$ pour le postérieur droit) sont notées. Le graphe de la figure 25 illustre cette corrélation. Le chien GRMD présentant les valeurs les plus extrêmes (Dfois) présentait d'ailleurs une atteinte clinique prononcée, puisqu'au moment du test il venait de perdre la locomotion.

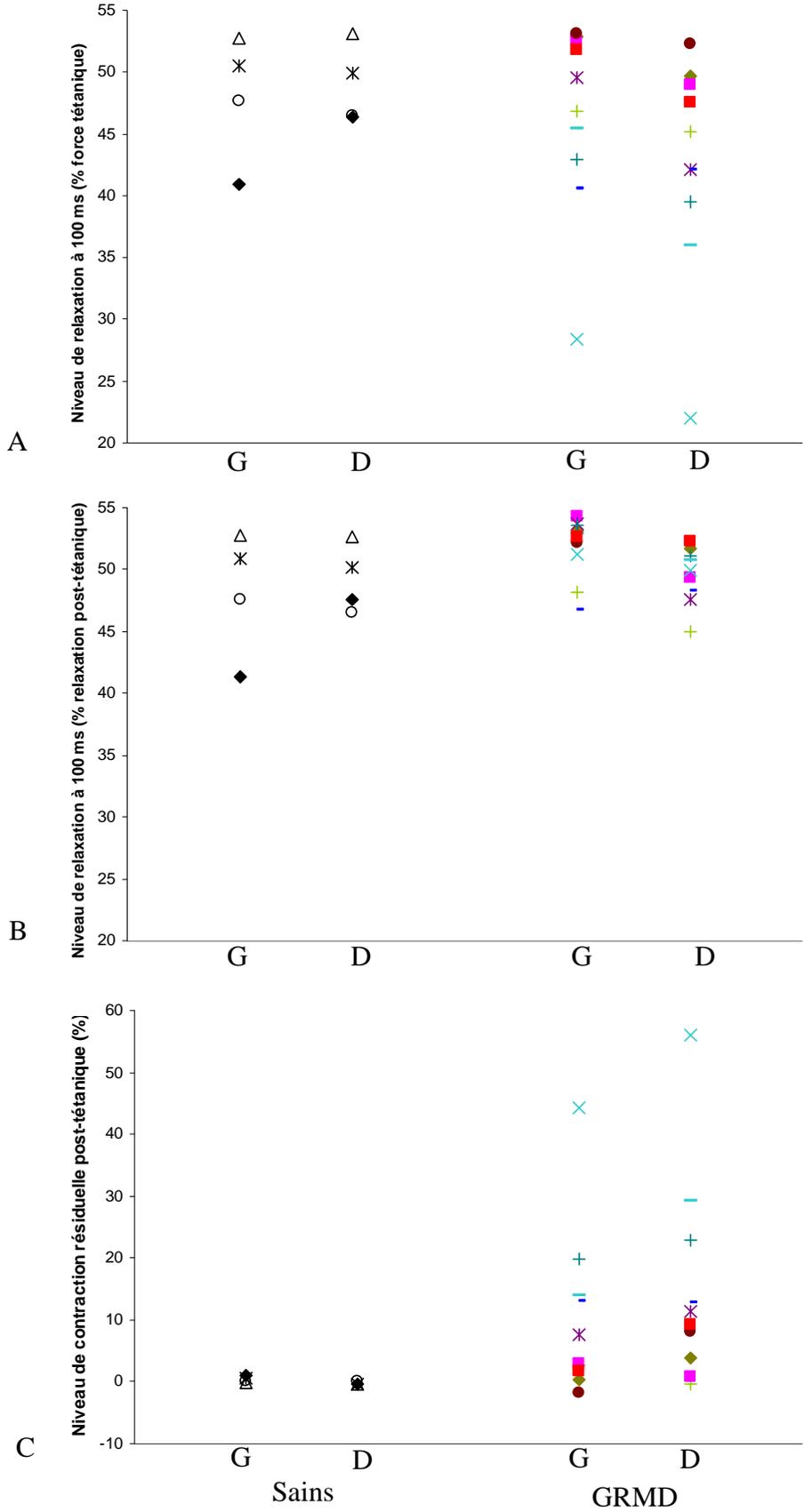
Un effet significatif du côté a par ailleurs été démontré (Tableau 23) chez les chiens GRMD, pour ces deux mêmes variables, mais pas pour le niveau de relaxation à 100 ms, exprimé en pourcentage du niveau de relaxation post-tétanique, ce qui suggère que les variations d'un côté à l'autre sont davantage liées à des niveaux de contraction résiduelle différents qu'à des variations de vitesse de relaxation.

Tableau 23 : Résultats des mesures de niveaux de relaxation à 100 ms et de contraction résiduelle post-tétaniques et de l'analyse statistique à 6 mois

	Relaxation 100 ms (% force tétanique)		Relaxation 100 ms (% niveau post-tétanique)		Niveau de contraction résiduelle post-tétanique (%)	
	G	D	G	D	G	D
Moy (ET) Sains	48.0 (5.1)	49.0 (3.2)	48.1 (5.0)	49.2 (2.8)	0.38 (0.52)	-0.27 (0.22)
Moy (ET) GRMD	46.4 (7.7)	53.0 (34.3)	51.8 (2.49)	46.5 (12.8)	10.5 (13.8)	39.6 (77.1)
p (statut)	0.3733		0.1713		0.1243	
p (côté) GRMD	0.0041		0.0946		0.0327	
p (côté) sain	0.5360		0.5718		0.1474	

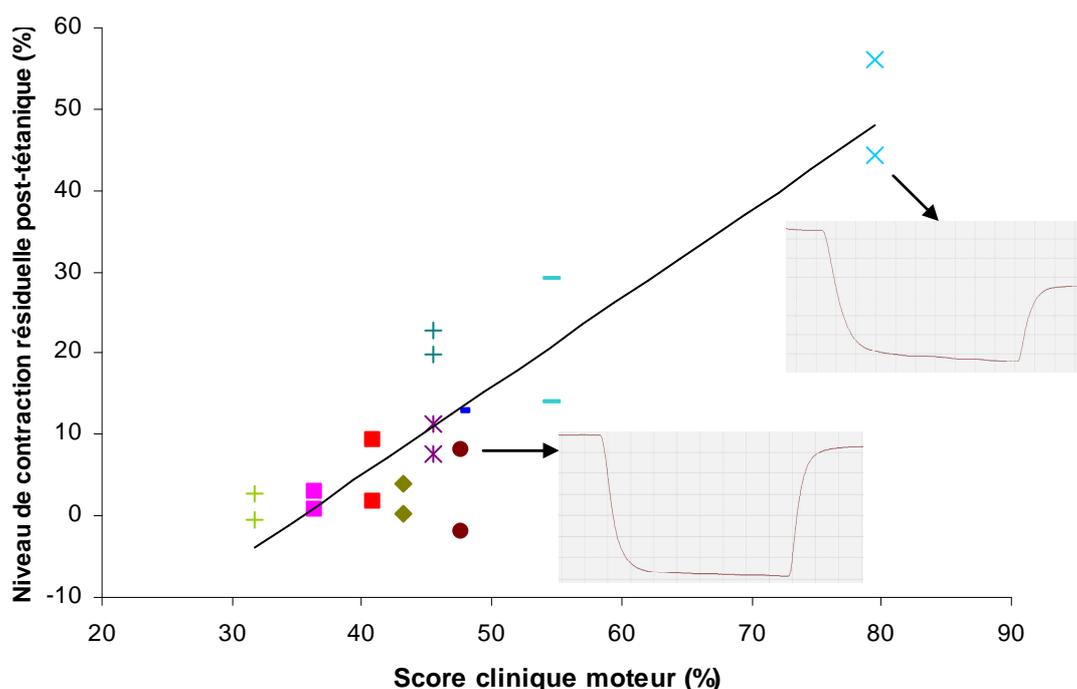
Pour chacune des variables et chaque côté (droit ou gauche), sont indiquées la moyenne et l'écart-type dans chaque population, pour la relaxation à 100 ms, exprimée en pourcentage de la force tétanique ou du niveau de relaxation post-tétanique, et le niveau de contraction résiduelle post-tétanique, exprimé en pourcentage de la force tétanique. Les résultats de l'analyse statistique sont donnés pour l'effet groupe (GRMD vs Sain), et l'effet côté (droite vs gauche) dans chacune des deux populations. Abréviations : G : gauche, D : droite, Moy : moyenne, ET : écart-type. Les résultats significatifs figurent en gras.

Figure 24 : Niveaux de relaxation à 100 ms et de contraction résiduelle post-tétaniques à 6 mois : comparaison entre chiens sains et GRMD



A : Valeurs de niveau de relaxation post-tétanique après 100 ms, en pourcentage de la force tétanique
 B : Valeurs de niveau de relaxation post-tétanique après 100 ms, en pourcentage du niveau de relaxation post-tétanique
 C : Valeurs de niveau de contraction résiduelle post-tétanique, en pourcentage de la force tétanique, obtenues chez les chiens sains et GRMD. Sur les trois graphes, les chiens sains sont représentés sur la gauche (symboles noirs), et les chiens GRMD sur la droite (symboles de couleur). Pour chaque population, sont représentées les valeurs obtenues pour le postérieur gauche (G), et pour le postérieur droit (D). Les symboles utilisés correspondent chacun à un animal et cette correspondance figure dans le tableau 13.

Figure 25 : Corrélation entre score clinique moteur et niveau de contraction résiduelle post-tétanique à 6 mois : illustration par droite de régression



Le pourcentage de score clinique moteur figure en abscisse et la valeur de niveau de contraction résiduelle post-tétanique en ordonnée. Chaque chien est représenté en deux points (postérieur gauche et droit), par le symbole qui lui correspond (Tableau 13). Deux exemples de tracés de tétanos montrant une contraction résiduelle, mais à des degrés différents, sont présentés, à côté du point leur correspondant. Cette correspondance est indiquée par une flèche.

Etude à 9 mois

Force tétanique

A l'âge de 9 mois, la force tétanique des chiens GRMD est significativement diminuée, que ce soit en valeur absolue ou relative (en N/kg ou en N/m) (tableau 24). Les graphes de la figure 26 montrent qu'il existe une zone de superposition entre les deux populations, majorée par la normalisation par la masse corporelle. Cette superposition est notamment liée à la position du chien Dfois, qui montre une force tétanique maximale importante, alors même que cet animal présentait une forme clinique très prononcée, et avait perdu l'usage de la locomotion à l'âge de 6 mois. Aucune corrélation, dans un sens ou dans l'autre, des valeurs de force tétanique avec le score clinique moteur n'a d'ailleurs été mise en évidence (coefficient de Pearson avec la force tétanique relative en N/m : $r = 0.15$, $p = 0.7251$ (postérieur gauche)). Ces éléments indiquent que la force de flexion du tarse et d'extension des doigts chez le chien GRMD ne peut en aucun cas constituer un élément de gradation du phénotype global de l'individu.

Enfin, aucun effet du côté testé sur les valeurs de force tétanique n'a été démontré (tableau 24).

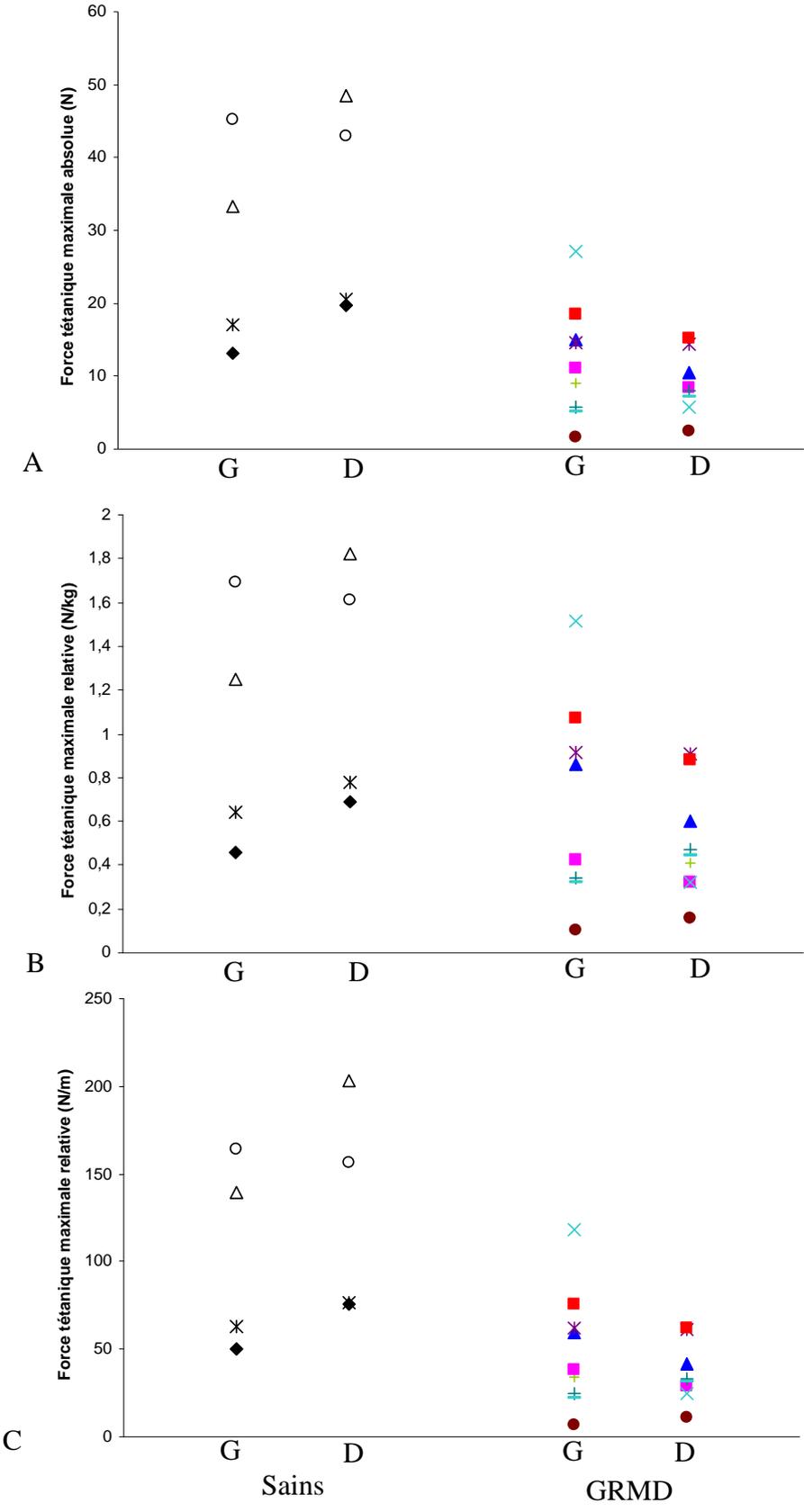
Tableau 24 : Résultats des mesures de forces tétaniques et de l'analyse statistique à 9 mois

	Séquence 1				Séquence 2				Séquence 3				Séquence 4			
	FTa (N)		FTr (N/m)		FTa (N)		FTr (N/m)		FTa (N)		FTr (N/m)		FTa (N)		FTr (N/m)	
	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D
Moy (ET) Sains	27.10 (14.82)	32.91 (14.91)	104.2 (56.0)	127.9 (62.9)	26.14 (14.82)	31.50 (14.97)	100.5 (55.9)	122.6 (63.8)	25.02 (14.31)	29.90 (15.06)	96.2 (54.2)	116.7 (64.7)	20.95 (11.67)	23.84 (11.94)	80.6 (44.2)	93.5 (53.5)
Moy (ET) GRMD	11.99 (7.82)	8.94 (3.98)	49.0 (33.9)	36.2 (16.6)	11.15 (6.74)	8.33 (4.36)	45.4 (29.0)	33.7 (18.1)	10.29 (5.86)	7.85 (4.39)	41.8 (25.1)	31.7 (18.2)	8.12 (4.08)	6.79 (3.90)	32.8 (16.8)	27.4 (16.2)
P (statut)	0.0032		0.0052		0.0031		0.0049		0.0031		0.0050		0.0021		0.0039	
P (côté) GRMD	0.2441		0.2611		0.2476		0.2658		0.2636		0.2811		0.3332		0.3571	
P (côté) sain	0.2071		0.2140		0.2933		0.2907		0.3650		0.3549		0.6303		0.5871	

Pour chaque séquence et chaque côté (droit ou gauche), sont indiquées la moyenne et l'écart-type dans chaque population, pour la force tétanique relative (N/m) et absolue.

Les résultats de l'analyse statistique sont donnés pour l'effet groupe (GRMD vs Sain), et l'effet côté (droite vs gauche) dans chacune des deux populations. Abréviations : FTa : force tétanique absolue, FTr : force tétanique relative, G : gauche, D : droite, Moy : moyenne, ET : écart-type. Les résultats significatifs figurent en gras.

Figure 26 : Force tétanique maximale à 9 mois, mesurée avec le module de deuxième génération : comparaison entre chiens sains et GRMD



A : Valeurs de force tétanique maximale absolue (N) obtenues chez les chiens sains et GRMD B : Valeurs de force tétanique maximale relative (N/kg), obtenues chez les chiens sains et GRMD. C : Valeurs de force tétanique maximale relative (N/m), obtenues chez les chiens sains et GRMD. Sur les trois graphes, les chiens sains sont représentés sur la gauche (symboles noirs), et les chiens GRMD sur la droite (symboles de couleur). Pour chaque population, sont représentées les valeurs obtenues pour le postérieur gauche (G), et pour le postérieur droit (D). Les symboles utilisés correspondent chacun à un animal et cette correspondance figure dans le tableau 13.

Fatigue musculaire

Comme à l'âge de 6 mois, les mesures de fatigue, effectuées au cours des quatre séquences de stimulations tétaniques à 9 mois, ne sont pas significativement différentes entre chiens sains et GRMD (tableau 25). Le graphique de la figure 27 illustre cette absence de modification.

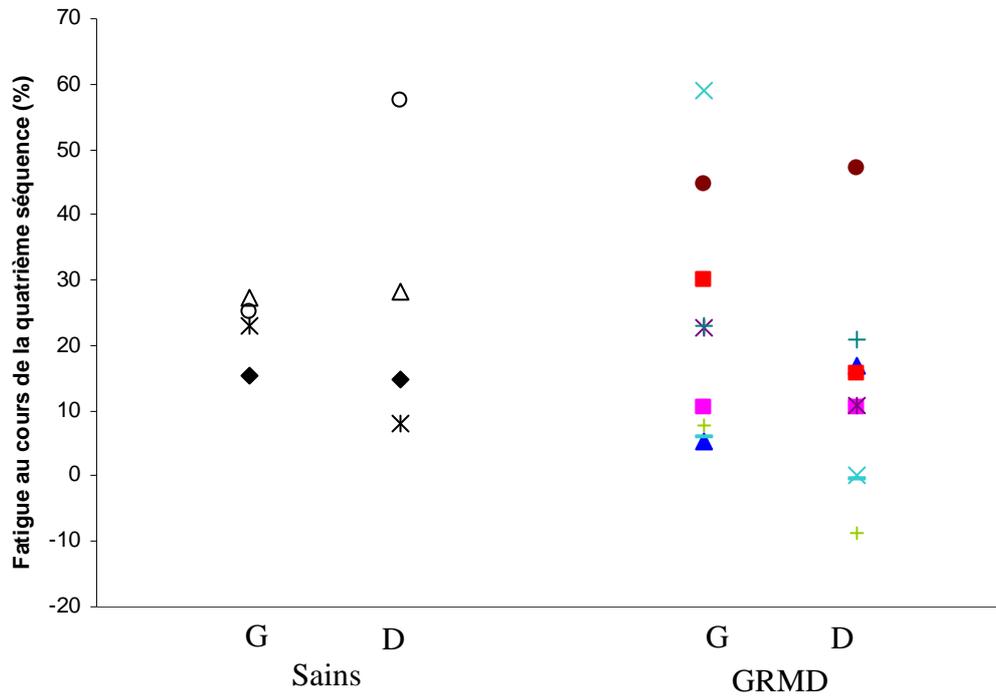
Aucun effet du côté testé n'a par ailleurs été mis en évidence (tableau 25).

Tableau 25 : Résultats des mesures de fatigue, et de l'analyse statistique à 9 mois

	Fatigue séquence 1 (%)		Fatigue séquence 2 (%)		Fatigue séquence 3 (%)		Fatigue séquence 4 (%)	
	G	D	G	D	G	D	G	D
Moy (ET) Sains	2.9 (2.7)	2.5 (1.8)	2.5 (1.6)	4.8 (3.0)	2.2 (1.5)	4.3 (4.0)	22.7 (5.2)	27.0 (21.9)
Moy (ET) GRMD	2.1 (8.4)	3.9 (11.3)	3.0 (2.3)	7.7 (13.7)	4.6 (5.3)	4.2 (16.8)	23.3 (18.7)	14.1 (16.5)
P (statut)	0.9538		0.6679		0.7983		0.3430	
P (côté) GRMD	0.5626		0.3234		0.9591		0.2057	
P (côté) sain	0.8083		0.1301		0.3039		0.6951	

Pour chaque séquence et chaque côté (droit ou gauche), sont indiquées la moyenne de fatigue et l'écart-type dans chaque population. Les résultats de l'analyse statistique sont donnés pour l'effet groupe (GRMD vs Sain), et l'effet côté (droite vs gauche) dans chacune des deux populations. Abréviations : G : gauche, D : droite, Moy : moyenne, ET : écart-type.

Figure 27 : Fatigue à la quatrième séquence, mesurée avec le module de deuxième génération à 9 mois : comparaison entre chiens sains et GRMD



Les chiens sains sont représentés sur la gauche (symboles noirs), et les chiens GRMD sur la droite (symboles de couleur). Pour chaque population, sont représentées les valeurs de fatigue obtenues pour le postérieur gauche (G), et pour le postérieur droit (D), au cours de la dernière séquence de stimulations. Les symboles utilisés correspondent chacun à un animal et cette correspondance figure dans le tableau 13.

Potentiation musculaire

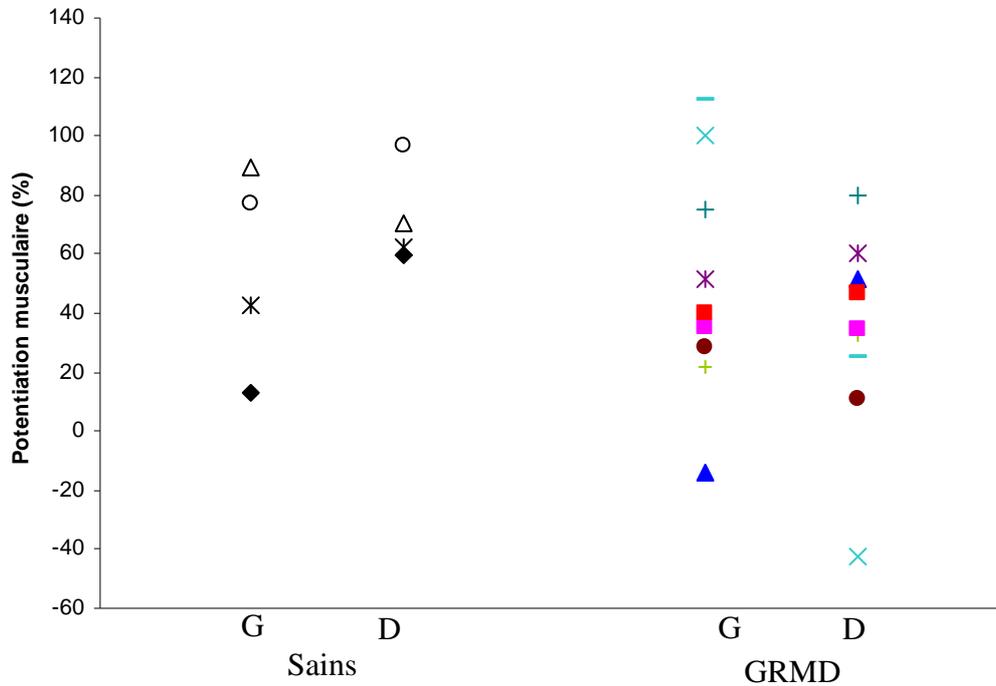
De la même façon que pour la fatigue, la potentiation musculaire n'est, à 9 mois, pas différente entre chiens GRMD et chiens sains, comme le montrent les résultats figurant dans le tableau 26, et le graphe de la figure 28. Le côté testé n'a pas d'effet significatif sur la valeur obtenue (tableau 26).

Tableau 26 : Résultats des mesures de potentiation musculaire, et de l'analyse statistique à 9 mois

	Potentiation séquence 1 (%)		Potentiation séquence 2 (%)	
	G	D	G	D
Moy (ET) Sains	55.6 (34.8)	72.4 (16.9)	38.8 (19.9)	43.5 (7.6)
Moy (ET) GRMD	50.1 (39.8)	33.3 (34.8)	42.7 (29.9)	18.2 (27.2)
p (statut)	0.1195		0.2939	
p (côté) GRMD	0.4366		0.1458	
p (côté) sain	0.3035		0.5379	

Pour chacune des deux séquences et chaque côté (droit ou gauche), sont indiquées la moyenne de potentiation et l'écart-type dans chaque population. Les résultats de l'analyse statistique sont donnés pour l'effet groupe (GRMD vs Sain), et l'effet côté (droite vs gauche) dans chacune des deux populations. Abréviations : G : gauche, D : droite, Moy : moyenne, ET : écart-type.

Figure 28 : Potentiation musculaire au cours de la première séquence de secousses à 9 mois, mesurée avec le module de deuxième génération : comparaison entre chiens sains et GRMD



Les chiens sains sont représentés sur la gauche (symboles noirs), et les chiens GRMD sur la droite (symboles de couleur). Pour chaque population, sont représentées les valeurs de potentiation au cours de la première séquence de secousses, obtenues pour le postérieur gauche (G), et pour le postérieur droit (D). Les symboles utilisés correspondent chacun à un animal et cette correspondance figure dans le tableau 13.

Relaxation musculaire

Aux deux temps précédents, se dessinait une tendance vers une relaxation post-tétanique moindre chez les chiens GRMD, sans qu'une différence significative avec les chiens sains puisse être démontrée. A l'âge de 9 mois, le niveau de contraction résiduelle post-tétanique est cette fois significativement augmenté chez les chiens GRMD ($p = 0.0131$) et la superposition entre les deux populations est quasi inexistante pour cette variable (figure 29). Sans que la différence avec les chiens sains soit significative (tableau 27), les valeurs de relaxation à 100 ms sont diminuées pour quelques animaux, et principalement pour le chien le plus touché (Dfois). Ces deux variables montrent à cet âge des corrélations significatives et négatives avec le score clinique moteur : les coefficients de corrélation de Pearson sont compris entre -0.67 ($p = 0.0480$) pour la relaxation à 100 ms en pourcentage de la force

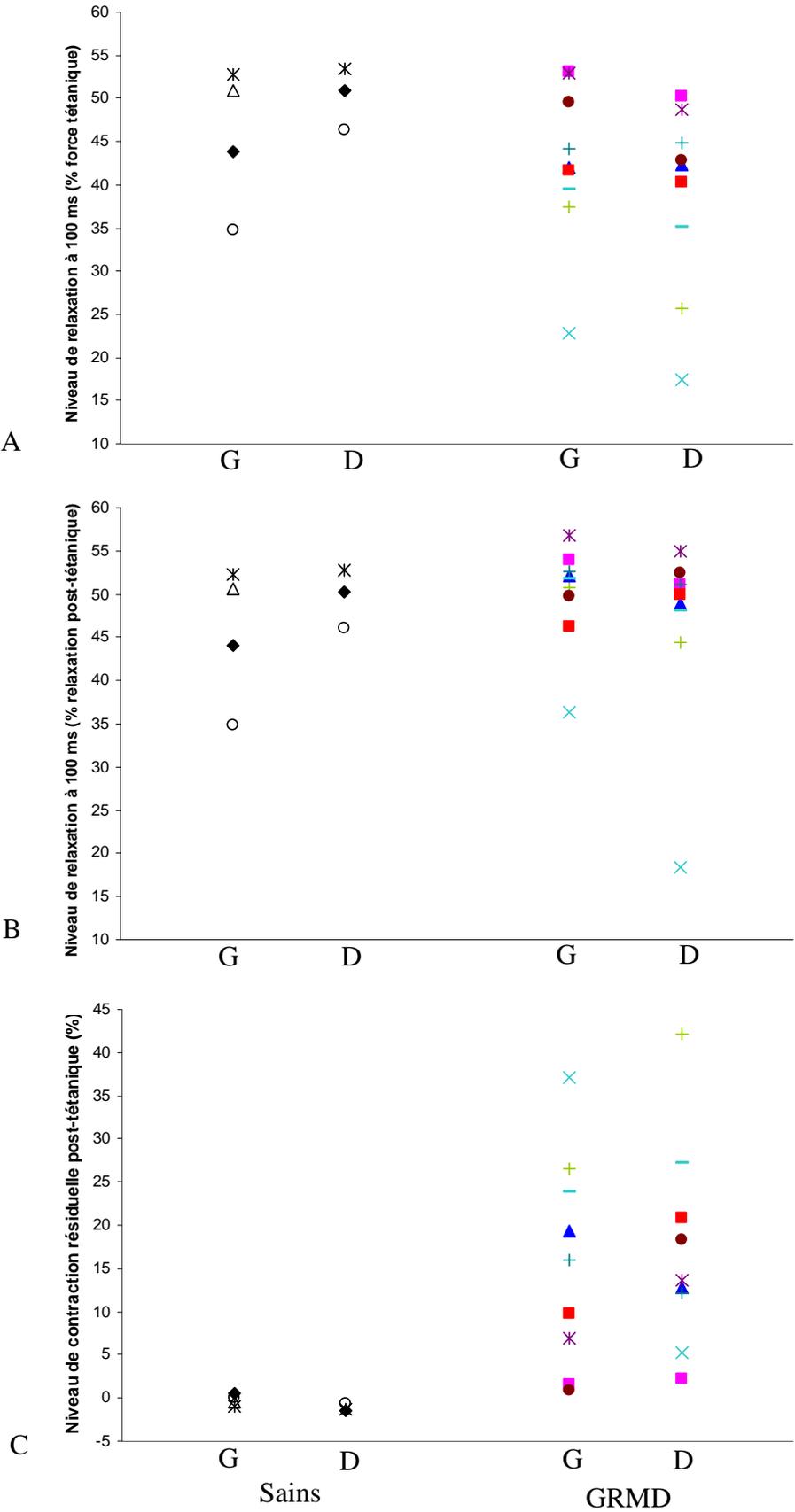
tétanique du postérieur droit et -0.78 ($p = 0.0121$) pour la relaxation à 100 ms en pourcentage de la relaxation post-tétanique de ce même membre.

Tableau 27 : Résultats des mesures de niveaux de relaxation à 100 ms et de contraction résiduelle post-tétaniques et de l'analyse statistique à 9 mois

	Relaxation 100 ms (% force tétanique)		Relaxation 100 ms (% niveau post-tétanique)		Niveau de contraction résiduelle post-tétanique (%) (%)	
	G	D	G	D	G	D
Moy (ET) Sains	45.5 (8.2)	50.3 (3.6)	45.4 (7.9)	49.7 (3.4)	-0.22 (0.67)	-1.13 (0.39)
Moy (ET) GRMD	42.5 (9.3)	38.6 (10.8)	50.0 (5.9)	46.6 (11.0)	15.78 (12.16)	17.20 (12.06)
p (statut)	0.3243		0.7622		0.0131	
p (côté) GRMD	0.0155		0.1384		0.7831	
p (côté) sain	0.1774		0.1913		0.1887	

Pour chacune des variables et chaque côté (droit ou gauche), sont indiquées la moyenne et l'écart-type dans chaque population, pour la relaxation à 100 ms, exprimée en pourcentage de la force tétanique ou du niveau de relaxation post-tétanique, et le niveau de contraction résiduelle post-tétanique, exprimé en pourcentage de la force tétanique. Les résultats de l'analyse statistique sont donnés pour l'effet groupe (GRMD vs Sain), et l'effet côté (droite vs gauche) dans chacune des deux populations. Abréviations : G : gauche, D : droite, Moy : moyenne, ET : écart-type. Les résultats significatifs figurent en gras.

Figure 29 : Niveaux de relaxation à 100 ms et de contraction résiduelle post-tétaniques à 9 mois : comparaison entre chiens sains et GRMD



A : Valeurs de niveau de relaxation post-tétanique après 100 ms, en pourcentage de la force tétanique B : Valeurs de niveau de relaxation post-tétanique après 100 ms, en pourcentage du niveau de relaxation post-tétanique C : Valeurs de niveau de contraction résiduelle post-tétanique, en pourcentage de la force tétanique, obtenues chez les chiens sains et GRMD. Sur les trois graphes, les chiens sains sont représentés sur la gauche (symboles noirs), et les chiens GRMD sur la droite (symboles de couleur). Pour chaque population, sont représentées les valeurs obtenues pour le postérieur gauche (G), et pour le postérieur droit (D). Les symboles utilisés correspondent chacun à un animal et cette correspondance figure dans le tableau 13.

d) Etude de l'effet de l'âge sur les différentes variables

Chez les chiens sains, les valeurs de force tétanique maximale absolue et relative montrent une tendance à l'augmentation, mais non significative (tableau 28). Aucun effet de l'âge n'a été détecté pour les autres variables.

Chez les chiens GRMD, la force tétanique maximale absolue augmente significativement avec l'âge. La potentiation musculaire, faible à 4 mois et qui se normalise par la suite, subit également un effet significatif de l'âge, ainsi que la contraction résiduelle post-tétanique qui augmente significativement au cours du temps, jusqu'à devenir significativement augmentée à 9 mois.

Tableau 28 : Effet de l'âge (4 à 9 mois) sur les principales variables étudiées, mesurées avec le module de deuxième génération.

	FT _{maxa}	FT _{maxr}	Fatigue ₄	Potentiation ₁	R ₁₀₀ (FTmax)	R ₁₀₀ (R P-T)	Contraction résiduelle P-T
Effet âge sains (p=)	0.0708	0.0991	0.7587	0.6306	0.4647	0.4806	0.2680
Effet âge GRMD (p=)	0.0167	0.0563	0.3009	0.0046	0.0522	0.1149	0.0289

Pour chacun des deux groupes, sont consignés les principaux résultats du test statistique évaluant l'effet de l'âge sur les variables mesurées. Les résultats significatifs figurent en gras.

Abréviations : FT_{maxa} : force tétanique maximale absolue, FT_{maxr} : force tétanique maximale relative (N/m), Fatigue₄ : fatigue musculaire au cours de la 4^{ème} séquence de stimulations, Potentiation₁ : potentiation musculaire au cours de la 1^{ère} séquence de secousses, R₁₀₀ (FTmax) : relaxation après 100 ms, en pourcentage de la force tétanique maximale, R₁₀₀ (R P-

T) : relaxation après 100 ms, en pourcentage de la relaxation post-tétanique, *P-T* : post-tétanique.

D. Discussion

Les deux études menées successivement sur deux générations de modules de conception différente, et incluant deux groupes d'animaux différents, ont toutes deux permis de dégager les mêmes tendances d'évolution des indices étudiés chez les chiens GRMD. Une diminution de la force tétanique maximale a été démontrée à tous les âges étudiés, tandis qu'une plus grande fatigue et une moindre potentiation musculaire n'ont été détectées qu'à l'âge de 4 mois. Cependant, s'il existe une concordance entre les conclusions obtenues à l'issue des deux parties de l'étude, ce qui constitue un argument en faveur de leur robustesse, les valeurs brutes de force tétanique absolue obtenues ont montré des différences entre les deux générations de module. Ainsi, comme cela était attendu, la moindre perte d'information dans la seconde génération de module a conduit à l'obtention de valeurs supérieures, chez les chiens sains comme chez les chiens GRMD. Ces valeurs sont également supérieures à celles publiées (Kornegay et al. 1999), qui se situent elles-mêmes entre celles obtenues avec la première génération et celles obtenues avec la deuxième.

Ainsi, par exemple, à l'âge de 6 mois, les chiens sains présentent une valeur de force tétanique absolue mesurée avec le premier module de 13.12 N (0.65 N), cette même valeur s'élevant à 24.60 N (12.29 N) lorsqu'elle est mesurée avec le second module, et à 16.33 N (3.88 N) dans la littérature (Kornegay et al. 1999). Ces mêmes mesures s'élèvent chez les chiens GRMD respectivement à 4.56 N (1.16 N) (premier module), 7.32 N (3.94 N) (second module), et 5.89 N (2.30 N) (Kornegay et al. 1999). Cette différence avec les données publiées peut peut-être s'expliquer par les différences existant entre les dispositifs de mesure. La description détaillée du statif utilisé par J.N. Kornegay *et al.* n'est pas publiée, mais il semble, au vu de l'illustration donnée, que celui-ci se situe, sur le plan de sa conception, entre les deux générations de module présentées ici. Ainsi, la pédale semble bien fixe, comme dans le module de seconde génération, mais le capteur est relié à la partie haute de la pédale seulement. Il existe donc sans doute une perte d'information, liée à la position du capteur, mais moindre que dans la première génération de module décrite ici, puisque les mouvements ne sont pas autorisés durant la contraction (pédale fixe). Ceci permet d'offrir une piste d'explication aux différences de valeurs obtenues sur les trois dispositifs.

Une problématique méthodologique, évoquée par J.N. Kornegay *et al.* (Kornegay et al. 1999), a été soulevée ici et a trait à la prise en considération du gabarit des animaux évalués dans l'analyse des résultats. La normalisation classiquement effectuée par la masse corporelle des animaux (Kornegay et al. 1999), et reproduite dans la première partie de la présente étude, a été remise en question en raison des caractéristiques staturo-pondérales du chien GRMD, énoncées en détail à la fin du chapitre B. Une normalisation par la longueur du segment tibial a été proposée en tant qu'alternative dans la seconde partie de l'étude. Ce paramètre était en effet celui qui pouvait probablement constituer un des meilleurs éléments anatomiques prédictifs de la force, et le plus simple d'obtention chez les chiens, parmi ceux proposés dans les diverses études réalisées chez les patients humains (Blazevich et al. 2009, Li et al. 2010). Une illustration parfaite de l'influence de cette normalisation est le résultat de l'analyse statistique obtenu à 4 mois avec le second module : la force tétanique absolue est, à cet âge significativement diminuée chez les chiens GRMD ($p = 0.0206$). Cette même différence, sur la force tétanique relative, obtenue en normalisant la valeur absolue par la masse corporelle, n'est plus significative ($p = 0.2004$). Par contre, la normalisation par la longueur du segment tibial permet de retrouver un niveau de significativité quasi-identique à celui obtenu pour la force tétanique absolue ($p = 0.0246$). L'utilisation de la masse corporelle pour normaliser des variables liées à la taille chez les chiens GRMD est donc à proscrire, au profit d'autres indices de taille des individus (tels que la longueur de la jambe ici, ou, plus loin, la hauteur au garrot). Un autre point de méthodologie essentiel concerne la répétabilité des mesures. Cette question n'avait jamais été abordée dans les travaux déjà réalisés sur la mesure de force chez le chien GRMD ; elle a été investiguée ici sur les deux générations de module pour les chiens sains, et sur la seconde uniquement pour les chiens GRMD. Si aucun effet du jour de test n'a pu être mis en évidence chez les chiens GRMD, il n'en reste pas moins que la variabilité des mesures est importante chez ces animaux, puisque le coefficient de variation de la force tétanique maximale atteint 22.4 % (écart-type 16.1 %). Chez les patients atteints de DMD, la variabilité des mesures de force est également, bien que peu documentée, décrite comme importante (Edwards et al. 1987). Les coefficients de variation publiés se situent en effet entre 15.4 % (écart-type 2.6 %) et 27 % (écart-type 10.5 %) suivant les muscles testés, et ceux-ci ne sont pas modifiés par le mode d'obtention de la contraction (volontaire ou stimulation électrique). Les variations de l'état lésionnel des muscles d'un jour à l'autre chez les patients comme chez les chiens peut permettre d'expliquer de telles fluctuations dans les mesures de force (Edwards et al. 1987). La variabilité des mesures est en effet moindre chez les patients sains, puisque des coefficients de variation de seulement 6 à 9% sont publiés (Edwards et al. 1987).

Les chiens sains évalués ici montrent des coefficients de variation effectivement plus faibles que les chiens GRMD (11.5 % (écart-type : 8.0 %) avec le premier module ; 14.8 % (écart-type : 6.4 %) avec le second module), mais néanmoins plus élevés que ce qui est décrit chez le patient. Plusieurs hypothèses explicatives pourraient être avancées telles que des variations dans le positionnement des animaux d'un jour à l'autre, des variations de l'état physiologique des animaux d'un test à l'autre (température corporelle notamment, et degré d'hypothermie sous anesthésie générale), ou encore variabilité intrinsèque du système de mesure. Une autre hypothèse a été soulevée dans l'étude publiée sur la mesure de force (Kornegay et al. 1999), pour expliquer des différences entre postérieur droit et gauche chez les chiens sains : chez des animaux plus musclés, il peut être plus difficile d'obtenir une stimulation correcte du nerf, le positionnement d'électrodes pouvant être plus hasardeux. Dans le cas présent, cette hypothèse est peu probable, d'une part car elle était avancée dans le cas du nerf tibial. Or, quelle que soit la masse musculaire du chien, le nerf fibulaire est quasiment toujours très facilement palpable car très superficiel ; le placement de l'électrode de stimulation est donc relativement sûr. De surcroît, un contrôle de la réponse musculaire a été effectué ici, par enregistrement des potentiels d'action musculaires composés, garantissant la qualité de la stimulation réalisée.

L'amplitude de ces potentiels d'action musculaires composés, enregistrés chez les chiens GRMD, s'est d'ailleurs montrée significativement réduite. Cette différence n'avait jamais été décrite chez les chiens déficients en dystrophine, sauf dans un cas isolé (Baltzer et al. 2007). Il s'agit d'une modification présente dans les cas d'atteintes musculaires prononcées (Cuddon 2002). Cette amplitude diminuée des potentiels composés est également classiquement décrite chez les patients atteints de DMD (Botelho et al. 1960, Sharma et al. 1995) et peut être attribuée le plus probablement à une diminution du nombre et/ou de la taille des fibres musculaires (Botelho et al. 1960, Sharma et al. 1995) ou à une modification des propriétés électriques des fibres musculaires (potentiel membranaire) (BOTELHO et al. 1960). L'hypothèse de diminution artéfactuelle de ces potentiels, en liaison avec une séparation électrode-muscle par du tissu non musculaire (Botelho et al. 1960) peut ici être rejetée, puisque l'électrode est positionnée dans l'espace sous-cutané, nettement moins riche en tissu adipeux chez les chiens GRMD que chez les chiens sains. Une étude d'électromyographie quantitative pourrait être envisagée chez les chiens GRMD, et permettrait probablement de définir de nouveaux index pertinents pour l'évaluation de leur fonction musculaire.

Les éléments reflétés par la diminution d'amplitude des potentiels d'action musculaire composés sont probablement ceux qui expliquent également la diminution de force tétanique : une diminution du nombre des fibres musculaires générant de la force. Cependant, les causes

de cette diminution sont probablement différentes en fonction de l'âge. A l'âge de 4 mois, les nécroses segmentaires, la proportion importante de fibres en régénération, et, dans une moindre mesure, la fibrose débutante, expliquent la diminution de force musculaire. Aux stades plus tardifs, elle est certainement davantage liée à la raréfaction des fibres musculaires dans un tissu musculaire envahi par le tissu conjonctif. Améliorer l'état lésionnel du muscle peut donc augmenter sa force musculaire. La diminution majeure de la force musculaire des muscles crâniens de la jambe, décrite chez les chiens GRMD, permet l'utilisation de la mesure de leur force pour l'évaluation d'un bénéfice thérapeutique éventuel, apporté par une stratégie locale (injection intra-musculaire) ou systémique. La mesure de force s'inscrit donc dans toutes les étapes de validation des stratégies thérapeutiques chez les chiens GRMD : de la preuve d'efficacité initiale (injection locale), au bénéfice à l'échelle de l'individu (administration par voie générale).

Cependant, dans ce cadre, il apparaît surprenant qu'aucune corrélation n'existe entre la force mesurée et l'état clinique des animaux. Au-delà même, le seul animal testé dans cette étude ayant perdu la locomotion a montré les valeurs de force tétanique les plus élevées du groupe de chiens GRMD. De la même façon, la force tétanique absolue augmente avec l'âge, donc l'évolution clinique, chez les chiens GRMD, et la force tétanique relative également, mais de manière non significative. Ce dernier point a déjà été décrit chez le chien GRMD pour la force de flexion du tarse (Kornegay et al. 1999). Tous ces éléments indiquent que la force musculaire (du moins celle générée par les muscles crâniens de la jambe) n'a pas de réelle signification clinique. Le même type d'observation a pu être fait chez les patients atteints de DMD, montrant par exemple que la force de la main augmente au cours des premières années d'évolution clinique (Mattar and Sobreira 2008), mais aussi qu'il n'existe pas de lien entre force musculaire et perte de la locomotion (Edwards et al. 1987). Une amélioration de la force musculaire, si elle peut sans doute refléter une amélioration des lésions du groupe musculaire testé, ne peut en aucun cas être extrapolée à une amélioration du phénotype global de l'individu. Ceci est renforcé par la théorie avancée par JN Kornegay *et al.*, selon laquelle la préservation de la force musculaire des fléchisseurs du tarse, en comparaison des extenseurs, serait responsable de la plantigradie observée chez ces animaux. Plus la force de ces muscles est importante, et plus l'animal serait plantigrade, ce qui constituerait même une relation inverse entre force musculaire et atteinte clinique, ce qui n'a pas pu être démontré ici, malgré quelques cas évoquant une telle liaison.

A contrario, les paramètres d'évaluation de la relaxation se sont avérés corrélés à l'atteinte clinique motrice, mesurée par le score moteur. Le défaut de relaxation post-tétanique, mesuré

par le niveau de contraction résiduelle, augmente significativement avec l'âge, donc l'évolution clinique, jusqu'à devenir significativement augmenté à l'âge de 9 mois. Les animaux les plus touchés, et notamment l'animal inclus dans l'étude et ayant perdu la locomotion, montrent un défaut de relaxation post-tétanique, ainsi qu'un ralentissement de celle-ci. Une moindre relaxation chez les chiens les plus touchés avait été suggérée pour le muscle long péronier (Kornegay et al. 1994), et trouve ici confirmation. Les études menées chez les patients atteints de DMD et chez la souris *mdx* montrent, pour la plupart, qu'il existe également un défaut de relaxation dans ces deux espèces (Gordon and Stein 1988, Nicolas-Metral et al. 2001, Sharma et al. 1995). Toutefois, cette caractéristique n'est pas mise en évidence dans tous les muscles, et ne semble pas liée à l'état lésionnel du muscle considéré (Edwards et al. 1987). Ces résultats pourraient suggérer que cette mauvaise relaxation ne serait pas un critère pertinent, dans la mesure où il ne reflèterait pas le processus pathologique (Edwards et al. 1987). L'étude menée ici montre qu'au contraire, ce défaut de relaxation, mesuré sur un groupe musculaire pourtant relativement peu touché (Kornegay et al. 1999), reflète de manière significative l'atteinte clinique des chiens GRMD.

Ce phénomène a connu différentes hypothèses explicatives. Il a notamment été mis en relation avec la forte proportion de fibres en régénération, pouvant se traduire par un comportement contractile de muscle immature (Edwards et al. 1987, Sharma et al. 1995). La prédominance de fibres de type I s'installant avec l'évolution de la maladie a également été avancée pour expliquer ce retard de relaxation (Kornegay, 1994 102 /id}). Plus probablement, des échanges ioniques altérés, comme dans beaucoup de myotonies congénitales qui trouvent leur origine dans des canalopathies, pourraient être responsables du profil pseudomyotonique présent chez le chien GRMD, depuis les caractéristiques électromyographiques, à ce défaut de relaxation. En particulier, une homéostasie calcique perturbée, et la persistance d'une quantité élevée d'ions Ca^{2+} dans le cytoplasme en fin de contraction pourraient être à l'origine de ce retard de relaxation, et de l'existence d'une contraction résiduelle post-tétanique (Gordon and Stein 1988, Nicolas-Metral et al. 2001, Sharma et al. 1995). A l'origine de cette quantité d'ions Ca^{2+} résiduels ne permettant pas une relaxation totale, peuvent être mentionnés une perméabilité membranaire accrue après contraction, laissant entrer des ions Ca^{2+} , et/ou une altération de l'activité des canaux calciques intracellulaires (Constantin et al. 2006): un défaut de recapture par les canaux SERCA du réticulum sarcoplasmique (Nicolas-Metral et al. 2001), ou encore des fuites de Ca^{2+} par les canaux RyR de ce même réticulum (Bellinger et al. 2009). Les surcharges cytoplasmiques en calcium activent les protéases et sont responsables

de la destruction de la fibre musculaire (Constantin et al. 2006). Il s'agit de l'un des mécanismes pathogéniques probables de la déficience en dystrophine.

Chez les chiens GRMD, le défaut de relaxation mesuré par la contraction résiduelle post-tétanique atteint des niveaux élevés pour les animaux les plus touchés. Il est envisageable que ce niveau de contraction résiduelle traduise un état d'homéostasie ionique particulièrement altéré chez ces animaux plus atteints. En particulier, l'homéostasie calcique pourrait être altérée, et les fibres musculaires plus rapidement détruites par activation des calpaïnes. Les contractures parfois majeures, évocatrices d'un syndrome myotonique, observées sur ces animaux, pourraient également être une conséquence de ce défaut de relaxation. Tous ces éléments représentent des arguments en faveur d'un potentiel bénéfice clinique que pourraient apporter des stratégies thérapeutiques visant à réguler les flux calciques dans ce modèle de DMD, efficacité qui a d'ailleurs déjà été démontrée dans le modèle murin *mdx* (Bellinger et al. 2009).

La potentiation musculaire est également un phénomène lié à la libération de calcium par le réticulum sarcoplasmique (Johnson et al. 2005, Mettler and Griffin 2010). Les modifications décrites de la potentiation en cas de dystrophinopathie sont divergentes. Chez les patients, la potentiation musculaire post-tétanique est décrite comme étant altérée (Botelho et al. 1960). Chez la souris *mdx*, elle est tantôt décrite comme altérée également (Johnson et al. 2005), tantôt comme augmentée (Gordon and Stein 1988). Une description contradictoire existe également chez le chien GRMD, chez lesquels la potentiation serait soit meilleure (Kornegay et al. 1994), soit moins performante (Kornegay et al. 1999) que chez les chiens sains. Ici, seule une modification de la potentiation musculaire à l'âge de 4 mois a été démontrée. A ce jeune âge, les muscles du chien GRMD montrent une tension de secousse moins augmentée après stimulations répétées que ceux du chien sain. Le phénomène de potentiation faisant intervenir les flux de calcium, mais aussi une augmentation de la sensibilité de l'appareil contractile au Ca^{2+} , il paraît complexe de prédire la réponse obtenue dans un modèle à l'homéostasie calcique altérée tel que le chien GRMD. Les deux générations de modules ont permis de déterminer que la potentiation musculaire était altérée chez les chiens GRMD, mais uniquement à 4 mois, et sans relation avec le degré d'atteinte clinique. Ce paramètre ne paraît donc que peu pertinent pour l'évaluation fonctionnelle de ce modèle.

De la même façon, la fatigue musculaire s'est avérée augmentée, mais seulement à l'âge de 4 mois, pour se normaliser ensuite. Chez les patients atteints de DMD, est décrite une résistance à la fatigue (Edwards et al. 1987), ou une fatigue musculaire équivalente à celle des patients sains, suivant les auteurs (Sharma et al. 1995). Le défaut de relaxation décrit ici chez le chien,

mais également chez les patients, pourrait contribuer à diminuer la fatigue (Edwards et al. 1987) : les fibres musculaires présentant des vitesses de libération et recapture du calcium faibles seraient moins sensibles à la fatigue (Bellinger et al. 2008). En suivant cette hypothèse, le défaut de relaxation augmentant avec l'âge chez les chiens GRMD pourrait expliquer la diminution concomitante de la fatigue. De plus, la prédominance des fibres du type I, augmentant également au cours du temps (Liu et al. 2004, Yuasa et al. 2008), pourrait expliquer que la fatigue musculaire des animaux diminue.

Malgré quelques points critiques (nombre limité de chiens sains, problème de saturation du signal à résoudre), cette étude a permis de dégager quelques points d'intérêt quant à l'utilisation de la mesure de force musculaire pour l'évaluation du chien GRMD. Deux indices d'évaluation pertinents peuvent être retenus. Tout d'abord, la force tétanique, critère d'évaluation central au cours des essais cliniques et d'amont, est effondrée chez les chiens GRMD pour le groupe musculaire testé. Ceci permet donc l'utilisation de cette variable pour évaluer un bénéfice local, apporté par une stratégie locale ou systémique. Toutefois, son utilisation dans le cadre d'essais systémiques doit être raisonnée : un résultat obtenu sur ce groupe musculaire ne peut pas être, en lui seul, extrapolé à l'individu entier, comme l'a démontré l'absence de corrélation entre force tétanique et atteinte motrice. Le deuxième groupe de variables ayant démontré sa pertinence pour l'évaluation du chien GRMD, est celui qui a trait à la relaxation. Corrélé à l'état clinique moteur des animaux, car très probablement à l'origine de leurs contractures, et reflétant le niveau de perturbation de l'homéostasie ionique dans le tissu musculaire, le défaut de relaxation quantifié par ce groupe de variables permet d'apporter une information sur les propriétés contractiles du groupe musculaire étudié. Si ces variables sont moins discriminantes que la force tétanique, elles présentent néanmoins l'intérêt, bien qu'évaluées localement, d'avoir une signification clinique claire, atout évident lorsqu'il s'agit d'évaluer un modèle pré-clinique tel que le chien GRMD.

II. Evaluation de la locomotion

A. Introduction

Evaluer la locomotion, chez le patient atteint de DMD comme chez le chien GRMD, représente un enjeu important, tant pour le suivi clinique du patient, que pour son évaluation dans le cadre d'un essai thérapeutique. La locomotion, chez l'homme comme chez le chien déficients en dystrophine, est la première fonction touchée de manière évidente (Bushby et al. 2010a, Kornegay et al. 1988b, Valentine et al. 1988, Yiu and Kornberg 2008), et son altération ou son retard de développement représentent le plus souvent, chez les enfants, le motif de consultation au diagnostic (Manzur et al. 2008). De plus, la perte de la marche est systématique chez les patients, et survient, suivant les études, entre 9.3 (Eagle et al. 2002) et 12 ans (Yiu and Kornberg 2008), contraignant l'enfant à l'usage permanent du fauteuil roulant. Cet âge de perte de la marche, variable d'un individu à l'autre, est d'ailleurs couramment utilisé comme critère de gravité de l'atteinte, ou pour évaluer l'effet d'un traitement. D'autres tests, plus fonctionnels, tels que le 2 ou le 6 minutes de marche, ou encore le 10 mètres de marche sont également utilisés chez le patient encore ambulateur (Mercuri et al. 2008, Mok et al. 2009).

Ainsi, si l'altération de la fonction locomotrice n'est pas la cause du décès des patients, elle n'en reste pas moins une fonction emblématique, l'objectif phare des stratégies thérapeutiques mises en place pour DMD étant de retarder, voire d'éviter le passage au fauteuil.

Chez le chien GRMD, lorsque le travail présenté ici a débuté, aucun outil d'analyse de la locomotion n'avait été publié. La perte de la locomotion étant décrite comme inhabituelle chez le chien GRMD (Valentine et al. 1988), et les tests de 6 minutes et de 10 mètres de marche étant difficilement exécutables car nécessitant la coopération de l'animal, ces critères et tests n'ont jamais été envisagés dans ce modèle. Néanmoins, disposer d'un outil d'analyse quantifiée de la locomotion chez le chien GRMD est devenu indispensable avec l'essor des stratégies de traitements par voie systémique (Kerkis et al. 2008, Kornegay et al. 2010, Sampaolesi et al. 2006), l'atteinte locomotrice étant, comme souligné plus haut, le principal signe clinique de cette maladie, du moins à des stades précoces (Valentine et al. 1988), et probablement un reflet global de l'atteinte musculaire striée squelettique.

Les différentes méthodes existantes d'analyse de marche ont connu, au cours des vingt dernières années, un développement important, en réponse à un besoin d'objectiver et de quantifier des altérations souvent subtiles de la locomotion, chez des patients atteints de troubles orthopédiques (Andriacchi and Alexander 2000), de maladies neuromusculaires (Armand et al. 2005) ou neurodégénératives (Maquet et al. 2010, Salarian et al. 2004), mais également chez le cheval (Barrey 1999) ou le chien (Gillette and Angle 2008, McLaughlin 2001), dans le cadre de détection de boiteries (Audigie et al. 2002, Brebner et al. 2006, Pfau et al. 2007, Poy et al. 2000), ou d'évaluation de procédures chirurgicales correctives de troubles orthopédiques par exemple (Evans et al. 2005). Les outils à disposition sont nombreux, mais il existe deux « gold standards », qui sont la cinématique d'une part, et la cinétique via plateformes de force d'autre part.

La cinématique consiste à analyser les mouvements des segments osseux ou des articulations produits au cours de la marche. Concrètement, des marqueurs sont positionnés sur la peau, en regard de reliefs osseux d'intérêt, et le patient est ensuite filmé, au cours de la marche, par une ou plusieurs caméras (Barrey 1999, Gillette and Angle 2008), McLaughlin 2001). L'image ainsi obtenue est ensuite analysée dans des logiciels dédiés, qui calculent, au cours d'un cycle de marche, des distances, des angles, ou des vitesses à partir du déplacement, dans un plan ou dans l'espace, d'un marqueur donné, ou de marqueurs les uns par rapport aux autres. Les marqueurs utilisés peuvent être de différents types : marqueurs simples non réfléchissants, offrant un simple contraste de couleur, marqueurs réfléchissants, émetteurs de rayonnements infrarouges, ou encore marqueurs avec photodiodes de type LED (Light Emitting Diodes) incorporées (Gillette and Angle 2008). Les caméras utilisées sont à haute fréquence d'acquisition, de 60 à 1000 (Armand et al. 2005, (Waxman et al. 2008) ou 2000 Hz (Barrey 1999). La plupart des études réalisées sur le chien ou le cheval emploient une fréquence d'acquisition comprise entre 60 (Allen et al. 1994, Clements et al. 2005), Poy et al. 2000) et 200 Hz (Colborne et al. 2006, Leleu et al. 2002). L'analyse du déplacement des marqueurs en 2 ou, le plus souvent en 3 dimensions, permet d'obtenir des courbes représentant l'évolution d'un angle articulaire, de la vitesse de déplacement d'un site anatomique donné, ou de la distance entre deux membres au cours d'un cycle de marche (Clements et al. 2005, Poy et al. 2000).

La cinétique consiste à mesurer les forces produites au cours de la marche. Classiquement, ce sont les forces exercées par les membres au sol qui sont étudiées, grâce à l'utilisation de plateformes de force (Barrey 1999, Gillette and Angle 2008). Les capteurs de ces plateformes sont composés de cristaux de quartz, dont les propriétés piézoélectriques permettent la

production d'un signal électrique dont la tension est proportionnelle à la déformation du cristal, donc à la force qui lui est appliquée (Gillette and Angle 2008, McLaughlin 2001). Ces plateformes sont généralement équipées de quatre capteurs, qui, positionnés à chacun des coins, permettent de mesurer précisément la force exercée dans les trois axes (vertical, cranio-caudal et médio-latéral), au cours du temps (Fanchon et al. 2006), McLaughlin 2001). Les données enregistrées par plateformes de force peuvent être représentées graphiquement par des courbes de force en fonction du temps (Fanchon et al. 2006), et l'analyse des données permet l'obtention de valeurs pour des paramètres tels que force maximale, impulsion (force produite par unité de temps, calculée par mesure de l'aire sous la courbe), ou pente d'établissement de la force maximale (Fanchon et al. 2006, McLaughlin 2001). Chez le chien, la majorité des études réalisées en cinétique se focalise sur les forces verticales, et sur le pic de force et l'impulsion verticales (Evans et al. 2005, Gillette and Angle 2008, McLaughlin 2001).

Autour de ces deux gold-standards que sont cinématique et plateformes de force, d'autres méthodes de mesure se sont développées, en réponse à certaines problématiques soulevées par l'utilisation de ces deux techniques.

Ainsi, des tapis roulants avec capteurs à cristaux de quartz incorporés (Brebner et al. 2006, Fanchon et al. 2006), ou encore des « chemins de force » mesurant plusieurs mètres de long (Lascelles et al. 2006), ont été développés afin de pallier à la faible distance de marche que peut enregistrer une plateforme de force, et qui contraint l'individu étudié à effectuer de multiples passages. Si le tapis roulant permet une standardisation de la vitesse, démontrée comme ayant un effet majeur sur les forces enregistrées au sol, son usage est controversé, suite aux conclusions de plusieurs études, chez l'Homme et l'animal, démontrant que celui-ci modifie la qualité de la marche (Barrey et al. 1993, Buchner et al. 1994, Gomez Alvarez et al. 2009, Strathy et al. 1983, Watt et al. 2010). Les chemins de force, composés de jauges de contrainte à haute densité (Gillette and Angle 2008, Lascelles et al. 2006), permettent l'enregistrement de nombreux cycles de marche successifs, en un nombre limité de passages. Ce type de système a été utilisé avec succès chez les carnivores domestiques (Lascelles et al. 2006, (Lascelles et al. 2007). Néanmoins, seules les forces verticales sont alors enregistrées.

Dans le domaine de la cinétique, définie par l'analyse des causes du mouvement, d'autres systèmes ont vu le jour, en réponse à une autre problématique, qui est celle de l'accessibilité

des systèmes d'analyse de marche classiques. Les installations de cinématique et les plateformes de force sont en effet complexes et non aisément transportables. Leur accès est donc restreint aux laboratoires d'analyse de marche, ce qui constitue une des causes de leur sous-utilisation (Simon 2004).

C'est ainsi qu'accéléromètres et gyroscopes, associés ou non, sont apparus comme outils d'analyse de marche (Kavanagh and Menz 2008, Mayagoitia et al. 2002). Qu'ils soient piézoélectriques, piézorésistifs, capacitifs ou à jauge de contrainte, les accéléromètres délivrent un signal proportionnel aux accélérations exercées sur eux, qui est enregistré le plus souvent par une mémoire interne associée, où il est stocké avant d'être analysé (Kavanagh and Menz 2008). Ces systèmes sont miniaturisés, permettant leur utilisation hors du cadre d'un laboratoire d'analyse de marche, et leur faible encombrement permet de ne pas gêner le patient. Les accéléromètres peuvent être utilisés accrochés à un membre, ou à un site anatomique particulier (Kavanagh and Menz 2008, Mayagoitia et al. 2002), ou être positionnés à proximité du centre de gravité (Auvinet et al. 2002, Leleu et al. 2002). Dans ce dernier cas de figure, les accélérations enregistrées sont, selon, la seconde loi fondamentale de la dynamique de Newton, le reflet direct des forces exercées au sol durant la locomotion. Ainsi, si trois accéléromètres sont placés au centre de gravité et orthogonalement les uns par rapport aux autres, ils permettent une mesure cinétique de la locomotion de l'individu porteur du dispositif. A partir des courbes d'accélération, peuvent être calculées de nombreuses variables descriptives, telles que fréquence des foulées, puissance, et des variables qualitatives telles que régularité (également appelée variabilité, suivant les auteurs) ou symétrie (Dingwell and Cavanagh 2001, Leleu et al. 2002). Les premières sont calculées par analyse spectrale, et plus précisément par transformée rapide de Fourier le plus souvent. Les secondes sont issues de calculs de corrélations visant à étudier la répétabilité du signal d'un cycle de marche à l'autre ou d'un pas à l'autre (Auvinet et al. 2002). Cette technique permet donc d'étudier la dynamique de la marche, et sa qualité.

Parmi tous ces outils disponibles, et alors qu'aucune méthode d'évaluation de la locomotion du chien GRMD n'avait été développée lorsque ce travail a débuté, le choix de l'outil de mesure a dû être effectué, en suivant plusieurs critères.

En premier lieu, le test recherché devait être réalisable chez les chiens GRMD, et donc notamment tenir compte de leur fatigabilité. Des tests d'assez longue durée dans leur préparation et dans leur exécution, tels que les tests de cinématique (Simon 2004), ont donc

semblé ne pas répondre à cette exigence. Par ailleurs, dans la mesure où ce test devait pouvoir être réalisé chez de très jeunes animaux en début d'évolution, au moment de leur inclusion dans un essai thérapeutique, une méthode nécessitant un apprentissage conséquent, tel que, par exemple, l'utilisation d'un tapis roulant (Fanchon et al. 2006), n'était pas souhaitable. De surcroît, l'usage d'un tapis roulant pour une étude de cinématique (Fanchon 2003) avait été testé sur des chiens GRMD quelques années avant ce travail, dans le cadre d'une thèse vétérinaire. L'expérience avait été peu concluante en liaison avec les difficultés rencontrées pour habituer les chiens au tapis roulant et déterminer une vitesse de confort. Cette étude a également mis en évidence la difficulté de standardiser la vitesse d'un individu à l'autre, en liaison avec l'hétérogénéité de l'atteinte locomotrice, qui contraint à choisir une vitesse très faible.

Une autre exigence pour ce test était sa simplicité de mise en œuvre, et son coût le plus réduit possible. Ce point du cahier des charges s'inscrivait dans un contexte de mise en place de consortiums, visant à harmoniser les méthodes d'évaluation chez les patients, comme dans les modèles animaux, ce, afin de rendre comparables les résultats obtenus par différentes équipes (Mercuri et al. 2008). Dans un souci de permettre l'utilisation de cet outil par les différentes équipes travaillant sur le chien déficient en dystrophine, le test se devait d'être simple, c'est-à-dire de pouvoir être mis en œuvre par une personne non obligatoirement spécialisée en biomécanique, d'être le plus rapide possible dans son analyse, de pouvoir être mis en place directement dans les unités de recherche, sans obligatoirement passer par un laboratoire d'analyse de marche, et enfin d'être d'un coût raisonnable afin que ce facteur ne soit pas limitant pour l'équipement des différents laboratoires. Les deux gold-standards que sont cinématique et cinétique par plateformes de force ne répondent pas à ce critère.

Un dernier point du cahier des charges était le potentiel de transposabilité de l'outil du chien au patient, et donc potentiellement des résultats obtenus. De par la position particulière pré-clinique du modèle GRMD, l'outil choisi devait être le plus clinique possible, transposable au patient et pourquoi pas déjà utilisé chez le patient DMD. Seules quelques études sur la locomotion du patient DMD ont été publiées. Elles utilisent la cinématique et/ou des plateformes de force (D'Angelo et al. 2009, Gaudreault et al. 2009, Sutherland et al. 1981). Néanmoins, ces analyses de marche du patient DMD restent ponctuelles et ces deux outils de mesure n'ont jamais été proposés comme méthode d'évaluation au cours d'un essai thérapeutique, sans doute en liaison, comme mentionné plus haut, avec la complexité et la faible accessibilité de ces techniques. Plus récemment, un intérêt croissant pour l'utilisation

de l'accélérométrie chez ces patients est apparu (Jeannet et al. 2008, Jeannet et al. 2010, Mercuri et al. 2008), orientant le choix vers cette méthode de mesure.

Chez le chien, l'accélérométrie n'a jamais été utilisée dans le cadre d'une analyse de marche, mais uniquement comme outil d'actimétrie (Hansen et al. 2007, Yamada and Tokuriki 2000). Néanmoins, cette technique a été validée chez un autre quadrupède, le cheval (Leleu et al. 2002), chez lequel sa répétabilité, sa précision et ses capacités à détecter des anomalies ont été démontrées (Biau et al. 2002), Leleu et al. 2002). Chez l'Homme, l'accélérométrie a démontré ses capacités à mettre en évidence des anomalies spécifiques de la locomotion chez des patients âgés ou atteints de neuropathies ou de maladies neurodégénératives (Iwashita et al. 2003, Maquet et al. 2010, Paquet et al. 2003). L'hypothèse que cette méthode de mesure permettrait d'identifier et de quantifier des anomalies locomotrices chez le chien GRMD a donc été formulée. L'étude présentée ici est la première publiée sur l'analyse de marche par accélérométrie chez le chien, et il s'agit également de la première étude d'analyse de marche publiée chez le chien GRMD (Barthelemy et al. 2009).

Le développement de l'accélérométrie a été conduit en deux grandes phases. Tout d'abord, une phase de validation de la pertinence de l'outil pour le modèle GRMD. Cette partie du travail a été effectuée chez des animaux adultes, cliniquement stabilisés, et présentant une atteinte locomotrice installée. La reproductibilité inter-opérateur ainsi que la répétabilité des mesures ont été évaluées. Dans un second temps, la pertinence des différentes variables sélectionnées comme pouvant présenter un intérêt potentiel a été évaluée, par comparaison des valeurs obtenues dans la population GRMD à celles obtenues dans une population de chiens sains.

La deuxième phase de ce travail a consisté en l'établissement d'une histoire naturelle de l'accélérométrie chez le chien GRMD en cours d'évolution, de l'âge de deux mois à l'âge de neuf mois. Cette deuxième phase avait pour objectif de répondre à plusieurs problématiques. Tout d'abord celle de vérifier qu'un suivi longitudinal de la locomotion par accélérométrie était possible, et pertinent (c'est-à-dire permettait de détecter une évolution de la locomotion). En effet, les différentes stratégies thérapeutiques testées dans ce modèle le sont à un stade généralement précoce de la maladie, c'est-à-dire dans les premiers mois (Kerkis et al. 2008, Kornegay et al. 2010, Sampaolesi et al. 2006). Etre capable de détecter des anomalies de locomotion à ces stades précoces, de manière sensible, et leur évolution de manière quantifiée

était donc primordial. Enfin, un dernier objectif de cette deuxième partie de l'étude était tout simplement de disposer d'une population témoin, décrite grâce à cet outil, et disponible comme population de référence pour évaluer des chiens traités.

B. Evaluation de la locomotion chez des animaux adultes cliniquement stables

1) Matériel et Méthode

a) Matériel

L'équipement choisi et utilisé dans cette étude était un Locometrix 3D ®. Il comportait notamment l'avantage d'être commercialisé avec un logiciel d'analyse de marche dédié, et adapté au quadrupède (Auvinet et al. 2002).

Le Locometrix 3D ®, composé de trois accéléromètres disposés orthogonalement les uns par rapport aux autres (figure 1), a permis l'enregistrement des accélérations dans les axes craniocaudal, dorso-ventral et médio-latéral. La plage de mesure des accéléromètres était de ± 2 g, avec une résolution de 0.001 g. Un enregistreur de données intégré, connecté aux accéléromètres, a permis l'enregistrement continu du signal, via 3 voies synchrones, à une fréquence d'acquisition de 100 Hz. Disposant d'une autonomie en enregistrement de 11 heures, le système Locometrix a permis l'enregistrement de plusieurs tests le même jour sans contraindre l'opérateur à recharger l'appareil ou à le décharger de ses données entre deux tests.

Les tracés d'accélération collectés et enregistrés dans l'appareil ont ensuite été transférés via un port USB et l'interface du logiciel Equimetrix ®.

b) Variables calculées

Les différentes variables étudiées ont été calculées dans le logiciel Equimetrix ®. Sur les tracés d'accélérations dorso-ventrales, des séquences de 10.24 secondes de locomotion stable ont été sélectionnées. S'entendent par séquences de locomotion stable des tracés correspondant à une même allure maintenue, hors phases d'accélération et de décélération. Afin d'optimiser au mieux le choix de ces séquences, le curseur permettant de déterminer le

début de l'échantillonnage était déplacé plusieurs fois et la position permettant d'obtenir la meilleure valeur de régularité, donc de qualité de marche (voir infra), a été conservée pour l'analyse.

Les variables choisies ont été les suivantes :

La vitesse (exprimée en m/s)

Celle-ci a été mesurée par chronométrage des chiens sur une zone de 5 mètres, délimitée sur le parcours. Dans la mesure où cette variable est le plus probablement corrélée à la taille de l'animal, elle a été ici normalisée par la hauteur au garrot, elle-même définie par la hauteur (en mètres) du chien par rapport au sol, mesurée sur le dos, en arrière des scapulae. Cette variable, issue d'une normalisation par la hauteur en mètres, est donc exprimée en s^{-1} .

La fréquence des cycles locomoteurs (exprimée en s^{-1})

Chez les quadrupèdes, un cycle de marche comporte quatre accélérations dorso-ventrales, en cas d'allure à quatre temps, telle que le pas, et deux accélérations dorso-ventrales en cas d'allures à deux temps telles que le trot ou le galop (annexe 1). Par conséquent, en fonction du type d'allure employé, la fréquence des cycles a été calculée comme le quart ou la moitié de la fréquence fondamentale (correspondant en fait à la fréquence d'un pas), dérivée du signal d'accélérations dorso-ventrales par une transformée rapide de Fourier. Une vérification de la valeur calculée par le logiciel, notamment sur des allures aux tracés très modifiés (fusion de pics d'accélération par exemple) telles que le galop dit « en saut de lapin » (bonds) (annexe 1) a été réalisée par l'opérateur par comptage « manuel » du nombre de cycles observés sur le tracé durant les 10.24 secondes.

La longueur de foulée (exprimée en m)

Cette variable correspond à la distance parcourue au cours d'un cycle de marche (c'est-à-dire entre deux appuis successifs d'un même membre). Elle a été calculée par le logiciel en divisant la vitesse par la fréquence. De la même façon que la vitesse, la longueur des foulées a été normalisée par la hauteur au garrot, afin de s'affranchir de différences entre individus simplement dues à des tailles différentes. Cette variable, issue d'une normalisation par la hauteur en mètres, est donc sans unité.

La régularité (sans unité)

Il s'agit d'un score normalisé qui a pour objectif de quantifier la répétabilité des accélérations dorso-ventrales au cours des cycles successifs de locomotion compris dans l'échantillonnage de 10.24 secondes. La régularité a été calculée par le logiciel, et par addition de deux

coefficients de corrélation, nommés C1 et C2, C1 représentant la corrélation des accélérations entre chaque cycle locomoteur, et C2 la corrélation entre accélérations d'un même cycle. C1 et C2 ont été obtenus par calcul d'une fonction d'autocorrélation sur le signal d'accélérations dorso-ventrales. De manière à obtenir une échelle de score linéaire, les coefficients C1 et C2 ont été multipliés par 100 et le résultat normalisé par une transformée en Z.

La puissance totale (exprimée en W/kg)

Dans chacun des 3 axes de mesure des accélérations, la puissance des accélérations a été calculée comme l'intégrale du spectre de puissance obtenue par transformée rapide de Fourier, à partir du signal brut d'accélérations. La puissance totale correspond à la somme des puissances calculées dans les 3 axes.

Puissance relative dans chaque axe (exprimée en %)

Afin de déterminer la contribution de chaque axe à la puissance totale, la puissance des accélérations dans chaque axe a été rapportée à la puissance totale, permettant d'obtenir la proportion de puissance cranio-caudale, dorso-ventrale et médio-latérale.

La force relative (exprimée en N/kg)

Afin de s'affranchir des différences de vitesse et d'allure influençant de manière certaine la valeur de la puissance totale, celle-ci (en W/kg) a été rapportée à la vitesse (en m/s), donnant lieu à une variable en N/kg, qui a été appelée force relative.

c) Déroulement du test

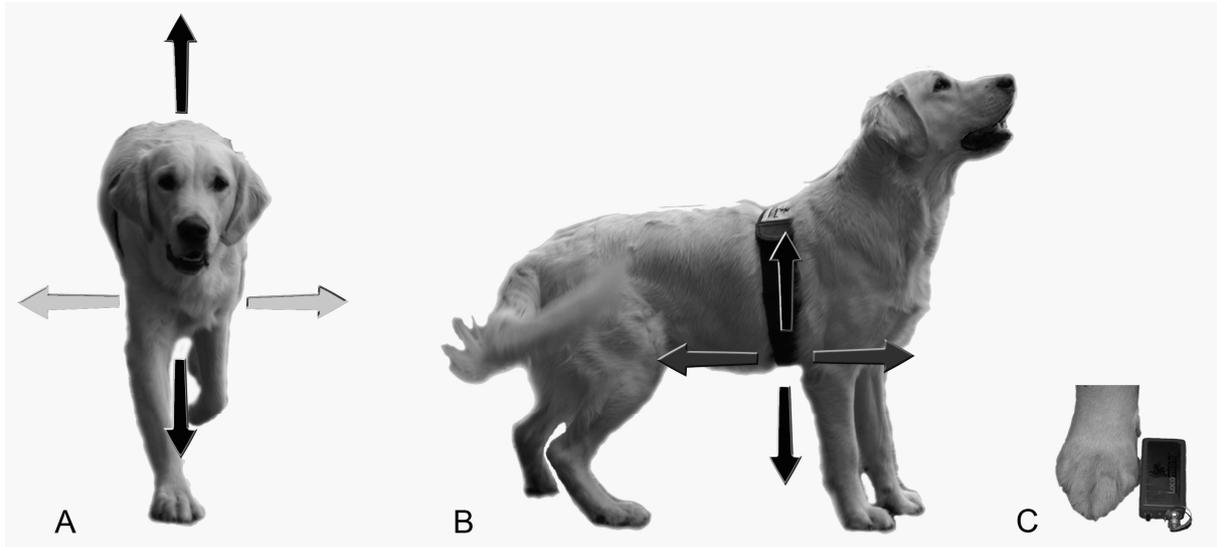
Au moment du test, et afin d'éviter toute fatigue préalable, le chien à évaluer était porté, jusqu'au couloir de marche, situé devant le chenil, et mesurant 30 mètres de long. Les chiens sains progressant souvent à une vitesse trop importante pour permettre un enregistrement aisé de 10.24 secondes de locomotion stable sur 30 mètres, ce couloir était alors rallongé à 45 mètres. Suivant le tempérament de l'animal, une petite phase d'acclimatation au couloir et/ou au port de l'appareillage a parfois été réalisée durant quelques minutes lors du premier test. Le boîtier contenant les accéléromètres et la mémoire était inséré dans une ceinture élastique. Cette ceinture était ensuite serrée délicatement mais assez fermement autour du thorax, afin d'éviter, ou, du moins, limiter, les mouvements du boîtier au cours du test (figure 1). L'ensemble, d'une masse de 156 g (50 g pour le boîtier, (voir taille de celui-ci figure 1C) et 106 g pour la ceinture), a permis le maintien du dispositif à proximité du centre de gravité du

chien au repos, en regard de l'appendice xiphoïde du sternum. Une attention particulière a dû être portée d'une part à la bonne orientation du boîtier par rapport au chien, afin que l'enregistrement des accélérations ne soit pas inversé, et d'autre part aux mouvements éventuels du dispositif durant le test, et plus particulièrement aux déplacements latéraux du boîtier. Ceux-ci auraient en effet pu être responsables d'une surestimation de la puissance des accélérations médio-latérales, car l'accéléromètre placé sur cet axe aurait alors été impacté par les accélérations générées dans l'axe dorso-ventral (Annexe 1). Ainsi, à la fin de chaque longueur de couloir, le bon positionnement du boîtier sur le sternum était contrôlé.

Une fois le dispositif en place, l'enregistrement était déclenché manuellement, chien debout et immobile durant quelques secondes. Le test proprement dit pouvait ensuite débuter, l'opérateur encourageant l'animal à avancer à ses côtés, sans laisse, à l'allure et la vitesse de son choix, mais en stimulant par la voix l'animal, avec pour but de faire atteindre au chien le maximum de ses capacités. L'opérateur était en charge de chronométrer l'animal à chaque passage exploitable (allure stabilisée, sans arrêt) et sur une zone de 5 mètres délimitée par des marques au sol.

Hormis pour l'étude de reproductibilité, tous les tests ont été réalisés par le même opérateur.

Figure 1 : Accélérométrie – positionnement du dispositif sur l’animal et axes de mesure des accélérations (A, B), taille du boîtier en comparaison de l’extrémité distale du membre antérieur d’un chien adulte (C).



A : Chien vu de face ; les flèches noires schématisent l'axe dorso-ventral, et les flèches gris clair l'axe médio-latéral. B : Chien vu de profil, portant la ceinture dans laquelle est inséré le boîtier de mesure, placé en regard de l'appendice xiphoïde du sternum ; les flèches noires schématisent l'axe dorso-ventral, et les flèches gris foncé l'axe cranio-caudal. C : boîtier contenant les trois accéléromètres et l'enregistreur de données, en comparaison de l'extrémité distale d'un antérieur de chien adulte. Noter la petite taille de l'appareil.

d) Méthode

Evaluation de la répétabilité de la méthode de mesure

Animaux

L'étude de répétabilité a été conduite sur 19 chiens adultes cliniquement stabilisés, dont huit chiens golden retriever mâles sains (âge moyen : 24.3 mois, écart-type : 25.3 mois) et onze chiens GRMD (âge moyen : 21.6 mois, écart-type : 17.8 mois) (Tableau 1). Parmi les chiens sains, 5 étaient issus de la colonie GRMD, et 3 étaient des chiens en cours d'éducation par des étudiants vétérinaires volontaires auprès de l'association Handi'chien, qui éduque des chiens guides pour personnes en fauteuil roulant. Parmi les 5 chiens issus de la colonie GRMD, seuls

4 étaient hébergés au chenil, le cinquième (Spirou) avait été adopté, et revenait avec son propriétaire pour les tests d'accélérométrie.

Tableau 1 : Accélérométrie - Animaux inclus dans l'étude de répétabilité

Nom	Statut (origine)	Age au 1 ^{er} test (mois)	Intervalle entre 1 ^{er} et 3 ^{ème} test (jours)
Cbof	Sain (colonie GRMD)	12.3	9
Ckan	Sain (colonie GRMD)	12.4	8
Cayak	Sain (Handi'chien)	10.6	53
Caïd	Sain (Handi'chien)	15.7	55
Chips	Sain (Handi'chien)	15.1	34
Spirou	Sain (colonie GRMD)	86.3	20
Cliff	Sain (colonie GRMD)	21.0	3
Crock	Sain (colonie GRMD)	21.5	2
Cki	GRMD	12.1	2
Cbidon	GRMD	9.8	2
Cballot	GRMD	12.5	2
Clown	GRMD	11.6	38
Clovis	GRMD	12.9	7
Cobra	GRMD	15.9	3
Charlot	GRMD	13.9	53
Charly	GRMD	12.6	3
Ajax	GRMD	34.2	3
Athos	GRMD	34.1	3
T-Fal	GRMD	68.5	3

Déroulement de l'étude

Chacun des 19 chiens a subi un test d'accélérométrie, trois fois à quelques jours d'intervalle (voir tableau 1), et par le même opérateur. Les tests ont été conduits conformément à la procédure énoncée précédemment. Tous les animaux inclus dans l'étude avaient déjà subi des tests d'accélérométrie auparavant, et pouvaient donc être considérés comme des animaux

« habitués » à ce test, ce qui permettait *a priori* d'éviter, ou du moins d'atténuer, un éventuel effet apprentissage ou habituation.

Analyse des données

Pour chacun des tests, toutes les séquences exploitables ont été analysées dans le logiciel Equimetrix, et les données suivantes ont été retenues pour l'analyse statistique : vitesse (m/s), fréquence des foulées (/s), longueur des foulées (m), régularité, puissance totale (W/kg), puissances relatives dans chacun des trois axes (%), force (N/kg).

Pour chaque test, les valeurs obtenues au cours de deux séquences différentes d'un même test ont été conservées, afin de déterminer s'il existait un effet intra-jour. Lorsque plus de deux séquences étaient exploitables au cours du même test, un tirage au sort a été effectué permettant de sélectionner deux d'entre elles.

Analyse statistique

Une ANOVA à mesures répétées à deux facteurs (intra- et inter-jour) a été effectuée dans le logiciel Statistica 9 afin de déterminer la répétabilité de la méthode. Le seuil de significativité a été fixé à $p = 0.05$.

Evaluation de la reproductibilité inter-opérateurs de la méthode

Animaux

L'étude de reproductibilité inter-opérateur a été conduite sur huit chiens adultes cliniquement stabilisés, dont quatre chiens golden retriever sains issus de la colonie GRMD et hébergés au chenil, deux chiens GRMD et deux chiens LRMD (Labrador Retriever Muscular Dystrophy) (Tableau 2). Tous les chiens avaient déjà effectué des tests auparavant.

Tableau 2 : Accélérométrie – Animaux inclus dans l'étude de reproductibilité inter-opérateurs.

Nom	Statut	Age au 1 ^{er} test (mois)	Intervalle entre 1 ^{er} et 3 ^{ème} test (jours)
Dclack	Sain	18.3	4
Crock	Sain	32.0	4
Dzastre	Sain	10.4	4
Dzer	Sain	10.4	4
Ajax	GRMD	50.8	2
Athos	GRMD	50.7	2
Alcaline	LRMD	52.5	2
Desmet	LRMD	17.8	2

Déroulement de l'étude

Les chiens ont été examinés par trois opérateurs différents, trois fois à quelques jours d'intervalle. L'étude a été réalisée en deux temps : une première session de tests sur chiens dystrophiques, et une seconde sur chiens sains. Chacune des sessions était composée de trois jours de tests, en une courte période de temps (Tableau 2). Au cours de chaque jour de test, chaque opérateur a dû réaliser le test d'accélérométrie sur chacun des chiens. Afin de limiter l'influence de la fatigue sur les performances de l'animal, les trois opérateurs ont effectué leurs tests à des créneaux horaires espacés d'au moins deux heures. De plus, et malgré ces précautions, afin que l'effet opérateur ne soit pas confondu avec un effet fatigue ou heure de passage dans la journée, l'ordre d'intervention des différents opérateurs a été modifié chaque jour.

Parmi les trois opérateurs, se trouvaient un opérateur semi-expérimenté (opérateur 1), un opérateur novice (opérateur 2) et un opérateur expérimenté (opérateur 3). Une formation préalable avait été dispensée par l'opérateur expérimenté aux deux autres intervenants.

Analyse des données

Pour chacun des tests, toutes les séquences exploitables ont été analysées dans le logiciel Equimetrix ®, et les données suivantes ont été retenues pour l'analyse statistique : vitesse (m/s), fréquence des foulées (/s), longueur des foulées (m), régularité, puissance totale (W/kg), puissances relatives dans chacun des trois axes (%), force (N/kg).

Analyse statistique

Une ANOVA à mesures répétées avec un effet opérateur et un effet jour a été effectuée dans le logiciel Statistica 9, afin de déterminer l'effet opérateur, et la répétabilité de chaque opérateur. Le seuil de significativité a été fixé à $p = 0.05$.

Evaluation de la pertinence des différentes variables pour la caractérisation de la locomotion du chien GRMD

Animaux

L'étude d'évaluation de la pertinence des différentes variables dans le modèle GRMD a été conduite sur 29 chiens adultes cliniquement stabilisés, dont onze chiens golden retriever sains, d'un âge moyen de 21,3 mois (écart-type : 21,9 mois) et 18 chiens GRMD d'un âge moyen de 17,8 mois (écart-type : 14,5 mois) (Tableau 3). Les chiens GRMD montraient une importante hétérogénéité clinique sur le plan locomoteur, comme peuvent en témoigner leurs scores cliniques moteurs, compris entre 27.3 % pour un chien très peu touché (T-Fal) et 86.3 %, pour un chien présentant une atteinte motrice importante (Charlot) (Tableau 3).

Afin de déterminer dans quelle mesure les caractéristiques de marche dégagées chez le chien GRMD sont spécifiques de cette myopathie chez le chien, 9 chiens labradors adultes atteints de myopathie centronucléaire (CNM) ont également subi des tests d'accélérométrie (Tableau 4). Cette myopathie entraîne sur le plan clinique une faiblesse musculaire et une hypotonie, avec une altération de la locomotion plus discrète que chez le chien GRMD.

Parmi tous ces animaux, 8 des 11 chiens sains, 10 des 18 chiens GRMD et 5 des 9 chiens CNM avaient subi des tests au préalable, dans le cadre de suivis longitudinaux durant leurs premiers mois de vie.

Tableau 3 : Accélérométrie – Animaux inclus dans l'étude d'évaluation de la pertinence des différentes variables pour la caractérisation locomotrice du chien GRMD

Nom	Symbole (graphes)	Statut (origine)	Age (mois)	Poids (kg)	Hauteur au garrot (m)	Score moteur (%)
Cbof	✖	Sain (colonie GRMD)	12.3	30.9	0.60	-
Ckan	◆	Sain (colonie GRMD)	12.4	31.7	0.61	-
Cayak	▬	Sain (Handi'chien)	10.6	30.5	0.61	-
Caïd	✕	Sain (Handi'chien)	15.7	33.6	0.63	-
Chips	◇	Sain (Handi'chien)	15.1	28.7	0.56	-
Spirou	□	Sain (colonie GRMD, adoption)	86.3	23.7	0.54	-
Cliff	●	Sain (colonie GRMD)	21.0	27.2	0.58	-
Crock	▬	Sain (colonie GRMD)	21.5	27.4	0.61	-
Dzastre	○	Sain (colonie GRMD)	10.4	24.1	0.62	-
Dzer	△	Sain (colonie GRMD)	10.4	22.0	0.56	-
Dclack	■	Sain (colonie GRMD)	18.3	26.9	0.62	-
Cki	●	GRMD	12.1	14.7	0.52	43.2
Cbidon	+	GRMD	9.8	20.1	0.59	45.5
Cballot	▲	GRMD	12.5	16.2	0.55	52.3
Clown	◆	GRMD	11.6	19.4	0.52	54.5
Clovis	●	GRMD	12.9	22.3	0.54	45.5
Cobra	✖	GRMD	15.9	22.4	0.60	38.6
Charlot	✕	GRMD	13.9	14.3	0.45	86.3
Charly	▬	GRMD	12.6	17.4	0.49	70.4
Ajax	✖	GRMD	34.2	24.5	0.56	36.4
Athos	◆	GRMD	34.1	21.4	0.46	59.1
T-Fal	✕	GRMD	68.5	24.4	0.50	27.3
Ebam	▬	GRMD	11.2	24.4	0.62	40.9
Eboum	■	GRMD	11.2	16.8	0.54	43.2
Dlice	+	GRMD	10.2	18.4	0.50	52.3
Dluge	▬	GRMD	13.6	16.5	0.52	56.8
Dk	●	GRMD	13.9	18.4	0.51	59.1
Eaudvy	▬	GRMD	11.7	23.5	0.54	47.7
Dbrouille	■	GRMD	11.4	27.2	0.64	31.8

Tableau 4 : Accélérométrie – Chiens adultes atteints de myopathie centronucléaire

Nom	Age (mois)	Sexe	Poids (kg)	Hauteur au garrot (m)
Elvis	12.1	Mâle	21.1	0.53
Elton	12.1	Mâle	24.0	0.58
Elios	12.1	Mâle	19.2	0.56
Elnett	12.1	Femelle	18.6	0.52
Elisa	12.1	Femelle	19.9	0.52
Tex	81.5	Mâle	26.5	0.54
Teddy	81.5	Mâle	31.6	0.57
Team	81.5	Mâle	29.0	0.57
Sprag	96.8	Mâle	26.0	0.55

Déroulement de l'étude

Les 29 chiens ont effectué au moins un test d'accélérométrie. Les animaux également inclus dans l'étude de répétabilité ont été testés 3 fois (voir plus haut). Les autres chiens ont subi au moins un test. Les tests ont été effectués en suivant la procédure énoncée plus haut. Tous les tests ont été réalisés par le même opérateur.

Analyse des données

Toutes les séquences exploitables ont été analysées puis les données obtenues moyennées, de manière à obtenir une valeur moyenne par chien et par variable. Les variables étudiées ont été les suivantes : vitesse/hauteur au garrot (/s), fréquence des cycles (/s), longueur des foulées /hauteur au garrot, régularité, puissance totale (W/kg), puissances relatives dans chacun des trois axes (%), force (N/kg).

Analyse statistique

Une ANOVA à un facteur (statut : sains versus GRMD) a été effectuée dans le logiciel Statistica 9, afin de déterminer quelles variables pouvaient présenter un intérêt dans la caractérisation de la locomotion et la quantification du déficit locomoteur chez GRMD, c'est-à-dire quelles variables présentaient des valeurs différentes de celles rencontrées dans la population normale.

Un coefficient de corrélation de Pearson a été calculé afin de déterminer si les variables calculées étaient corrélées au score clinique moteur.

Des coefficients de variation, pour chaque variable et chacun des groupes ont été calculés, en normalisant l'écart-type par la moyenne, de manière à étudier l'aptitude des différentes variables à décrire la dispersion de la population (c'est-à-dire son hétérogénéité).

Une Analyse en Composantes Principale (ACP), méthode d'analyse multivariée, a enfin été réalisée, afin de déterminer si les variables interagissaient, et si oui, de quelle manière. Elle a également été effectuée afin d'étudier de quelle manière les individus se projetaient sur le plan d'ACP, et d'évaluer la capacité des différentes variables à séparer les individus GRMD des individus sains. Sept variables ont été utilisées pour la réalisation de cette ACP et sont les suivantes : la fréquence des cycles, la longueur des foulées/hauteur au garrot, la régularité, la puissance totale, et les 3 puissances relatives. La vitesse, corrélée de manière évidente à la fréquence et à la longueur des foulées, de même que la force, corrélée à la puissance totale, n'ont pas été incluses.

De manière à disposer d'un index permettant de situer les individus les uns par rapport aux autres, suivant les valeurs obtenues pour chacune des variables, la distance euclidienne au centre de gravité des individus sains a été calculée pour chaque chien. Cette distance a, comme les variables brutes, fait l'objet d'une ANOVA à un facteur afin de déterminer si elle permet de différencier les chiens GRMD des chiens sains.

Le seuil de significativité a été fixé à $p = 0.01$.

2) Résultats

a) Répétabilité de la méthode de mesure

Pour aucune des variables étudiées n'a été identifié d'effet intra- ou inter-jour significatif ($p > 0.05$), et ce quel que soit le type d'animaux considéré (GRMD ou sains). Ce résultat démontre que les mesures effectuées par cette méthode sont répétables, chez des chiens sains comme chez des chiens GRMD.

b) Reproductibilité inter-opérateur de la méthode de mesure

L'ensemble des tests prévus ont pu être réalisés. Tous les tracés obtenus ont pu être analysés, c'est-à-dire que chaque opérateur a été en mesure d'obtenir de la part de chacun des 8 chiens au moins une séquence de 10 secondes de locomotion stabilisée, à et ce à chacun des trois tests effectués. Néanmoins, des tracés évoquant fortement une rotation de la ceinture au cours du test ont été obtenus par les opérateurs 1 et 2, pour trois tests sur chiens sains. En ce qui concerne l'opérateur 1, les tracés en question concernaient des tests de Dclack, Dzer et Dzastre ; pour l'opérateur 2, ces trois tracés concernaient deux tests de Dclack, et un test de Dzer.

L'analyse statistique a tout d'abord confirmé les résultats obtenus dans l'étude de répétabilité : pour chacune des variables étudiées, aucun effet jour n'a été identifié ($p > 0.05$). Chaque opérateur a donc obtenu des mesures comparables d'un jour à l'autre, ce qui démontre une nouvelle fois la répétabilité de la méthode de mesure, pour un opérateur donné.

Cependant, un effet opérateur significatif ($p < 0.05$) a été révélé par l'analyse de variance, pour plus de la moitié des variables étudiées, à savoir : la vitesse, la fréquence des cycles (FC), la longueur des foulées (LF), la régularité (reg), et la puissance totale (PT). La force, calculée en normalisant la puissance totale par la vitesse, deux variables significativement impactées par le changement d'opérateur, ne subit pas, quant à elle, l'effet de ce changement. Les variations de puissance totale sont donc probablement essentiellement dues à des modifications de la vitesse choisie par le chien en fonction de l'opérateur, et ces variations sont donc lissées par la normalisation.

Le détail de l'analyse de variance montre que l'effet opérateur identifié pour les variables précédemment énumérées est essentiellement dû aux variations entre opérateurs sur les tests réalisés sur les chiens sains. Les cinq variables considérées sont significativement impactées par l'opérateur chez les chiens sains, tandis qu'une seule d'entre elles, la fréquence des cycles, est modifiée par le changement d'opérateur chez les chiens dystrophiques. La force est, chez les chiens dystrophiques, significativement modifiée par l'opérateur.

Les résultats détaillés de l'analyse de variance à mesures répétées utilisée ici sont présentés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Accélérométrie – résultats de l'étude de reproductibilité inter-opérateurs.

	Vitesse	FC	LF	Rég	PT	PDV/PT	PCC/PT	PML/PT	Force
Effet opérateur (tous)	p = 0.0034	p = 0.0047	p = 0.0515	p = 0.0282	p = 0.0131	p = 0.7956	p = 0.2177	p = 0.7921	p = 0.1578
Effet opérateur (sains)	p = 0.0018	p = 0.0051	p = 0.0107	p = 0.0093	p = 0.0164	p = 0.2830	p = 0.2783	p = 0.6881	p = 0.2122
Effet opérateur (GRMD)	p = 0.0846	p = 0.0337	p = 0.2697	p = 0.3032	p = 0.0658	p = 0.8296	p = 0.0808	p = 0.9479	p = 0.0210

La première ligne du tableau contient les effets opérateurs calculés sur l'ensemble des chiens. La deuxième et la troisième ligne contiennent respectivement les effets opérateurs calculés dans les populations saine et GRMD.

Abréviations utilisées : FC : fréquence des cycles ; LF : longueur des foulées ; Rég : régularité ; PT : puissance totale ; PDV/PT : puissance dorso-ventrale/puissance totale ; PCC/PT : puissance cranio-caudale/puissance totale ; PML/PT : puissance médio-latérale/puissance totale.

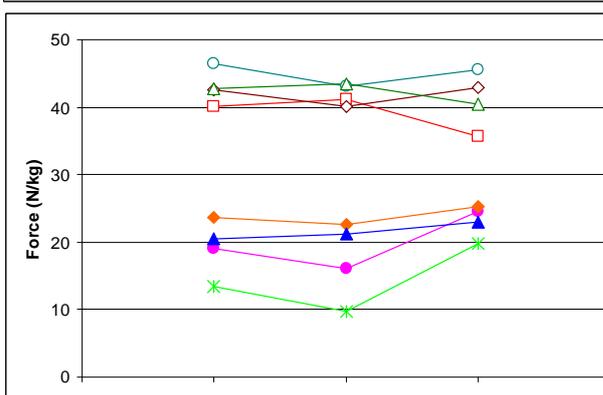
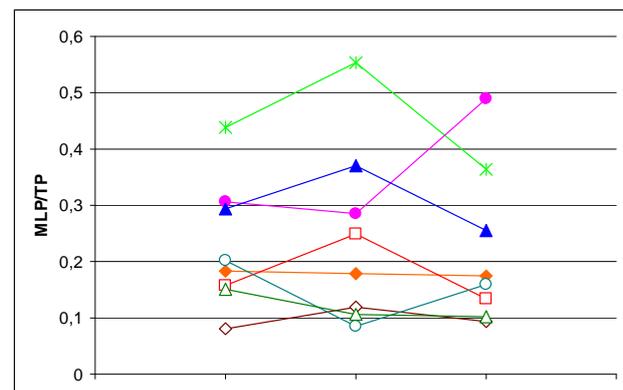
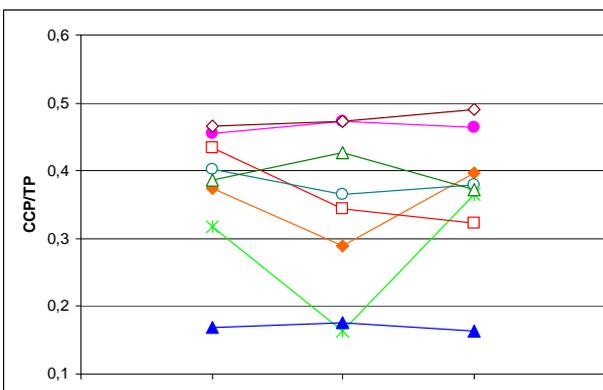
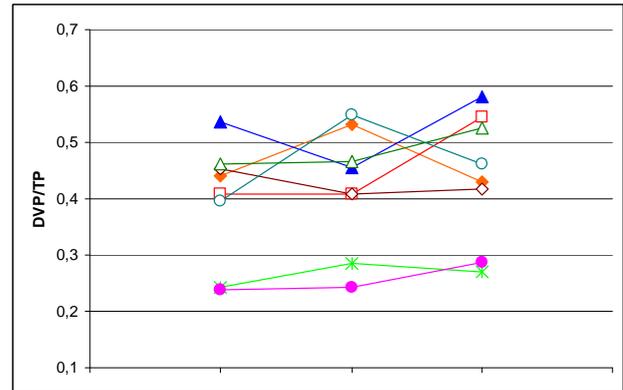
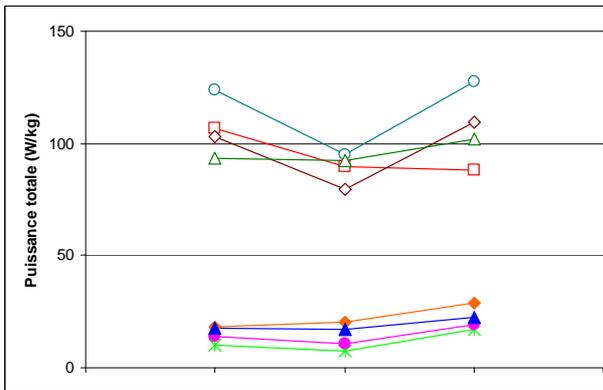
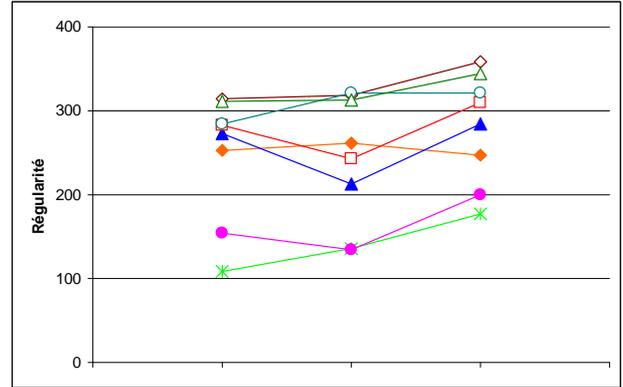
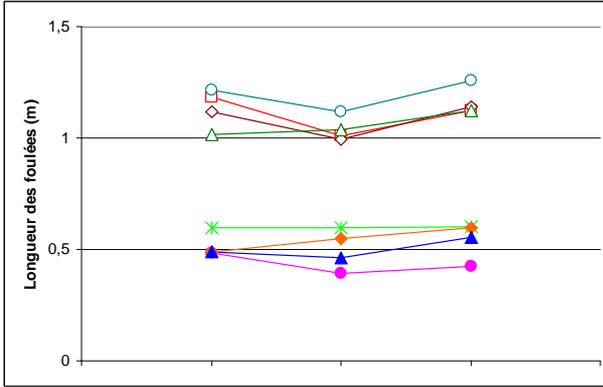
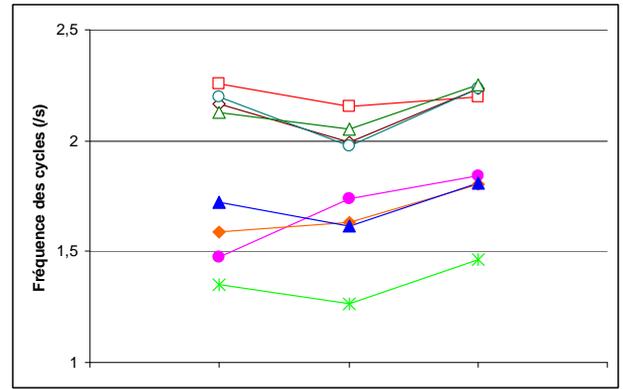
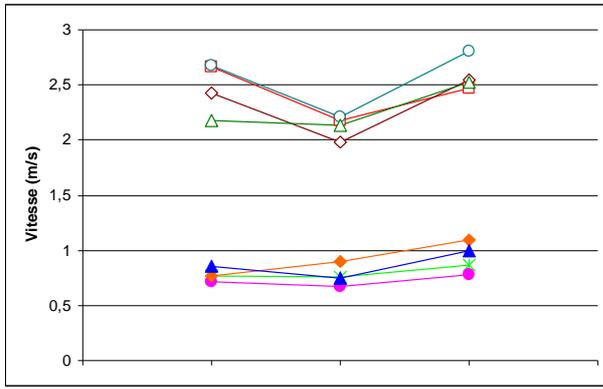
La figure 2 contient des graphes illustrant les résultats obtenus pour chacune des variables étudiées, par les trois opérateurs, et sur les huit chiens examinés. Pour davantage de lisibilité, et étant donné que la répétabilité intra-opérateur a été démontrée, la moyenne des trois tests effectués par chaque opérateur et pour chaque chien a été utilisée pour réaliser ces graphes. Il apparaît, à la lecture de ces graphes, que la vitesse utilisée par les chiens est plus élevée en présence de l'opérateur 3 (moyenne sains : 2.59 m/s écart-type : 0.15 m/s ; moyenne GRMD : 0.94 m/s, écart-type : 0.14 m/s) qu'en présence de l'opérateur 1 (moyenne sains : 2.48 m/s écart-type : 0.23 m/s ; moyenne GRMD : 0.78 m/s, écart-type : 0.06 m/s), avec lequel les chiens sont plus rapides qu'avec l'opérateur 2 (moyenne sains : 2.12 m/s écart-type : 0.10 m/s ; moyenne GRMD : 0.77 m/s, écart-type : 0.09 m/s). Ces variations de vitesse s'expliquent essentiellement par une modification dans le même sens de la fréquence des cycles locomoteurs, et dans une moindre mesure de la longueur des foulées. Parallèlement, et en conséquence de ces variations de vitesse, la puissance totale calculée est également plus importante à l'issue des tests réalisés par l'opérateur 3 (moyenne sains : 106.8 W/kg écart-type : 16.5 W/kg ; moyenne GRMD : 22.1 W/kg, écart-type : 5.0 W/kg), qu'à l'issue de ceux

réalisés par l'opérateur 1 (moyenne sains : 106.8 W/kg écart-type : 12.8 W/kg ; moyenne GRMD : 15.0 W/kg, écart-type : 3.7 W/kg), et surtout par l'opérateur 2 (moyenne sains : 89.1 W/kg écart-type : 6.8 W/kg ; moyenne GRMD : 13.8 W/kg, écart-type : 5.8 W/kg). En bref, les chiens présentent une locomotion plus rapide avec l'opérateur expérimenté, moins rapide avec l'opérateur semi-expérimenté et encore moins rapide avec l'opérateur novice, et les autres variables participant à la vitesse suivent également ce schéma. L'index de régularité est par ailleurs également supérieur pour les séquences enregistrées par l'opérateur 3 (moyenne sains : 333.4 écart-type : 22.2 ; moyenne GRMD : 227.3, écart-type : 48.0), que pour celles enregistrées par l'opérateur 1 (moyenne sains : 298.2 écart-type : 16.6 ; moyenne GRMD : 196.8, écart-type : 78.5), elles-mêmes comparables à celles obtenues par l'opérateur 2 (moyenne sains : 299.0 écart-type : 37.5 ; moyenne GRMD : 186.2 écart-type : 62.2).

Comme démontré par les résultats de l'analyse statistique, ces modifications en fonction de l'opérateur sont essentiellement présentes dans le groupe de chiens sains. Néanmoins, le même type de profil opérateur-dépendant est observé chez les chiens GRMD, certes dans une moindre mesure.

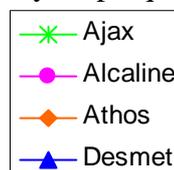
Enfin, si l'existence d'un effet opérateur est indéniable, les animaux n'en restent pas moins classés les uns par rapport aux autres de manière quasi équivalentes par les trois opérateurs.

Figure 2 : Accélérométrie – Reproductibilité inter-opérateur. Graphes montrant les valeurs moyennes des variables sur les trois tests, obtenues pour chaque chien, opérateur par opérateur (voir page suivante).

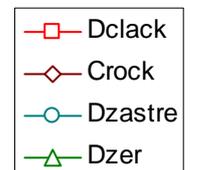


Légende :

Chiens dystrophiques



Chiens sains



1 2 3
Opérateur

1 2 3
Opérateur

Abréviations utilisées : DVP/TP : puissance dorso-ventrale/puissance totale ; CCP/TP : puissance cranio-caudale/puissance totale ; MLP/TP : puissance médio-latérale/puissance totale.

c) Evaluation de la pertinence des différentes variables pour la caractérisation de la locomotion du chien GRMD

Tous les animaux prévus pour les tests ont pu être évalués, et des séquences de locomotion exploitables ont été obtenues pour tous. Paradoxalement, il a fréquemment été plus difficile d'obtenir des séquences de locomotion stabilisée chez les chiens sains, plus dissipés que les chiens malades. Aucun des chiens examinés n'a eu besoin d'une phase d'apprentissage (port de la ceinture, marche dans un couloir) excédant quelques minutes d'acclimatation, même des chiens n'ayant jamais subi d'enregistrement auparavant.

L'allure préférentiellement et systématiquement choisie par les chiens sains, ainsi que par les chiens atteints de myopathie centronucléaire est le trot. Les chiens GRMD quant à eux ont employé deux allures différentes : le trot pour les animaux les moins touchés, ou le pas pour les animaux plus atteints.

Résultats de l'analyse de variance : étude de l'effet groupe (Sain vs GRMD)

L'analyse de variance visant à explorer l'effet groupe, donc les différences éventuelles entre chiens sains et chiens GRMD, a démontré que toutes les variables étudiées, à l'exception des puissances dorso-ventrale et cranio-caudale relatives sont très significativement ($p < 0.0001$) différentes chez le chien GRMD en comparaison de la population normale.

Les résultats détaillés de cette analyse statistique sont donnés dans le tableau 6.

Tableau 6 : Accélérométrie – pertinence des différentes variables pour la caractérisation de la locomotion du chien GRMD : résultats de l’analyse de variance (effet groupe sain vs GRMD)

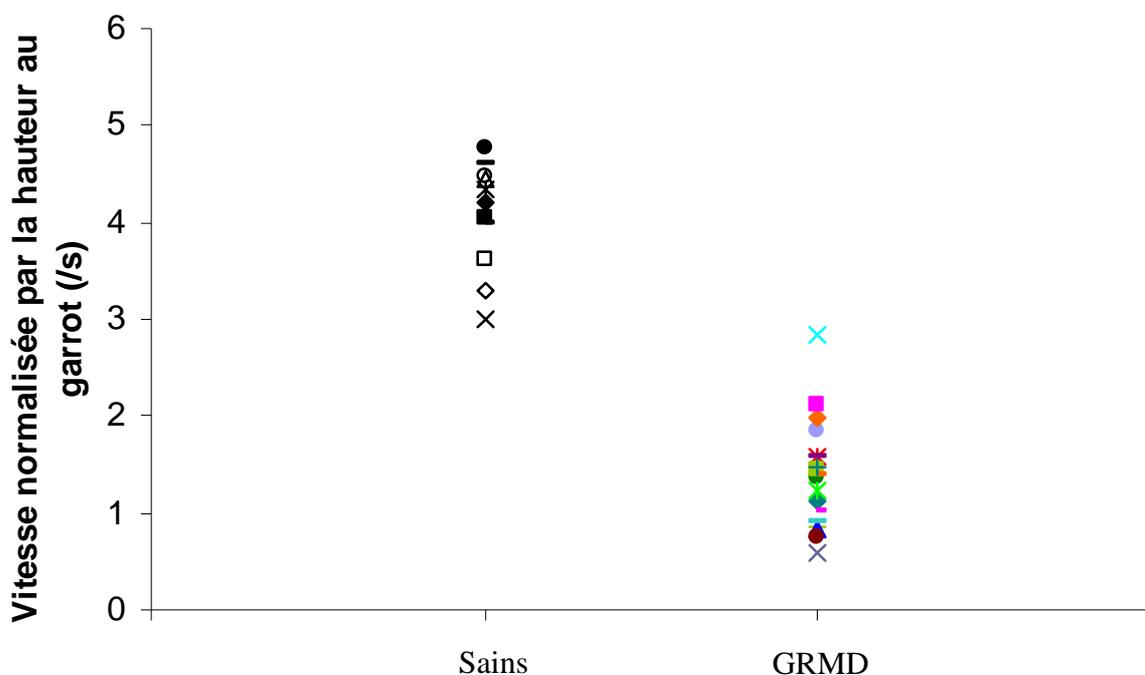
	Vitesse/HG (s ⁻¹)	FC (s ⁻¹)	LF /HG	Reg	PT (W/kg)	PDV/PT (%)	PCC/PT (%)	PML/PT (%)	Force (N/kg)
Valeur de p	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0773	0.0437	<0.0001	<0.0001
Moy (ET)	4.07 (0.56)	2.15 (0.14)	1.90 (0.16)	330.6 (27.5)	98.7 (22.2)	47.5 (6.3)	43.1 (7.4)	9.5 (2.6)	40.6 (5.1)
CV (%) sains	13.7%	6.5 %	8.4 %	8.3 %	22.5 %	13.3 %	17.2 %	27.4 %	12.6 %
Moy (ET)	1.38 (0.56)	1.57 (0.19)	0.86 (0.27)	218.7 (75.9)	15.9 (9.0)	38.0 (16.1)	33.2 (14.1)	28.7 (12.9)	20.6 (6.2)
CV (%) GRMD	40.6 %	12.1 %	31.4 %	34.7 %	56.6 %	42.4 %	42.5 %	44.9 %	30.1 %

Les niveaux de significativité < 0.01 figurent en gras.

Abréviations utilisées : Moy : moyenne ; ET : écart-type ; CV : coefficient de variation ; Vitesse/HG : vitesse normalisée par la hauteur au garrot ; FC : fréquence des cycles ; LF/HG : longueur des foulées normalisée par la hauteur au garrot ; Reg : régularité ; PT : puissance totale ; PDV/PT : puissance dorso-ventrale normalisée par la puissance totale ; PCC/PT : puissance cranio-caudale normalisée par la puissance totale ; PML/PT : puissance médio-latérale normalisée par la puissance totale.

La vitesse, normalisée par la hauteur au garrot (elle-même significativement ($p = 0.0017$) diminuée chez les chiens GRMD) afin de prendre en considération les variations de taille qui pourraient être à l'origine de différences de vitesse brute, est très significativement ($p < 0.0001$) diminuée chez les chiens GRMD (moyenne : 1.38 s^{-1} , écart-type : 0.56 s^{-1}), par rapport aux chiens sains (moyenne : 4.07 s^{-1} , écart-type 0.56 s^{-1}). Le graphe de la figure 3 montre les valeurs obtenues pour les individus sains en comparaison des individus GRMD. Les deux populations apparaissent bien distinguées par cette variable, sans zone de superposition, même si un chien GRMD, T-Fal, se rapproche très distinctement de la population de chiens sains. De la même manière, chez les chiens sains, trois animaux, Caïd, Chips et Spirou, se distinguent légèrement du reste du groupe avec des valeurs assez faibles. Enfin, la dispersion de la population GRMD, évaluée par un coefficient de variation à 40.6 %, est supérieure à celle observée dans la population saine, mesurée par la même méthode à 13.7 %.

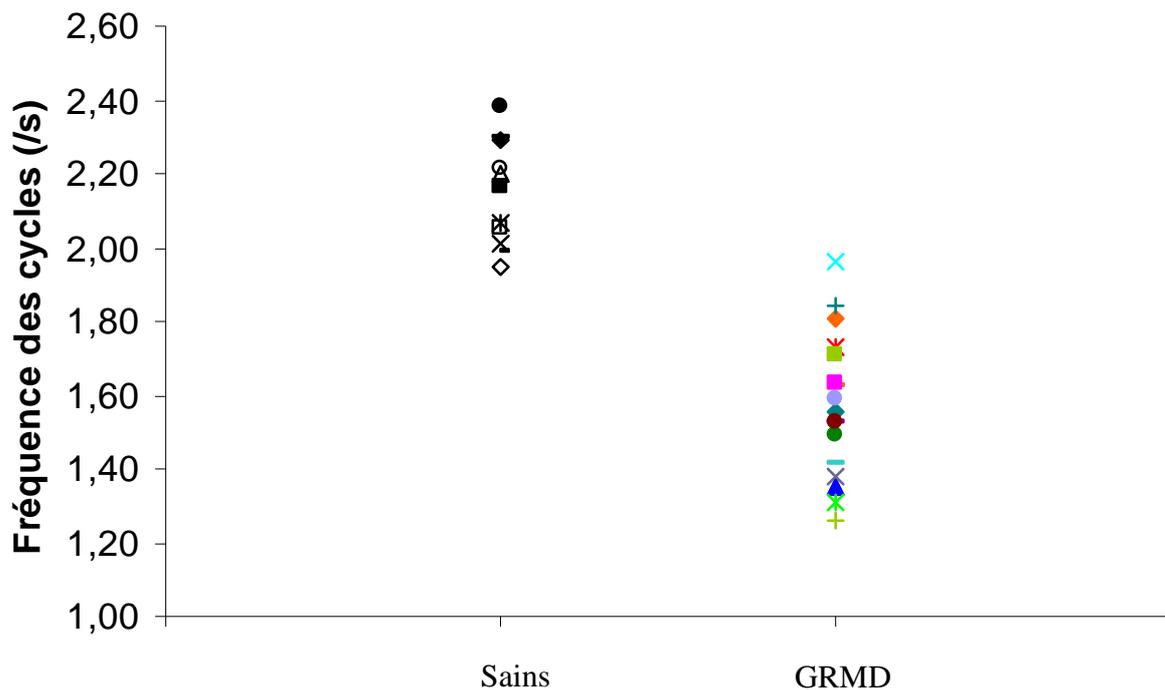
Figure 3 : Accélérométrie – pertinence des différentes variables pour la caractérisation de la locomotion du chien GRMD : valeurs de vitesse normalisée par la hauteur au garrot, obtenues pour les individus sains en comparaison des individus GRMD.



Les symboles de couleur représentent chacun un individu GRMD, et les symboles noirs chacun un individu sain. Ils sont consignés dans le tableau 3.

La fréquence des cycles locomoteurs est également très significativement ($p < 0.0001$) diminuée chez les chiens GRMD (moyenne : 1.57 s⁻¹, écart-type : 0.19 s⁻¹), par rapport aux chiens sains (moyenne : 2.15 s⁻¹, écart-type : 0.14 s⁻¹). Le graphe de la figure 4 montre les valeurs obtenues pour les individus sains en comparaison des individus GRMD. Il apparaît qu'une zone de superposition existe pour cette variable, et que ceci est lié à la position du chien GRMD T-Fal, dont la fréquence de cycle est supérieure à celle du chien sain Chips. Le coefficient de variation dans la population GRMD, calculé à 12.1 %, témoigne d'une dispersion plus importante que dans la population saine (6.5 %).

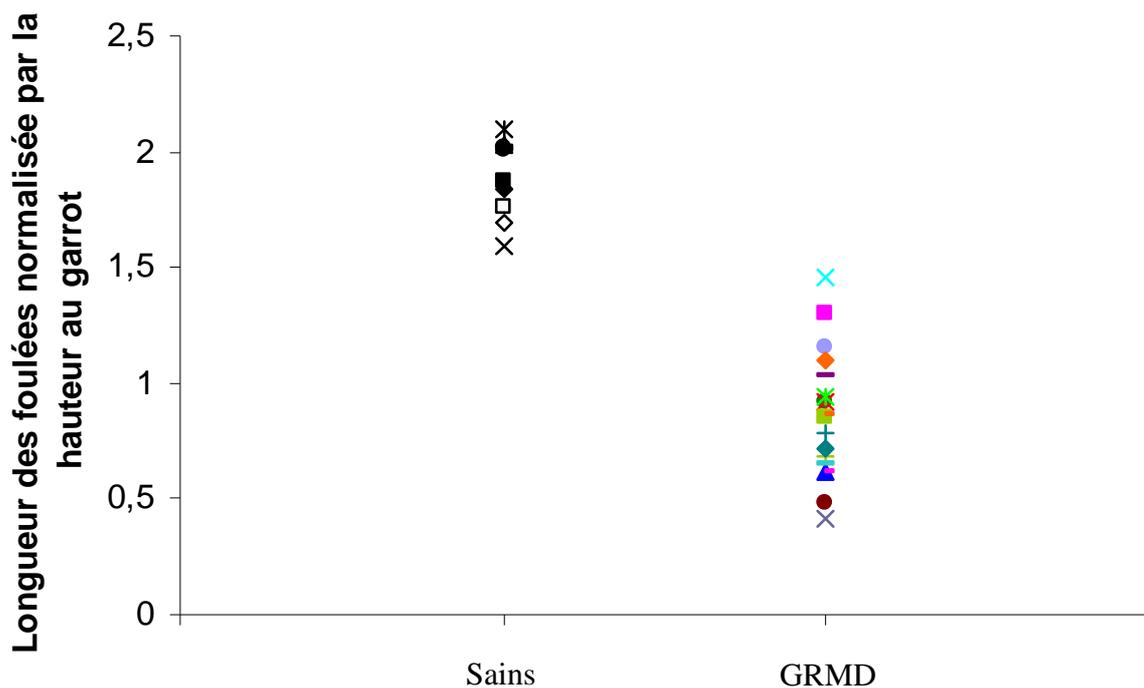
Figure 4 : Accélérométrie – pertinence des différentes variables pour la caractérisation de la locomotion du chien GRMD : valeurs de fréquence de cycle locomoteur, obtenues pour les individus sains en comparaison des individus GRMD.



Les symboles de couleur représentent chacun un individu GRMD, et les symboles noirs chacun un individu sain. Ils sont consignés dans le tableau 3.

La longueur des foulées, normalisée par la hauteur au garrot, est elle aussi très significativement diminuée ($p < 0.0001$) chez les chiens GRMD (moyenne : 0.86, écart-type : 0.27) en comparaison des chiens sains (moyenne : 1.90, écart-type : 0.16). Le graphe de la figure 5 montre les valeurs obtenues pour les individus sains en comparaison des individus GRMD. Aucune zone de superposition n'est constatée pour cette variable, même si le chien T-Fal apparaît une fois encore comme ayant la valeur la plus proche de celles des chiens sains. La dispersion, mesurée par le coefficient de variation, est assez faible pour la population normale (8.4 %), et nettement plus importante (31.4 %) pour la population GRMD.

Figure 5 : Accélérométrie – pertinence des différentes variables pour la caractérisation de la locomotion du chien GRMD : valeurs de longueur de foulée, normalisée par la hauteur au garrot, obtenues pour les individus sains en comparaison des individus GRMD.



Les symboles de couleur représentent chacun un individu GRMD, et les symboles noirs chacun un individu sain. Ils sont consignés dans le tableau 3.

La régularité, index quantifiant la répétabilité des cycles locomoteurs, est très significativement ($p < 0.0001$) diminuée chez les chiens GRMD (moyenne : 218.7, écart-type : 75.9), en comparaison des chiens sains (moyenne : 330.6, écart-type : 27.5). Le graphe de la figure 6 montre les valeurs obtenues pour les individus sains, en comparaison des individus GRMD. Il apparaît qu'une zone de superposition entre les deux populations existe. En effet, les chiens GRMD Cki, T-Fal et Ebam ont obtenu des valeurs de régularité comprises dans l'intervalle de valeurs défini par les chiens sains. Les 15 chiens GRMD restants ont quant à eux des valeurs inférieures, voire très basses pour certains animaux. Le coefficient de variation de la population GRMD est, pour cette variable encore, plus important (34.7 %) que celui de la population normale (8.3 %).

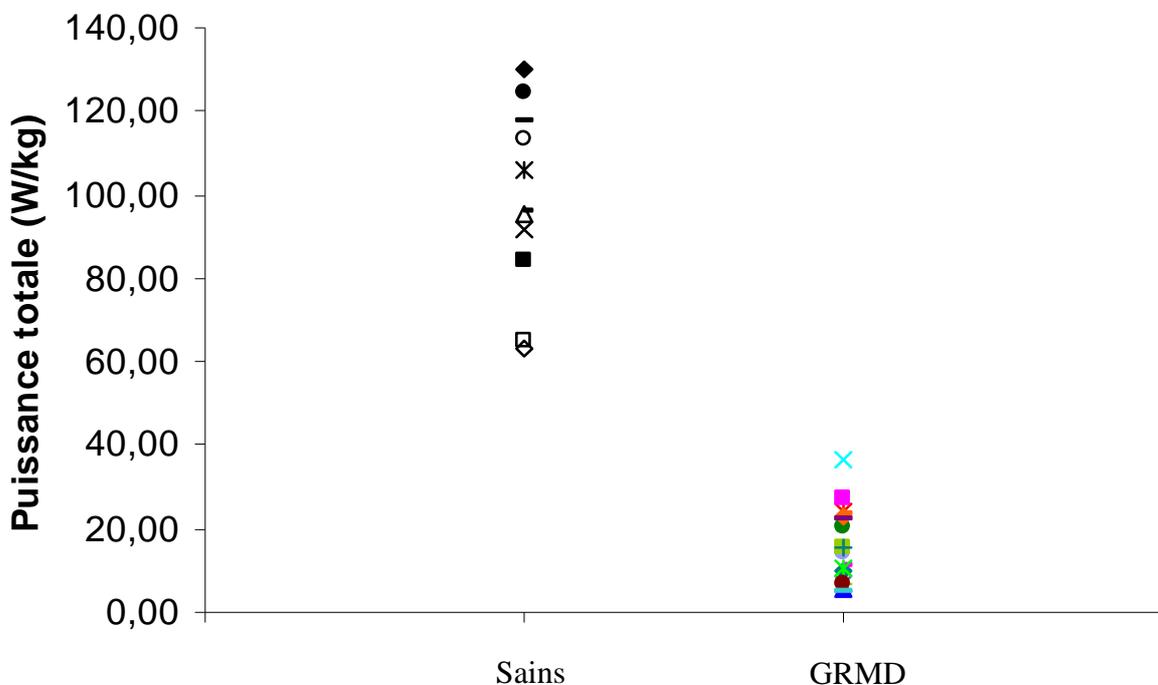
Figure 6 : Accélérométrie – pertinence des différentes variables pour la caractérisation de la locomotion du chien GRMD : valeurs de régularité obtenues pour les individus sains, en comparaison des individus GRMD.



Les symboles de couleur représentent chacun un individu GRMD, et les symboles noirs chacun un individu sain. Ils sont consignés dans le tableau 3.

La puissance totale est très significativement diminuée ($p < 0.0001$) chez les chiens GRMD (moyenne : 15.9 W/kg, écart-type : 9.0 W/kg), en comparaison des chiens sains (moyenne : 98.7 W/kg, écart-type : 22.2 W/kg). Le graphe de la figure 7 montre les valeurs obtenues pour les individus sains, en comparaison des individus GRMD. Il apparaît que la puissance totale est une variable qui distingue bien les deux populations, puisqu'aucune zone de superposition n'est présente. Les valeurs obtenues chez les chiens sains apparaissent très variables d'un individu à l'autre, de 63.3 W/kg pour Chips, à 129.9 W/kg pour Ckan, avec un écart-type de 22.2 W/kg, nettement supérieur à l'écart-type calculé dans la population GRMD (9.0 W/kg). Cependant, les valeurs de puissance totale obtenues chez les chiens GRMD étant très faibles en comparaison de celles obtenues chez les chiens sains, la valeur de l'écart-type comme le graphe donnent une impression relative d'homogénéité du groupe GRMD sur cette variable. Comme le démontre le coefficient de variation, il n'en est rien, puisque celui-ci atteint 56.6 % chez les chiens GRMD, alors qu'il ne s'élève qu'à 22.5 % chez les chiens sains.

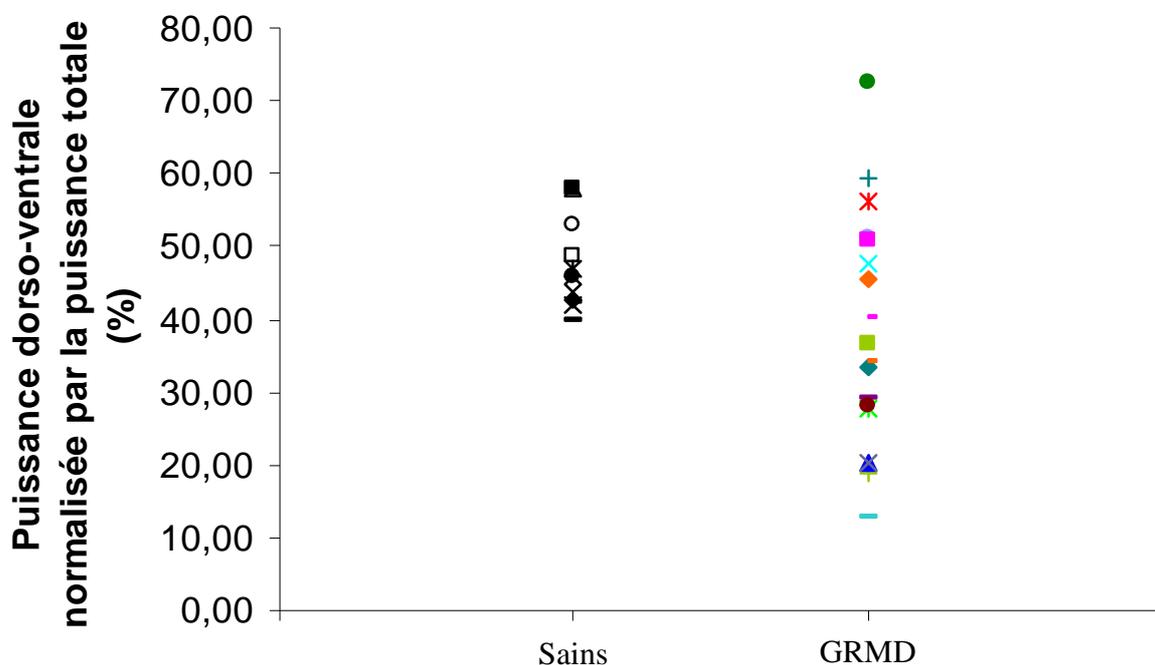
Figure 7 : Accélérométrie – pertinence des différentes variables pour la caractérisation de la locomotion du chien GRMD : valeurs de puissance totale obtenues pour les individus sains, en comparaison des individus GRMD.



Les symboles de couleur représentent chacun un individu GRMD, et les symboles noirs chacun un individu sain. Ils sont consignés dans le tableau 3

La puissance dorso-ventrale normalisée par la puissance totale n'est pas significativement ($p = 0.0773$) modifiée chez les chiens GRMD (moyenne : 38.0 %, écart-type : 16.1 %), en comparaison des chiens sains (moyenne : 47.5 %, écart-type : 6.3 %). Le graphe de la figure 8 montre les valeurs obtenues pour les individus sains, en comparaison des individus GRMD. Il apparaît qu'un chien GRMD (Cki) a une valeur de puissance dorso-ventrale relative supérieure à celles obtenues chez les chiens sains. Sept autres chiens GRMD ont des valeurs comprises dans l'intervalle de celles obtenues chez les chiens sains, et les 10 autres des valeurs inférieures. Cette hétérogénéité existant dans la population GRMD est également illustrée par le coefficient de variation qui s'élève à 42.4 %, alors qu'il n'atteint que 13.3 % chez les chiens sains.

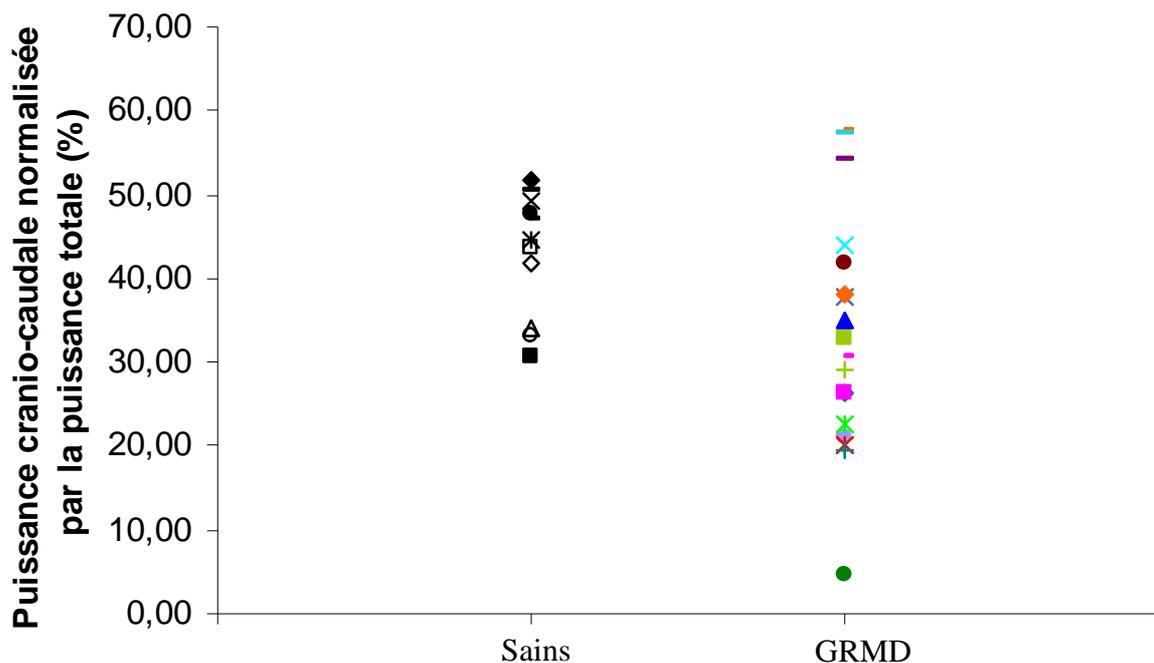
Figure 8 : Accélérométrie – pertinence des différentes variables pour la caractérisation de la locomotion du chien GRMD : valeurs de puissance dorso-ventrale relative obtenues pour les individus sains, en comparaison des individus GRMD.



Les symboles de couleur représentent chacun un individu GRMD, et les symboles noirs chacun un individu sain. Ils sont consignés dans le tableau 3

La puissance cranio-caudale normalisée par la puissance totale n'est pas significativement modifiée ($p = 0.0437$) chez les chiens GRMD (moyenne : 33.2 %, écart-type : 14.1 %) en comparaison des chiens sains (moyenne : 43.1 %, écart-type : 7.4 %). Néanmoins, une tendance à la diminution de cette variable est constatée, comme l'illustre la figure 9. A sa lecture, il apparaît qu'une zone de superposition importante existe entre les deux populations, comme c'est également le cas pour la puissance dorso-ventrale relative (figure 8). Il est cependant intéressant de noter qu'à l'exception des chiens GRMD T-fal, qui se positionne dans les valeurs des chiens sains pour ces deux variables, et Cki, qui montre une puissance dorso-ventrale augmentée et une puissance cranio-caudale très diminuée, les animaux GRMD superposés au groupe de chiens sains pour la puissance dorso-ventrale relative, ont des valeurs de puissance cranio-caudale relative diminuées, et vice versa. Les valeurs obtenues pour les chiens sains sont assez similaires à celles obtenues dans l'axe dorso-ventral (environ 45 %), mais avec une dispersion légèrement supérieure, comme le démontre le coefficient de variation s'élevant à 17.2 %. La population GRMD est une nouvelle fois plus dispersée, son coefficient de variation atteignant 42.5 %.

Figure 9 : Accélérométrie – pertinence des différentes variables pour la caractérisation de la locomotion du chien GRMD : valeurs de puissance cranio-caudale relative obtenues pour les individus sains, en comparaison des individus GRMD.



La puissance médio-latérale, normalisée par la puissance totale, est très significativement ($p < 0.0001$) augmentée chez les chiens GRMD (moyenne : 28.7 %, écart-type : 12.9 %), en comparaison des chiens sains (moyenne : 9.5 %, écart-type : 2.6 %). Les valeurs obtenues chez les chiens sains sont très faibles, en comparaison des valeurs obtenues pour les deux autres axes : la distribution normale de la puissance dans les trois axes pourrait être schématisée ainsi : 45 % en dorso-ventral, 45 % en cranio-caudal, et 10 % en médio-latéral. Le graphe de la figure 10 montre les valeurs obtenues pour les individus sains, en comparaison des individus GRMD. Seuls deux chiens GRMD (T-Fal et Charly) montrent des valeurs superposées à celles des chiens sains. Les autres individus du groupe GRMD ont des valeurs légèrement à très augmentées, avec une dispersion importante de la population (coefficient de variation de 44.9 %, contre 27.4 % dans la population normale). Au vu des résultats obtenus pour les puissances relatives dans les trois axes, il apparaît qu'à l'exception de deux individus (T-Fal et Charly), le profil énergétique tri-dimensionnel des chiens GRMD est modifié par report de puissance de l'axe dorso-ventral ou cranio-caudal (suivant les individus), vers l'axe medio-latéral. La figure 11 illustre ce report de puissance.

Figure 10 : Accélérométrie – pertinence des différentes variables pour la caractérisation de la locomotion du chien GRMD : valeurs de puissance médio-latérale relative obtenues pour les individus sains, en comparaison des individus GRMD.

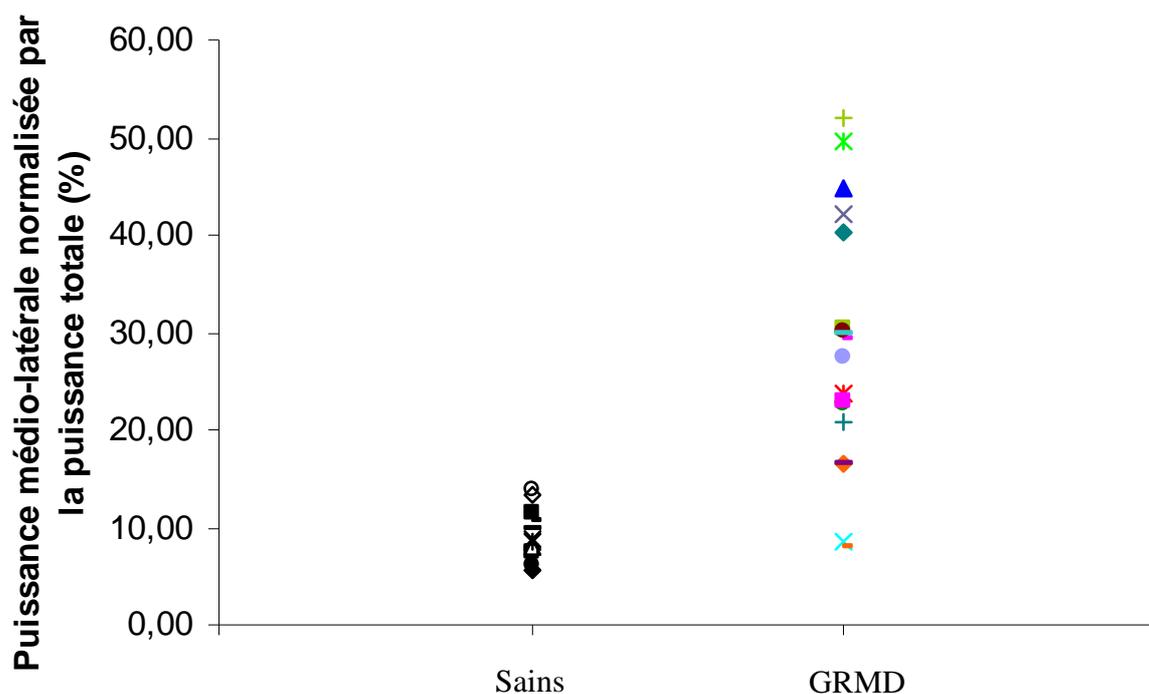
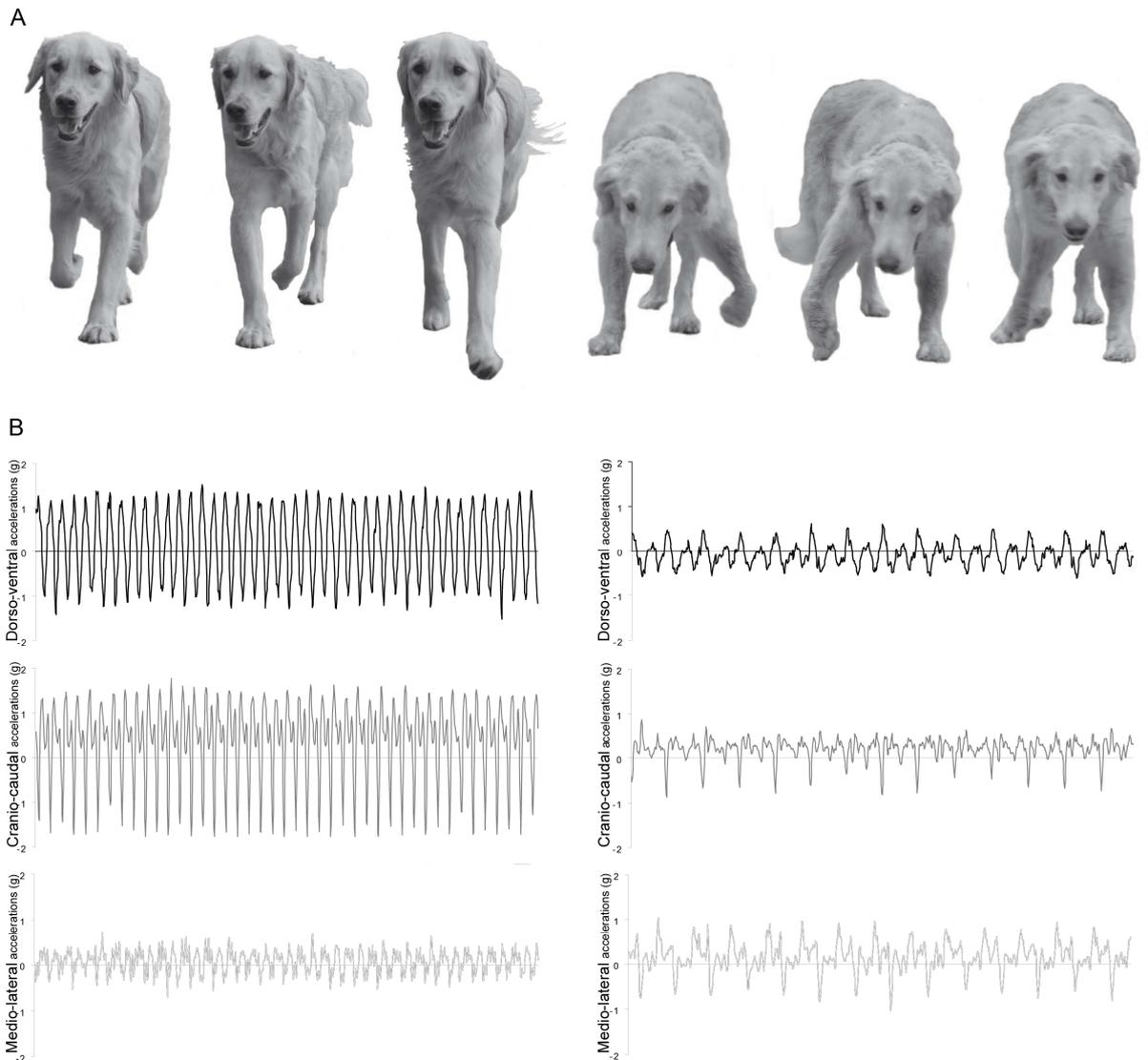


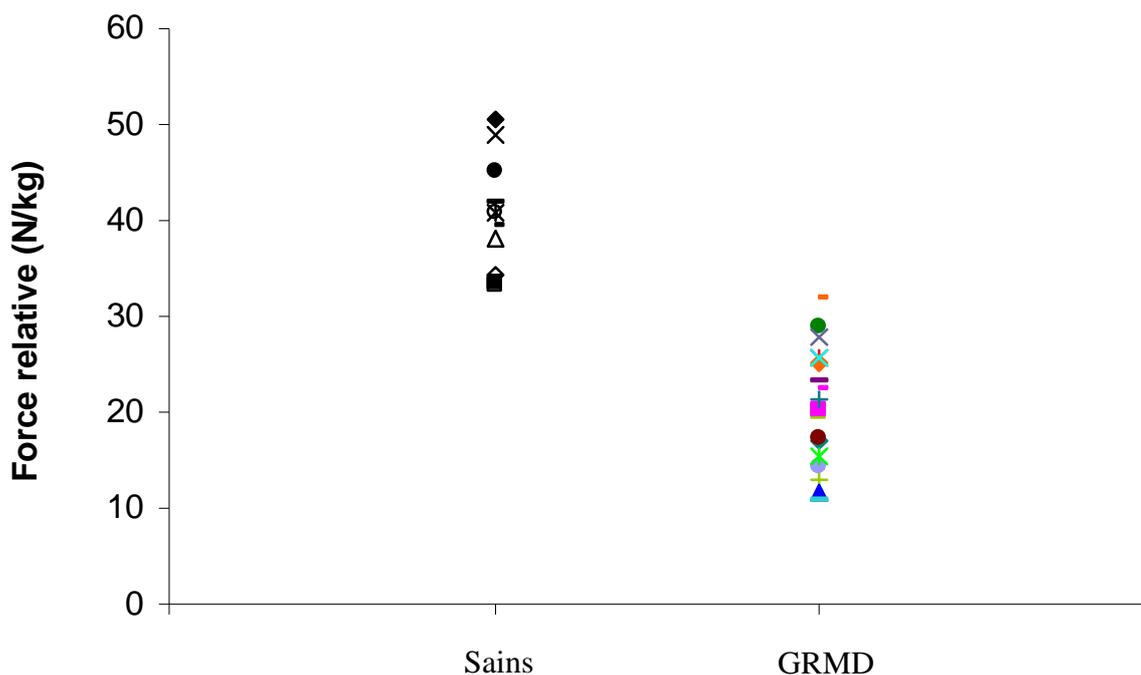
Figure 11 : Accélérométrie - pertinence des différentes variables pour la caractérisation de la locomotion du chien GRMD : illustration de la perte globale de puissance, et de sa redistribution vers l'axe medio-latéral chez le chien GRMD.



A : Photos de face d'un chien sain (trois premières photos en partant de la gauche), en comparaison d'un chien GRMD (trois photos suivantes) en cours de locomotion, illustrant le balancement de droite à gauche présent chez le chien GRMD. B : tracés d'accélération dans les axes dorso-ventral (en haut, tracé noir), cranio-caudal (au milieu, tracé gris foncé) et médio-latéral (en bas, tracé gris clair). Les trois tracés de gauche ont été enregistrés sur un chien sain, et ceux de droite sur un chien GRMD. Noter l'amplitude globalement plus faible des accélérations chez le chien GRMD, et la forte amplitude du tracé médio-latéral en comparaison des tracés obtenus dans les deux autres axes, et de celui obtenu dans ce même axe chez le chien sain.

La force relative, calculée en normalisant la puissance totale par la vitesse, afin de s'affranchir des variations de vitesse et/ou d'allure, est très significativement ($p < 0.0001$) diminuée chez les chiens GRMD (moyenne : 20.6 N/kg, écart-type : 6.2 N/kg), en comparaison des chiens sains (moyenne : 40.6 N/kg, écart-type : 5.1 N/kg). Le graphe de la figure 12 montre les valeurs obtenues pour les individus sains, en comparaison des individus GRMD. Aucune superposition n'est observée entre les deux populations. Ceci démontre que la diminution de puissance totale n'est pas uniquement due à la diminution de vitesse également observée. Pour cette variable encore, le coefficient de variation est plus élevé chez les chiens GRMD (30.1 %) que chez les chiens sains (12.6 %).

Figure 12 : Accélérométrie – pertinence des différentes variables pour la caractérisation de la locomotion du chien GRMD : valeurs de force relative obtenues pour les individus sains, en comparaison des individus GRMD.



Les symboles de couleur représentent chacun un individu GRMD, et les symboles noirs chacun un individu sain. Ils sont consignés dans le tableau 3

Etude de corrélation des variables étudiées avec le score clinique moteur

Seules trois variables présentent une corrélation négative significative avec le score clinique : la vitesse normalisée par la hauteur au garrot ($R = -0.68$, $p = 0.0020$), la longueur des foulées normalisée par la hauteur au garrot ($R = -0.77$, $p = 0.0002$), et la puissance totale ($R = -0.62$, $p = 0.0060$). Les autres variables ne sont pas significativement corrélées au score moteur. Le tableau 7 contient les résultats de calcul du coefficient de Pearson. Les graphes de la figure 13 illustrent par des droites de régression la corrélation existant entre le score clinique et les trois variables précédemment énoncées.

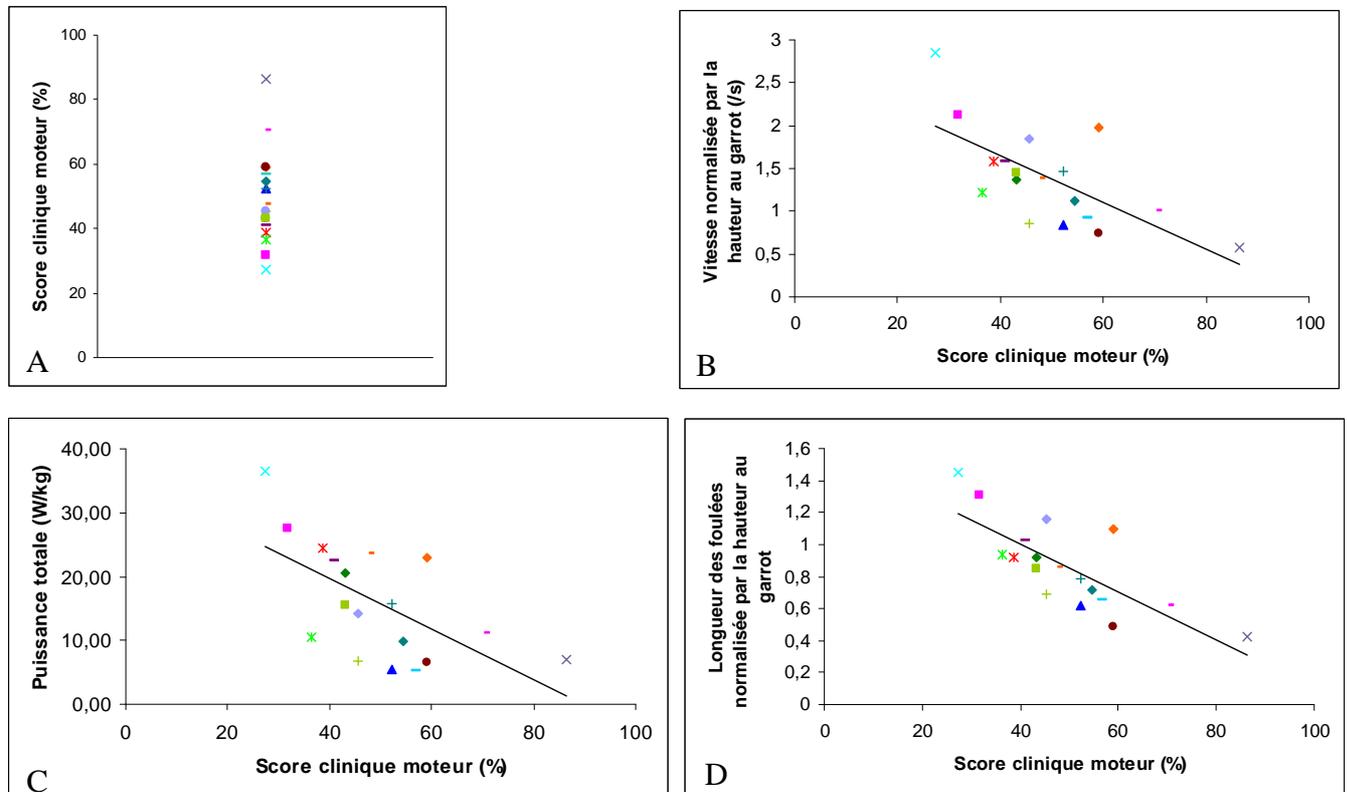
Tableau 7 : Accélérométrie – pertinence des différentes variables pour la caractérisation de la locomotion du chien GRMD : résultats de l’analyse de corrélation avec le score clinique moteur

	Vitesse/HG	FC	LF /HG	Reg	PT	PDV/PT	PCC/PT	PML/PT	Force
R de Pearson	-0.68	-0.27	-0.77	-0.57	-0.62	-0.37	0.16	0.29	0.05
Valeur de p	0.0020	0.2757	0.0002	0.0127	0.0060	0.1281	0.5288	0.2411	0.8369

La première ligne de résultats contient le coefficient R de corrélation de Pearson avec le score clinique moteur, la seconde ligne, son niveau de significativité. Les résultats significatifs figurent en gras.

Abréviations utilisées : Vitesse/HG : vitesse normalisée par la hauteur au garrot ; FC : fréquence des cycles ; LF/HG : longueur des foulées normalisée par la hauteur au garrot ; Reg : régularité ; PT : puissance totale ; PDV/PT : puissance dorso-ventrale, normalisée par la puissance totale ; PCC/PT : puissance cranio-caudale normalisée par la puissance totale ; PML/PT : puissance médio-latérale, normalisée par la puissance totale.

Figure 13 : Accélérométrie – scores cliniques moteurs des chiens GRMD adultes (A) – corrélation avec la vitesse (B), la puissance totale (C) et la longueur des foulées (D) : illustration par droites de régression.



Les chiens GRMD sont représentés chacun par un symbole, figurant dans le tableau 3.

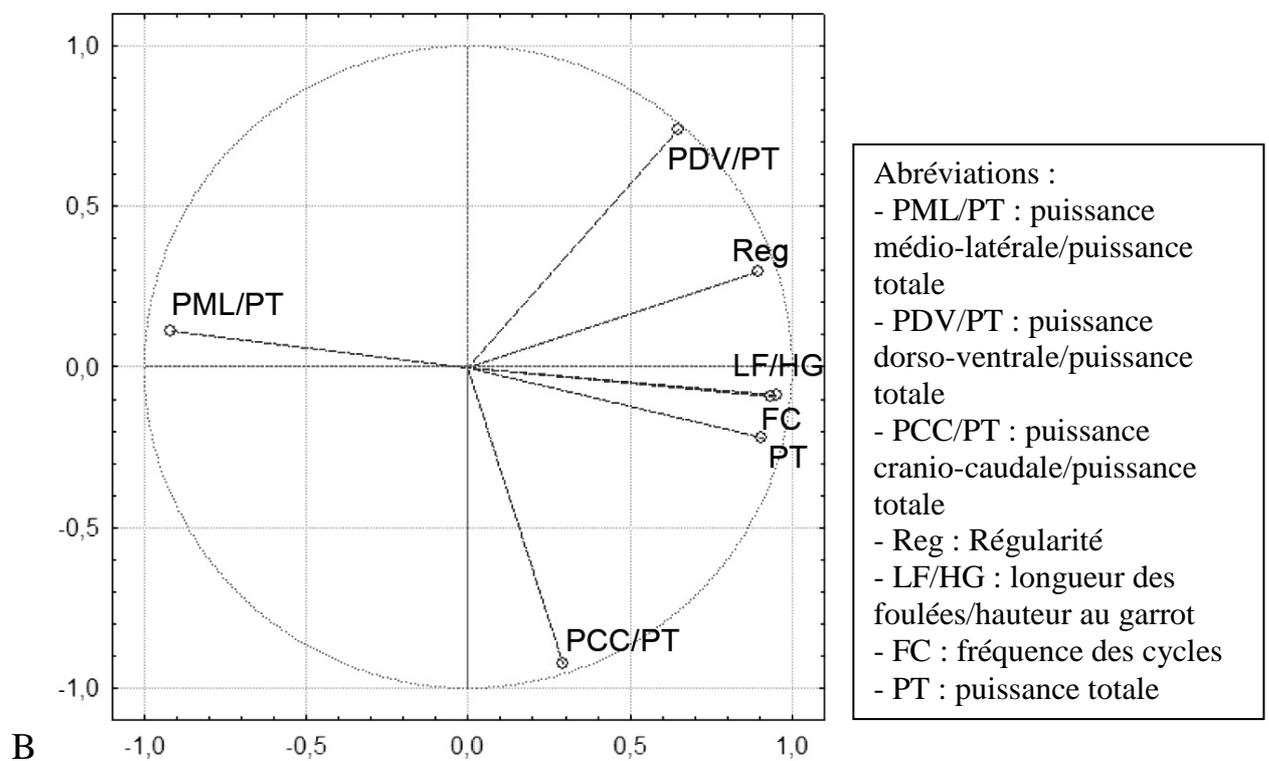
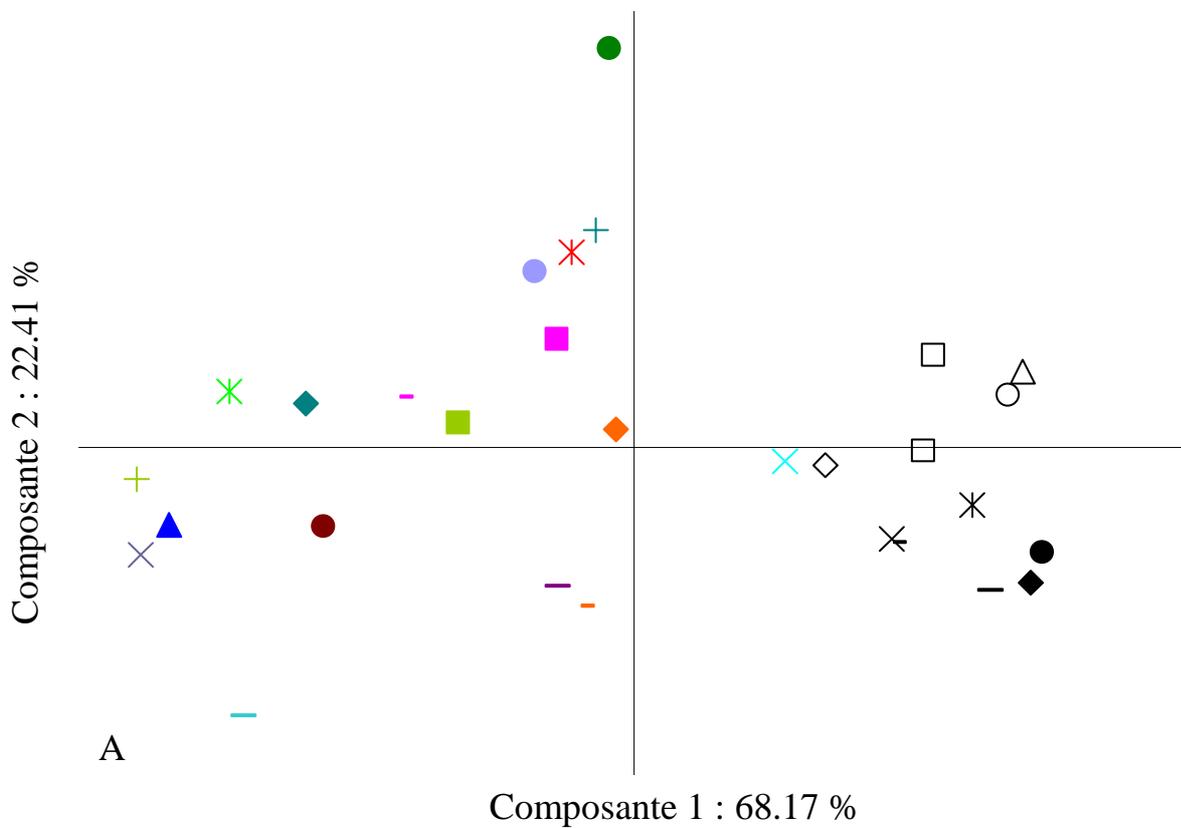
Analyse multivariée par analyse en composantes principales (ACP)

Afin de simplifier l'analyse et la lecture des données obtenues pour l'ensemble des variables, une analyse en composantes principales a été effectuée. Ce test statistique consiste à positionner des individus les uns par rapport aux autres, sans *a priori* de classement, c'est-à-dire dans le cas présent sans distinction chien sain-chien GRMD (contrairement à une analyse discriminante par exemple), en les éloignant le plus possible les uns des autres dans un espace à n dimensions (nommées composantes), n étant le nombre de variables définissant chaque individu (dans le cas présent, 7), en fonction de la valeur obtenue pour chaque variable et pour chaque individu. L'ACP doit son nom à sa représentation graphique qui projette individus et

vecteurs de variables sur un plan à deux dimensions, suivant deux axes appelés composantes principales. Ces deux composantes visent à représenter au mieux le positionnement des individus dans les n dimensions, en deux dimensions. Plus ces deux composantes expliquent la variance des données, et plus la représentation graphique est juste, car moins d'information est alors perdue.

Le plan d'ACP produit grâce aux valeurs de 7 variables (Fréquence des cycles, longueur des foulées/hauteur au garrot, régularité, puissance totale, puissances relatives dans les trois axes) obtenues pour les 18 chiens GRMD et les 11 chiens sains permet d'expliquer 68.17 % de la variance par la composante 1 et 22.41 % par la composante 2, soit un total de 90.58 %. Très peu d'information est donc perdue par la projection des individus sur un plan à deux dimensions. Les plans de projection des individus et des variables sont présentés dans la figure 14. A la lecture de ceux-ci, il apparaît que la composante 1, qui explique plus des deux tiers de la variance, est essentiellement expliquée par la puissance médio-latérale relative, la puissance totale, la régularité dans une moindre mesure, la longueur des foulées normalisée par la hauteur au garrot et la fréquence des cycles, ces deux dernières variables apparaissant très probablement corrélées étant donné le positionnement très proche de leurs deux vecteurs. La deuxième composante est expliquée par les puissances dorso-ventrale et cranio-caudale relatives. Il apparaît, à la lecture du plan de projection des individus, que le positionnement des chiens GRMD est bien distinct de celui des chiens sains, et que la distinction des deux groupes est essentiellement expliquée par la composante 1. Le groupe de chiens sains apparaît comme un nuage de points relativement localisé sur la droite du plan (régularité, puissance totale, longueur de foulée et fréquence de cycle élevées, puissance médio-latérale relative réduite). La population de chiens GRMD apparaît par contre plus dispersée, mais bien distincte de la population de chiens sains car davantage localisée sur la gauche du plan, exception faite du chien T-Fal, dont la position est très proche du nuage des chiens sains.

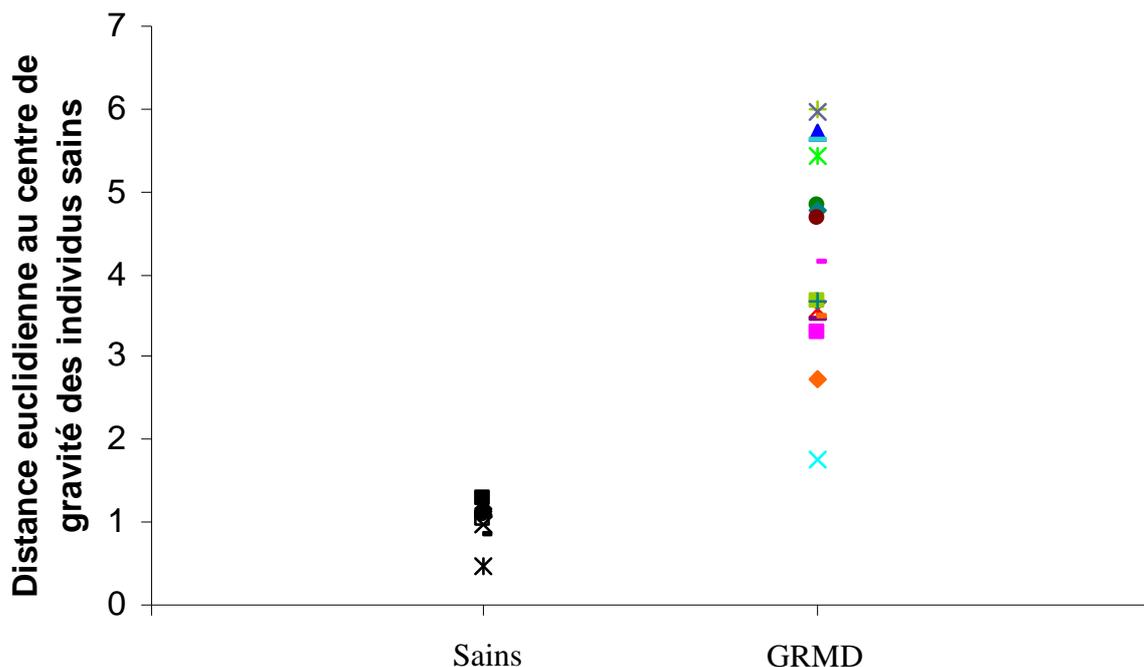
Figure 14 : Accélérométrie – analyse en composantes principales :
 projection des individus (A) et des variables (B) sur le plan d'ACP.



Cette analyse en composantes principales permet donc de situer les animaux les uns par rapport aux autres, en fonction des valeurs de 7 variables de locomotion, et ce, en une seule représentation.

Toujours dans un souci de simplifier l'interprétation des résultats obtenus, il a été proposé de quantifier la position des individus sur ce plan d'ACP. La distance euclidienne de chaque chien par rapport au barycentre des animaux sains, considéré comme la position « normale » a donc été calculée, avec comme objectif de valider ce paramètre comme index global de locomotion. Le graphe de la figure 15 présente les valeurs obtenues pour cet index chez les chiens GRMD, en comparaison des chiens sains. Comme cela paraissait être le cas à la lecture du plan d'ACP, les individus GRMD décrits par cette nouvelle variable globale apparaissent bien séparés des individus sains. Une fois encore, le chien T-Fal est le plus proche de la population normale, mais n'entraîne pas de superposition entre les deux populations pour cet index. L'analyse de variance réalisée sur cette distance euclidienne confirme qu'elle distingue bien les deux populations, puisqu'elle démontre un effet groupe très significatif ($p < 0.0001$).

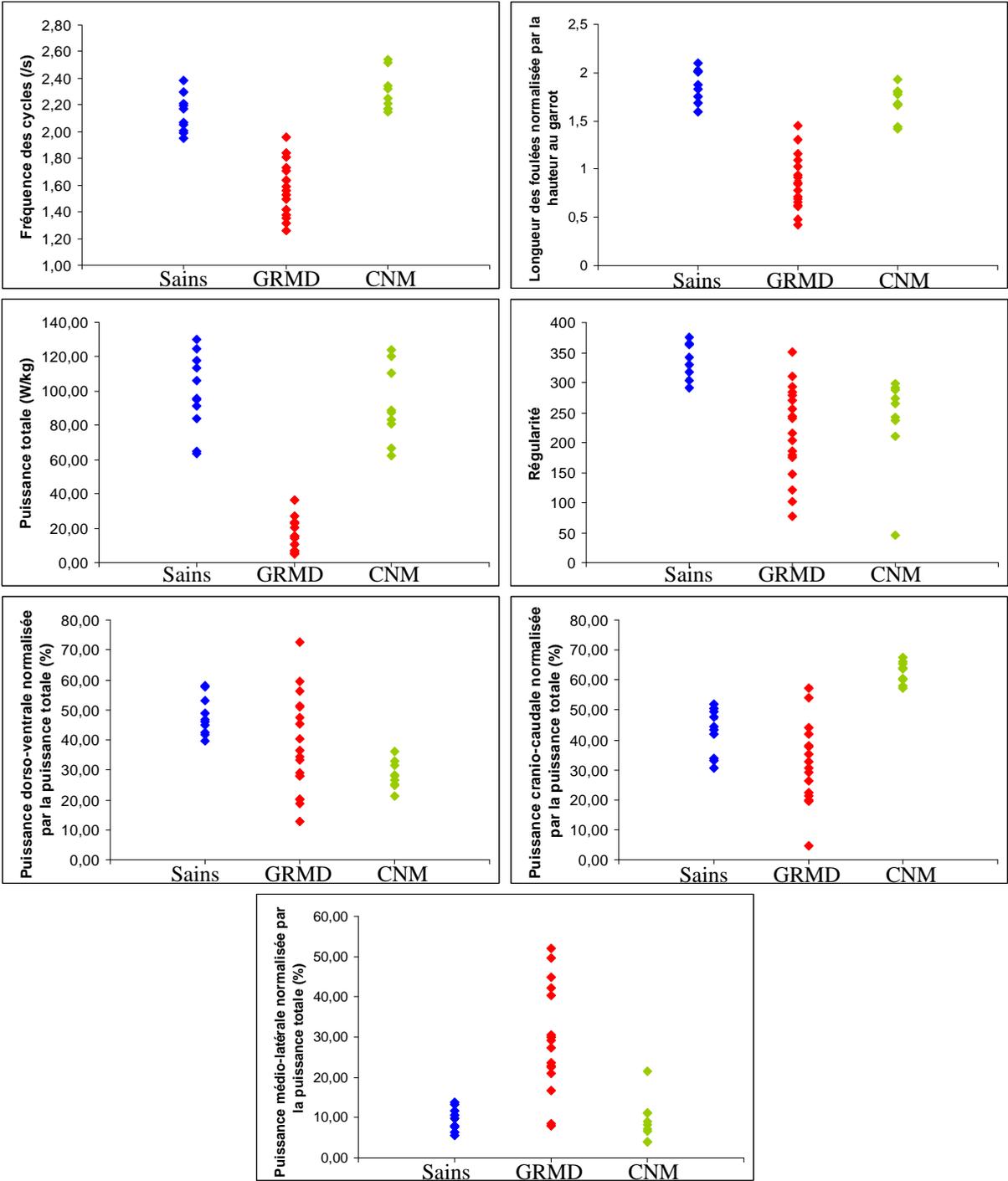
Figure 15 : Accélérométrie – analyse en composantes principales : valeurs de distance euclidienne au centre de gravité de la population normale, des individus GRMD, en comparaison des chiens sains.



Evaluation de la spécificité des anomalies locomotrices détectées chez les chiens GRMD

Afin de déterminer si les nombreuses anomalies locomotrices détectées par accélérométrie chez le chien GRMD sont spécifiques de cette myopathie canine, 9 chiens adultes atteints d'une autre myopathie, dite centronucléaire, ont été évalués. Contrairement à ce qui est observé chez les chiens GRMD, la vitesse rapportée à la hauteur au garrot, la fréquence des cycles, la puissance totale, la puissance médio-latérale rapportée à la puissance totale et la force relative restent inchangées chez les chiens CNM. En revanche, une diminution significative de la régularité ($p = 0.0019$) et de la longueur des foulées rapportée à la hauteur au garrot ($p = 0.0097$) représente un point commun entre les deux myopathies, même si cette diminution n'est, pour la majorité des animaux pas aussi drastique que dans le cas des GRMD (figure 16). Le maintien de la vitesse, dans un contexte de diminution de la longueur de foulée, est probablement assuré par une discrète augmentation de la fréquence des cycles, sans que celle-ci n'atteigne le niveau fixé de significativité ($p = 0.0324$). L'originalité des anomalies de locomotion observées chez les chiens CNM réside dans une redistribution de la puissance dorso-ventrale, qui est très significativement diminuée ($p < 0.0001$), vers l'axe cranio-caudal, la puissance relative dans cet axe étant quant à elle très significativement augmentée ($p < 0.0001$). Ceci signe un défaut de propulsion verticale de ces chiens. Les graphes de la figure 16 illustrent ces anomalies, en comparaison de celles observées chez les chiens GRMD, et de la situation normale.

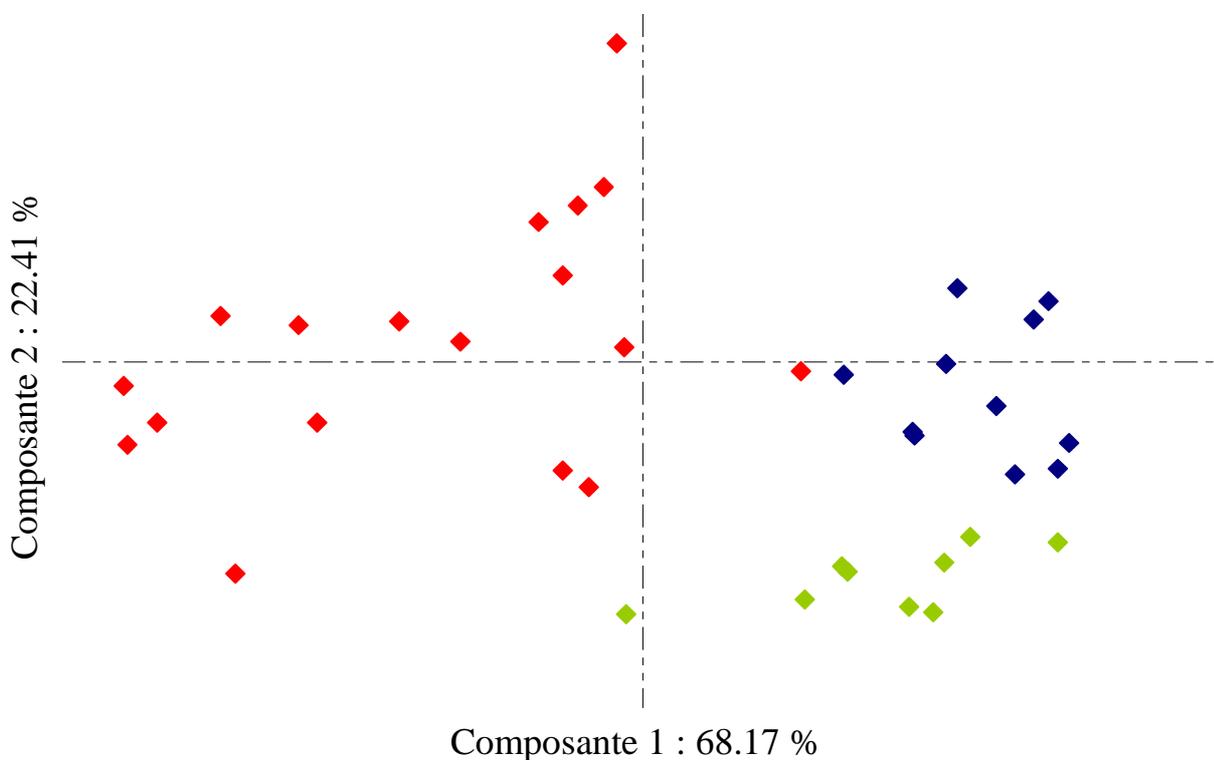
Figure 16 : Accélérométrie – spécificité des caractéristiques de marche mises en évidence chez le chien GRMD – comparaison avec un groupe de chiens CNM, des valeurs obtenues pour la fréquence des cycles, la longueur des foulées rapportée à la hauteur au garrot, la régularité, la puissance totale, et les puissances relatives dans les trois axes.



Points bleus : chiens sains ; points rouges : chiens GRMD ; points verts : chiens CNM.

La spécificité des anomalies de locomotion détectées par accélérométrie dans ces deux myopathies canines sont illustrées par la projection, comme individus supplémentaires, des chiens CNM sur le plan d'ACP précédemment décrit et illustré dans la figure 14. La figure 17 présente ce plan d'ACP. Il apparaît que les chiens CNM forment une population bien distincte des chiens sains, mais également des chiens GRMD, puisqu'ils sont situés en bas à droite du plan. Cette position basse est en liaison avec la diminution de puissance dorso-ventrale et l'augmentation de puissance cranio-caudale relatives. En parallèle, la puissance totale, et la puissance médio-latérale relatives ne sont pas modifiées, tandis que la fréquence des cycles et la longueur des foulées ne le sont pas suffisamment pour décaler la population CNM à gauche du plan d'ACP, comme l'est la population GRMD.

Figure 17 : Accélérométrie – spécificité des caractéristiques de marche mises en évidence chez le chien GRMD – projection des chiens CNM comme individus supplémentaires sur le plan d'ACP défini par les chiens GRMD et sains adultes.



Points bleus : chiens sains ; points rouges : chiens GRMD ; points verts : chiens CNM

C. Evaluation de la locomotion chez de jeunes animaux en cours d'évolution clinique

1) Matériel et méthodes

a) Matériel

Le matériel utilisé était identique à celui employé sur les chiens adultes.

b) Variables calculées

Les variables étudiées chez les chiens en croissance ont été celles déjà étudiées chez les adultes, à savoir :

- La vitesse / hauteur au garrot
- La fréquence des cycles
- La longueur des foulées / hauteur au garrot
- La régularité
- La puissance totale
- Les puissances relatives dans les 3 axes
- La force relative

c) Déroulement du test

Le test s'est déroulé comme énoncé plus haut pour les chiens adultes. Lors du premier test, le chiot a tout d'abord été acclimaté quelques minutes au couloir, puis au port de la ceinture. Le test pouvait débuter lorsque le chiot était à l'aise. Les chiens ont été mesurés au garrot à la fin de chaque test.

d) Méthode

Animaux

Cette étude longitudinale a été conduite sur 30 chiens en croissance, dont 6 chiens golden retriever sains et 24 chiens GRMD. Les 6 chiens sains provenaient de la colonie GRMD et ont été hébergés dans les mêmes conditions que les chiens GRMD. Tous les chiots GRMD issus

de la colonie sur une période de 20 mois ont été inclus dans cette étude. Les animaux entrant en protocole ont été exclus de l'étude. Chaque chien GRMD a fait l'objet d'un score clinique chaque mois.

Tableau 8 : Accélérométrie –suivi longitudinal – Animaux inclus dans l'étude, synthèse des tests réalisés et des allures utilisées.

Nom	Statut	Age (mois)														
		2	2.5	3	3.5	4	4.5	5	5.5	6	6.5	7	7.5	8	8.5	9
Ckan	Sain	T	T	T	T	T	T	na	T	T	T	na	T	T	T	T
Cbof	Sain	GC	T	T	T	T	T	na	T	T	T	na	T	T	T	T
Dclick	Sain	T	na	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
Dclack	Sain	GC	na	T	T	T	T	T	T	na	T	T	T	T	T	T
Dzer	Sain	T	na	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
Dzastre	Sain	GC	na	GC	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
Dchou ▲	GRMD	T	T	P	P	Perte locomotion 4 mois										
Dmo ◆	GRMD	B	B	B	B	na	B	Décès à 5 mois – complications digestives								
Dfois ✕	GRMD	T	T	T	T	M	M	M	Perte locomotion 5.5 mois							
Dsir ▲	GRMD	T	na	T	T	T	P	P	Perte locomotion 5.5 mois							
Dlire -	GRMD	B	B	B	T	T	B	T	T	T	T	T	T	P	T	Décès 9 mois – pneumonie
Dlice +	GRMD	T	B	B	B	B	na	T	T	T	T	T	P	T	T	P
Dluge -	GRMD	T	T	B	B	B	B	B	T	B	B	M	T	T	T	B
Dk ●	GRMD	B	T	B	P	B	B	B	B	B	T	B	P	P	P	P
Dbrouille ■	GRMD	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
Dmon ■	GRMD	B	T	B	B	T	T	T	P	T	T	T	T	P	na	P
Dalton ◆	GRMD	B	na	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
Didon ✕	GRMD	T	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	P	P	B	B
E.T. ✕	GRMD	T	T	T	T	T	T	B	na	T	Décès à 6 mois – anesthésie					
Ebam -	GRMD	Na	B	T	T	T	T	B	P	na	T	P	T	T	T	T
Ebim ●	GRMD	T	T	T	B	B	P	na	P	Perte locomotion 6 mois						
Eboum ■	GRMD	Na	na	T	T	P	T	T	T	na	T	T	P	T	T	T
Eiffel +	GRMD	T	T	T	T	P	na	T	T	Perte locomotion 6 mois						
Einstein ✕	GRMD	T	T	T	T	T	Perte locomotion 4.5 mois									
Eop ●	GRMD	B	B	T	B	T	T	Perte locomotion 5 mois								
Ercule ▲	GRMD	T	na	T	T	T	T	T	na	T	T	T	T	T	Décès 8.5 mois – pneumonie	
Evian ■	GRMD	B	B	P	P	Perte locomotion 4 mois										
Exon ◆	GRMD	T	T	B	T	na	P	P	Perte locomotion 5.5 mois							
Eject ◆	GRMD	T	nr	P	nr	P	Perte locomotion 4.5 mois									
Eaudvy -	GRMD	Na	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	P	T	T

A côté du nom de chaque chien figure le symbole qui sera utilisé dans les figures 18 à 29. Les cases grisées correspondent aux examens manquants. Dans les cases non grisées est indiquée l'allure conservée pour l'analyse. Abréviations : na : non analysable ; nr : non réalisé ; GC : galop circulaire ; T : trot ; B : bond ; P : pas.

Déroulement de l'étude

L'objectif de l'étude était de décrire l'évolution de la locomotion entre l'âge de 2 mois et l'âge de 9 mois. Quinze tests étaient planifiés pour cette étude, soit un test toutes les deux semaines.

Analyse des données

Toutes les séquences de locomotion exploitables ont été analysées dans le logiciel Equimetrix®. Lorsque plusieurs allures étaient utilisées au cours d'un test, celle permettant d'obtenir la meilleure valeur de régularité a été conservée pour l'analyse statistique. Ici, cet index a été utilisé comme indicateur de qualité de marche, et donc dans l'optique de déterminer l'allure à laquelle le chien était le plus à l'aise.

Analyse statistique

Une ANOVA à mesures répétées avec un facteur âge et un facteur groupe (sain versus GRMD) a été réalisée afin de déterminer l'effet de l'âge sur l'évolution des variables dans chacun des groupes, et les différences entre les deux groupes.

Un coefficient de corrélation de Pearson a été calculé, afin d'étudier les corrélations entre variables, et principalement entre variables d'accélérométrie et score clinique.

Des coefficients de variation, pour chaque variable et à chaque âge ont été calculés, en normalisant l'écart-type par la moyenne, de manière à étudier l'aptitude des différentes variables à décrire la dispersion de la population (c'est-à-dire son hétérogénéité).

Enfin, la distance euclidienne sur le plan d'ACP, déjà utilisée comme index global de marche chez les adultes, a été calculée chez les animaux en croissance, par projection des animaux de chaque catégorie d'âge, comme observations supplémentaires sur le plan d'ACP défini par les adultes. Les 7 variables utilisées pour cette analyse étaient : la fréquence des cycles, la longueur des foulées / hauteur au garrot, la régularité, la puissance totale, et les puissances relatives dans les trois axes. La distance euclidienne au centre de gravité des chiens sains de la catégorie d'âge étudiée, dans l'espace à sept dimensions, a ensuite été calculée, puis soumise à une ANOVA à mesures répétées, de la même manière que les variables brutes. Un coefficient de corrélation de Pearson a également été calculé.

Le seuil de significativité a été fixé à $p = 0.01$.

2) Résultats

a) Déroulement des tests - évolution clinique des chiens

Tous les tests ont pu être effectués chez les chiens sains. Cependant, à l'âge de 2.5 mois, seuls les tests de deux animaux ont pu être analysés, les tracés des quatre autres étant trop instables et ne comportant pas de séquence de 10 secondes de locomotion stabilisée. Cet âge a donc été exclu des analyses statistiques.

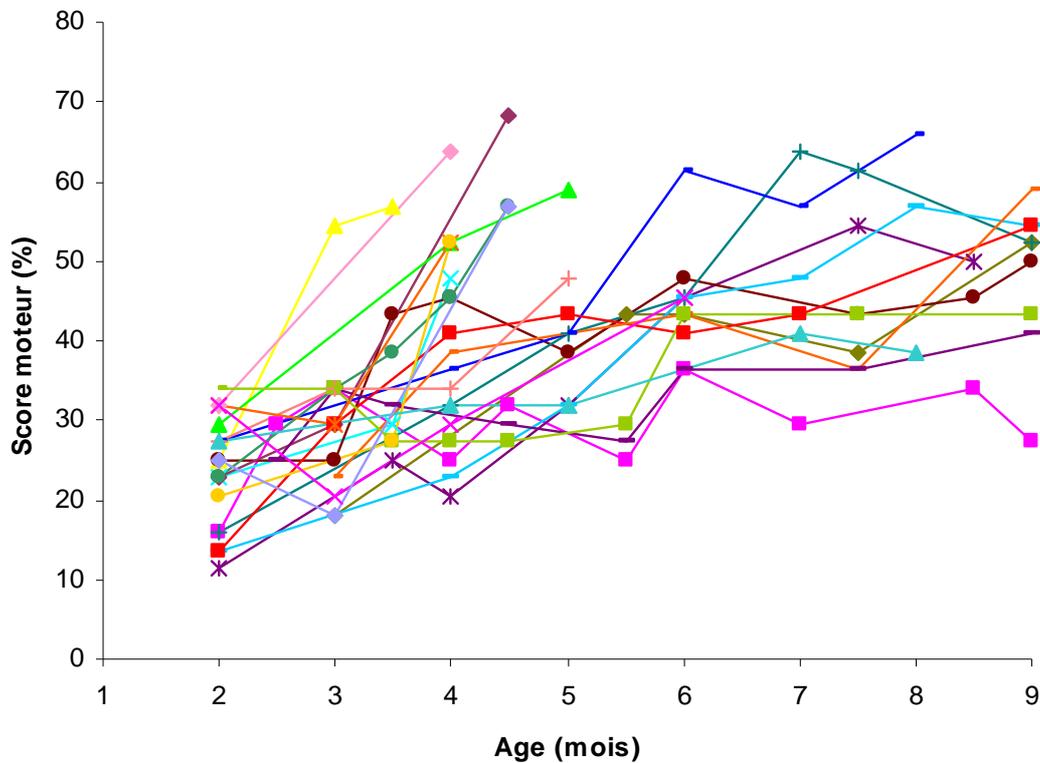
Seuls 10 chiens GRMD sur les 24 inclus ont pu être suivis jusqu'à l'âge de 9 mois. Parmi les 14 autres, 10 ont totalement perdu la locomotion avant l'âge de 6 mois, et ont dû être euthanasiés car ils se trouvaient en décubitus permanent. Deux des quatre autres animaux (Ercule et Dlire) sont décédés de bronchopneumonie peu de temps avant la fin de l'étude. Le chien Dmo est décédé, à l'âge de 5 mois, de complications digestives liées à l'engagement de son duodénum via le hiatus oesophagien, après réduction chirurgicale d'une hernie hiatale avec engagement de l'estomac. Le dernier chien, E.T., est mort suite à un arrêt cardio-respiratoire lors de l'induction de l'anesthésie au cours de laquelle un tube de gastrostomie devait lui être posé. Cette mesure, visant à assurer la bonne alimentation des animaux, a d'ailleurs été prise sur 14 des 24 chiens, dont 9 sur les 10 chiens ayant perdu la locomotion.

Enfin, 18 des 24 chiens GRMD ont présenté au moins un épisode de bronchopneumonie au cours de leur période de suivi par accélérométrie.

Sur le plan de la réalisation des tests, la majorité des chiots GRMD a pu réaliser les tests, et ce, dès l'âge de 2 mois. Seul un chien GRMD, Eboum, s'est montré totalement réfractaire à la réalisation des deux premiers tests. Le premier test sur ce chien a donc été réalisé à l'âge de trois mois, après une période d'acclimatation au port de la ceinture durant quelques heures dans sa cage, qui s'est révélée être une solution efficace.

Les scores cliniques moteurs réalisés sur ces animaux témoignent de l'hétérogénéité existant entre les chiens GRMD de ce suivi longitudinal, reflet de celle de la population générale des chiens GRMD, déjà décrite et documentée par diverses équipes (Ambrosio et al. 2009, Valentine et al. 1988). Le graphe de la figure 18 montre l'évolution des scores moteurs des différents chiens avec l'âge sur la période étudiée.

Figure 18 : Accélérométrie – suivi longitudinal – évolution des scores cliniques moteurs chez les chiens GRMD



Chaque chien GRMD est représenté par un symbole différent. Ces symboles sont consignés dans le tableau 8.

b) Evolution des différentes variables de locomotion avec l'âge et l'évolution de la maladie.

Les résultats de l'analyse de variance à mesures répétées, ainsi que les moyennes et écart-types obtenus pour chaque âge et chaque variable dans les deux populations sont consignés dans le tableau 9.

Tableau 9 : Accélérométrie – suivi longitudinal : résultats de l’analyse de variance.

	V/HG	FC	LF/HG	Reg	PT	PDV/PT	PCC/PT	PML/PT	Force	
p (âge Sains)	0.0024 (↘)	<0.0001 (↘)	0.4769	0.0145 (↗)	0.1793	0.1075	0.3920	0.0089 (↘)	0.1412	
p (âge GRMD)	0.0067 (↘)	0.0350 (↘)	0.0853 (↘)	0.4050	0.0902 (↘)	0.1856	0.6630	0.0969 (↗)	0.0034 (↘)	
2 mois	p (Sains vs GRMD)	0.0003	0.0711	<0.0001	0.8669	<0.0001	0.7136	0.5409	0.5431	0.1314
	Moy (E-T) Sains	5.68 (0.71)	2.89 (0.14)	1.97 (0.21)	197.0 (40.8)	81.5 (13.5)	40.3 (6.1)	44.0 (6.2)	15.8 (3.9)	53.2 (4.8)
	Moy (E-T) GRMD	3.36 (1.01)	2.49 (0.51)	1.30 (0.22)	204.3 (55.3)	38.1 (18.3)	38.2 (11.4)	48.1 (14.6)	13.7 (7.3)	38.3 (14.9)
2.5 mois	p (Sains vs GRMD)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Moy (E-T) Sains	-	2.43 (0.01)	-	292.8 (53.3)	73.0 (14.0)	49.5 (3.9)	41.8 (3.3)	8.7 (0.6)	42.4 (5.2)
	Moy (E-T) GRMD	3.09 (0.85)	2.38 (0.49)	1.33 (0.25)	183.3 (44.4)	32.4 (12.8)	39.1 (13.3)	47.8 (12.2)	13.1 (6.1)	30.2 (7.7)
3 mois	p (Sains vs GRMD)	0.0036	0.4428	0.0002	0.1381	<0.0001	0.0187	0.0673	0.3800	<0.0001
	Moy (E-T) Sains	4.76 (0.46)	2.42 (0.11)	1.94 (0.10)	187.3 (17.7)	93.4 (10.6)	44.6 (8.2)	42.5 (8.2)	12.9 (1.4)	43.5 (2.0)
	Moy (E-T) GRMD	2.81 (1.18)	2.24 (0.53)	1.23 (0.32)	182.6 (61.5)	29.8 (17.1)	33.8 (9.0)	50.8 (9.4)	15.4 (6.6)	28.5 (8.6)
3.5 mois	p (Sains vs GRMD)	<0.0001	0.4874	<0.0001	0.0256	<0.0001	0.0013	0.4231	0.0577	<0.0001
	Moy (E-T) Sains	4.48 (0.34)	2.30 (0.16)	1.95 (0.07)	250.5 (30.6)	99.2 (14.4)	44.1 (3.1)	45.6 (2.8)	10.3 (1.5)	43.2 (4.8)
	Moy (E-T) GRMD	2.40 (0.87)	2.17 (0.46)	1.08 (0.26)	187.3 (62.0)	24.4 (11.2)	32.2 (7.8)	49.4 (11.3)	18.3 (9.8)	25.2 (6.5)
4 mois	p (Sains vs GRMD)	<0.0001	0.1394	<0.0001	0.0007	<0.0001	0.0018	0.1475	0.0786	<0.0001
	Moy (E-T) Sains	4.63 (0.64)	2.31 (0.10)	1.93 (0.15)	255.9 (13.4)	96.4 (11.1)	49.4 (2.4)	39.0 (2.1)	11.6 (1.4)	36.7 (4.5)
	Moy (E-T) GRMD	2.35 (0.92)	2.01 (0.50)	1.14 (0.19)	189.7 (44.6)	21.6 (11.8)	31.8 (13.6)	47.1 (13.1)	21.1 (13.6)	21.3 (7.3)
4.5 mois	p (Sains vs GRMD)	<0.0001	0.4305	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.3231	0.0395	<0.0001
	Moy (E-T) Sains	4.39 (0.26)	2.19 (0.09)	2.01 (0.08)	256.5 (13.4)	97.3 (14.9)	50.0 (4.6)	40.6 (4.4)	9.4 (3.4)	42.2 (5.6)
	Moy (E-T) GRMD	2.18 (1.04)	1.98 (0.61)	1.06 (0.23)	169.2 (43.0)	22.3 (16.1)	28.0 (8.6)	47.1 (15.0)	24.9 (16.9)	21.2 (7.9)
5 mois	p (Sains vs GRMD)	0.0003	0.4208	<0.0001	0.0173	<0.0001	0.0293	0.5807	0.0767	<0.0001
	Moy (E-T) Sains	4.33 (0.23)	2.23 (0.02)	1.94 (0.11)	266.3 (48.6)	105.5 (17.5)	47.9 (2.9)	41.1 (1.2)	11.0 (2.5)	36.7 (3.2)
	Moy (E-T) GRMD	2.30 (0.90)	2.01 (0.53)	1.12 (0.24)	180.4 (59.7)	24.7 (16.6)	33.0 (12.3)	44.7 (12.6)	22.3 (11.8)	21.4 (7.7)

		V/HG	FC	LF/HG	Reg	PT	PDV/PT	PCC/PT	PML/PT	Force
5.5 mois	p (Sains vs GRMD)	<0.0001	0.2542	<0.0001	0.0057	<0.0001	0.0937	0.9766	0.0171	0.0006
	Moy (E-T) Sains	4.18 (0.25)	2.13 (0.07)	1.96 (0.11)	280.1 (37.0)	96.6 (13.0)	48.5 (2.8)	40.4 (2.5)	11.1 (2.1)	40.1 (5.7)
	Moy (E-T) GRMD	1.85 (0.72)	1.91 (0.46)	0.95 (0.19)	195.1 (57.8)	23.2 (16.2)	37.4 (15.1)	40.6 (14.4)	22.1 (9.9)	25.4 (9.7)
6 mois	p (Sains vs GRMD)	<0.0001	0.4779	<0.0001	0.0014	<0.0001	0.0006	0.1100	0.0230	0.0013
	Moy (E-T) Sains	4.36 (0.26)	2.12 (0.11)	2.05 (0.08)	277.6 (24.8)	90.8 (12.5)	54.9 (2.3)	36.2 (4.3)	8.9 (3.4)	49.4 (4.3)
	Moy (E-T) GRMD	2.05 (0.71)	1.96 (0.49)	1.03 (0.14)	218.7 (26.3)	24.8 (15.6)	34.5 (10.1)	46.5 (12.8)	18.8 (8.1)	21.9 (8.4)
6.5 mois	p (Sains vs GRMD)	<0.0001	0.1319	<0.0001	0.0201	<0.0001	0.0724	0.7160	0.0121	<0.0001
	Moy (E-T) Sains	4.41 (0.32)	2.18 (0.07)	2.03 (0.10)	260.3 (23.8)	108.3 (7.9)	46.7 (3.0)	42.9 (3.2)	10.4 (3.4)	40.4 (4.6)
	Moy (E-T) GRMD	2.02 (0.70)	1.91 (0.41)	1.05 (0.23)	214.5 (38.0)	23.6 (12.8)	35.8 (13.5)	45.2 (14.5)	19.0 (6.9)	22.6 (5.5)
7 mois	p (Sains vs GRMD)	<0.0001	0.1032	<0.0001	0.0173	<0.0001	0.0462	0.7457	0.0018	<0.0001
	Moy (E-T) Sains	4.72 (0.36)	2.25 (0.06)	2.10 (0.13)	273.1 (23.2)	109.4 (8.4)	45.6 (3.8)	45.8 (5.2)	8.6 (1.8)	46.7 (2.9)
	Moy (E-T) GRMD	1.88 (0.56)	1.85 (0.44)	1.00 (0.16)	214.2 (40.2)	20.3 (11.0)	33.8 (10.3)	43.4 (13.7)	22.8 (7.1)	21.5 (6.5)
7.5 mois	p (Sains vs GRMD)	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0208	<0.0001	0.1339	0.9122	0.0134	<0.0001
	Moy (E-T) Sains	4.56 (0.41)	2.19 (0.12)	2.07 (0.11)	271.3 (36.8)	100.8 (13.2)	47.8 (6.0)	42.6 (7.7)	9.7 (3.0)	46.8 (5.0)
	Moy (E-T) GRMD	1.65 (0.42)	1.70 (0.13)	0.97 (0.21)	219.9 (37.3)	17.7 (10.7)	37.6 (14.3)	41.6 (18.7)	20.7 (9.3)	21.8 (9.0)
8 mois	p (Sains vs GRMD)	<0.0001	0.0004	<0.0001	0.0121	<0.0001	0.0068	0.4722	0.0035	<0.0001
	Moy (E-T) Sains	4.68 (0.29)	2.17 (0.09)	2.15 (0.05)	277.7 (49.1)	108.2 (10.5)	45.6 (6.7)	43.5 (5.9)	10.9 (2.3)	49.3 (4.5)
	Moy (E-T) GRMD	1.58 (0.72)	1.73 (0.46)	0.90 (0.19)	213.4 (57.8)	20.1 (16.2)	30.3 (15.1)	48.2 (14.4)	21.5 (9.9)	24.3 (9.7)
8.5 mois	p (Sains vs GRMD)	<0.0001	0.0213	<0.0001	0.0046	<0.0001	0.0430	0.9715	0.0092	<0.0001
	Moy (E-T) Sains	4.45 (0.38)	2.19 (0.11)	2.03 (0.14)	289.9 (41.5)	104.2 (16.1)	47.1 (2.9)	40.6 (4.5)	12.3 (2.3)	47.9 (5.6)
	Moy (E-T) GRMD	1.67 (0.48)	1.80 (0.35)	0.93 (0.23)	227.8 (26.3)	18.5 (9.4)	36.0 (11.0)	40.9 (8.3)	23.1 (8.3)	21.4 (8.8)
9 mois	p (Sains vs GRMD)	<0.0001	0.0117	<0.0001	0.0520	<0.0001	0.0007	0.7725	0.0046	<0.0001
	Moy (E-T) Sains	4.39 (0.19)	2.21 (0.10)	1.99 (0.05)	269 (34.7)	111.4 (12.1)	43.3 (3.0)	47.8 (3.4)	8.9 (2.6)	41.7 (2.0)
	Moy (E-T) GRMD	1.01 (0.65)	1.74 (0.37)	0.94 (0.26)	228.4 (32.6)	21.2 (14.6)	30.6 (6.4)	46.2 (13.0)	21.7 (8.8)	22.9 (8.7)

Les deux premières lignes du tableau contiennent les valeurs de significativité de l'effet âge, dans la population saine (première ligne) et la population GRMD (deuxième ligne).
Les lignes suivantes contiennent les niveaux de significativité de l'effet groupe (sain

versus GRMD) à chaque âge étudié, ainsi que la moyenne et l'écart-type de chaque variable et pour chacune des deux populations. Les résultats significatifs figurent en gras. Abréviations utilisées : Moy : moyenne ; ET : écart-type ; V/HG : vitesse, normalisée par la hauteur au garrot ; LF/HG : longueur des foulées, normalisée par la hauteur au garrot ; Reg : régularité ; PT : puissance totale ; PDV/PT : puissance dorso-ventrale, normalisée par la puissance totale ; PCC/PT : puissance cranio-caudale, normalisée par la puissance totale ; PML/PT : puissance médio-latérale, normalisée par la puissance totale.

Evolution des différentes variables avec l'âge chez les chiens sains

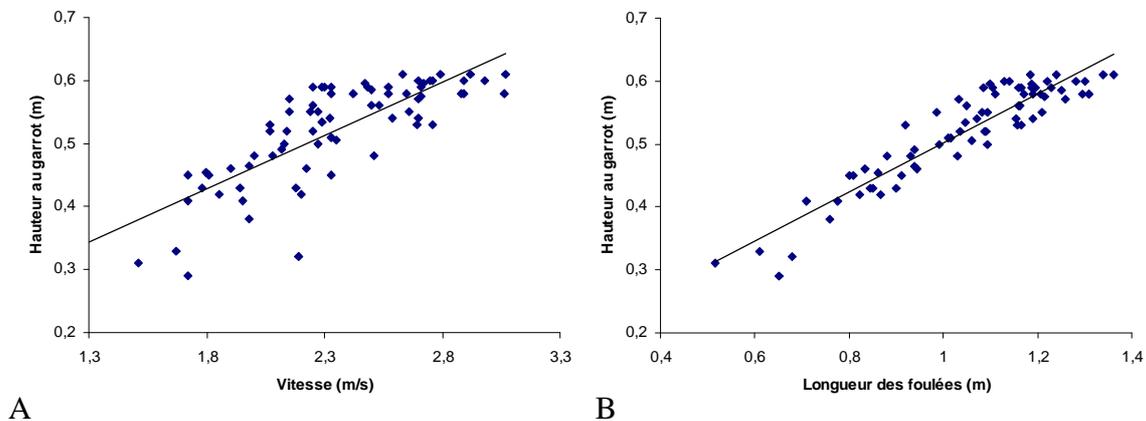
La description de l'évolution avec l'âge des différentes variables étudiées chez les chiens sains est nécessaire afin de pouvoir comparer celle des chiens GRMD à une situation de locomotion normale. Les graphes des figures 20 à 27 montrent l'évolution de la moyenne des chiens sains pour chaque variable au cours du temps, plus ou moins un écart-type. Le choix de la représentation d'un écart-type et non de deux a été effectué en raison de la distribution non normale des données, donnant davantage de sens à la représentation d'un écart-type que de deux. Brièvement, les variables étudiées évoluent ainsi dans le détail :

La vitesse, normalisée par la hauteur au garrot, diminue significativement ($p = 0.0024$) avec l'âge. Ceci est probablement dû au fait que certains chiens utilisent le galop aux premiers tests, puis passent au trot en vieillissant (tableau 8). Cependant, la vitesse non normalisée montre une augmentation très significative avec l'âge ($p < 0.0001$). L'effet de la normalisation par la hauteur au garrot est donc non négligeable, mais l'importance de réaliser celle-ci est renforcée par le coefficient de corrélation entre vitesse et hauteur au garrot, qui s'élève à 0.78 ($p < 0.0001$). Le graphe A de la figure 19 illustre cette corrélation. Un tel effet de la taille sur la vitesse est donc à prendre en considération, d'autant plus qu'ici, les chiens GRMD ont une taille significativement ($p < 0.01$ dès 3 mois) inférieure à celle des chiens sains.

La fréquence des cycles locomoteurs présente une diminution très significative ($p < 0.0001$) avec l'âge. Ceci explique probablement la diminution de la vitesse rapportée à la hauteur au garrot avec l'âge.

La longueur des foulées, normalisée par la hauteur au garrot, ne subit pas d'effet âge ($p = 0.4769$). En revanche, ce paramètre non normalisé augmente avec l'âge et la croissance, comme le montre la forte corrélation entre la hauteur au garrot et la longueur des foulées ($R = 0.93$, $p < 0.0001$), illustrée par le graphe B de la figure 19. Une fois encore, ceci renforce la pertinence de la normalisation par la hauteur au garrot, dans le cadre d'une comparaison entre chiens de taille différente.

Figure 19 : Accélérométrie – suivi longitudinal – corrélations entre la hauteur au garrot et la vitesse (A), et la hauteur au garrot et la longueur des foulées (B) chez les chiens sains. Illustration par droites de régression.



La régularité augmente avec l'âge, mais de manière non significative ($p = 0.0145$).

La puissance totale, ainsi que les puissances dorso-ventrale et cranio-caudale relatives ne subissent pas d'effet lié à l'âge et à la croissance.

La puissance médio-latérale relative diminue de manière significative ($p = 0.0089$) avec l'âge

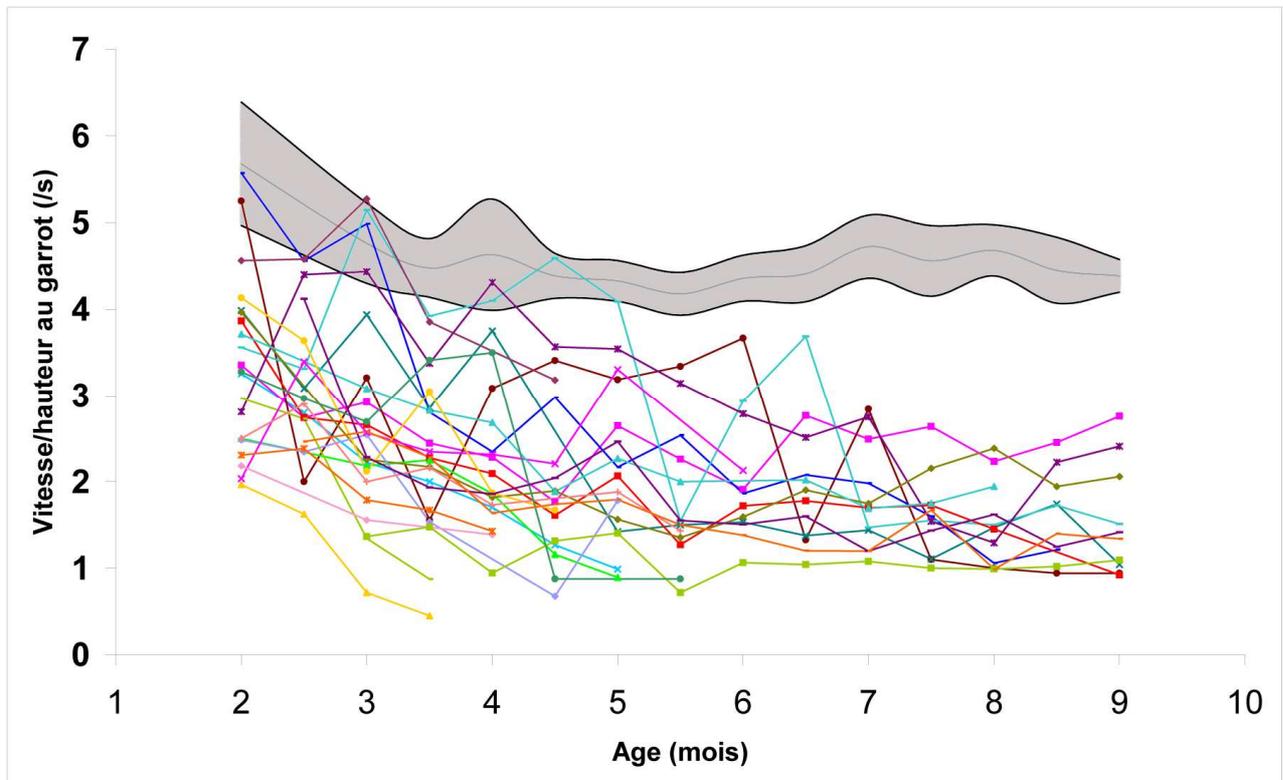
La force relative ne varie pas en fonction de l'âge.

Evolution des différentes variables avec l'âge et l'évolution de la maladie chez les chiens GRMD

Pour chacune des variables étudiées, les résultats de l'analyse de variance ainsi que les moyennes et écart-types à chaque âge figurent dans le tableau 9. Pour chacune des variables, l'évolution des chiens GRMD en comparaison des chiens sains est représentée dans les figures 17 à 24. Chaque chien y est représenté par un symbole et/ou une couleur différents, qui figurent dans le tableau 8. Il est important de noter que l'effet âge a été calculé sur 5 chiens GRMD seulement, car le logiciel Statistica élimine les animaux présentant des « trous », et donc notamment ceux qui sont décédés avant l'âge de neuf mois. Cet effet a donc été calculé sur une partie incontestablement moins touchée de la population GRMD de départ (Dalton, Didon, Dbrouille, Dk, Dluge).

La vitesse, normalisée par la hauteur au garrot, diminue de façon significative avec l'âge chez les chiens GRMD ($p = 0.0067$), comme c'est le cas également chez les chiens sains. Si cette variable distingue déjà bien les deux populations à l'âge de 2 mois ($p = 0.0003$), il apparaît, à la lecture du graphe de la figure 20, que cette séparation des deux groupes s'accroît par la suite jusqu'à devenir complète à l'âge de 5,5 mois, comme en témoignent également les résultats très significatifs de l'effet groupe rapportés dans le tableau 9, pour toutes les classes d'âge. Le graphe de la figure 20 témoigne également d'une nette hétérogénéité dans la population GRMD. Ainsi, la vitesse chute fortement et rapidement chez certains individus qui évoluent vers une perte de la locomotion, comme Evian, Dchou, Ebim ou encore Dsir. Cette chute est moins nette chez des animaux comme Dbrouille ou Dalton, chez qui une relative stabilité, voire même une augmentation se dessine. Entre ces deux situations, de multiples intermédiaires se dessinent.

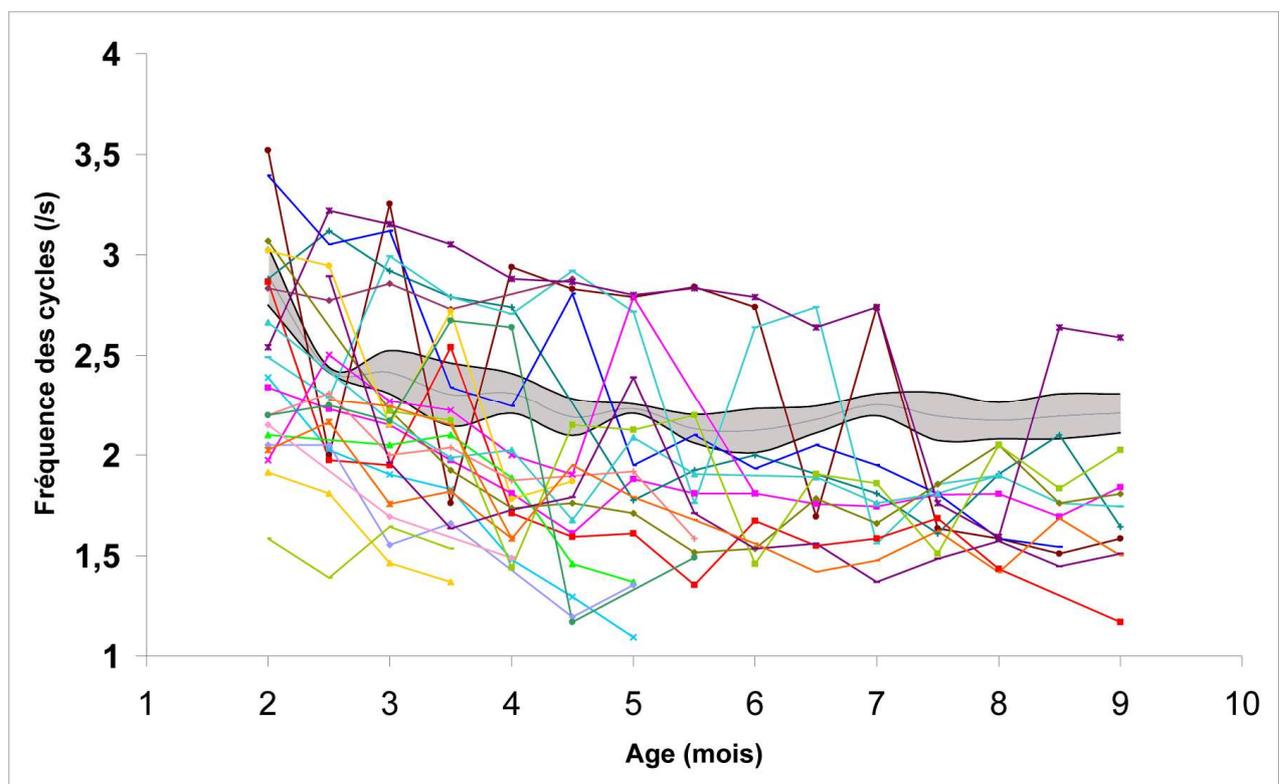
Figure 20 : Accélérométrie – suivi longitudinal – évolution de la vitesse, normalisée par la hauteur au garrot chez les chiens GRMD en comparaison des chiens sains



Les chiens GRMD sont représentés par leurs symboles propres (tableau 8), par comparaison avec la moyenne (ligne grise) ± 1 écart-type (lignes noires, espace grisé) des chiens sains.

La fréquence des cycles, malgré une tendance vers la diminution, ne subit pas d'effet significatif ($p = 0.0350$) de l'âge chez les chiens GRMD. Cette variable, contrairement à la vitesse, ne distingue significativement les deux groupes qu'à quelques points tardifs (après 7.5 mois). Le graphe de la figure 21 permet d'expliquer ces résultats. Il montre en effet que certains chiens présentent une forte diminution de la fréquence des cycles locomoteurs, qui s'accroît avec l'âge, mais que d'autres ont une fréquence augmentée. Cette augmentation de fréquence, qui conduit d'ailleurs à des valeurs très élevées, atteignant plus de 3.5 cycles par seconde, correspond à l'utilisation, par les chiens GRMD, d'une allure qui leur est propre et qui est appelée galop en bonds (tableau 8, annexe 1). Il s'agit d'une allure fréquemment employée par les jeunes chiots GRMD, et certains animaux la maintiennent sur plusieurs mois (Dk, Dluge ou Didon, qui l'emploie encore à 9 mois). Cependant, la majorité des chiens GRMD, et en particulier ceux qui perdent la locomotion, présentent des valeurs de fréquence qui se situent progressivement en deçà de celles observées chez les chiens sains.

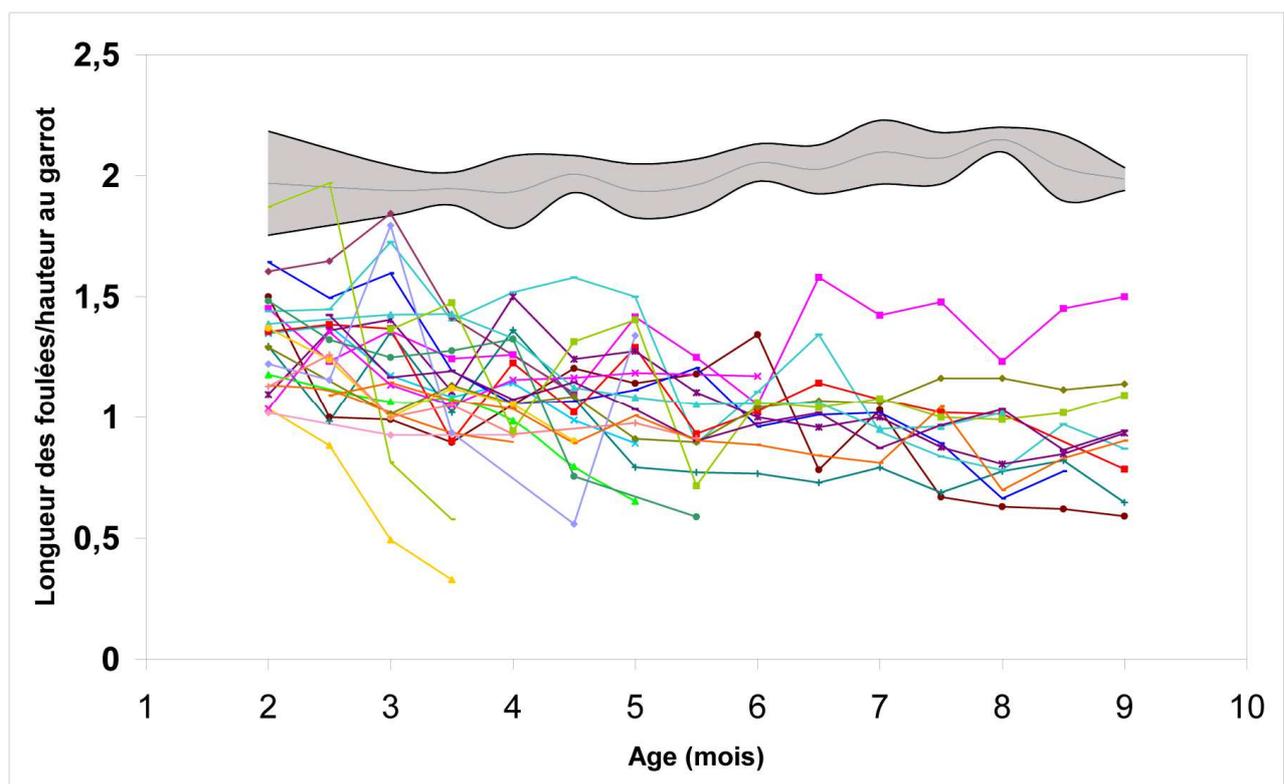
Figure 21 : Accélérométrie – suivi longitudinal – évolution de la fréquence des cycles locomoteurs chez les chiens GRMD en comparaison des chiens sains



Les chiens GRMD sont représentés par leurs symboles propres (tableau 8), par comparaison avec la moyenne (ligne grise) ± 1 écart-type (lignes noires, espace grisé) des chiens sains

La longueur des foulées, rapportée à la hauteur au garrot, malgré une tendance vers la diminution, ne subit pas d'effet significatif ($p = 0.0853$) de l'âge chez les chiens GRMD. Néanmoins, il s'agit d'une variable très significativement ($p < 0.001$) diminuée dès l'âge de 2 mois, et qui le demeure jusqu'au dernier test, à 9 mois. Cette forte distinction apparaît nettement sur le graphe de la figure 22. Il apparaît également de nouveau une hétérogénéité d'évolution, entre des chiens qui, avant de perdre la locomotion, présentent une chute très importante et à des niveaux très bas de la longueur de leurs foulées, d'autres animaux qui raccourcissent très progressivement leurs foulées, et le chien Dbrouille qui rallonge les siennes à partir de 6 mois.

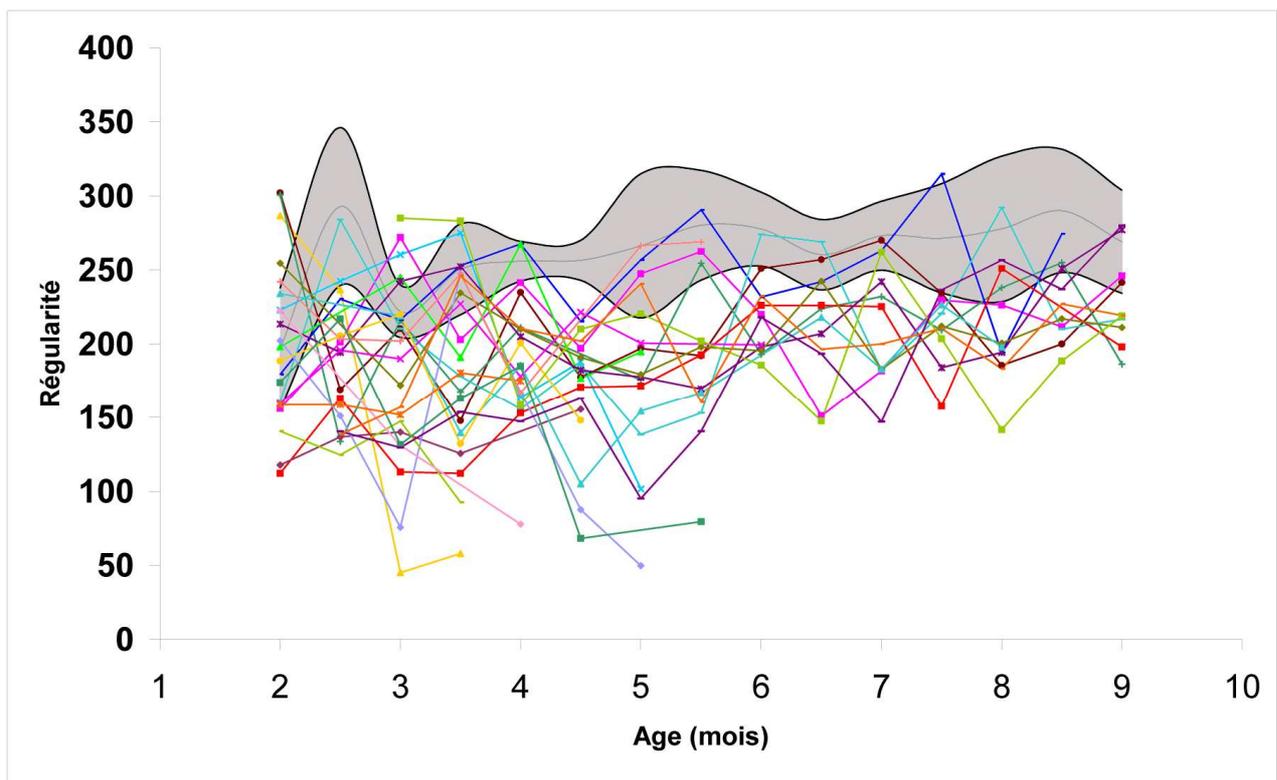
Figure 22 : Accélérométrie – suivi longitudinal – évolution de la longueur des foulées, normalisée par la hauteur au garrot chez les chiens GRMD en comparaison des chiens sains.



Les chiens GRMD sont représentés par leurs symboles propres (tableau 8), par comparaison avec la moyenne (ligne grise) ± 1 écart-type (lignes noires, espace grisé) des chiens sains

La régularité ne montre aucune modification significative avec l'âge ($p = 0.4050$) chez le chien GRMD, tandis qu'elle augmente avec l'âge chez les chiens sains. Cependant, à quelques temps d'examen (4 mois, 4.5 mois, 5.5 mois, 6 mois, et 8.5 mois), les chiens GRMD se montrent significativement moins réguliers que les chiens sains. A la lecture du graphe de la figure 23, il apparaît en effet que les deux populations ne sont jamais très nettement séparées. Par ailleurs, si la plupart des chiens GRMD montre un global maintien de leur régularité, certains animaux chutent pour cet index de manière spectaculaire, le plus souvent juste avant une perte de locomotion, contribuant alors très probablement à rendre ponctuellement significative la différence entre chiens sains et chiens GRMD.

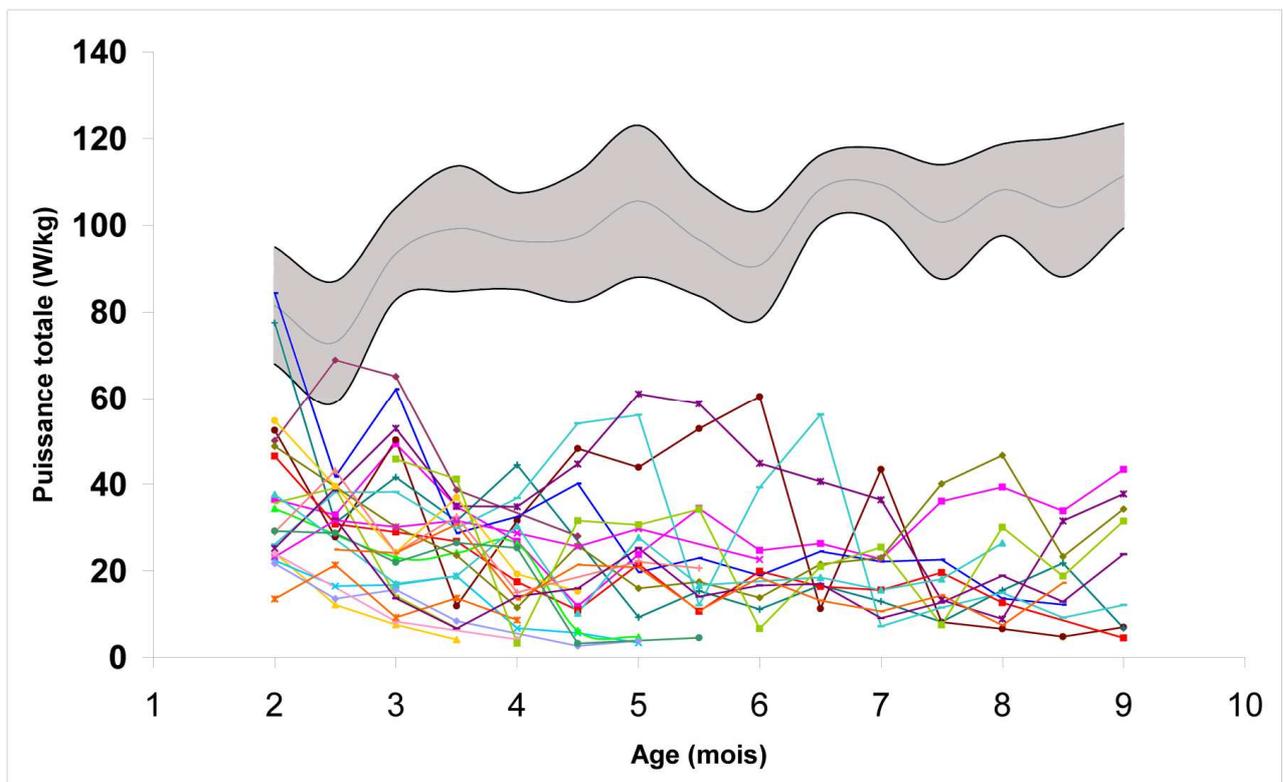
Figure 23 : Accélérométrie – suivi longitudinal – évolution de la régularité chez les chiens GRMD en comparaison des chiens sains



Les chiens GRMD sont représentés par leurs symboles propres (tableau 8), par comparaison avec la moyenne (ligne grise) ± 1 écart-type (lignes noires, espace grisé) des chiens sains

La puissance totale, malgré une tendance vers la diminution, ne subit pas d'effet significatif de l'âge ($p = 0.0902$). Cependant l'effet groupe est, lui, très significatif dès l'âge de 2 mois, et le reste jusqu'à 9 mois. Cette forte distinction entre chiens GRMD et chiens sains par cette variable est illustrée par le graphe de la figure 24, qui montre que, déjà à 2 mois, les chiens GRMD ont pour certains des valeurs très faibles de puissance totale (< 30 W/kg). Certains animaux (en particulier Didon, Dluge et Dk) montrent une évolution « en dents de scie » pour cette variable, comme pour la vitesse. Ceci est à relier à l'utilisation intermittente de galop en bonds, allure plus puissante que le trot ou la marche chez le chien GRMD, mais dont la puissance n'égale toutefois pas celle d'un chien sain au trot.

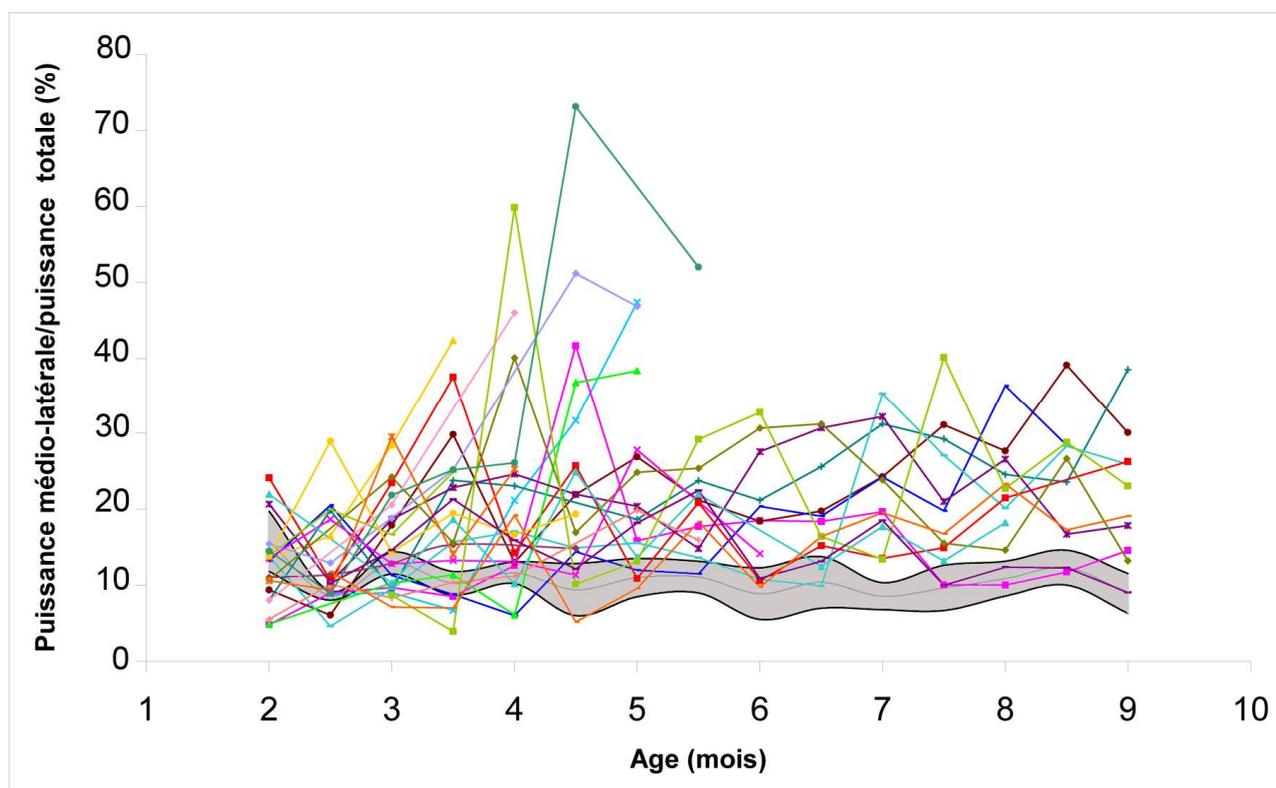
Figure 24 : Accélérométrie – suivi longitudinal – évolution de la puissance totale chez les chiens GRMD en comparaison des chiens sains



Les chiens GRMD sont représentés par leurs symboles propres (tableau 8), par comparaison avec la moyenne (ligne grise) ± 1 écart-type (lignes noires, espace grisé) des chiens sains

Les puissances relatives dans les trois axes ne montrent pas de modification significative liée à l'âge, malgré une discrète tendance à l'augmentation de la puissance médio-latérale relative ($p = 0.0969$). Au vu des résultats présentés dans le tableau 9 et le graphe de la figure 25, l'augmentation de la puissance médio-latérale est un évènement tardif, puisque la différence avec les chiens sains ne devient significative qu'à partir de 7 mois. Cependant, cette variable reste normale chez certains chiens, même à ces stades tardifs (Dbrouille, Ebam). De la même façon que pour d'autres variables, les chiens perdant la locomotion augmentent leur puissance médio-latérale relative jusqu'à des niveaux très importants, avant leur perte de locomotion.

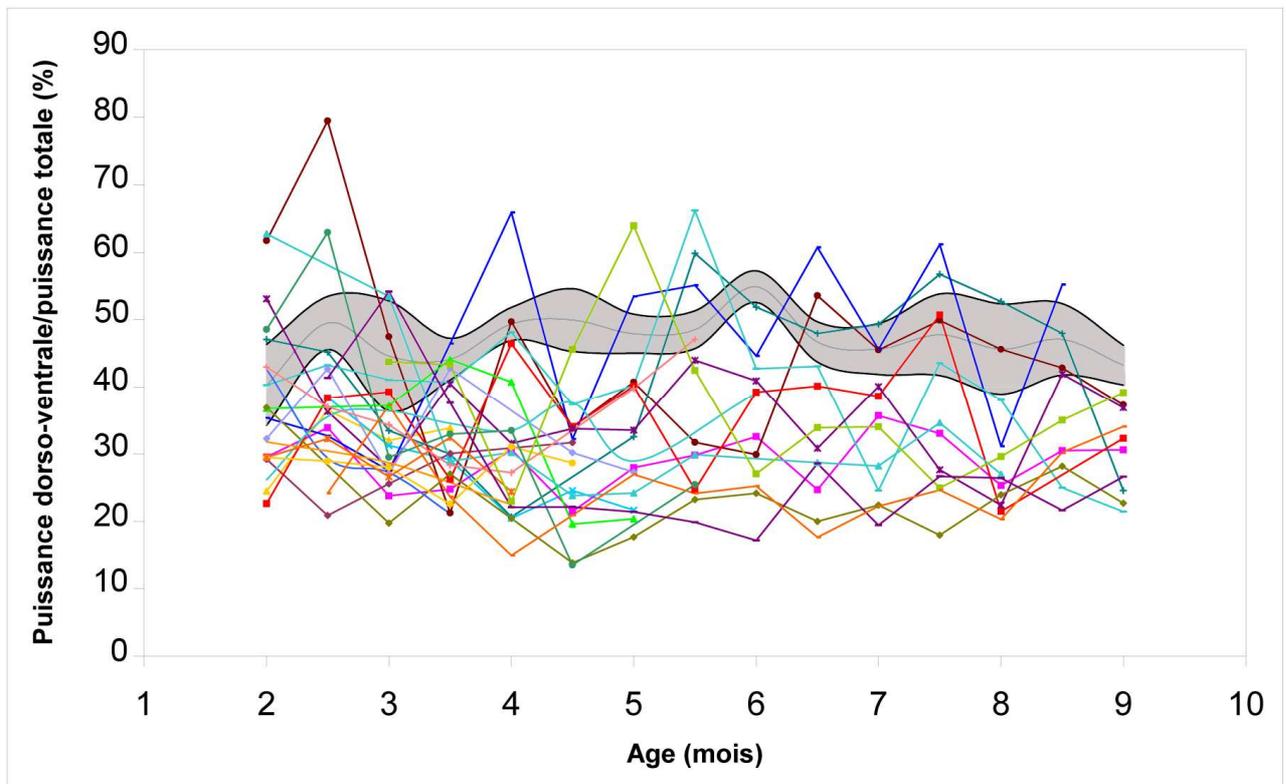
Figure 25 : Accélérométrie – suivi longitudinal – évolution de la puissance médio-latérale relative chez les chiens GRMD en comparaison des chiens sains



Les chiens GRMD sont représentés par leurs symboles propres (tableau 8), par comparaison avec la moyenne (ligne grise) ± 1 écart-type (lignes noires, espace grisé) des chiens sains

Si la puissance dorso-ventrale relative n'était pas modifiée chez les adultes, force est de constater qu'une diminution significative de celle-ci est observée à plusieurs reprises dans ce suivi longitudinal, et avant les modifications de puissance médio-latérale. Le graphe de la figure 26 illustre cette diminution de puissance dans l'axe vertical.

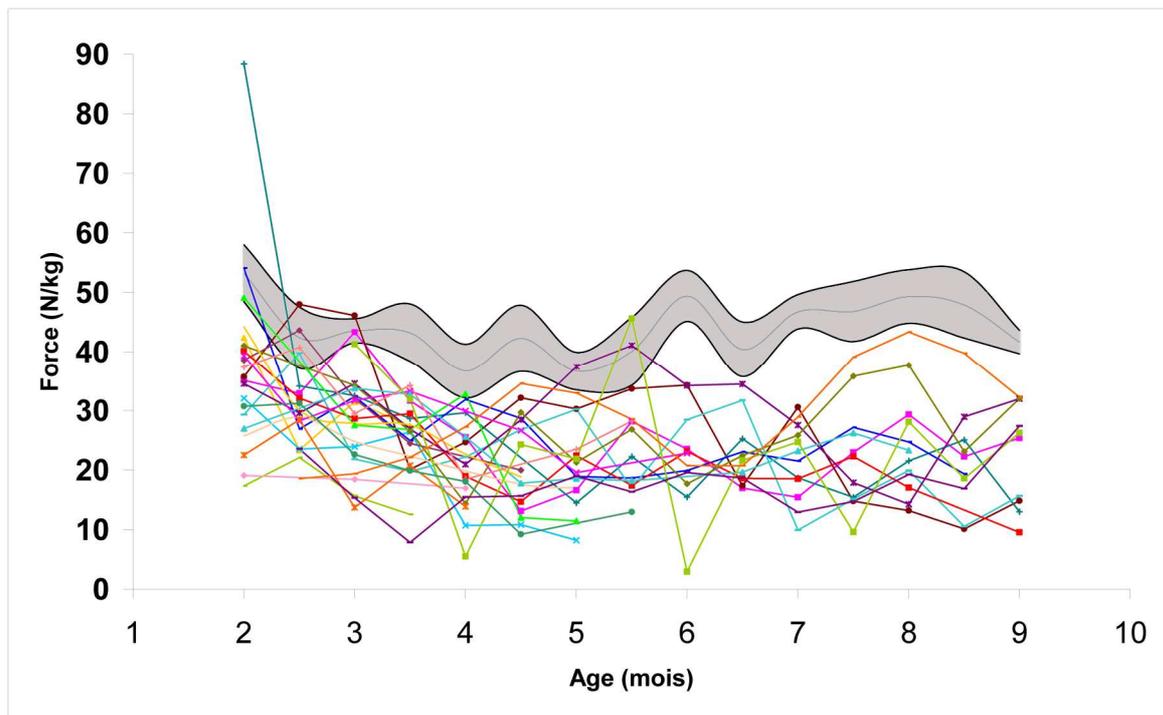
Figure 26 : Accélérométrie – suivi longitudinal – évolution de la puissance dorso-ventrale relative chez les chiens GRMD en comparaison des chiens sains



Les chiens GRMD sont représentés par leurs symboles propres (tableau 8), par comparaison avec la moyenne (ligne grise) ± 1 écart-type (lignes noires, espace grisé) des chiens sains

La force relative diminue de manière significative avec l'âge ($p = 0.0034$) chez le chien GRMD, ce qui n'est pas le cas chez le chien sain. Le graphe de la figure 27 montre que cette variable distingue de manière assez efficace les deux populations, comme en témoignent les niveaux de significativité obtenus pour l'effet groupe à tous les âges, à partir de 3 mois (tableau 9). A l'âge de deux mois, un individu, Dlice, présente une valeur de force relative extrêmement élevée. Ce chiot a en effet, au premier test, produit une locomotion puissante (77.5 W/kg), avec néanmoins une vitesse réduite (0.88 m/s), en liaison avec sa petite taille (0.220 m). Il s'agissait d'ailleurs du plus petit chien à cet âge, après le chien Dfois (0.215 m).

Figure 27 : Accélérométrie – suivi longitudinal – évolution de la force relative chez les chiens GRMD en comparaison des chiens sains

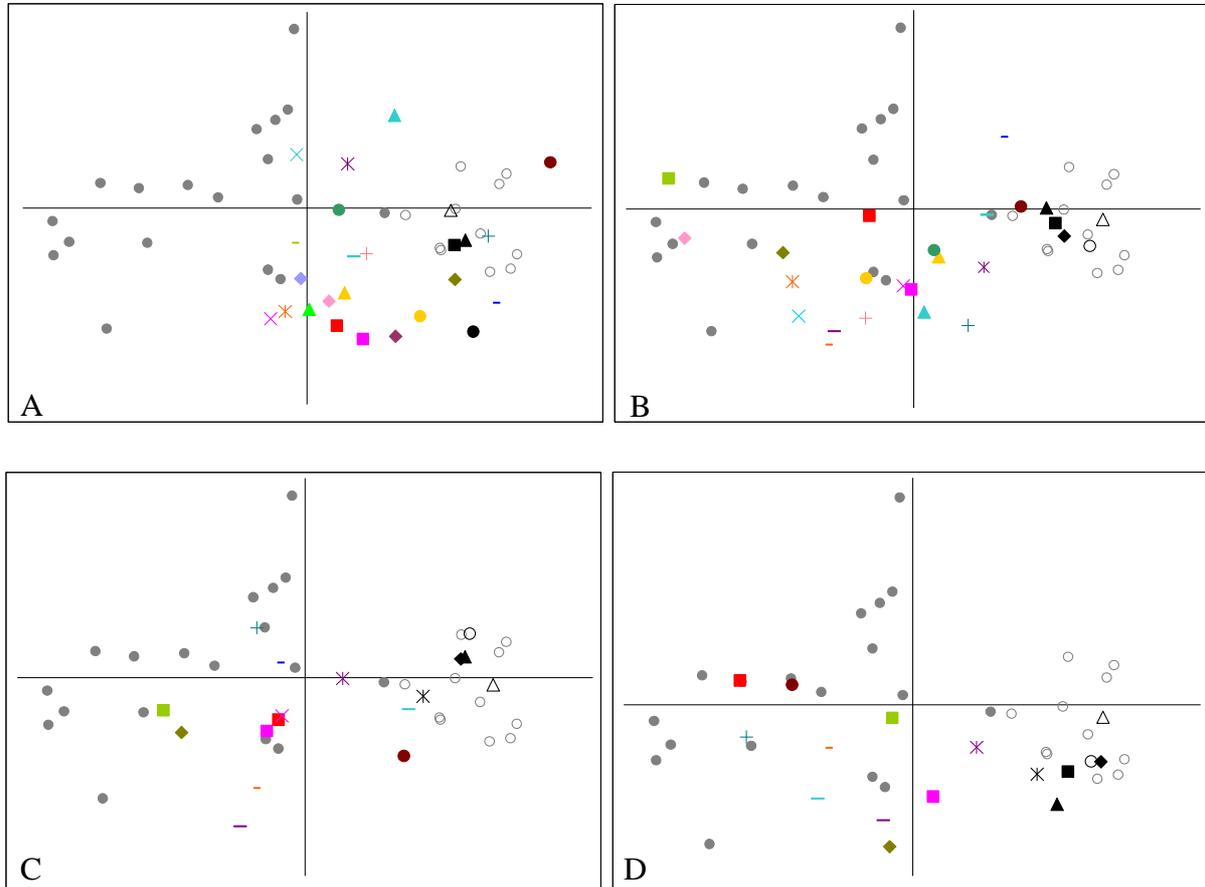


Les chiens GRMD sont représentés par leurs symboles propres (tableau 8), par comparaison avec la moyenne (ligne grise) ± 1 écart-type (lignes noires, espace grisé) des chiens sains

Utilisation de l'ACP et de la distance euclidienne au centre de gravité des chiens sains comme index global de locomotion

Les chiens sains et GRMD décrits par les 7 variables choisies pour l'analyse en composantes principales ont été projetés, comme individus supplémentaires, sur le plan d'ACP précédemment décrit et obtenu chez les chiens adultes. L'objectif est ici de suivre l'évolution de la locomotion des chiens suivant toutes ces variables au cours du temps, en étudiant leur déplacement sur le plan d'ACP. Les graphes de la figure 28 montrent la position des chiens étudiés dans le cadre du suivi longitudinal sur le plan d'ACP à l'âge de 2, 4, 6 et 9 mois. Les chiens adultes, individus actifs, sont représentés par des symboles grisés, pleins pour les GRMD et vides pour les chiens sains. Il apparaît que les chiens sains en croissance (symboles noirs) se superposent à tout âge au nuage de points des chiens sains adultes, et se déplacent peu sur le plan d'ACP. Ceci n'est pas le cas des chiens GRMD. A l'âge de 2 mois (graphe A), ils ne se superposent pas à la population GRMD adultes. Par contre, ils ne se confondent pas non plus avec les individus sains : la position de la majorité des individus évoque celle des individus CNM adultes (figure 17), à la différence près qu'ils sont déjà décalés vers la gauche du plan, traduisant la chute précoce de la puissance totale, et de la longueur des foulées notamment. A l'âge de 4 mois (graphe B), la population de chiens GRMD est déjà plus étalée, et se superpose au nuage de points des chiens adultes, en se localisant néanmoins essentiellement dans la zone basse du plan, très probablement en liaison avec la chute de puissance dorso-ventrale relative. A l'âge de 6 (graphe C) et 9 (graphe D) mois, cette superposition est encore observée, malgré le plus faible nombre d'animaux. Il est intéressant de noter que les chiens suivent des parcours différents : certains s'éloignent progressivement du nuage de chiens sains, signant une aggravation de leur locomotion (Dmon, Dlice, Dluge ou Dk par exemple), tandis que d'autres, après s'en être éloignés, s'en rapprochent aux temps les plus tardifs (Dbrouille, Eboum, Didon ou Dalton, par exemple).

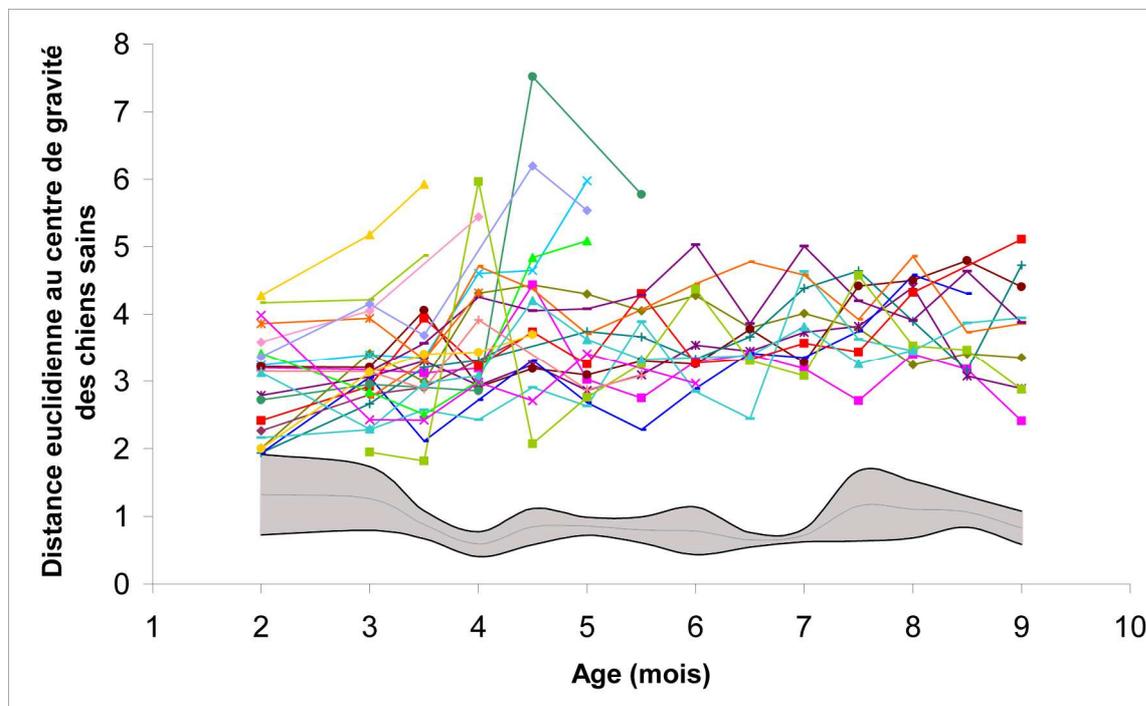
Figure 28 : Accélérométrie – suivi longitudinal – évolution des chiens GRMD sur le plan d’ACP calculé pour les adultes



Les animaux actifs pour l’élaboration de ce plan d’ACP sont les animaux utilisés dans l’étude sur chiens adultes. Ils sont représentés ici par des cercles gris pleins pour les GRMD, et vides pour les chiens sains. Les chiens en croissance ont été projetés comme individus supplémentaires, et sont représentés par les symboles qui leur sont associés (tableau 8). A : projection des chiens de 2 mois ; B : projection des chiens de 4 mois ; C : projection des chiens de 6 mois ; D : projection des chiens de 9 mois.

Afin de quantifier le déplacement des chiens sur le plan d'ACP et de disposer d'un index global de locomotion, la distance euclidienne de chacun des chiens par rapport au centre de gravité des chiens sains du même âge a été calculée. Celle-ci est augmentée chez les chiens GRMD en comparaison des chiens sains, dès l'âge de deux mois ($p = 0.0002$), et cette différence se maintient aux temps suivants ($p < 0.0001$ à tous les temps). La distance euclidienne chez les chiens GRMD augmente avec l'âge, mais de manière non significative (effet âge : $p = 0.0728$). Le graphe de la figure 29 montre l'évolution de ce paramètre avec l'âge chez les chiens GRMD, en comparaison des chiens sains.

Figure 29 : Accélérométrie – suivi longitudinal - évolution de la distance euclidienne au centre de gravité de la population normale, chez les chiens GRMD en comparaison des chiens sains



Les chiens GRMD sont représentés par leurs symboles propres (tableau 8), par comparaison avec la moyenne (ligne grise) ± 1 écart-type (lignes noires, espace grisé) des chiens sains

Corrélation des différentes variables au score clinique moteur

Les résultats obtenus pour les coefficients de corrélation de Pearson au score clinique moteur des différentes variables montrent que toutes les variables sont significativement corrélées au score clinique moteur, sauf la puissance dorso-ventrale relative et la régularité. Ces corrélations sont inverses, sauf pour la puissance médio-latérale et la distance euclidienne, qui sont les seules variables positivement corrélées, puisque leur valeur augmente avec l'évolution de la maladie, tout comme le score moteur.

Les valeurs de coefficients de corrélation, qui figurent dans le tableau 10, ne sont cependant pas très élevées, signant des corrélations peu marquées dans l'ensemble. La vitesse, ainsi que la longueur des foulées, normalisées par la hauteur au garrot, montrent néanmoins des corrélations intéressantes (respectivement $R = -0.61$; -0.65 ; $p < 0.0001$).

Tableau 10 : Accélérométrie – suivi longitudinal – coefficients de corrélation au score clinique moteur obtenus pour les différentes variables

	V/HG	FC	LF/HG	Reg	PT	PDV/PT	PCC/PT	PML/PT	Force	D _{eucl}
R	-0.61	-0,48	-0.65	-0.07	-0.51	-0.10	-0.33	0.46	-0.45	0.46
p	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.4292	< 0.0001	0.2816	0.0002	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

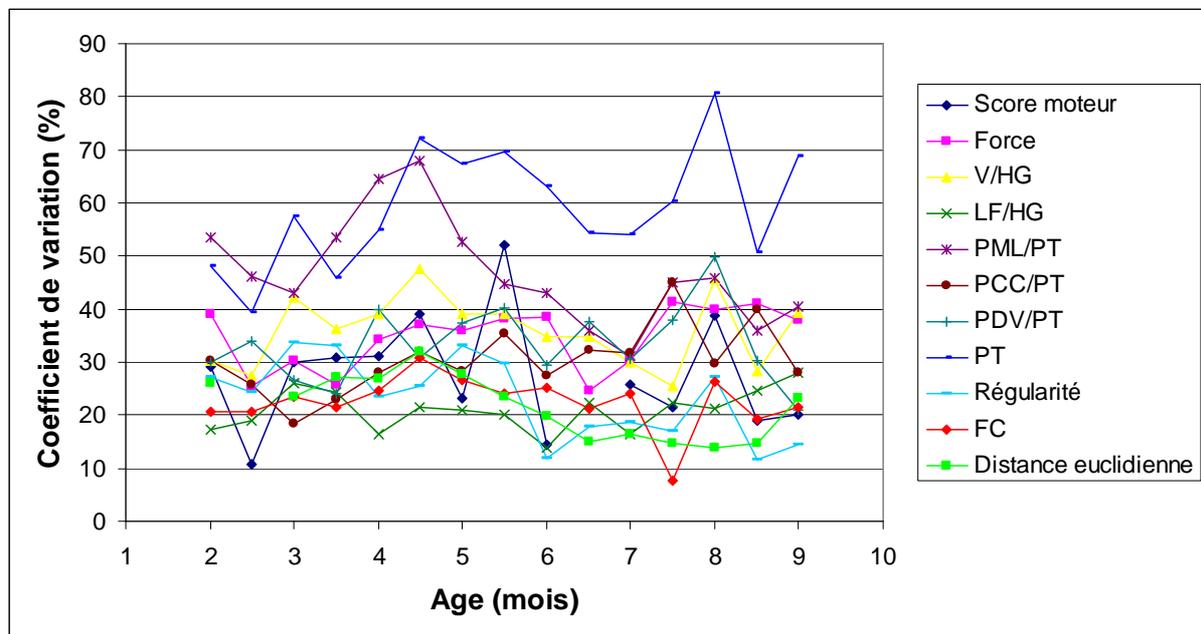
La première ligne de résultats contient les valeurs obtenues pour le coefficient R de corrélation de Pearson au score clinique moteur, pour chacune des variables, et la deuxième ligne le niveau de significativité associé. Les résultats significatifs figurent en gras.

Abréviations utilisées : V/HG : vitesse, normalisée par la hauteur au garrot ; FC : fréquence des cycles ; LF/HG : longueur des foulées, normalisée par la hauteur au garrot ; Reg : régularité ; PT : puissance totale ; PDV/PT : puissance dorso-ventrale, normalisée par la puissance totale ; PCC/PT : puissance cranio-caudale, normalisée par la puissance totale ; PML/PT : puissance médio-latérale, normalisée par la puissance totale ; D_{eucl} : distance euclidienne au centre de gravité des chiens sains.

Capacité comparée des différentes variables à expliquer la dispersion de la population

Evaluer la capacité des différentes variables à retranscrire quantitativement l'hétérogénéité de la population GRMD permet également d'appréhender la sensibilité de chacune des variables à des différences entre animaux. La comparaison des coefficients de variation obtenus pour les différentes variables et à chaque âge permet de positionner les variables les unes par rapport aux autres suivant leur capacité à disperser la population. Le graphe de la figure 30 illustre cette comparaison. A sa lecture, il apparaît que la puissance totale est, de manière très nette, la variable pour laquelle les coefficients de variation sont les plus importants. Des variables telles que la régularité, la fréquence des cycles ou la longueur des foulées témoignent en revanche de manière moins importante de la dispersion des individus. De plus, il est important de souligner que de nombreuses variables d'accélérométrie expliquent, mieux que le score clinique moteur, la dispersion de la population.

Figure 30 : Accélérométrie – suivi longitudinal – évolution des coefficients de variation des différentes variables avec l'âge chez les chiens GRMD



D. Discussion

L'accélérométrie, utilisée et évaluée ici comme outil d'analyse de marche chez le chien GRMD, a montré dans cette étude qu'elle pouvait répondre à la majorité des critères du cahier des charges, énoncés en introduction. En effet, son apparente simplicité de mise en application s'est avérée réelle : la phase d'apprentissage, à une exception près s'est révélée très rapide, et peu d'animaux se sont montrés gênés par le dispositif de mesure. De plus, des tracés exploitables ont été obtenus à la très grande majorité des tests. La durée du test, d'environ 15 minutes du moment où le chien est sorti de sa cage, jusqu'au moment où il y est replacé, est également une preuve évidente de la simplicité d'utilisation de cette méthode, surtout si l'on compare ce temps d'examen aux temps rapportés pour la cinématique par exemple. Ainsi, alors qu'il est possible d'évaluer quatre chiens environ en une heure par accélérométrie, une journée entière de travail ne permet d'évaluer que trois patients en cinématique (Simon 2004). Etant donnée la fatigabilité des chiens GRMD, cet élément constitue un atout essentiel de la méthode décrite ici. Enfin, la phase d'analyse des tracés peut être qualifiée de rapide, puisqu'une fois la zone de locomotion stabilisée sélectionnée sur le tracé d'accélération dorso-ventrales, un clic suffit à calculer l'ensemble des variables.

Un autre critère énoncé dans le cahier des charges était l'aptitude de la méthode de mesure à détecter des anomalies de locomotion chez le chien GRMD, et à les quantifier. Sur ce point encore, la méthode choisie s'est avérée efficace : de nombreuses variables se sont montrées capables de distinguer, de manière souvent très tranchée, les chiens GRMD des chiens sains, et ce, à l'âge adulte comme au cours de la croissance. De surcroît, ce fossé existant entre les deux groupes d'animaux n'empêche pas les variables étudiées de détecter de manière quantitative des différences entre chiens à l'intérieur même de la population GRMD, et de refléter ainsi l'hétérogénéité de cette maladie, déjà bien décrite, mais jamais réellement quantifiée (Ambrosio et al. 2009, Valentine et al. 1988).

Cette étude constitue le premier travail publié, employant l'accélérométrie comme outil d'analyse de marche chez le chien. Aussi, il est intéressant de confronter les données obtenues à celles présentes dans la littérature. Chez le chien, les données disponibles et comparables sont essentiellement la vitesse, la fréquence des cycles et la longueur des foulées, calculées à partir d'enregistrements de cinématique. Les données obtenues pour ces variables chez les chiens adultes de la présente étude ont été comparées à celles publiées dans deux articles

différents (Allen et al. 1994, Gillette and Zebas 1999), choisis pour leurs valeurs de vitesse imposée proche de celle spontanément employée par les chiens sains décrits ici. La comparaison de ces résultats est présentée dans le tableau 11. Il est intéressant de noter que la vitesse des chiens sains, intermédiaire entre celle des deux études considérées, est expliquée par une fréquence de cycle et une longueur de foulées également intermédiaire. Il existe donc une cohérence entre les données obtenues ici chez les chiens sains par accélérométrie, et celles publiées chez des chiens de même type racial, par cinématique. La valeur moyenne de régularité obtenue chez les chiens sains adultes a été comparée à celle obtenue chez des patients d'âge compris entre 20 et 29 ans (Auvinet et al. 2002). En effet, aucune donnée concernant cette variable n'existe dans la littérature chez le chien. De plus, connaissant la méthode de calcul de cet index, la nature bipède ou quadrupède de la locomotion ne doit pas modifier la valeur obtenue, et une comparaison pertinente peut donc être effectuée entre les deux espèces, du moins pour les allures à deux temps (trot chez le chien vs marche chez l'homme). La régularité moyenne s'avère quasiment identique entre les deux espèces, puisqu'un écart de deux points seulement est observé.

En résumé, les données obtenues chez les animaux sains sont en adéquation avec les données existant dans la littérature, ce qui représente un argument en faveur de leur validité, dans un contexte où la méthode de mesure n'a pas été validée dans l'espèce canine, par comparaison directe avec l'un des gold-standards que sont cinétique ou cinématique. Ce point constitue d'ailleurs une limite de cette étude, qui sera abordée plus loin.

Sur les chiens GRMD, rares sont les publications permettant la même comparaison, puisque la première étude d'analyse de marche publiée dans ce modèle a été le travail de comparaison chiens sain-chiens GRMD adultes présenté ici (Barthelemy et al. 2009). Néanmoins, une étude de cinématique sur des chiens GRMD, adultes également, a été publiée quelques semaines plus tard, et permet de comparer les vitesses de ces animaux, qui sont dans les deux cas choisies par l'individu étudié (Marsh et al. 2010). Cette comparaison permet de mettre en évidence que les chiens GRMD adultes de l'étude de cinématique marchent en moyenne plus vite que les chiens GRMD considérés ici, alors que ces mêmes chiens sont en moyenne plus petits. Cette nette différence peut s'expliquer par une atteinte clinique plus prononcée dans le groupe de chiens français que dans le groupe américain, traduisant peut-être une divergence d'évolutions entre les deux colonies, ayant pourtant une origine commune, mais des évolutions parallèles depuis de nombreuses années. Cette différence de vitesse peut également s'expliquer par le fait que, dans l'étude de cinématique, les chiens étaient tenus en laisse,

donnant moins de sens au terme de vitesse choisie par l'animal. Une vitesse d' 1 m/s constituant un pas très lent pour un opérateur humain (Auvinet et al. 2002), il est possible que le guidage par la laisse ait contribué à pousser les chiens à accélérer.

Tableau 11: Comparaison des données obtenues dans cette étude chez les chiens adultes aux données existant dans la bibliographie

	Vitesse chiens sains (m/s)	Fréquence cycles chiens sains (/s)	Longueur des foulées chiens sains (m)	Régularité chiens sains	Vitesse chiens GRMD (m/s)	Hauteur au garrot chiens GRMD (m)
Moy (ET) présente étude	2.42 (0.36)	2.15 (0.14)	1.13 (0.12)	330.7 (27.5)	0.75 (0.32)	0.54 (0.05)
Moy (ET) données littérature	1.95 (0.08) (Allen et al. 1994) 2.87 (0.44) (Gillette and Zebas 1999)	1.88 (0.14) (Allen et al. 1994) 2.36 (0.21) (Gillette and Zebas 1999)	1.01 (0.06) (Allen et al. 1994) 1.21 (0.15) (Gillette and Zebas 1999)	328.7 (38.0) (human subjects) (Auvinet et al. 2002)	1.18 (0.34) (Marsh et al. 2009)	0.49 (0.04) (Marsh et al. 2009)

Abréviations : Moy : moyenne ; ET : écart-type

Les différentes variables étudiées ont permis d'établir une histoire naturelle quantifiée de l'évolution de la locomotion chez le chien GRMD, de l'âge de 2 mois, considéré comme l'âge d'apparition des premiers signes cliniques locomoteurs, à l'âge adulte.

Dès l'âge de deux mois, et jusqu'à l'âge adulte, la vitesse spontanément adoptée par le chien, c'est-à-dire sa vitesse de confort, est effondrée. Cette perte de vitesse s'explique dans un premier temps par une réduction majeure de la longueur des foulées, dès l'âge de deux mois, et qui continue de diminuer jusqu'à l'âge adulte. En début d'évolution, seule cette diminution de longueur de foulée explique la perte de vitesse. En effet, à ce stade, la fréquence des cycles n'est pas diminuée chez tous les animaux. Certains d'entre eux parviennent même à l'augmenter de manière importante, maintenant ainsi à ce stade une vitesse subnormale. Cette augmentation de fréquence est à relier à l'utilisation du galop dit « en bonds ». Cette allure particulière, basée sur une propulsion synchrone des deux antérieurs puis des deux postérieurs (annexe 1), est une allure primitive, normalement employée, chez les grands mammifères tels que le chien, exclusivement dans les phases d'accélération et de décélération précédant et suivant un galop circulaire (Walter and Carrier 2007). Le maintien de cette allure

comme allure stabilisée de prédilection chez les chiens GRMD pourrait être interprété comme une stratégie leur permettant de produire davantage de puissance en utilisant deux membres synchronisés, et d'éviter les phases d'appui sur un seul membre, que leur imposerait un galop circulaire classique (Rocha-Barbosa et al. 2005, Walter and Carrier 2007) (annexe 1). Ce n'est donc que dans un deuxième temps que l'ensemble des chiens diminuent leur fréquence de cycles locomoteurs, participant ainsi un peu plus à la perte de vitesse.

En liaison avec cette diminution de vitesse, la puissance totale est également effondrée de manière précoce. Il s'agit ici d'une des variables les plus discriminantes, et ce, à tout âge. Cette perte de puissance constitue donc, tout comme la vitesse et la longueur des foulées, une modification primaire de la locomotion du chien GRMD. La puissance étant un produit de la vitesse et de la force, cette diminution pourrait s'expliquer simplement par la chute de vitesse. Afin de vérifier cela, l'index nommé force relative (car exprimé en N/kg), calculé en normalisant la puissance totale par la vitesse, a été créé. Cet index s'est avéré être également diminué, dès les stades précoces de l'évolution de la maladie. Ceci permet donc d'expliquer la très forte diminution de la puissance totale par la réduction de la vitesse, mais également par l'effondrement de la force générée au cours de la locomotion.

Cette puissance totale effondrée à tout âge, l'est, en début d'évolution, de manière homogène dans les trois axes. Rapidement, une chute de la puissance dorso-ventrale, donc de l'impulsion verticale, est observée. Puis, une redistribution de cette puissance dorso-ventrale vers l'axe médio-latéral est mise en évidence. Chez certains animaux, cette situation se maintient, et chez d'autres, la puissance dorso-ventrale relative finit par se normaliser à des stades tardifs (après 9 mois), tandis que la puissance cranio-caudale chute à son tour, toujours avec une redistribution médio-latérale. Le premier évènement, qui est la chute de puissance dorso-ventrale, traduit une faiblesse de propulsion, et représente un point commun avec les caractéristiques locomotrices observées dans le modèle CNM. Les chiens CNM présentent, comme les chiens GRMD, une faiblesse musculaire, qui entraîne probablement un défaut de propulsion verticale, démontré par la diminution importante de puissance dorso-ventrale relative, sans chute de la puissance totale. Néanmoins, si la démarche des chiens CNM est effectivement peu sautillante à l'œil, et donne une impression globale d'hypotonie, elle n'est jamais raide, comme elle peut l'être chez le chien GRMD. La puissance médio-latérale relative, qui augmente progressivement dans ce modèle, traduit et quantifie le balancement qui se produit au cours de la locomotion des chiens GRMD, et qui contribue à l'impression de raideur perçue par l'observateur. Cette augmentation de puissance médio-latérale relative peut

probablement être mise en relation avec les contractures et ankyloses articulaires entravant la souplesse de mouvements durant la locomotion. Notamment, il est fréquent d'observer une ankylose des antérieurs en abduction, ainsi que des difficultés à fléchir les articulations proximales, ce qui entraîne des mouvements de circumduction des membres durant la marche. Par ailleurs, le balancement observé durant la locomotion des chiens GRMD, et quantifié par la puissance médio-latérale relative, pourrait être mis en relation avec une nécessité pour l'animal de se stabiliser au cours de la phase de déséquilibre du cycle locomoteur, en supportant son poids de manière importante d'un côté pour permettre au membre controlatéral d'effectuer son mouvement de protraction.

Il s'agit là de l'une des nombreuses similitudes qui peuvent être relevées, entre les stratégies de locomotion employées par les patients atteints de DMD et les chiens GRMD. En effet, les patients atteints de myopathie de Duchenne augmentent leur polygone de sustentation, positionnent leurs bras en abduction et montrent un balancement des épaules au cours de la marche (D'Angelo et al. 2009, Sutherland et al. 1981). Ces éléments sont supposés être des adaptations pour maintenir l'équilibre. Cette modification n'est cependant pas la première chez les patients, qui commencent par diminuer leur longueur de foulée (Sutherland et al. 1981) (D'Angelo et al. 2009), puis leur fréquence de cycles locomoteurs (Sutherland et al. 1981). Cette évolution n'est pas sans rappeler celle décrite ici chez les chiens GRMD. Ainsi, au-delà des différences majeures de locomotion qui peuvent exister entre bipèdes et quadrupèdes, il est surprenant de constater qu'une même maladie entraîne des conséquences sur la locomotion, ainsi que des stratégies d'adaptation identiques dans deux espèces différentes, l'une bipède et l'autre quadrupède. Cependant, la perte de locomotion, systématique chez le patient, reste beaucoup plus rare chez le chien, bien que concernant une partie importante de la population de chiens GRMD de cette étude. Ceci s'explique très probablement par le fait que les patients finissent par atteindre un stade, auquel ils ne sont plus capables de développer des stratégies de compensation de la phase de déséquilibre de la marche, et sont donc contraints à l'usage du fauteuil roulant. La quadrupédie confère probablement au chien GRMD une protection vis-à-vis de cette perte de la gestion de l'équilibre au cours de la marche.

C'est probablement la raison pour laquelle la régularité ne représente pas la variable la plus discriminante chez le chien GRMD. Cet index est décrit comme diminué chez des patients sujets aux chutes, donc aux pertes d'équilibre (Dingwell and Cavanagh 2001, Hausdorff et al. 1997). La perte de régularité est attribuée chez ces patients à une moindre coordination

motrice, qui conduit à des difficultés à produire des adaptations rapides en cas d'obstacle. Certains chiens GRMD chutent également lors du franchissement d'un obstacle, ou même au cours de la locomotion. Ceci explique probablement la perte de régularité chez certains individus plus touchés, et notamment la diminution brutale de cet index avant une perte de locomotion, qui traduit dans ce cas la difficulté de l'animal à maintenir un équilibre et une stabilité au cours de la marche, difficulté qui représente très probablement la cause de la perte de locomotion. Chez les patients atteints de DMD, cet index n'a jamais été évalué, faute d'études employant l'accélérométrie, mais il est probable que la régularité soit diminuée chez ces individus, qui sont sujets à des chutes fréquentes dès le début de leur maladie, et perdent progressivement leur capacité à maintenir un équilibre correct durant la locomotion (Yiu and Kornberg 2008).

Parmi les nombreuses variables étudiées, certaines présentent davantage d'intérêts que d'autres, suivant les situations rencontrées, et les objectifs énoncés. Ainsi, l'utilisation de variables altérées précocement telles que la vitesse, la puissance totale ou la longueur des foulées, peut être envisagée dans le cadre de l'évaluation d'animaux inclus très tôt dans des essais thérapeutiques, qui pourraient permettre de prévenir les modifications primaires de la locomotion de ces animaux. Un bénéfice apporté par un traitement administré en phase néonatale pourrait donc être démontré dès l'âge de deux mois par une amélioration de ces variables par rapport à un groupe de chiens non traités, traduisant alors probablement une moindre faiblesse locomotrice. L'utilisation de ces mêmes variables pourrait également être envisagée pour évaluer une « réversion » de la maladie après un traitement plus tardif. L'amélioration de ces anomalies primaires de locomotion pourrait être considérée comme un argument en faveur d'un bénéfice clinique, voire d'une guérison, suivant le degré d'amélioration constaté.

Parallèlement, les variables traduisant des anomalies secondaires de la locomotion, c'est-à-dire celles altérées plus tardivement, telles que la fréquence des cycles ou encore la puissance médio-latérale relative, présentent également un intérêt. En effet, leur suivi au cours d'un essai thérapeutique peut permettre de mettre en évidence un effet préventif du traitement sur les altérations tardives de la locomotion, et donc probablement sur les ankyloses et contractures, qui sont responsables de ces altérations.

Dans ce contexte de multiplicité d'altérations de la locomotion et de variables étudiées, l'utilisation d'une variable unique permettant de refléter le niveau de l'ensemble des

variables, et de simplifier l'interprétation et la lisibilité des données a été proposée. L'analyse en composantes principales, méthode d'analyse multivariée, a été utilisée à cette fin. Le choix de projeter les individus en cours d'évolution comme individus supplémentaires sur le plan d'ACP défini par les chiens sains et GRMD adultes, a été fait afin de pouvoir situer les individus au cours du temps dans un même espace. A partir de la position des individus dans l'espace à sept dimensions, la distance euclidienne séparant chacun des chiens du barycentre des animaux sains du même âge a été calculée. Ce nouvel index, déjà utilisé comme variable globale dans des études d'analyse de marche, et nommé « index de normalité » (Romei et al. 2004, Schutte et al. 2000), a démontré ici sa capacité à distinguer les chiens GRMD des chiens sains et à suivre un chien GRMD au cours du temps.

Le choix d'une variable plutôt que d'une autre peut également être discuté en fonction de la capacité de cette variable, soit à discriminer de manière très nette les chiens GRMD des chiens sains, afin de pouvoir mettre en évidence des chiens traités qui « s'échapperaient » du groupe de chiens GRMD pour rejoindre le groupe de chiens sains, soit à détecter de manière sensible une évolution fine de la locomotion. Ce dernier point a été apprécié indirectement par l'évaluation de l'aptitude de chaque variable à distinguer les animaux malades les uns des autres, dans le contexte d'une hétérogénéité clinique inter-individuelle marquée connue dans ce modèle. Sur l'aspect discriminant des variables, peuvent être citées la vitesse, la longueur des foulées, la puissance totale, la force ou la distance euclidienne, quel que soit l'âge considéré. Sur le second point, si les coefficients de variation obtenus pour l'ensemble des variables permettent de traduire l'hétérogénéité clinique, dans la mesure où ils sont nettement supérieurs à ceux obtenus dans la population témoin, certains index dispersent davantage la population, suggérant une meilleure sensibilité. C'est par exemple le cas, chez les chiens en croissance, de la puissance médio-latérale relative, ou, plus particulièrement, de la puissance totale.

Il est donc intéressant de souligner que la puissance totale est une variable qui présente le double intérêt d'être extrêmement discriminante entre chiens sains et chiens GRMD, et d'être malgré cela très sujette à variations entre chiens GRMD, donc probablement une des plus sensibles. Il est probable que ces qualités soient liées au fait que la puissance totale est une variable modulée par de nombreux paramètres modifiés chez le chien GRMD. En effet, la puissance étant un produit de la vitesse par la force, sa valeur sera modifiée par les constituants de la vitesse que sont la longueur et la fréquence des cycles, et également par la

force générée par l'animal. Pour l'ensemble de ces raisons, la puissance totale constitue une variable de valeur pour l'évaluation de la locomotion du chien GRMD.

La très grande majorité des variables présentent par ailleurs des coefficients de variations supérieurs à ceux calculés pour les scores cliniques moteurs. Les variables d'accélérométrie expliquent donc mieux, pour la plupart d'entre elles, la dispersion de la population GRMD que ne le fait le score clinique.

Afin de déterminer si les variables étudiées sont capables de refléter un état clinique moteur global de l'animal, des coefficients de corrélation entre les valeurs obtenues pour ces différentes variables et le score clinique moteur ont été calculés. Il apparaît, chez les adultes comme chez les chiens en cours d'évolution, que seules trois variables sont réellement corrélées au score clinique : la vitesse, la longueur des foulées et la puissance totale. Ceci peut s'expliquer par le fait que la vitesse de marche et la longueur des foulées sont des éléments que perçoit inconsciemment l'opérateur qui effectue un score clinique, et qu'ils constituent très probablement des critères de jugement de la qualité de la démarche. Cependant, la locomotion en soi ne constitue qu'un seul item sur les onze que compte le score moteur. Il est donc plus probable que vitesse, longueur des foulées et puissance totale soient davantage influencées que les autres variables par les anomalies de posture (palmigradie, plantigradie, écartement des doigts, report de poids sur l'avant) par exemple, qui représentent la moitié des items du score moteur. Pour conclure sur ce point, certaines variables d'accélérométrie évoluent dans le même sens que le score clinique moteur, ce qui suggère que l'accélérométrie détecte des évolutions similaires à celles observées et semi-quantifiées par l'opérateur, mais les corrélations restent peu prononcées, probablement en liaison avec le fait qu'accélérométrie et score clinique moteur n'apprécient pas les mêmes éléments de la fonction motrice.

Cependant, les variables d'accélérométrie permettent, comme le score clinique, de dégager différents profils d'évolution. En effet, si des caractéristiques communes d'évolution de chaque variable chez les individus malades peuvent être dégagées, ces évolutions varient d'un individu à l'autre. L'hétérogénéité clinique existant dans la population GRMD a déjà fait l'objet de description et de classifications en différentes formes cliniques (Ambrosio et al. 2009, Valentine et al. 1988). L'opportunité de réaliser cette classification, cette fois de manière quantitative est donc apportée par la présente étude.

Un premier profil peut être dégagé : celui des chiens qui perdent la locomotion (10 sur 24 ici). Cet évènement est survenu, dans tous les cas étudiés, avant l'âge de 6 mois. Il est intéressant de noter que, de l'âge de 2 à l'âge de 6 mois, ces animaux présentent des évolutions similaires en termes de variables de locomotion. Pour la très grande majorité de ces variables, ces chiens très touchés sur le plan moteur montrent une évolution accélérée et une atteinte plus prononcée au terme de leur évolution que les autres chiens étudiés. Ainsi, leur vitesse, leur fréquence et longueur de foulée, leur puissance totale ou encore leur régularité chutent très rapidement, et à des niveaux inférieurs à ceux atteints par les chiens de 9 mois ou adultes. Il semble également que certaines variables (vitesse ou fréquence des cycles) soient déjà à des niveaux inférieurs chez ces chiens à l'âge de deux mois. Ce point sera ré-abordé au chapitre concernant les marqueurs prédictifs de la maladie.

Un second profil, représenté par des chiens tels que Dmon, Eaudvy, Ebam, Eboum ou Hercule est dessiné par une chute progressive et régulière de la puissance totale, de la vitesse, de la longueur et la fréquence des cycles.

Un troisième groupe d'animaux, comprenant Dluge, Dk, Dlice et Didon, correspond à des animaux qui, malgré une chute progressive de la longueur des foulées, restent capables de maintenir un certain temps (variable d'un individu à un autre) une fréquence de cycle très élevée, avant que celle-ci ne chute brutalement. Ces caractéristiques sont liées au maintien de l'aptitude à effectuer un galop en bonds régulier, jusqu'à un stade parfois tardif. La perte de la capacité à accomplir cette allure entraîne une cassure dans l'évolution de certaines variables, et en particulier de la fréquence des cycles.

Le dernier groupe de chiens, représenté par deux individus, Dbrouille et Dalton, montre un profil un peu plus particulier. En effet, après un début d'évolution semblable à celui du second groupe, c'est-à-dire une chute progressive des différentes variables, ces deux chiens montrent une amélioration également progressive de leur locomotion. Ces deux cas soulignent la nécessité de considérer avec précaution une amélioration discrète de la locomotion chez des chiens GRMD en cours d'essai thérapeutique.

De la même façon, il est important d'avoir en mémoire, lors de l'analyse de données de chiens en cours d'évaluation dans un essai pré-clinique, que quelques rares chiens GRMD présentent très peu d'anomalies phénotypiques. Le chien T-Fal, étudié parmi la population de chiens adultes, en est un représentant. Comme dans de tels cas déjà décrits (Ambrosio et al. 2008), ce chien, à l'âge de 5 ans, était capable de sauter et de se maintenir sur ses deux postérieurs. Un observateur non averti aurait pu ignorer sa maladie. Les valeurs obtenues pour ses variables

d'accélérométrie ainsi que sa position bien particulière sur le plan d'ACP témoignent de son atteinte modérée. Néanmoins, il convient de souligner que sa position, inhabituelle pour un chien GRMD, ne se confond toutefois pas avec celle d'un chien sain.

Outre ces quatre profils-types, il faut noter également les variations importantes qui peuvent exister chez certains animaux en croissance, d'un test à l'autre, donnant un aspect « en dents de scie » aux graphes représentant l'évolution des différentes variables. Si la répétabilité de la méthode chez des animaux adultes cliniquement stabilisés a été démontrée, ceci n'est, de manière évidente, pas le cas chez les animaux en croissance. Cet élément est probablement à mettre en relation avec les fluctuations de l'état général de ces jeunes animaux d'un jour à l'autre. Cela souligne également la nécessité d'examen répétés et rapprochés dans le temps sur un animal jeune en suivi, ce qui est rendu possible par la simplicité de mise en œuvre, et le caractère non invasif de la méthode de mesure choisie ici.

Si cette étude a démontré l'intérêt de l'accélérométrie comme outil d'analyse de la locomotion du chien GRMD, et a permis de décrire de manière quantifiée les anomalies locomotrices présentes dans ce modèle, elle présente cependant des limites qu'il est nécessaire de mentionner.

En premier lieu, la méthode n'a pas été réellement validée, au sens le plus strict du terme, dans l'espèce canine. Comme mentionné en introduction, cette étude est la première employant l'accélérométrie comme outil d'analyse de marche chez le chien. La fiabilité et la précision des mesures auraient donc dû être évaluées préalablement sur chiens sains, par comparaison avec un outil de référence tel que la cinétique ou la cinématique. Etant donné que ces données existent chez un quadrupède, le cheval, et démontrent la validité de l'accélérométrie et des calculs de variable (Leleu et al. 2002), cette étape de validation, longue, fastidieuse, et nécessitant le cadre d'un laboratoire d'analyse de marche, n'a pas été réalisée. Il n'en reste pas moins que cela constitue une limite de cette étude.

Une seconde limite de l'étude réside dans le manque d'homogénéité du groupe de chiens sains adultes. En effet, 4 des 11 chiens sains inclus étaient des animaux non hébergés en chenil, et dont les propriétaires s'étaient portés volontaires pour les faire participer à ces tests. Or les chiens GRMD étaient *a contrario* tous hébergés en chenil. Ce biais existant dans la population témoin a, de surcroît, des conséquences évidentes sur les résultats obtenus. En effet, ces quatre chiens présentent de manière récurrente les valeurs les plus faibles de la population témoin, et donc les plus proches de celles des chiens GRMD. Ainsi, leur vitesse

ainsi que leur fréquence de cycle et longueur de foulée sont inférieures à celles des chiens sains hébergés dans les mêmes conditions que les chiens GRMD. Ceci peut être mis en relation avec un probable manque de spontanéité dans le choix de la vitesse par ces animaux : leur éducation et leur interaction avec l'homme, différente de celle des chiens de chenil, les poussent probablement à se calquer sur le rythme de l'opérateur, davantage que ne le font des chiens moins imprégnés. Cette hypothèse est renforcée par le fait qu'au sein même de ce groupe de quatre chiens, il est possible de distinguer deux comportements locomoteurs différents, suivant le degré d'éducation des animaux considérés. Spirou et Cayak, deux chiens modérément éduqués (respectivement chien de compagnie et chien-guide en cours d'éducation) se détachent discrètement de la population des chiens de chenil, tandis que Caïd et Chips, deux chiens-guides en fin de cursus éducatif, sont responsables des valeurs les plus extrêmes observées dans le groupe témoin. Si ce biais expérimental représente une limite conséquente de l'étude sur chiens adultes, les conséquences observées ne sont pas sans intérêt : elles témoignent d'une sensibilité notable de cette méthode d'analyse de marche.

Une dernière limite de l'étude est le faible nombre de chiens sains ayant participé au suivi longitudinal. Initialement, comme pour les chiens adultes, quelques apprentis chiens-guides devaient venir compléter ce groupe. Etant données les constatations faites suite à l'utilisation des données récoltées sur ces animaux à l'âge adultes, le choix a été fait de réduire la population saine du suivi longitudinal aux seuls chiens « vrais » témoins, afin de respecter l'homogénéité de ce groupe.

L'accélérométrie, comme outil d'analyse de locomotion, présente également, au vu de cette étude, quelques limites. La première est son manque de reproductibilité inter-opérateur. Cette partie de l'étude menée ici a en effet démontré que les animaux modifiaient leurs caractéristiques de marche en fonction de l'opérateur. Dans la mesure où chacun des opérateurs présentait un niveau différent d'expérience de la méthode d'évaluation, il est difficile de déterminer si le manque de reproductibilité est lié à cette différence de niveau, comme le suggèrent les résultats, ou uniquement au changement d'opérateur. Il peut également être envisagé que les chiens interagissent différemment avec des personnes qu'ils connaissent plus ou moins, ou avec lesquelles ils ont l'habitude ou non d'effectuer les tests. Il en est de même pour l'opérateur : il sera sans doute plus à l'aise avec une méthodologie qu'il connaît bien d'une part, et un chien avec lequel il a l'habitude de travailler d'autre part. Toutes ces hypothèses participant probablement chacune un peu au manque de reproductibilité démontré, l'importance de la connaissance de l'outil par l'opérateur, et du

binôme chien-opérateur est à souligner. Il est donc préférable qu'un même animal soit suivi par le même opérateur au cours d'un essai thérapeutique, afin de ne pas biaiser les résultats relatifs à l'évolution du chien par un effet opérateur démontré comme significatif.

Une autre critique qui pourrait être faite à l'encontre de la méthode utilisée concerne la conception même du test : le choix de la vitesse par l'animal, qui aboutit nécessairement à la comparaison d'animaux évoluant à des vitesses et des allures différentes. Il est incontestable que, la vitesse influant sur l'ensemble des variables étudiées (sauf sur l'index de force relative), ses fluctuations vont être responsables de beaucoup des variations observées sur les autres variables. Eviter ces variations uniquement liées aux différences de vitesse de marche passerait nécessairement par la standardisation de celle-ci, et donc par l'utilisation d'un tapis roulant. Comme cela a été argumenté en introduction, l'usage du tapis roulant et la standardisation de la vitesse dans le contexte du chien GRMD présentent deux problématiques majeures : d'une part, la phase d'apprentissage, qu'il est souhaitable d'éviter ici, et d'autre part, la complexité que représenterait le choix d'une vitesse standardisée. En effet, considérant d'une part l'hétérogénéité de la population GRMD, et d'autre part l'éloignement des vitesses de confort des chiens GRMD de celles des chiens sains, l'utilisation d'une vitesse standardisée non seulement entre GRMD, mais aussi entre chiens GRMD et sains n'aurait aucun sens. Pour mémoire, le chien GRMD adulte évoluant le plus lentement avait une vitesse de 0.26 m/s, tandis que celle du chien sain évoluant le plus rapidement s'élevait à 2.81 m/s. De surcroît, la vitesse de confort, choisie par l'individu, est un critère reconnu comme présentant une signification clinique et un intérêt dans le suivi des patients (Guralnik et al. 2000).

Dans ce contexte alors, pourquoi ne pas simplement chronométrer les chiens et utiliser cette variable seule ? Simplement parce qu'elle ne permet pas d'expliquer toutes les anomalies de locomotion rencontrées chez le chien GRMD. Ainsi par exemple, détecter qu'un chien GRMD augmente sa vitesse en augmentant sa longueur de foulée plutôt que sa fréquence a une signification clinique de taille : l'augmentation de longueur de foulée n'est en effet pas une stratégie employée par le chien GRMD pour augmenter sa vitesse ; si cela se produisait sur un chien en cours de traitement par exemple, il serait capital de disposer de cette information, alors que ces éléments resteraient inconnus avec une simple mesure de la vitesse. Par ailleurs, et dans le même sens, la puissance totale, certes modulée par la vitesse, n'est pas effondrée chez le chien GRMD uniquement parce que ces chiens marchent moins vite. Les valeurs de force relative le prouvent. Le choix de ne pas standardiser la vitesse, partagé

d'ailleurs par l'équipe qui a publié ses résultats de cinématique sur le chien GRMD (Marsh et al. 2010), a été fait par volonté d'obtenir des résultats les plus proches possibles d'une réalité clinique. Contraindre un chien sain à évoluer à 0.5 m/s par exemple, ou pousser un chien GRMD très touché à marcher à cette vitesse, et risquer ainsi de le faire chuter, est apparu absurde. Les résultats obtenus démontrent que les variations de vitesse ne sont ni à considérer de manière unique, ni responsables de toutes les autres modifications observées. La recherche d'une signification clinique des résultats est également celle qui a motivé le choix de conserver à chaque test l'allure la plus régulière, considérée alors comme l'allure la plus naturelle pour l'animal, à laquelle il évolue avec le plus d'aisance.

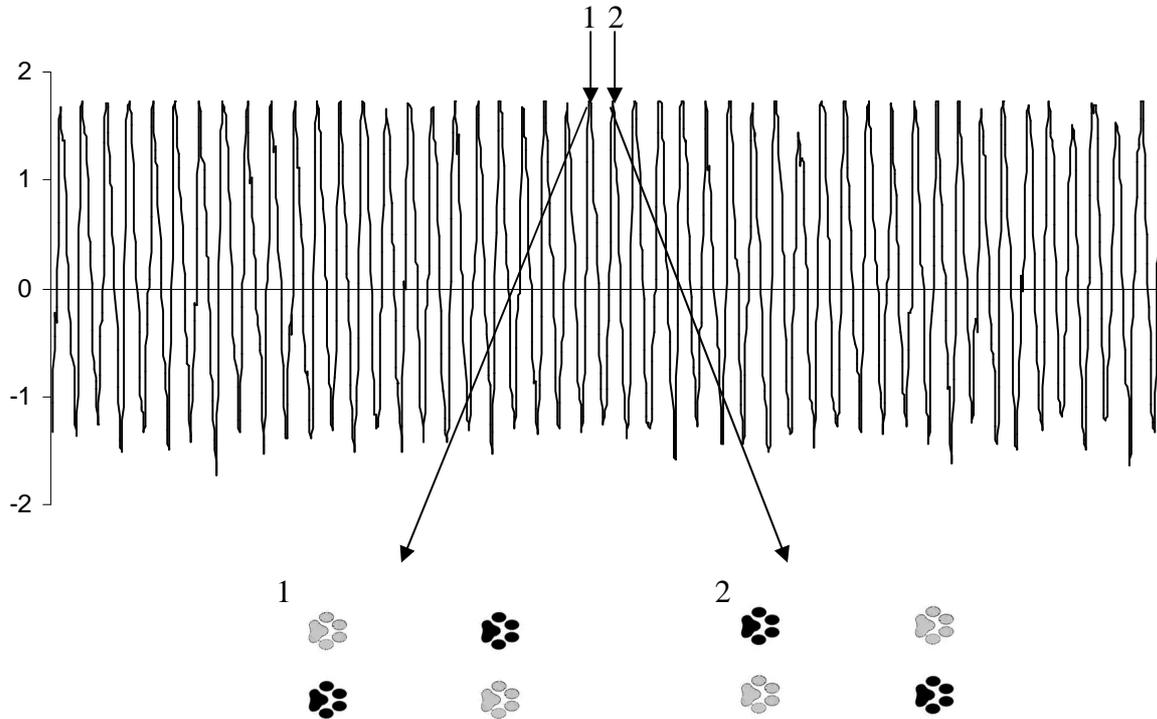
Un dernier point critique concernant l'outil est qu'il ne peut plus être utilisé dès lors que l'animal a perdu la locomotion. Ceci semble être une évidence, puisque sans locomotion, il est effectivement difficile d'envisager de l'évaluer, et ce, quel que soit l'outil envisagé. Néanmoins, cela constitue une problématique réelle pour un suivi dans le cadre d'un essai pré-clinique. Les chiens perdant la marche « sortent » en effet des statistiques à partir du moment où ils ne peuvent plus être évalués, ce qui constitue un biais de taille sur les résultats qui seront produits. Ce problème est, une nouvelle fois, un point commun avec ce qui pourrait se produire chez des patients en essai clinique.

Le chien GRMD peut aussi se révéler un modèle utile pour répondre à ce genre de problématique. L'hétérogénéité phénotypique, un point commun avec les patients atteints de DMD, en est une autre, de taille. Grâce à cette étude, elle a pu néanmoins être documentée de manière quantitative, ce qui constitue un premier pas vers la maîtrise de cette variabilité clinique.

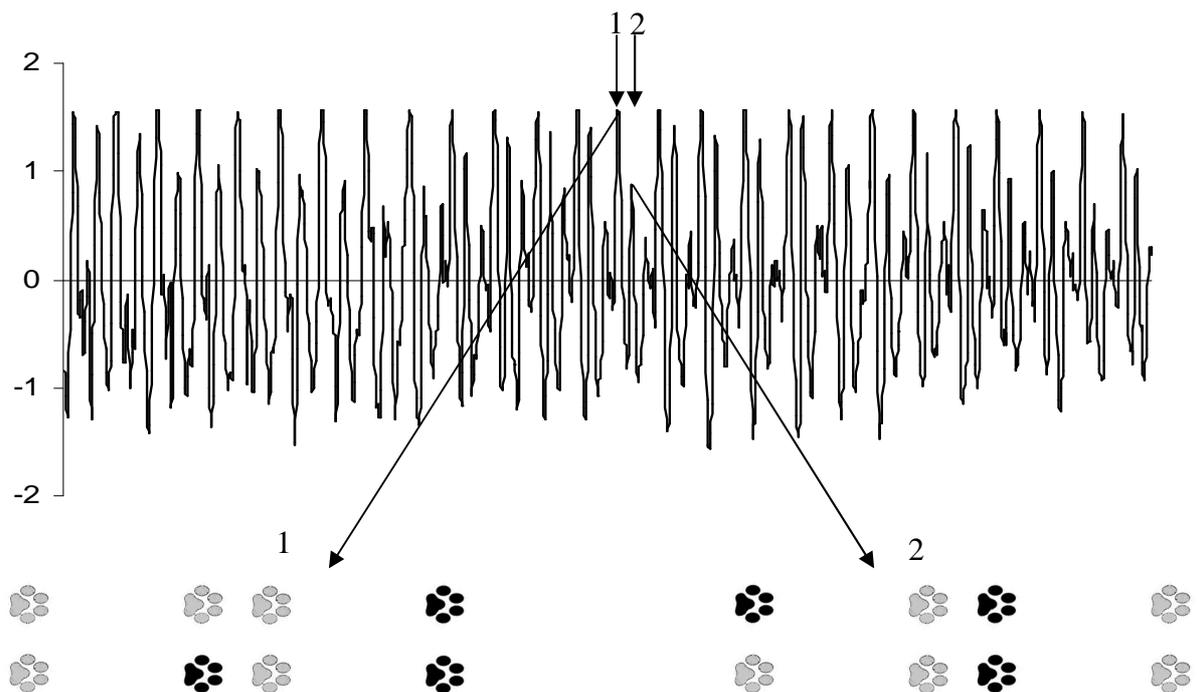
Annexe 1 : Atlas de tracés dorso-ventraux-types chez les chiens sains et GRMD.

A. Allures rencontrées chez les chiens sains

Trot :

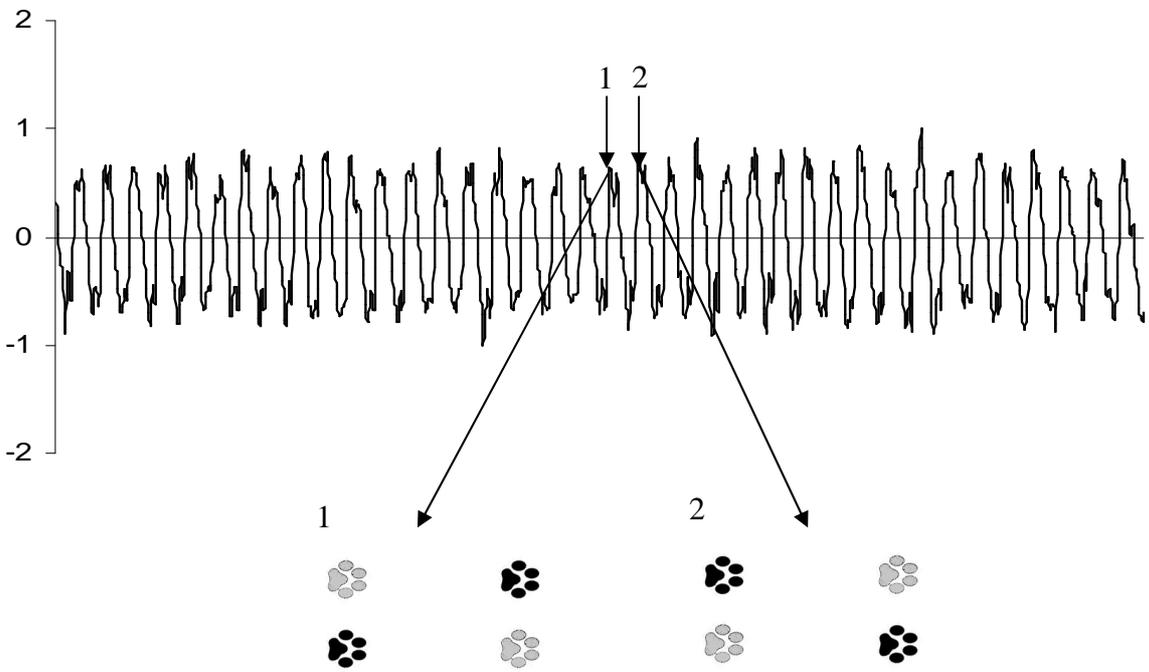


Galop circulaire

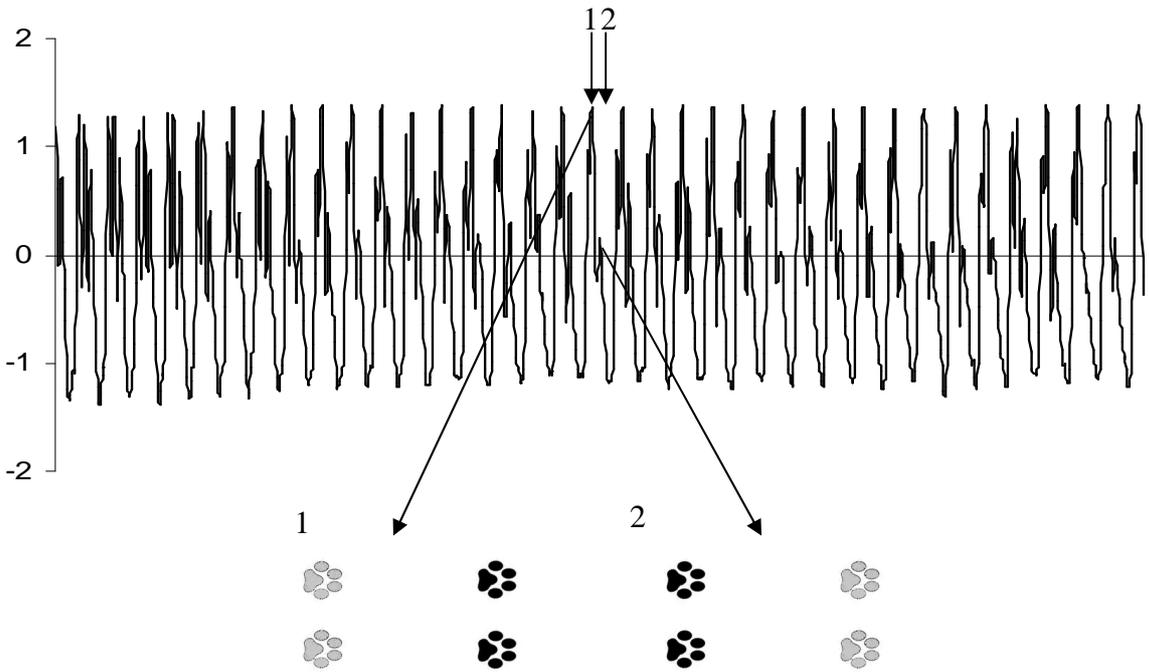


B. Allures rencontrées chez les chiens GRMD

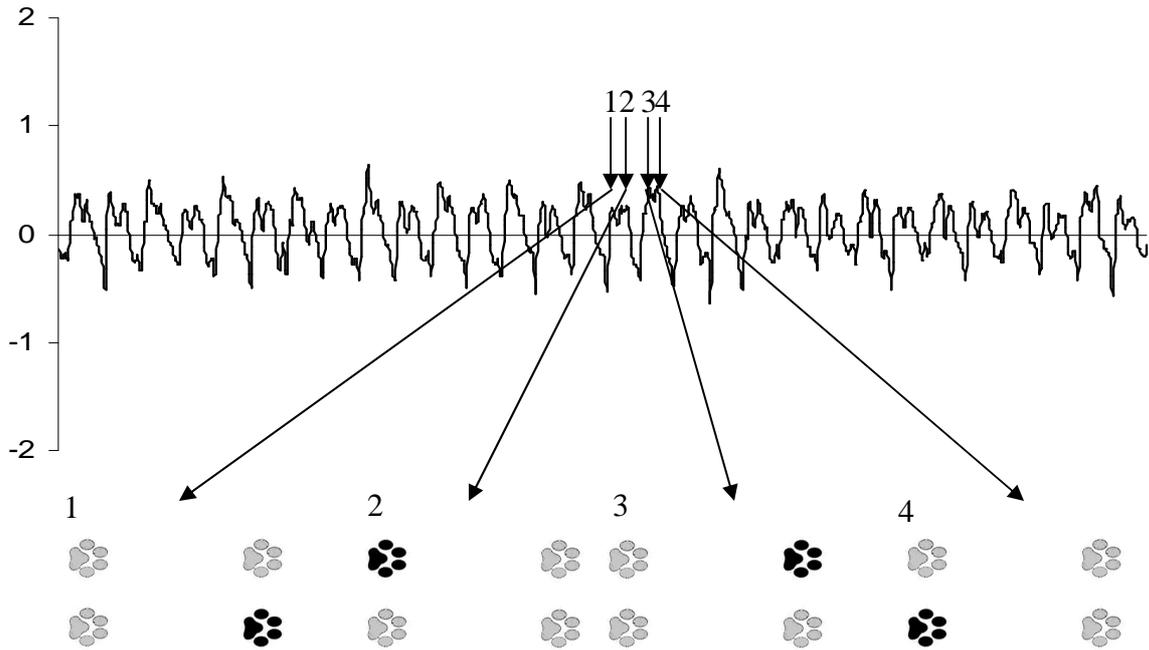
Trot :



Galop en bonds :



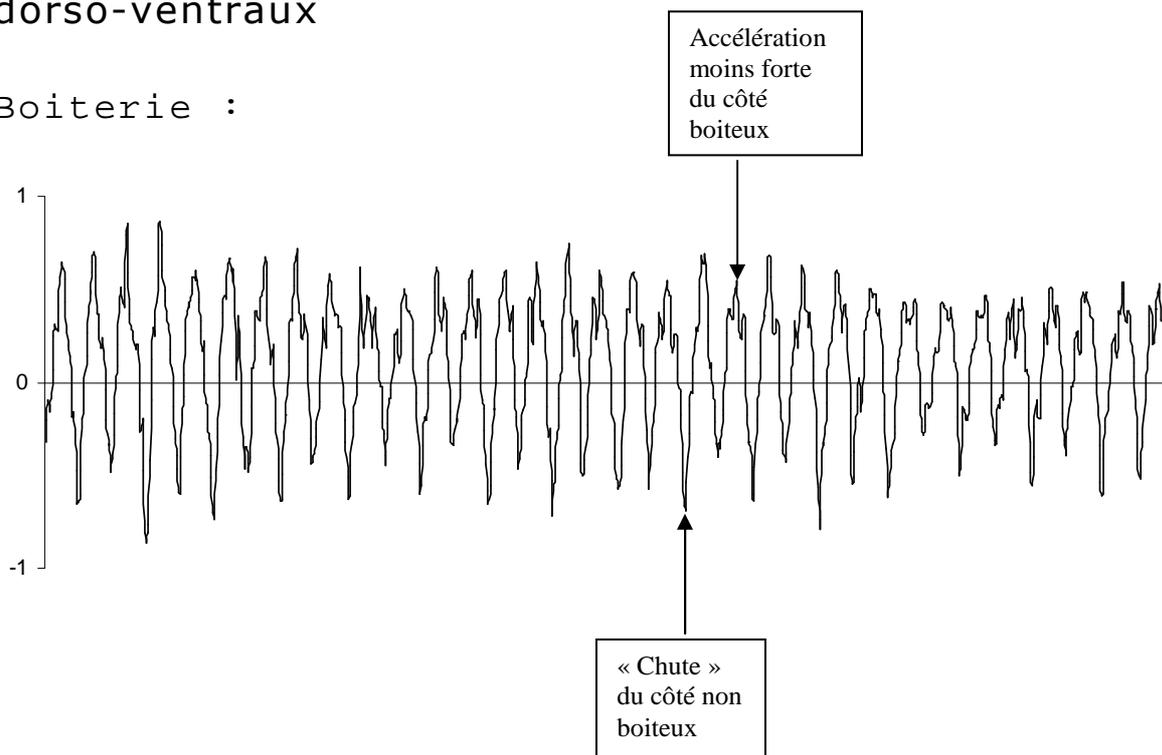
Pas :



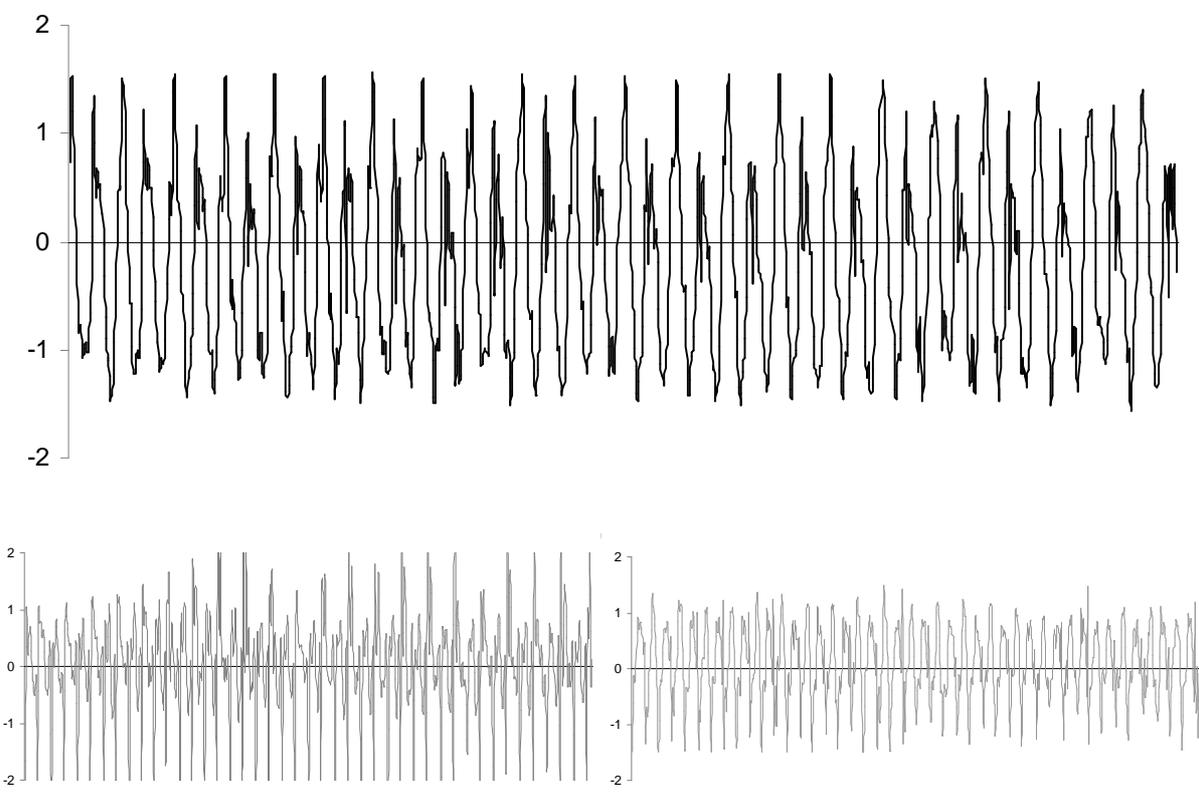
Les symboles de pattes de chien noirs représentent le ou les membre(s) propulseur(s) responsable (s) du pic d'accélération dorso-ventrale observé.

C. Exemples de modifications possibles des tracés dorso-ventraux

Boiterie :



Rotation du dispositif de mesure :



Noter le faible niveau des accélérations dorso-ventrales (ici trot chez un chien sain, en haut, tracé noir), et l'ampleur des accélérations médio-latérales (tracé gris clair en bas à droite). Noter également la plus faible amplitude d'accélération d'un pic dorso-ventral sur deux, liée au déplacement latéral de l'accéléromètre le long de la cage thoracique, qui capte alors davantage les accélérations produites de ce côté que de l'autre, alors qu'en regard du sternum, les accélérations produites sont homogènes, en l'absence de boiterie.

III. Evaluation de la fonction respiratoire

A. Introduction

Après la locomotion, la fonction recrutant le plus de muscles est très probablement la fonction respiratoire. Chez les patients atteints de dystrophie musculaire de Duchenne, elle constitue un véritable enjeu thérapeutique. En effet, l'insuffisance respiratoire, qui s'installe aux stades tardifs, est responsable du décès de la majorité des patients (Manzur et al. 2008). D'installation progressive et d'évolution inexorable (Yiu and Kornberg 2008), cette dysfonction, lorsqu'elle atteint un certain degré, constitue également un critère de mauvais pronostic de survie (Manzur et al. 2008, Phillips et al. 2001, Yiu and Kornberg 2008). Enfin, une meilleure connaissance et gestion de la fonction respiratoire, alliée à la mise en place de systèmes d'assistance de cette fonction, notamment nocturnes, ont permis l'allongement de l'espérance de vie des patients atteints de DMD, observé au cours de ces dernières années (Kohler et al. 2005). Tous ces éléments témoignent de l'importance de cette fonction et de l'enjeu thérapeutique qu'elle représente, tant par son importance clinique, que par le défi qu'elle constitue sur le plan de la distribution d'un agent thérapeutique, à l'ensemble des muscles impliqués.

Chez le chien GRMD, la fonction respiratoire est également touchée, comme le démontrent la respiration abdominale, les mouvements discordants entre les muscles abdominaux et la cage thoracique, ou encore l'augmentation excessive de la fréquence respiratoire après un exercice modéré (Valentine et al. 1988) qui peuvent être observés dans ce modèle. Le diaphragme, muscle respiratoire majeur, est l'un des muscles les plus précocement et fortement touchés (Nguyen et al. 2002, Valentine et al. 1990). Sur des radiographies de thorax, il peut apparaître anormalement caudal, asymétrique, et festonné (Brumitt et al. 2006). Les complications respiratoires que constituent les bronchopneumonies par fausse déglutition constituent par ailleurs une cause de décès majeure des chiens GRMD. Pour autant, aucune équipe travaillant sur le chien GRMD ne s'est penchée sur l'évaluation de cette fonction, alors que les stratégies thérapeutiques systémiques, dont les essais se multiplient dans ce modèle (Kerkis et al. 2008,

Kornegay et al. 2010, Sampaolesi et al. 2006, Yokota et al. 2009), ont pour cible, outre la fonction locomotrice, la fonction respiratoire, qui représente la cause du décès des patients.

Chez les patients atteints de DMD, comme chez ceux souffrant d'autres affections, neuromusculaires ou pulmonaires, l'outil le plus utilisé est la spirométrie (Pierce 2005). Il s'agit de mesurer au cours du temps les débits et volumes respiratoires. Le test d'expiration forcée est le plus répandu : il peut permettre, grâce à l'obtention de données de débit et de volume sur la courbe obtenue lors de cette expiration forcée, d'évaluer la présence d'un trouble ventilatoire ou la présence d'une grande faiblesse des muscles respiratoires. Chez les patients atteints de DMD, ce test constitue le principal outil de suivi de la fonction respiratoire, associé bien entendu à d'autres mesures telles que la gazométrie sanguine, ou encore la polysomnographie. Aux stades précoces, la polysomnographie permet de détecter les apnées du sommeil qui interviennent initialement durant le sommeil paradoxal uniquement, et deviennent responsables d'hypercapnies (Yiu and Kornberg 2008). Néanmoins, la spirométrie permet des mesures fiables de paramètres permettant de décider la mise en place d'une ventilation assistée, ou encore permettant d'établir un pronostic de survie. Chez les patients atteints de maladies neuromusculaires, les courbes débit-volume obtenues au cours d'une expiration forcée mettent en évidence un syndrome restrictif : la capacité vitale forcée diminue, tandis que le volume résiduel (air persistant dans les poumons) augmente, en liaison avec une faiblesse expiratoire. Le débit expiratoire de pointe est également diminué (Sharma 2009). Chez les patients atteints de DMD, la capacité vitale forcée (volume total expiré durant l'expiration forcée) est la variable la plus utilisée. Suivant une évolution normale jusqu'à l'âge de 10 ans environ (Yiu and Kornberg 2008), elle décroît ensuite entre 8 et 12 % par an (Phillips et al. 2001, Yiu and Kornberg 2008). Elle est employée pour décider de la mise en place d'une assistance ventilatoire (Bushby et al. 2010b), et constitue également un critère pronostique de survie fiable (Manzur et al. 2008, Phillips et al. 2001, Yiu and Kornberg 2008), ce qui renforce la valeur clinique de ce paramètre.

Si la spirométrie reste l'outil de référence chez le patient, d'autres critères et outils sont également utilisés, tels que les gaz du sang, la capnographie, la mesure des pressions maximales expiratoire et inspiratoire (maintien d'un effort expiratoire ou inspiratoire maximale après obstruction des voies respiratoires), la mesure de la pression inspiratoire nasale obtenue au cours d'un sniff-test, débit expiratoire de pointe à la toux (Perez 2006), mesures en position couchée (Sharma 2009). Une méthode plus invasive d'exploration de la fonction diaphragmatique est la mesure des pressions transdiaphragmatiques, mesurées à

l'aide de cathéters positionnés dans l'œsophage et l'estomac, après stimulation percutanée du nerf phrénique (Perez 2006). L'exploration de la mobilité du diaphragme est également un examen parfois réalisé chez les patients, dans l'objectif de mettre en évidence une parésie de ce muscle. Ceci peut être réalisé par radioscopie, superposition de clichés radiographiques en expiration et en inspiration (Fromageot et al. 2001, Roberts 2009) ou par échographie, ce qui présente l'avantage de ne pas avoir recours aux rayons X (Toledo et al. 2003).

Chez le chien, et même le chat, évaluer la fonction respiratoire a été envisagé dans quelques publications, et quelques outils ont été développés, dans l'objectif de quantifier les affections respiratoires les plus courantes dans ces espèces : bronchite chronique ou paralysie laryngée chez le chien, asthme du chat. La problématique posée par l'évaluation respiratoire chez l'animal provient du fait que les tests utilisés chez l'Homme font tous (à l'exception de tests invasifs tels que la mesure de pressions transdiaphragmatiques) appel à la coopération et à la volonté du patient, qui doit suivre des instructions précises. Ceci n'est évidemment pas envisageable dans les espèces animales quelles qu'elles soient. Ainsi, d'autres alternatives ont été développées par quelques auteurs pour contourner ce problème (Hoffman 2007, Rozanski and Hoffman 1999). L'outil le plus utilisé est l'analyse de courbes débit-volume en respiration de Tidal (ou respiration spontanée) (Amis et al. 1986, Amis and Kurpershoek 1986). Pour ce test, un spiromètre relié à un masque est utilisé. Le museau du chien, conscient au cours du test est placé dans ce masque et les débits et volumes au cours de cycles respiratoires normaux sont enregistrés. Ces études ont pu mettre en évidence que l'aspect des courbes débit-volume est modifié de manière spécifique par les différentes entités pathologiques pulmonaires (Amis and Kurpershoek 1986) ou extra-pulmonaires (Amis et al. 1986). Des index, calculés à partir de ces courbes, ont permis de quantifier les anomalies observées. Ce test présente l'avantage d'être non invasif, simple et bien toléré, même par des chiens dyspnéiques. Ce même test, utilisé chez le cheval, a cependant montré une variabilité importante, ce qui est moins le cas lorsqu'il est réalisé durant un exercice, sur tapis roulant (Evans 2007). Une autre limite de ce test est une sensibilité probablement faible en liaison avec un volume résiduel potentiellement élevé (ce qui n'est pas le cas lors d'une expiration forcée), pouvant contribuer à une mauvaise détection des obstructions faibles (Rozanski and Hoffman 1999).

L'usage de cabines de pléthysmographie a également été testé chez les chiens (Hoffman 2007), afin de déterminer la résistance des voies aériennes, dans le cadre du diagnostic d'une obstruction. Ce test, réalisé en plaçant le corps du chien dans une cabine de pléthysmographie,

et sa tête à l'extérieur, museau dans un masque relié à un spiromètre, permet l'obtention de courbes débit-volume, le volume correspondant alors aux variations de volume de l'air contenu dans la cabine et non plus au volume mesuré par le spiromètre. Ce test est également non invasif, bien toléré, mais représente un investissement supérieur en terme de coût d'équipement. La pléthysmographie corps entier a également été validée comme outil d'évaluation chez la souris *mdx* (Ishizaki et al. 2008). Les souris sont placées dans une cabine de pléthysmographie dans laquelle elles sont libres de leurs mouvements. Les échanges d'air avec l'enceinte sont quantifiés et permettent l'obtention de paramètres tels que le volume courant, la fréquence respiratoire, et donc la ventilation minute, les débits de pointe (inspiratoire et expiratoire), mais aussi le temps de relaxation. Par cette méthode, une diminution du volume courant a été démontrée chez les souris *mdx* les plus âgées (7 mois), accompagnée d'une tachypnée probablement compensatrice, permettant le maintien d'une ventilation minute normale.

Dans un contexte où de nombreux outils ont été développés chez le patient, parfois adaptés chez l'animal, mais jamais chez le chien GRMD, le choix de l'outil a alors dû être effectué. Parmi les impératifs concernant le test envisagé, figurait tout d'abord sa faisabilité chez le chien. Ceci impliquait donc un test ne faisant pas appel à la coopération ou à la volonté de l'animal. Dans la mesure où ce test devait également être le moins invasif possible, le recours à une anesthésie générale pour passer outre le problème de coopération de l'animal par exemple a été rejeté.

L'outil choisi devait par ailleurs être capable de refléter une réalité clinique : mettre en évidence un déficit de la fonction respiratoire chez le chien GRMD, traduisant la faiblesse des muscles impliqués dans cette fonction, indépendamment donc d'une situation d'atteinte pulmonaire infectieuse, qui ne représente qu'une complication de la maladie. Ce déficit mis en évidence devait par ailleurs pouvoir être quantifié de manière fiable par cet outil.

Enfin, étant donnée la position particulière pré-clinique du chien GRMD dans la recherche de stratégies thérapeutiques pour DMD, développer un outil commun au patient, qui aurait peut-être permis d'identifier des points communs entre la maladie humaine et la maladie canine sur le plan respiratoire, aurait offert une valeur ajoutée aux résultats obtenus au cours d'essais pré-cliniques.

Dans ce cadre, deux pistes différentes ont été suivies. D'une part, l'utilisation d'un spiromètre pour l'enregistrement et l'étude de courbes débit-volume en respiration spontanée de Tidal au repos. Cet outil offre l'avantage d'avoir déjà été expérimenté avec succès chez le chien (Amis

and Kurpershoek 1986), permettant d'identifier de manière spécifique des anomalies respiratoires (Amis et al. 1986, Amis and Kurpershoek 1986). Même si l'origine des anomalies attendues ne présente pas de point commun avec celle des anomalies décrites dans ces études, l'hypothèse selon laquelle d'autres anomalies, spécifiques cette fois de la faiblesse respiratoire de ces animaux, seraient identifiées à partir des courbes débit-volume a été formulée. De même, le test étant effectué en respiration spontanée et non en expiration forcée, les anomalies éventuellement détectées ne devraient pas être directement comparables à celles décrites chez le patient. Néanmoins, la spirométrie restant l'outil de référence chez le patient, elle offre l'avantage d'être connue, comprise et lisible dans ses résultats par le plus grand nombre, même utilisée dans le cadre d'un test différent des tests cliniques usuels.

La deuxième piste suivie est l'examen des mouvements diaphragmatiques au cours du cycle respiratoire par radioscopie. Ce test, nommé ici cinématique diaphragmatique, est également un test commun au patient, même si, chez l'Homme, il est employé en expiration et inspiration maximales. Il a été ici évalué comme outil d'analyse de la fonction diaphragmatique en respiration de Tidal, au repos, l'hypothèse étant qu'une parésie du diaphragme serait mise en évidence chez le chien GRMD. La pertinence d'un index, calculé sur ces mêmes images, et ayant pour objectif de quantifier la rétraction caudale du diaphragme, visuellement évidente sur des clichés thoraciques (Brumitt et al. 2006) mais jamais quantifiée, a également été investiguée. Si la mise en œuvre de ces tests requiert un matériel coûteux, ce type d'appareil est théoriquement présent dans toute structure réalisant des administrations vasculaires de traitements à des grands animaux, tels que le chien.

Cette étude de validation d'outils a, dans un premier temps, été conduite chez des animaux adultes cliniquement stabilisés. L'objectif était d'évaluer la répétabilité des deux méthodes choisies, et de déterminer quelles variables pouvaient présenter une pertinence dans la caractérisation du déficit respiratoire des chiens GRMD, par comparaison avec des animaux sains. Une phase d'étude de corrélation des différentes variables obtenues à partir des courbes débit-volume a également été menée, afin de déterminer quels paramètres devaient être normalisés par la hauteur au garrot pour pouvoir être correctement interprétés.

Dans un second temps, un suivi longitudinal des variables identifiées comme présentant un intérêt chez les adultes a été effectué chez des chiots en cours d'évolution, afin de déterminer la chronologie de mise en place des déficits respiratoires, et de disposer d'une histoire naturelle de ces déficits chez des chiens GRMD en croissance, à des âges auxquels les chiens inclus dans des essais précliniques nécessiteront le plus probablement d'être évalués, les

traitements testés étant pour la plupart administrés à de jeunes animaux (Kerkis et al. 2008, Kornegay et al. 2010, Sampaolesi et al. 2006, Yokota et al. 2009).

B. Evaluation de la fonction respiratoire chez des animaux adultes

1) Matériels et méthodes

a) Cinématique diaphragmatique

Déroulement du test

Un jeûne d'une durée minimale de deux heures a été effectué préalablement au test, afin de limiter les effets potentiels liés à la réplétion gastrique, sur l'amplitude des mouvements du diaphragme.

Le chien était porté par l'opérateur, depuis sa cage, jusqu'à la table de radiographie, de manière à ce que le test soit réalisé sur chien au repos. L'animal était positionné en décubitus latéral droit, de telle sorte que la coupole diaphragmatique droite soit en position légèrement plus crâniale que la gauche sur les images, facilitant ainsi la localisation du foramen de la veine cave caudale.

Une fois l'animal rassuré dans cette position, il était placé sous la caméra d'un amplificateur de brillance OEC 9800 Plus (General Electric ®) d'un diamètre de 31 cm. Le positionnement, de profil, et permettant de visualiser sur la même image les vertèbres thoraciques 9 à 13, et le foramen ventral de la veine cave caudale, tout au long du cycle respiratoire, était préalablement contrôlé grâce à une acquisition brève et de faible intensité. Deux séquences radioscopiques d'une durée de 9.5 secondes étaient ensuite acquises, à une fréquence de 25 Hz.

L'opérateur a réalisé ce test dans le respect des règles de radioprotection : il revêtait un tablier, un protège-thyroïde et des gants plombés, et veillait à minimiser la quantité de rayonnements X émis. Un contrôle dosimétrique individuel était assuré, et la dose émise par animal associée au fichier contenant les images acquises. Tous les tests ont été réalisés par le même opérateur.

A la fin du test, les images, au format DICOM, étaient transférées sur un PC équipé du logiciel eFilm, permettant la prise en charge de ce format d'images.

Le positionnement de l'animal et de l'opérateur sont représentés dans la figure 1.

Figure 1 : Cinématique diaphragmatique – positionnement de l’animal durant le test.



A : Vue d'ensemble du dispositif. B : Positionnement de l'animal, en décubitus latéral droit sur la table de radioscopie.

Analyse des images et calcul des variables

Dans le logiciel eFilm, les images de fin d'inspiration et de fin d'expiration ont été exportées des films acquis par radioscopie, au format jpeg.

Analyse des mouvements du diaphragme

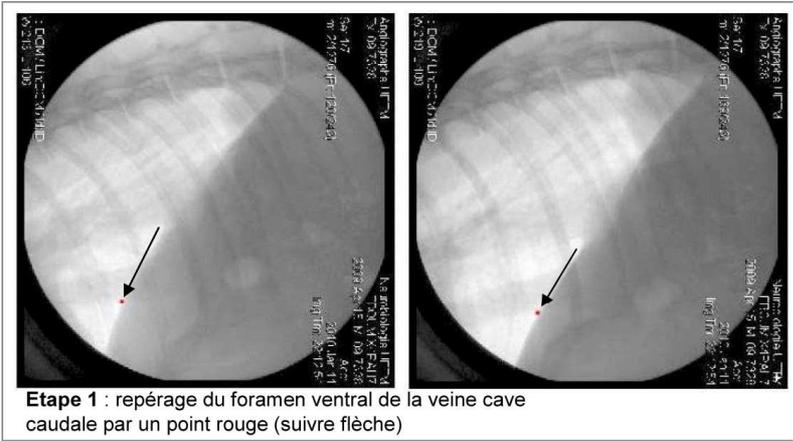
Cette analyse a été effectuée afin de déterminer si la mobilité du diaphragme au cours du cycle respiratoire était altérée chez le chien GRMD.

Deux images successives, l'une en inspiration, l'autre en expiration, ont été ouvertes dans le logiciel Photoshop CS2. Les deux images ont été transférées sur un nouveau plan de travail et

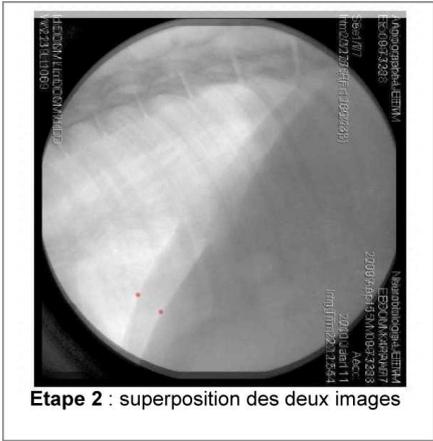
travaillées en tant que calques. Sur chacune d'elles, le foramen ventral de la veine cave caudale a été identifié manuellement à l'aide de l'outil pinceau, par un point de couleur rouge. Après diminution de l'opacité du fond du calque supérieur, le calque inférieur a été superposé à celui-ci, en veillant à la bonne superposition des corps vertébraux entre les deux images. Une fois les deux images correctement superposées, l'outil règle était utilisé pour mesurer la distance entre les deux points de repère. Enfin, le même outil était employé pour mesurer la longueur de la treizième vertèbre thoracique. Cette dernière valeur était calculée dans l'objectif de normaliser la distance parcourue par le diaphragme, afin de s'affranchir d'une part des variations de mesures d'un test à l'autre, ou d'un animal à l'autre qui pourraient être entraînées par les modifications de la distance entre la caméra et l'animal, et d'autre part du gabarit du chien étudié.

Pour chaque session, ces mesures ont été effectuées sur quatre paires d'images (quatre cycles respiratoires). Des copies d'écran, représentant étape par étape l'obtention de ces données, illustrent la méthodologie employée, dans la figure 2.

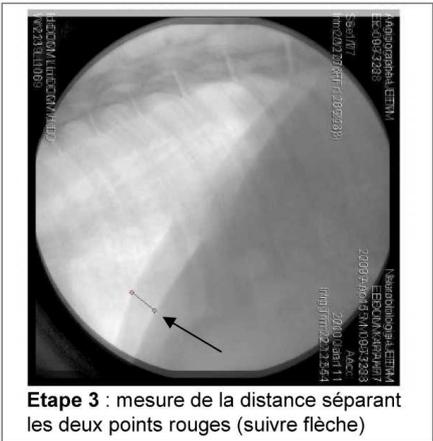
Figure 2 : Mesure de la distance parcourue par le diaphragme : analyse des images radioscopiques, schématisée en quatre étapes



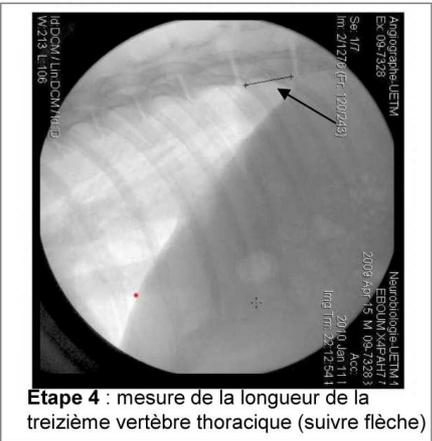
Etape 1 : repérage du foramen ventral de la veine cave caudale par un point rouge (suivre flèche)



Etape 2 : superposition des deux images



Etape 3 : mesure de la distance séparant les deux points rouges (suivre flèche)



Etape 4 : mesure de la longueur de la treizième vertèbre thoracique (suivre flèche)

Mesure de l'index de rétraction du diaphragme

Cet index a été calculé, afin de quantifier l'apparente rétraction caudale du diaphragme chez les chiens GRMD, bien visible sur des clichés radiographiques thoraciques (Figure 3) (Brumitt et al. 2006).

Figure 3 : Rétraction caudale du diaphragme illustrée par comparaison de clichés radiographiques de profil d'un chien sain et d'un chien GRMD adultes.

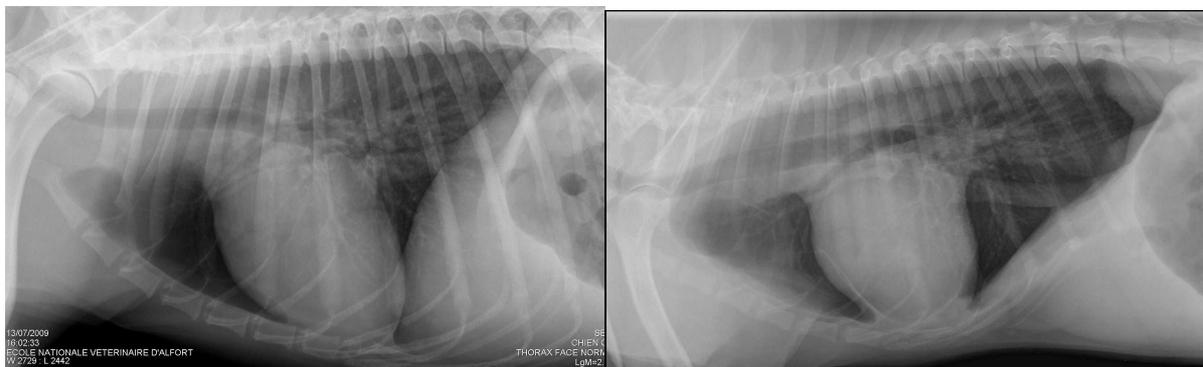
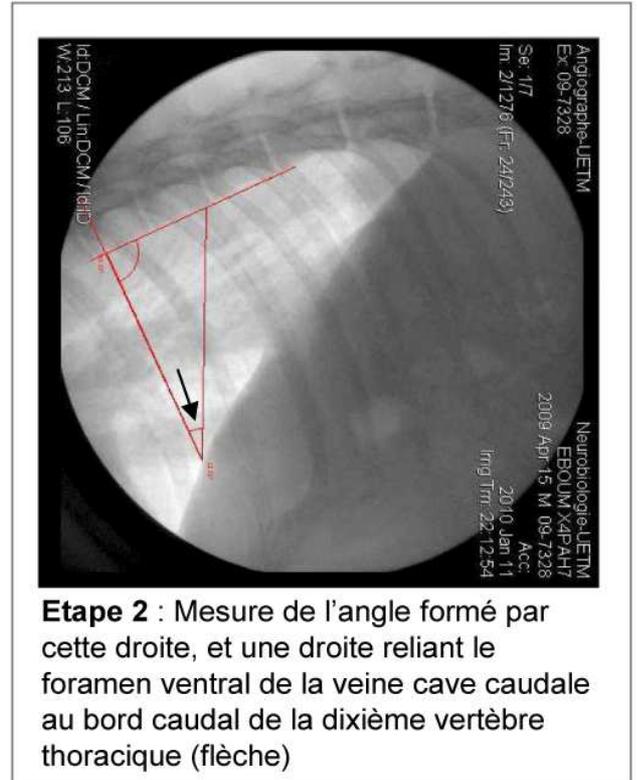
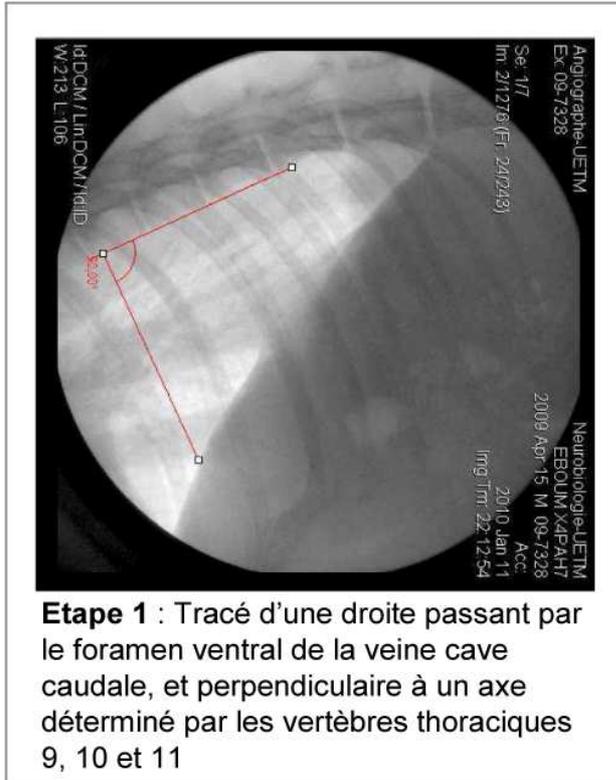


Image de gauche : cliché d'un chien sain ; image de droite : cliché d'un chien GRMD. Noter la position très caudale, et l'aplatissement du diaphragme sur ce dernier.

L'analyse a été réalisée sur image de fin d'expiration, ouverte dans le logiciel d'analyse d'images Visilog 6.4. Une droite reliant la partie ventrale des corps vertébraux thoraciques 9, 10 et 11 a été tracée sur l'image. Une seconde droite, perpendiculaire à la première, et passant par le foramen ventral de la veine cave caudale, a ensuite été positionnée sur cette même image. L'angle entre cette deuxième droite et le bord caudal de la dixième vertèbre thoracique a été mesuré au niveau du foramen ventral de la veine cave caudale, et constitue l'index de rétraction diaphragmatique. Plus l'angle est réduit, plus le diaphragme est caudal.

Les copies d'écran de la figure 4 illustrent cette méthodologie.

Figure 4 : Mesure de l'index de rétraction du diaphragme : analyse des images radioscopiques schématisée en deux étapes



Etude de répétabilité

Animaux

Quatre chiens mâles golden retriever sains (âge moyen : 13.0 mois, écart-type : 2.7 mois) et 5 chiens mâles GRMD (âge moyen : 23.1 mois, écart-type : 18.3 mois) ont été examinés 3 fois à quelques jours d'intervalle (intervalle moyen entre le premier et le troisième test : 3.9 jours, écart-type : 0.3 jour), afin d'évaluer la répétabilité du test. Les animaux inclus sont présentés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Cinématique diaphragmatique - animaux inclus dans l'étude de répétabilité.

Nom	Statut	Age (mois)	Délai 1^{er}-3^{ème} test (jours)
Ckan	Sain	15.4	4
Cbof	Sain	15.3	4
Dclick	Sain	10.7	4
Dclack	Sain	10.7	4
Athos	GRMD	43.1	4
Cki	GRMD	9.7	4
Ajax	GRMD	43.2	4
Dbrouille	GRMD	9.7	4
Ckoi	GRMD	9.7	3

Analyse statistique

Une analyse de variance (ANOVA) à mesures répétées a été effectuée afin de déterminer si un effet intra-jour ou un effet inter-jour pouvaient être détectés. Pour ce test, 4 mesures par session, et 3 sessions ont été étudiées.

Etude de validation de l'intérêt des variables étudiées chez le chien GRMD

Animaux

Cinq chiens mâles golden retriever sains (âge moyen : 15.2 mois, écart-type : 5.3 mois) et neuf chiens mâles GRMD (âge moyen : 25.0 mois, écart-type : 24.3 mois) adultes et indemnes de bronchopneumonie ont été examinés afin d'évaluer la pertinence des variables étudiées. Ces animaux sont listés dans le tableau 2.

Tableau 2 : animaux inclus dans l'étude de validation de la cinématique diaphragmatique chez le chien GRMD

Nom / symbole graphe	Statut	Age (mois)	Hernie hiatale (oui/non)
Ckan ◆	Sain	15.4	Non
Cbof ✖	Sain	15.3	Non
Cliff ●	Sain	23.8	Non
Dclick ▲	Sain	10.7	Non
Dclack ■	Sain	10.7	Non
Athos ◆	GRMD	43.1	Oui
Ajax ✖	GRMD	43.2	Oui
T-Fal ✕	GRMD	77.5	Oui
Cballot ▲	GRMD	9.8	Oui
Cki ●	GRMD	9.7	Oui
Ckoi +	GRMD	9.7	Non
Dbrouille ■	GRMD	9.7	Non
Ebam -	GRMD	11.3	Non
Eaudvy -	GRMD	11.0	Non

A droite du nom de chaque animal, figure le symbole qui lui correspond et qui sera utilisé dans les graphes des figures 5 et 6.

Analyse statistique

Une ANOVA à un facteur (sain versus GRMD) a été effectuée afin d'évaluer la capacité des index choisis à séparer la population GRMD de la population normale. De plus, sur le groupe GRMD, une ANOVA à deux facteurs (âge et hernie hiatale) a été effectuée, afin de déterminer l'effet du vieillissement et de la présence ou non d'une hernie hiatale sur les index étudiés.

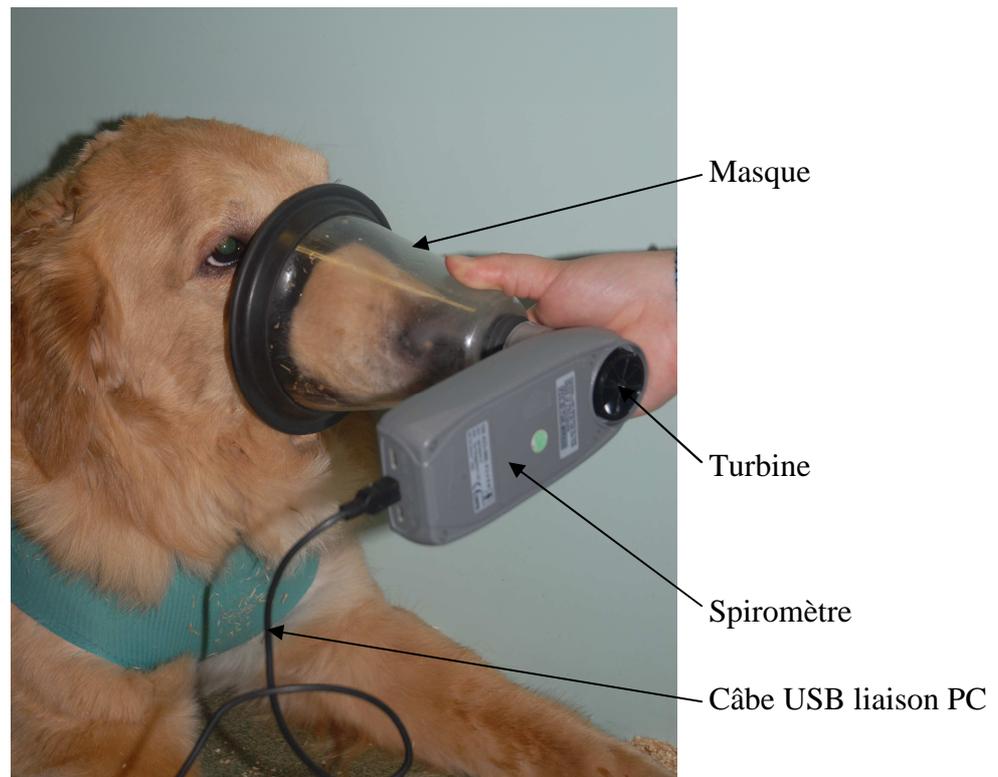
b) Spirométrie

Déroulement du test

Le matériel utilisé était un spiromètre Spirobank II (MIR ®), associé à une turbine réutilisable, qui était nettoyée après chaque session de tests. Le champ de mesure de volume était de 10 L, et la précision de 50 mL ; le champ de mesure de débit était de ± 16 L/s, et la précision de 200 mL/s. L'ensemble était relié à un masque à usage vétérinaire, conique, de 12 cm de longueur, et de 11.5 cm de diamètre à l'extrémité permettant l'insertion du museau du chien. Une membrane en caoutchouc a permis d'étanchéifier le système.

Afin de réaliser un test au repos, le chien à examiner était porté depuis sa cage jusqu'au lieu de l'examen. Un temps était laissé à l'animal pour trouver sa position de confort. Etaient tolérées la station debout, une position assise ou le décubitus sternal. Le museau du chien était inséré dans le masque, jusqu'à combler le plus possible le volume mort de l'enceinte. Les narines du chien étaient placées face à la sortie du masque, et donc au spiromètre. Une attention particulière était portée à l'insertion des babines dans le masque, et à la bonne adhérence de la membrane en caoutchouc au museau de l'animal. La figure 5 illustre le positionnement de l'animal durant le test.

Figure 5 : Spirométrie – photographie d'un chien en cours de test.



Une fois l'animal installé, l'enregistrement des courbes débit-volume pouvait débuter. Le spiromètre a été ici employé relié à un ordinateur, ce qui permettait un examen direct de l'aspect des courbes débit-volume. L'acquisition et l'analyse de ces courbes s'est fait via le logiciel WinSpiro Pro (MIR ®). Plusieurs cycles respiratoires, en respiration spontanée de type Tidal ont été enregistrés. Les séquences de toux, de halètement, de soupirs, ou les courbes débit-volumes pour lesquelles le volume inspiratoire et le volume expiratoire différaient de plus de 10 % ont été systématiquement exclues. Le test ainsi réalisé avait une durée d'environ 5 minutes.

Variables calculées à partir des courbes débit-volume

Les variables calculées de manière automatisée par le logiciel WinSpiro Pro, à partir des courbes débit-volume sont nombreuses, mais correspondent pour beaucoup à des index utilisés en pneumologie humaine, lors de tests dits d'expiration forcée. Dans le cas présent, les animaux ont été examinés en respiration spontanée de repos, dite de Tidal, et seules certaines des variables calculées par le logiciel, et jugées pertinentes hors du cadre de l'expiration forcée ont été étudiées. Ces variables sont les suivantes :

Variables expiratoires :

- Volume courant expiratoire ou VCE : il s'agit du volume, exprimé en litres, expiré en respiration spontanée. Il correspond au paramètre nommé FVC, pour capacité vitale forcée, dans le logiciel.
- Volume expiré après une seconde d'expiration ou VE1, exprimé en litres
- Débit expiratoire de pointe ou DEP : exprimé en L/s, il s'agit du débit maximum enregistré au cours de l'expiration.
- Débit moyen entre 25 % et 75 % du volume expiré ou DE2575 : exprimé en L/s, il s'agit du débit moyen enregistré entre le moment où le chien a expiré 25 % de son volume courant, et le moment où il en a expiré 75 %.
- Débit expiratoire à 25 % du volume expiré ou DE25, exprimé en L/s
- Débit expiratoire à 50 % du volume expiré ou DE50, exprimé en L/s
- Débit expiratoire à 75 % du volume expiré ou DE75, exprimé en L/s
- Temps expiratoire, ou TE, exprimé en secondes.

Variables inspiratoires :

- Volume courant inspiratoire ou VCI : il s'agit du volume, exprimé en litres, inspiré en respiration spontanée. Il ne diffère théoriquement pas de plus de 10 % du VCE.
- Volume inspiré après une seconde d'inspiration ou VI1, exprimé en litres
- Débit inspiratoire de pointe ou DIP : exprimé en L/s, il s'agit du débit maximum enregistré au cours de l'inspiration.
- Temps inspiratoire, ou TI, exprimé en secondes.

Variables descriptives globales :

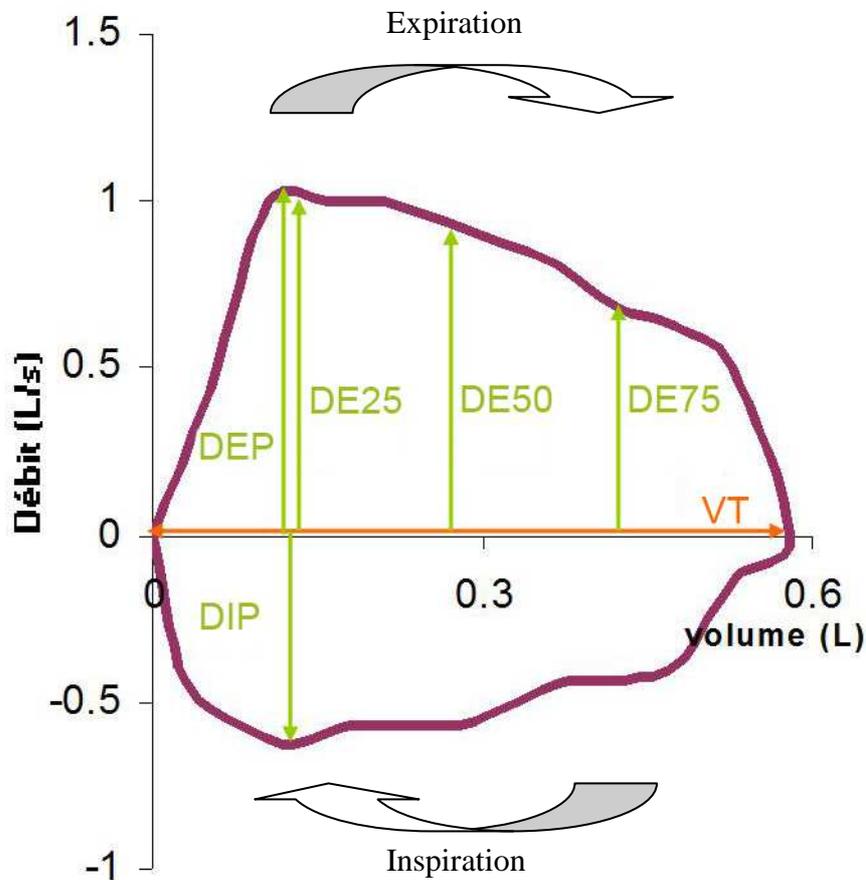
- Fréquence respiratoire ou FR, exprimée en /min
- Ventilation minute, ou VM : exprimée en L/min, elle est calculée en multipliant le volume courant par la fréquence respiratoire.

En sus de ces variables, différents rapports de volumes ou de débits, ont été calculés, afin de permettre une description quantifiée des courbes débit-volume. Certains de ces ratios ont été utilisés dans les publications sur les courbes débit-volume chez le chien (Amis et al. 1986, Amis and Kurpershoek 1986), les autres ont été créés pour cette étude. Ces ratios sont les

suivants : DIP/DEP, TI/TE, VE1/VCE, DE25/DEP, DE50/DEP, DE75/DEP, DE50/DE25, DE75/DE25, VI1/VCI

Les principales variables calculées sont schématisées sur une courbe débit-volume dans la figure 6.

Figure 6 : Spirométrie – courbe débit-volume type – principales variables calculées, schématisées sur un exemple de courbe.



Un exemple de courbe débit-volume (courbe violette). Par convention, le débit figure en ordonnée, et le volume en abscisse. Les débits négatifs représentent la phase inspiratoire, tandis que les débits positifs représentent la phase expiratoire. De la même façon, le volume augmente durant l'expiration, et diminue durant l'inspiration, jusqu'à revenir à une valeur nulle. Le débit expiratoire de pointe est atteint en début d'expiration, tandis que le débit inspiratoire de pointe l'est en fin d'inspiration (Amis and Kurpershoek 1986), ce qui donne à la courbe débit-volume la forme d'un D.

Les principales variables calculées à partir de ces courbes figurent sur le schéma. Les débits y sont inscrits en vert, et les volumes en orange.

Abréviations : DEP : débit expiratoire de pointe ; DIP : débit inspiratoire de pointe ; DE25 : débit expiratoire à 25 % du volume expiré ; DE50 : débit expiratoire à 50 % du volume expiré ; DE75 : débit expiratoire à 75 % du volume expiré ; VT : volume de Tidal ou volume courant expiratoire/inspiratoire.

Etude de répétabilité

Animaux

Quatre chiens mâles golden retriever sains (âge moyen : 27.3 mois, écart-type : 7.7 mois) et 4 chiens mâles GRMD adultes (âge moyen : 33.6 mois, écart-type : 26.2 mois) indemnes de bronchopneumonie ont été examinés 3 fois, à quelques jours d'intervalle (intervalle moyen entre le premier et le troisième test : 4.7 jours, écart-type : 1.7 jours), afin d'évaluer la répétabilité de la mesure. Une liste détaillée de ces animaux figure dans le tableau 3.

Tableau 3 : animaux inclus dans l'étude de répétabilité – spirométrie

Nom	Statut	Age (mois)	Délai 1 ^{er} -3 ^{ème} test (jours)
Dingo	Sain	19.5	7
Cbof	Sain	28.5	3
Crock	Sain	37.5	3
Dclack	Sain	23.9	7
Athos	GRMD	56.3	4
Ajax	GRMD	56.4	4
Ebam	GRMD	11.0	4
Eaudvy	GRMD	10.8	6

Analyse statistique

Une ANOVA à mesures répétées a été effectuée afin de déterminer si un effet intra-jour ou un effet inter-jour pouvaient être détectés. Pour ce test, 3 mesures par session, et 3 sessions ont été étudiées. Le niveau de significativité a été fixé à $p = 0.05$.

Etude de corrélation à la taille de l'animal

Animaux

Afin de déterminer quels paramètres de spirométrie subissaient des variations liées à la taille de l'animal, quatorze chiens sains de gabarits différents, dont 6 chiens beagles (hauteur au garrot moyenne : 0.397 m, écart-type : 0.036 m, min : 0.355 m, max : 0.44 m) et 8 chiens golden retriever (hauteur au garrot moyenne : 0.616 m, écart-type : 0.017 m, min : 0.59 m,

max : 0.64 m), ont été examinés une fois. Une liste détaillée de ces animaux figure dans le tableau 4.

Tableau 4 : animaux inclus dans l'étude de corrélation à la taille de l'animal – spirométrie

Nom	Race	Sexe	Hauteur au garrot (m)	Age (mois)
D'olique	Beagle	Femelle	0.355	12.6
Courgette	Beagle	Femelle	0.37	15.6
Bidule	Beagle	Mâle	0.37	31.8
Bigoune	Beagle	Femelle	0.42	29.7
Aorte	Beagle	Femelle	0.43	41.7
Gingko	Beagle	Mâle	0.44	31.9
Cliff	Golden retriever	Mâle	0.59	24.2
Dingo	Golden retriever	Mâle	0.595	19.5
Ckan	Golden retriever	Mâle	0.61	15.7
Crash	Golden retriever	Mâle	0.62	24.7
Dclack	Golden retriever	Mâle	0.62	23.9
Dclick	Golden retriever	Mâle	0.625	11.0
Crock	Golden retriever	Mâle	0.625	37.5
Cbof	Golden retriever	Mâle	0.64	28.5

Analyse statistique

Des coefficients de corrélation de Pearson entre la hauteur au garrot et les différentes variables ont été calculés afin de déterminer quelles variables étaient corrélées au gabarit de l'animal. Le niveau de significativité a été fixé à $p = 0.01$.

Etude de validation de variables d'intérêt chez le chien GRMD

Animaux

Huit chiens mâles golden retriever sains (âge moyen : 23.1 mois, écart-type : 8.1 mois ; hauteur au garrot moyenne : 0.615 m, écart-type : 0.017 m ; poids moyen : 29.5 kg, écart-

type : 3.3 kg), et 11 chiens mâles GRMD (âge moyen : 25.7 mois, écart-type : 25.0 mois ; hauteur au garrot moyenne : 0.539 m, écart-type : 0.047 m ; poids moyen : 21.5 kg, écart-type : 4.5 kg) ont été examinés une à trois fois, afin de déterminer quelles variables pouvaient s'avérer pertinentes pour caractériser et quantifier le déficit respiratoire chez les chiens GRMD adultes. La liste détaillée des animaux inclus dans cette étude figure dans le tableau 5.

Tableau 5 : Etude de validation de variables d'intérêt chez le chien GRMD
– spirométrie

Nom	Statut	Hauteur au garrot (m)	Age (mois)	Poids (kg)
Dingo +	Sain	0.595	19.5	22.9
Cbof ✖	Sain	0.64	28.5	33.6
Crock –	Sain	0.625	37.5	29.5
Dclack ■	Sain	0.62	23.9	29.3
Ckan ◆	Sain	0.61	15.7	30.6
Cliff ●	Sain	0.59	24.2	27.9
Crash ×	Sain	0.62	24.7	32.7
Dclick ▲	Sain	0.625	11.0	29.3
T-Fal ✕	GRMD	0.50	77.9	24.7
Dbrouille ■	GRMD	0.62	9.6	26.5
Cballot ▲	GRMD	0.55	15.1	17.1
Dk ●	GRMD	0.51	12.3	17.2
Dluge –	GRMD	0.52	12.0	16.3
Ajax ✖	GRMD	0.56	56.4	26.6
Athos ◆	GRMD	0.46	56.3	26.8
Eaudvy –	GRMD	0.54	10.8	23.1
Ebam –	GRMD	0.615	11.0	23.9
Eboum ■	GRMD	0.54	11.0	16.2
Dlice +	GRMD	0.52	10.5	18.45

A la droite du nom de chaque chien figure le symbole qui lui correspond et qui sera utilisé pour le représenter dans les graphes des figures 8 à 12.

Analyse statistique

Les variables démontrées comme étant significativement corrélées à la taille du chien ont été utilisées après normalisation par la hauteur au garrot. Une ANOVA à un facteur (sain versus GRMD) a été effectuée afin d'évaluer la capacité des variables étudiées à séparer la population GRMD de la population normale. De plus, sur le groupe GRMD, une ANOVA à deux facteurs (âge et hernie hiatale) a été effectuée, afin de déterminer l'effet du vieillissement et de la présence ou non d'une hernie hiatale sur les index étudiés. Le niveau de significativité a été fixé à $p = 0.01$.

Etude de l'influence de lésions de bronchopneumonie sur les variables de spirométrie

Animaux

5 chiens GRMD adultes ont été inclus dans cette étude, visant à identifier les anomalies liées à une bronchopneumonie chez le chien GRMD. Ces animaux ont été évalués par spirométrie soit quelques jours avant, et au début d'un épisode de bronchopneumonie (2 chiens), soit au début d'un épisode de bronchopneumonie, puis après disparition des lésions sur les images radiographiques de thorax (3 chiens). Pour l'un des chiens GRMD étudiés, l'intervalle entre l'examen pré-bronchopneumonie et l'examen per-bronchopneumonie était de 2 jours, pour l'autre chien GRMD testé de cette manière, cet intervalle était de 10 jours. L'intervalle entre le test per-bronchopneumonie et le test post-bronchopneumonie était de 16 jours pour les trois autres chiens.

Analyse statistique

Une ANOVA à mesures répétées a été effectuée afin de déterminer l'effet bronchopneumonie sur les différentes variables spirométriques. Le niveau de significativité a été fixé à $p = 0.01$.

Etude de corrélation avec les variables de cinématique diaphragmatique

Animaux

Cinq chiens golden retriever sains, et sept chiens GRMD adultes ont subi la double évaluation spirométrie-cinématique diaphragmatique, afin d'étudier les interactions entre variables.

Analyse statistique

Des coefficients de corrélation de Pearson, entre les variables spirométriques et de cinématique diaphragmatique d'intérêt ont été calculés chez les sept chiens GRMD. Une analyse en composante principale (ACP) a également été effectuée à partir de ces variables d'intérêt, afin d'étudier les relations entre variables et leur capacité à séparer les individus.

A partir des coordonnées de chaque individu dans l'espace à 5 dimensions défini par l'analyse en composantes principales, la distance euclidienne de chaque animal à la position du centre de gravité des individus sains a été calculée. Cette distance, nommée index respiratoire, a été évaluée en tant qu'index rendant compte de la fonction respiratoire du chien GRMD de manière globale. Les valeurs obtenues ont été, au même titre que celles obtenues pour les autres variables, soumises à une ANOVA, afin de déterminer l'effet du groupe (sain versus GRMD) sur l'index respiratoire. Le niveau de significativité a été fixé à $p = 0.01$.

2) Résultats

a) Cinématique diaphragmatique

Etude de répétabilité

Aucun effet jour ou cycle respiratoire n'a été démontré, que ce soit pour la distance parcourue par le diaphragme ou pour l'index de rétraction de celui-ci. Ceci atteste donc de la répétabilité du test pour l'obtention de ces deux variables. Les résultats de l'analyse statistique sont consignés dans le tableau 6.

Etude de validation de l'intérêt des variables étudiées chez le chien GRMD

Tous les animaux prévus ont pu être examinés. La contention, légère, a été bien tolérée.

Néanmoins, quelques clichés d'animaux présentant une hernie hiatale volumineuse n'ont pas pu être analysés, le foramen ventral de la veine cave caudale étant parfois masqué par l'estomac en position anormale.

Les résultats de l'analyse de variance sont consignés dans le tableau 6.

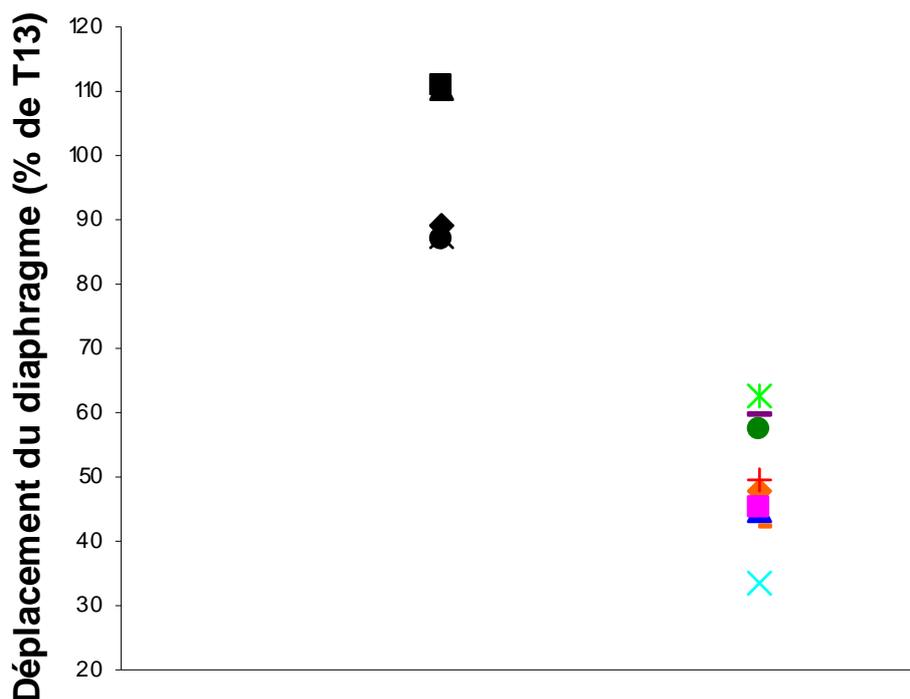
Tableau 6 : Cinématique diaphragmatique – résultats

	Distance parcourue (%T13)	Angle (°)
Effet intra-jour	p = 0.6322	P = 0.6510
Effet inter-jour	p = 0.3190	P = 0.1670
Effet intra-jour Sains	p = 0.4780	P = 0.2945
Effet inter-jour Sains	p = 0.5410	P = 0.1791
Effet intra-jour GRMD	p = 0.5256	P = 0.4943
Effet inter-jour GRMD	p = 0.7932	P = 0.6600
Moyenne (écart-type) GRMD	49.2 (9.3)	7.19 (10.4)
Moyenne (écart-type) Sains	96.8 (12.5)	40.6 (5.6)
Effet groupe (GRMD vs Sains)	p < 0.0001	p < 0.0001

Distance parcourue par le diaphragme

Les valeurs obtenues pour cette variable chez les chiens GRMD sont très significativement inférieures à celles des chiens sains ($p < 0.0001$). La distance normale moyenne parcourue par le diaphragme au cours d'un cycle respiratoire est de 96.8 % de la longueur de la treizième vertèbre thoracique (écart-type : 12.5 %), tandis qu'elle n'est que de 49.2 % (écart-type : 9.3 %) chez les chiens GRMD. Le graphe de la figure 5 illustre cette moindre mobilité diaphragmatique chez les chiens GRMD, en comparaison des chiens sains. Il apparaît qu'aucune zone de superposition entre les deux populations n'est présente. Le chien GRMD T-Fal, le plus âgé du groupe (6.5 ans), présente la valeur la plus basse (33.6 %).

Figure 5 : Cinématique diaphragmatique – intérêt des variables chez le chien GRMD – Valeurs de distance parcourue par le diaphragme au cours d'un cycle respiratoire, obtenues chez les chiens GRMD, en comparaison des chiens sains.

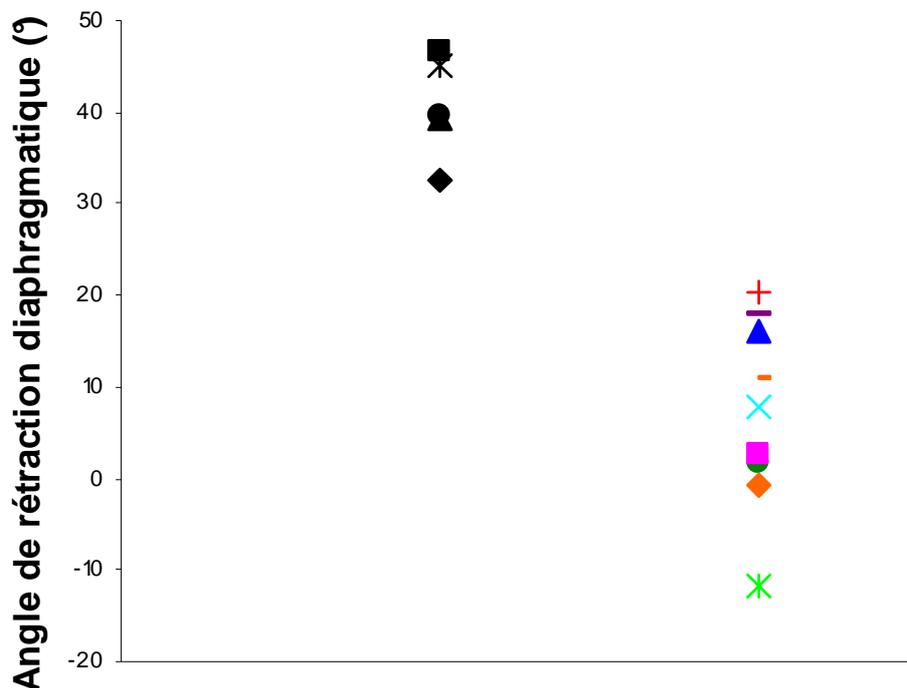


Les chiens sains sont représentés par des symboles noirs, et figurent sur la gauche du graphe, tandis que les chiens GRMD sont représentés, sur la droite de celui-ci, par des symboles de couleur. Chaque chien est représenté par un symbole ; la correspondance chien-symbole est consignée dans le tableau 2.

Index de rétraction diaphragmatique

Cet index, ayant pour but de quantifier la rétraction caudale du diaphragme, évidente visuellement sur des clichés thoraciques de chiens GRMD (figure 3), est significativement ($p < 0.0001$) diminué chez les chiens GRMD, en comparaison des chiens sains. Un angle moyen de 40.6° (écart-type : 5.6°) a été mesuré chez les chiens sains, tandis qu'il n'atteint que 7.2° (écart-type : 10.4°) chez les chiens GRMD. Cette différence apparaît nettement à la lecture du graphe de la figure 6. Comme pour le déplacement du diaphragme, aucun des animaux GRMD ne se superpose aux chiens sains. La population GRMD apparaît dispersée sur cet index (coefficient de variation de 144.4 %, versus 13.8 % chez les chiens sains), avec certains animaux dont l'angle devient même négatif, signant une forte rétraction caudale du diaphragme.

Figure 6 : Cinématique diaphragmatique – intérêt des variables chez le chien GRMD – Valeurs d'angle de rétraction diaphragmatique, obtenues chez les chiens GRMD, en comparaison des chiens sains.



Les chiens sains sont représentés par des symboles noirs, et figurent sur la gauche du graphe, tandis que les chiens GRMD sont représentés, sur la droite de celui-ci, par des symboles de couleur. Chaque chien est représenté par un symbole ; la correspondance chien-symbole est consignée dans le tableau 2.

Evaluation de l'effet de l'âge et de la présence d'une hernie hiatale sur la mobilité et l'index de rétraction du diaphragme

Aucun effet de l'âge ($p = 0.2266$), ni de la présence ou non d'une hernie hiatale ($p = 0.2343$) sur la valeur de la distance parcourue par le diaphragme n'a été mis en évidence.

De même, les effets de l'âge ($p = 0.7982$) et de la présence d'une hernie hiatale ($p = 0.6427$) sur la valeur de l'index de rétraction ne sont pas significatifs.

Ainsi, les chiens les plus âgés ou ceux présentant une hernie ne présentent pas nécessairement les valeurs les plus basses pour ces deux index.

c) Spirométrie

L'ensemble des tests programmé a pu être effectué. Le port du masque a été dans l'ensemble bien toléré par les animaux, après parfois une petite période d'adaptation. Le masque peut en effet s'avérer stressant pour certains chiens, et dans cette étude davantage chez les chiens sains. Ce stress s'est rapidement estompé chez les animaux concernés.

Etude de répétabilité

Un effet intra-jour très significatif ($p = 0.0300$) sur le volume inspiré après une seconde d'inspiration (VI1) chez les chiens GRMD a été démontré. De même, un effet intra-jour significatif sur le débit inspiratoire de pointe (DIP) a été mis en évidence, chez les chiens sains ($p = 0.0411$), et surtout chez les chiens GRMD ($p = 0.0069$). Les deux populations confondues montrent un effet intra-jour très significatif sur cette variable ($p = 0.0009$).

L'ensemble des autres variables et index calculés n'ont pas été démontrés comme influencés par le jour de test ou la courbe débit-volume considérée au cours d'un même test.

Tous les résultats de l'ANOVA à mesures répétées sont consignés dans le tableau 7.

Etude de corrélations des différentes variables à la taille de l'animal

L'ensemble des variables quantifiant les volumes (inspiratoires ou expiratoires, ventilation minute) et débits présentent des coefficients de corrélation à la hauteur au garrot positifs et significatifs. De façon assez logique, plus l'animal est de grande taille, plus les volumes et débits augmentent. Ces corrélations sont illustrées par quelques graphes, présentés dans la figure 7. Une exception est représentée par le débit expiratoire à 75% du volume expiré

(DE75) : son coefficient de Pearson avec la hauteur au garrot est assez faible (0.3952), et la corrélation n'est donc pas tout à fait significative ($p = 0.0160$).

A contrario, la fréquence respiratoire, les temps inspiratoires et expiratoires, ainsi que tous les rapports calculés, visant à décrire de manière quantifiée l'aspect des courbes débit-volume, ne sont pas modifiés par la taille de l'animal.

Des chiens de tailles différentes présenteront donc des débits et volumes différents, mais une fréquence respiratoire comparable et une similitude d'aspect des courbes débit-volumes obtenues.

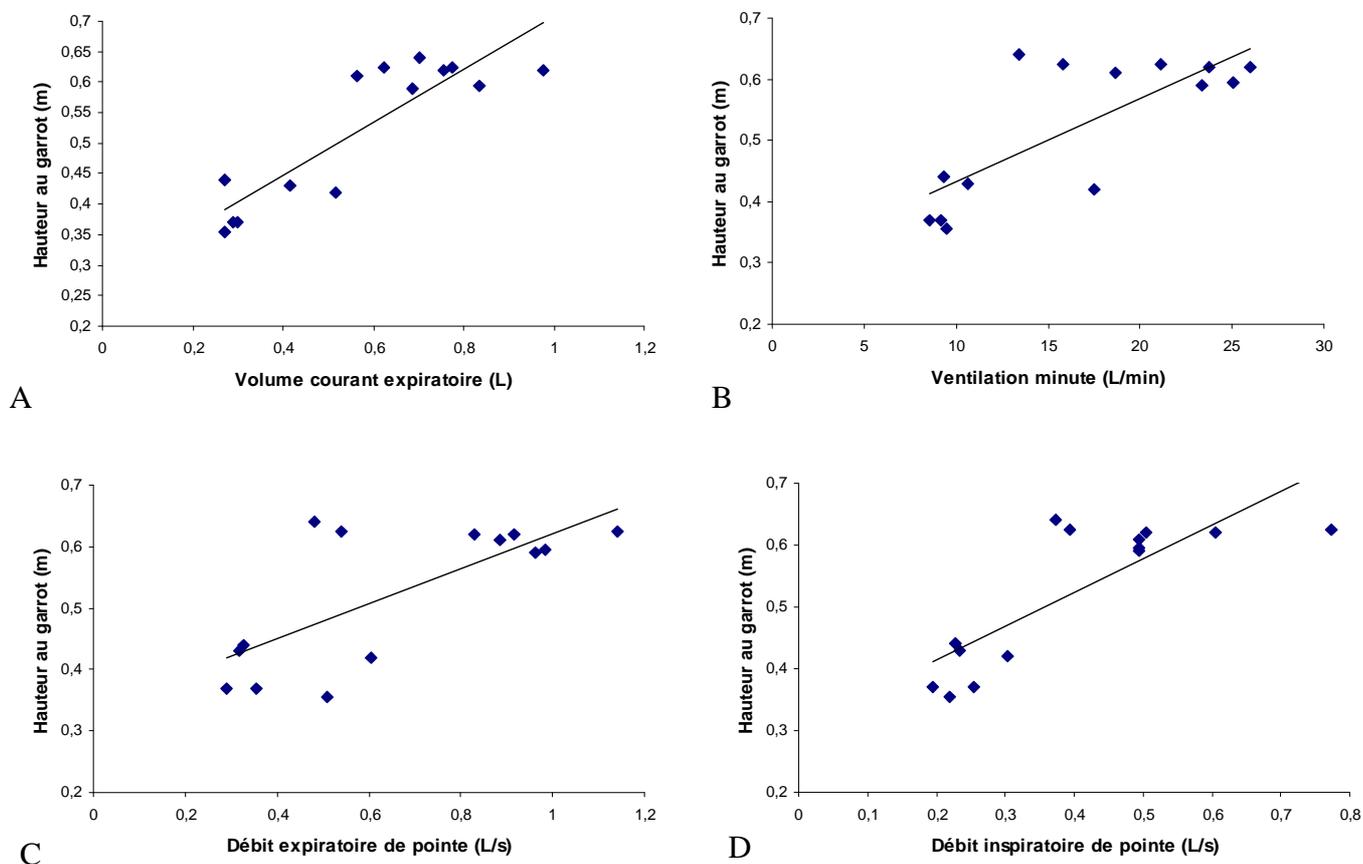
Tableau 7 : Spirométrie – résultats de l'étude de répétabilité et de corrélation des variables à la taille des animaux.

	Effet intra-jour	Effet inter-jour	Effet intra-jour (Sains)	Effet inter-jour (Sains)	Effet intra-jour (GRMD)	Effet inter-jour (GRMD)	Corrélation hauteur au garrot
VCE	p = 0.0948	p = 0.7087	P = 0.1636	p = 0.4384	p = 0.1185	P = 0.6451	r = 0.8776 p < 0.0001
VE1	p = 0.0962	p = 0.6854	P = 0.1746	p = 0.9006	p = 0.1193	P = 0.5487	r = 0.7683 p = 0.0013
DEP	p = 0.1572	p = 0.3497	P = 0.3428	p = 0.6210	p = 0.4534	P = 0.5105	r = 0.7210 p = 0.0036
DE2575	p = 0.4232	p = 0.1380	P = 0.5222	p = 0.3940	p = 0.6378	P = 0.2895	r = 0.7190 p = 0.0037
DE25	p = 0.2502	p = 0.3076	P = 0.5868	p = 0.5576	p = 0.3923	P = 0.4807	r = 0.7133 p = 0.0042
DE50	p = 0.1351	p = 0.1538	P = 0.3714	p = 0.3714	p = 0.3121	p = 0.3465	r = 0.7264 p = 0.0032
DE75	p = 0.2235	p = 0.3679	P = 0.2560	p = 0.9004	p = 0.1719	p = 0.2271	r = 0.3952 p = 0.0160
TE	p = 0.6870	p = 0.2566	P = 0.8093	p = 0.3428	p = 0.8670	p = 0.8008	r = 0.3784 p = 0.1821
VCI	p = 0.0653	p = 0.8040	P = 0.1534	p = 0.5522	p = 0.1232	p = 0.8253	r = 0.8809 p < 0.0001
VII	p = 0.1363	p = 0.8481	P = 0.3158	p = 0.9800	p = 0.0300	p = 0.7343	r = 0.8430 p = 0.0001
DIP	p = 0.0009	p = 0.8226	P = 0.0411	p = 0.5661	p = 0.0069	p = 0.9372	r = 0.8172 p = 0.0003
TI	p = 0.9772	p = 0.5870	P = 0.6659	p = 0.7599	p = 0.8674	p = 0.7950	r = 0.2210 p = 0.4477
FR	p = 0.1257	p = 0.5787	P = 0.2853	p = 0.2963	p = 0.3837	p = 0.3108	r = -0.3122 p = 0.2771
VM	p = 0.3275	p = 0.7988	P = 0.3316	p = 0.2381	p = 0.1167	p = 0.5536	r = 0.7680 p = 0.0013
DIP/DEP	p = 0.8081	p = 0.3210	P = 0.7112	p = 0.7062	p = 0.5289	p = 0.3703	r = 0.1297 p = 0.6584
TI/TE	p = 0.5928	p = 0.4189	P = 0.4237	p = 0.5124	p = 0.8898	p = 0.8978	r = -0.3144 p = 0.2736
VE1/VCE	p = 0.7265	p = 0.3439	P = 0.8007	p = 0.3754	p = 0.6693	p = 0.9408	r = -0.3476 p = 0.2233
DE25/DEP	p = 0.8508	p = 0.8839	P = 0.5392	p = 0.8068	p = 0.3365	p = 0.6834	r = 0.1441 p = 0.6230
DE50/DEP	p = 0.7803	p = 0.4460	P = 0.9695	p = 0.4888	p = 0.5699	p = 0.7419	r = 0.0763 p = 0.7955
DE75/DEP	p = 0.8426	p = 0.9595	P = 0.9301	p = 0.8485	p = 0.3036	p = 0.4193	r = -0.3815 p = 0.1783
DE50/DE25	p = 0.7846	p = 0.5357	P = 0.6925	p = 0.5959	p = 0.9903	p = 0.6625	r = -0.0134 p = 0.9636
DE75/DE25	p = 0.9811	p = 0.9497	P = 0.9385	p = 0.8376	p = 0.2717	p = 0.3843	r = -0.3688 p = 0.1944
VII/VCI	p = 0.5766	p = 0.5859	P = 0.7825	p = 0.6965	p = 0.2323	p = 0.7324	r = -0.2628 p = 0.3640

Abréviations : VCE : volume courant expiratoire ; VE1 : volume expiré au bout d'une seconde ; DEP : débit expiratoire de pointe ; DE2575 : débit expiratoire moyen entre 25 et 75 % du volume expiré ; DE25, DE50, DE75 : débits expiratoires à 25, 50 et 75 % du

volume expiré ; TE : temps expiratoire ; TI : temps inspiratoire ; VCI : volume courant inspiratoire ; VI1 : volume inspiré au bout d'une seconde ; DIP : débit inspiratoire de pointe ; FR : fréquence respiratoire ; VM : ventilation minute.

Figure 7 : Spirométrie – corrélation des variables calculées avec la taille de l'animal. Illustration par droites de régression.



A : corrélation entre volume courant expiratoire et hauteur au garrot, illustrée par droite de régression ; B : corrélation entre ventilation minute et hauteur au garrot, illustrée par droite de régression ; C : corrélation entre débit expiratoire de pointe et hauteur au garrot, illustrée par droite de régression ; D : corrélation entre débit inspiratoire de pointe et hauteur au garrot, illustrée par droite de régression.

Etude de validation des variables d'intérêt chez le chien GRMD.

Considérant les résultats énoncés ci-dessus, démontrant des corrélations significatives entre variables de volume et de débit, et hauteur au garrot, toutes ces variables ont été utilisées rapportées à la hauteur au garrot dans la présente étude. Un cas particulier a été envisagé pour le débit expiratoire à 75% du volume expiré (DE75), seul débit dont la corrélation avec la hauteur au garrot n'a pas été nettement démontrée. Cette variable a donc fait l'objet d'une double analyse (normalisée et non normalisée par la hauteur au garrot).

L'analyse de variance a démontré que des variables telles que volume courant, ventilation minute, fréquence respiratoire, ou débits de pointe ne sont pas modifiées chez les chiens GRMD adultes. Sur les 23 variables étudiées, seules quatre montrent une différence significative entre chiens sains et chiens GRMD.

Les principaux résultats obtenus sont résumés dans le tableau 8.

Tableau 8 : Spirométrie – validation des variables d'intérêt chez le chien GRMD – résultats de l'analyse statistique

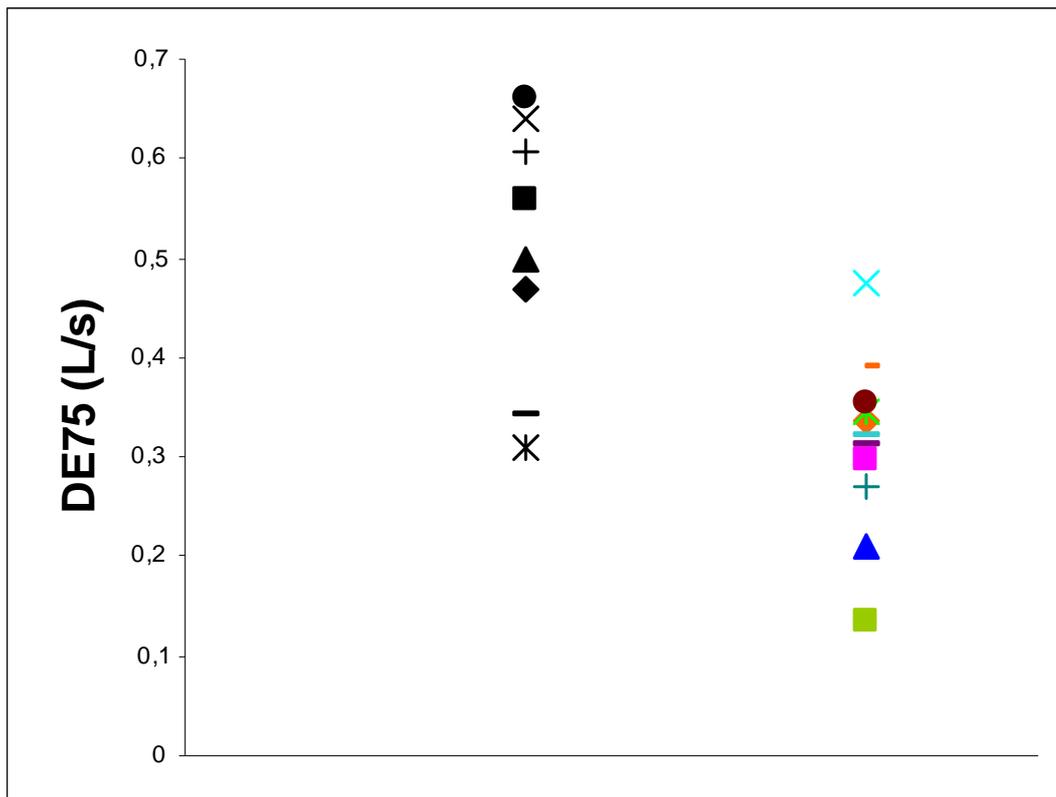
	Moyenne (écart-type) Sains	Moyenne (écart-type) GRMD	Effet groupe (GRMD vs Sains)
VCE/HG (L/m)	1.20 (0.21)	1.02 (0.19)	p = 0.0678
VE1/HG (L/m)	0.81 (0.17)	0.87 (0.07)	p = 0.3519
DEP/HG (L/ms)	1.37 (0.38)	1.69 (0.49)	p = 0.1480
DE2575/HG (L/ms)	1.17 (0.30)	1.12 (0.29)	p = 0.7269
DE25/HG (L/ms)	1.30 (0.38)	1.62 (0.48)	p = 0.1327
DE50/HG (L/ms)	1.10 (0.31)	1.15 (0.35)	p = 0.7602
DE75/HG (L/ms)	0.83 (0.23)	0.59 (0.19)	p = 0.0203
DE75 (L/s)	0.51 (0.13)	0.31 (0.09)	p = 0.0011
TE (s)	1.56 (0.56)	1.77 (0.26)	p = 0.2883
VCI/HG (L/m)	1.08 (0.21)	0.92 (0.18)	p = 0.1065
VII/HG (L/m)	0.78 (0.18)	0.65 (0.15)	p = 0.0886
DIP/HG (L/ms)	0.84 (0.20)	0.69 (0.15)	p = 0.0812
TI (s)	1.41 (0.40)	1.54 (0.33)	p = 0.4362
FR (/min)	22.6 (6.4)	18.6 (2.9)	p = 0.0821
VM/HG (L/mmin)	34.1 (7.9)	31.1 (5.7)	p = 0.3532
DIP/DEP (%)	63.0 (11.1)	44.0 (15.2)	p = 0.0081
TI/TE (%)	95.4 (29.4)	87.9 (15.3)	p = 0.4761
VE1/VCE (%)	81.5 (16.9)	87.0 (6.6)	p = 0.3391
DE25/DEP (%)	94.1 (2.6)	95.9 (2.9)	p = 0.1844
DE50/DEP (%)	79.8 (6.0)	68.4 (12.9)	p = 0.0339
DE75/DEP (%)	61.7 (1.0)	36.9 (15.0)	p = 0.0008
DE50/DE25 (%)	84.8 (6.0)	71.3 (13.5)	p = 0.0176
DE75/DE25 (%)	65.6 (10.6)	38.5 (15.4)	p = 0.0005
VII/VCI (%)	74.0 (18.2)	71.3 (13.5)	p = 0.7177

Abréviations : HG : hauteur au garrot, VCE : volume courant expiratoire, VE1 : volume expiré après une seconde, DEP : débit expiratoire de pointe, DE2575 : débit expiratoire moyen entre 25 et 75 % du volume expiré, DE25, DE50, DE75 : débits expiratoires à 25, 50 et 75 % du volume expiré, TE : temps expiratoire, TI : temps inspiratoire, VCI : volume courant inspiratoire, VII : volume inspiré après une seconde, DIP : débit

inspiratoire de pointe, FR : fréquence respiratoire, VM : ventilation minute.

Le débit expiratoire à 75 % du volume expiré (DE75) est significativement ($p = 0.0011$) diminué chez les chiens GRMD, mais la significativité est perdue lorsque cet index est normalisé par la hauteur au garrot ($p = 0.0203$). Pour mémoire, le DE75 est le seul débit non significativement ($p = 0.0160$) corrélé à la taille de l'animal. Il est néanmoins probable que cette variable subisse une influence de la taille de l'animal malgré tout. Ici, la hauteur au garrot est significativement ($p = 0.0004$) plus faible chez les chiens GRMD. Il convient donc d'utiliser ce débit, brut ou normalisé, avec précaution, le premier subissant probablement légèrement les différences de taille, et le deuxième étant normalisé par une variable faiblement corrélée. La figure 8 représente les valeurs de DE75 obtenues pour les chiens GRMD en comparaison des chiens sains.

Figure 8 : Spirométrie – validation de variables d'intérêt pour les chiens GRMD – Débit expiratoire à 75 % du volume expiré.



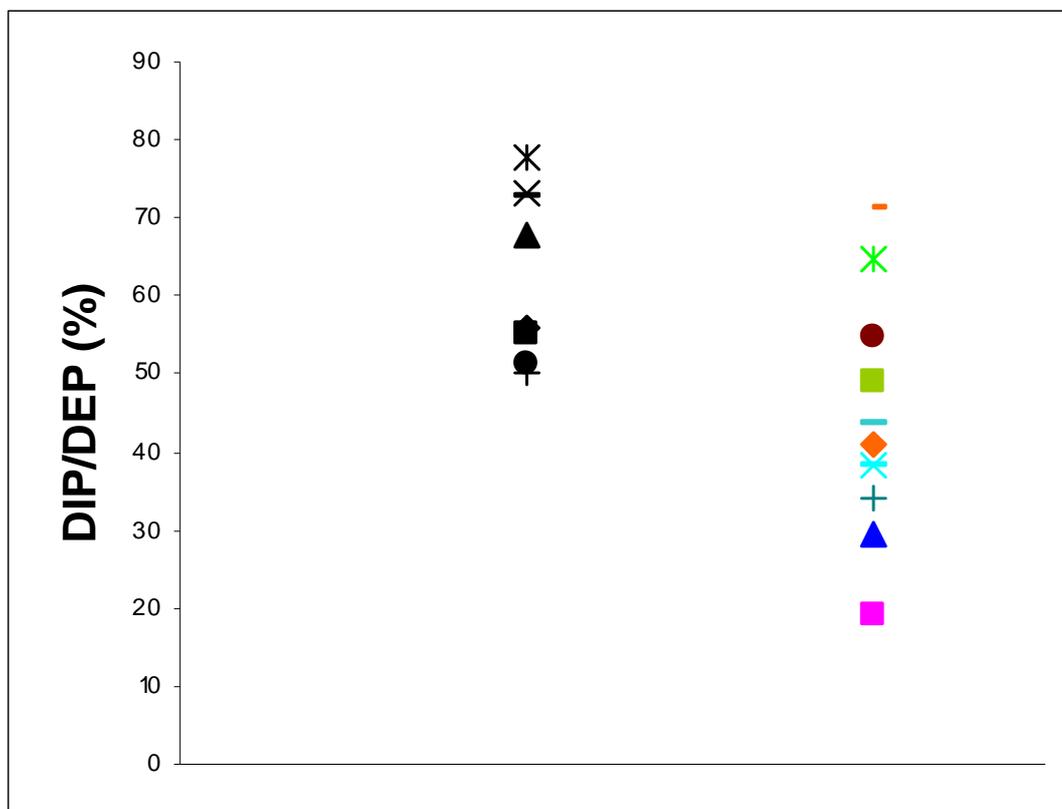
Les chiens sains sont représentés par des symboles noirs, et figurent sur la gauche du graphe, tandis que les chiens GRMD sont représentés, sur la droite de celui-ci, par des

symboles de couleur. Chaque chien est représenté par un symbole ; la correspondance chien-symbole est consignée dans le tableau 5.

Les rapports de débit suivants sont également modifiés :

Le rapport du débit inspiratoire sur le débit expiratoire de pointe (DIP/DEP) est significativement diminué chez les chiens GRMD. Ainsi, le débit inspiratoire de pointe représente en moyenne 63.0 % (écart-type : 11.1 %) du débit expiratoire de pointe chez les chiens sains, tandis qu'il n'en représente que 44.0 % en moyenne (écart-type : 15.2 %) chez les chiens GRMD, comme le montre le graphe de la figure 9. Ceci peut traduire une faiblesse inspiratoire chez ces animaux.

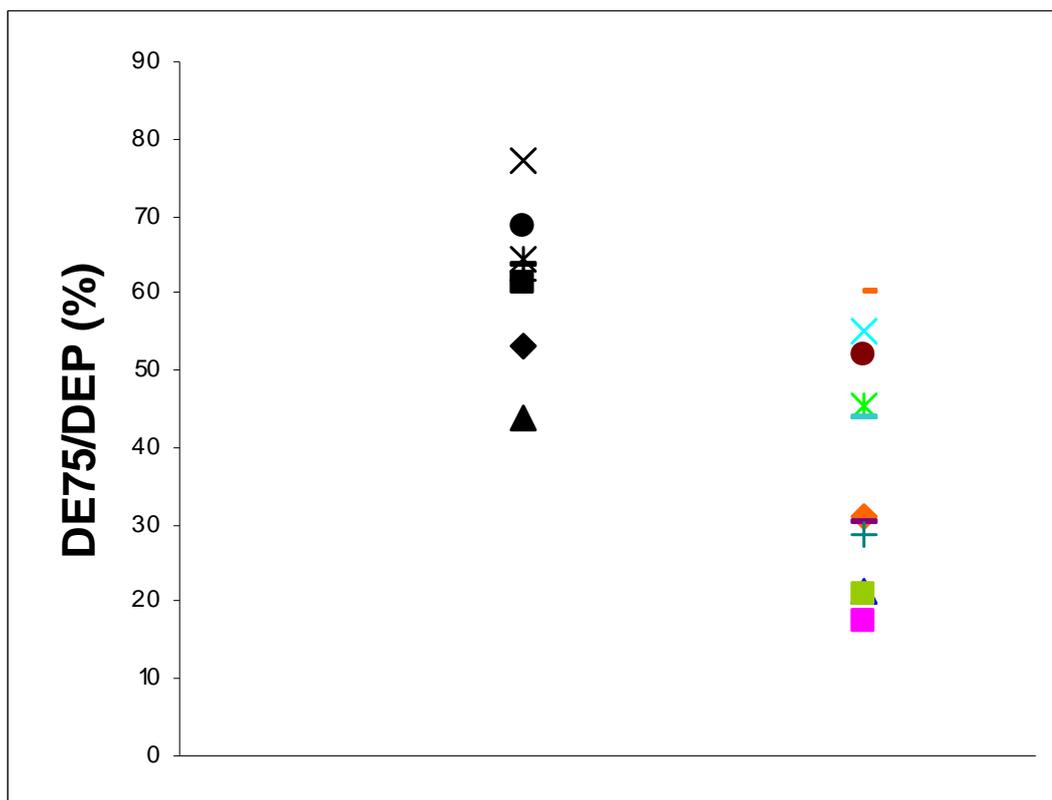
Figure 9 : Spirométrie – validation de variables d'intérêt pour le chien GRMD – Ratio du débit inspiratoire sur le débit expiratoire de pointe.



Les chiens sains sont représentés par des symboles noirs, et figurent sur la gauche du graphe, tandis que les chiens GRMD sont représentés, sur la droite de celui-ci, par des symboles de couleur. Chaque chien est représenté par un symbole ; la correspondance chien-symbole est consignée dans le tableau 5.

Le rapport du débit expiratoire à 75% du volume expiré sur le débit expiratoire de pointe (DE75/DEP) est significativement ($p = 0.0008$) diminué chez le chien GRMD. En moyenne, le débit expiratoire à 75 % du volume expiré atteint 61.7 % (écart-type : 10 %) du débit expiratoire de pointe chez les chiens sains, tandis qu'il n'est que de 36.9 % en moyenne (écart-type : 15.0 %) chez les chiens GRMD. La chute de ce ratio met en évidence un effondrement du débit en fin d'expiration, que laissait présumer la chute significative de DE75 chez les chiens GRMD. Ce ratio est néanmoins moins contestable que le DE75 brut, car totalement décorrélé de la taille de l'animal. Une superposition existe entre les deux populations pour ce ratio : cinq chiens GRMD se situent dans les valeurs basses de la population normale, comme le montre la figure 10.

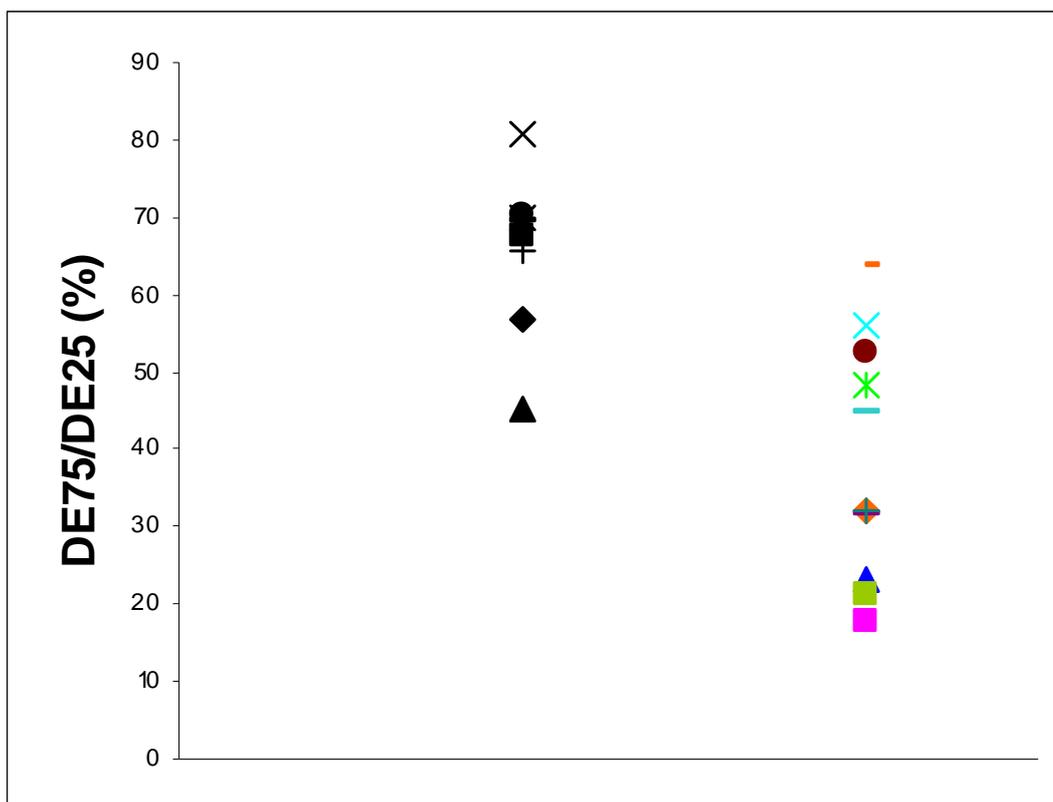
Figure 10 : Spirométrie – validation de variables d'intérêt pour le chien GRMD – Ratio du débit expiratoire à 75 % du volume expiré sur le débit expiratoire de pointe.



Les chiens sains sont représentés par des symboles noirs, et figurent sur la gauche du graphe, tandis que les chiens GRMD sont représentés, sur la droite de celui-ci, par des symboles de couleur. Chaque chien est représenté par un symbole ; la correspondance chien-symbole est consignée dans le tableau 5

Le rapport du débit expiratoire à 75 % du volume expiré sur le débit expiratoire à 25% du volume expiré (DE75/DE25) est significativement ($p = 0.0005$) diminué chez le chien GRMD. Cette différence concorde avec celle obtenue pour le ratio DE75/DEP, et traduit probablement le même déficit. D'ailleurs, la superposition des deux populations est identique, et concerne les mêmes individus, comme l'illustre la figure 11. Le DE75 est en moyenne de 65.6 % (écart-type : 10.6 %) du DE25 chez les chiens sains, et seulement de 38.5 % (écart-type : 15.4 %) chez les chiens GRMD.

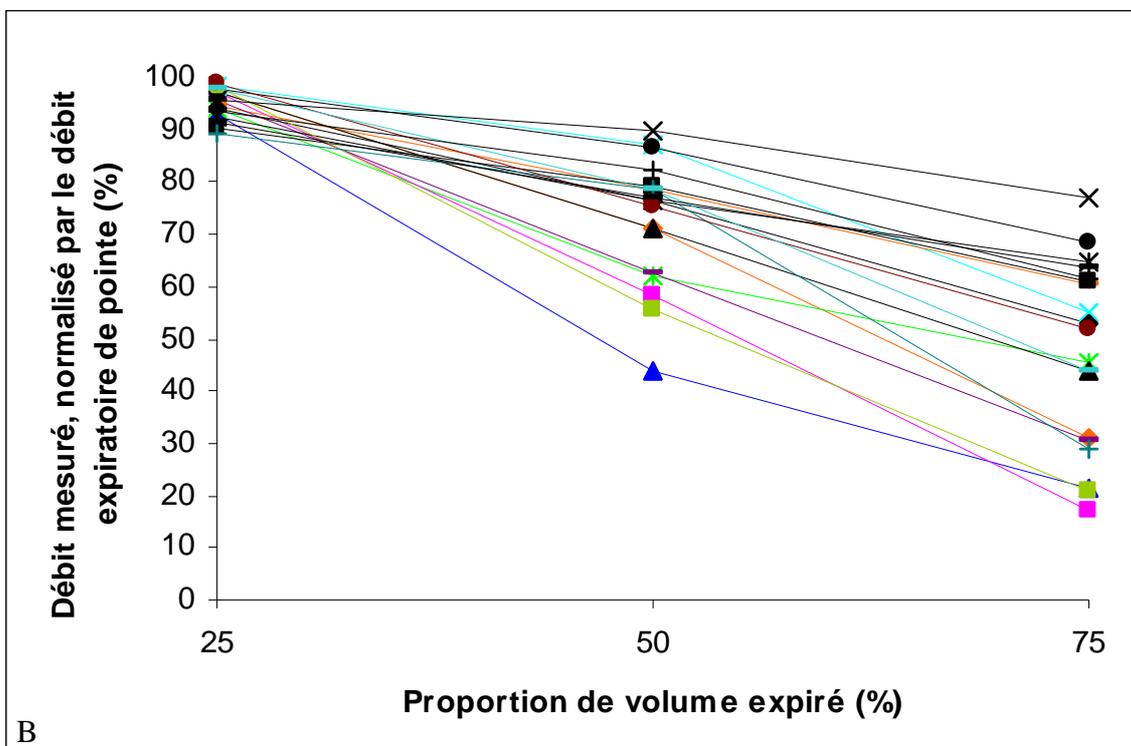
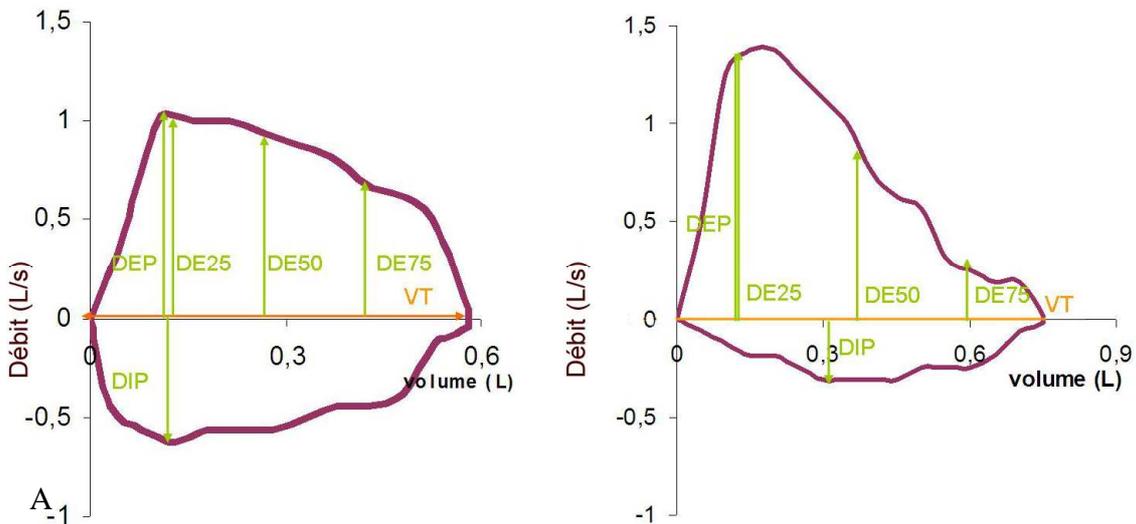
Figure 11 : Spirométrie – validation de variables d'intérêt pour le chien GRMD – Ratio du débit expiratoire à 75 %, sur le débit expiratoire à 25 % du volume expiré.



Les chiens sains sont représentés par des symboles noirs, et figurent sur la gauche du graphe, tandis que les chiens GRMD sont représentés, sur la droite de celui-ci, par des symboles de couleur. Chaque chien est représenté par un symbole ; la correspondance chien-symbole est consignée dans le tableau 5

Cette chute de débit excessive, significative en fin d'expiration, débute pour certains animaux en milieu d'expiration, mais de manière non significative à l'échelle du groupe GRMD ($p = 0.0339$ pour DE50/DEP, et $p = 0.0176$ pour DE50/DE25). Cette moindre capacité à maintenir un débit normal dans la deuxième moitié de l'expiration est responsable d'un aspect différent des courbes obtenues chez les chiens GRMD : le D se creuse. Ceci est illustré dans la figure 12.

Figure 12 : Spirométrie – identification de variables d’intérêt chez le chien GRMD. Illustration des anomalies observées par un exemple de courbe débit-volume, et par un graphe représentant les débits expiratoires à 25, 50 et 75 % du volume expiré, normalisés par le débit expiratoire de pointe, pour chaque individu étudié.



A : comparaison d’une courbe obtenue chez un chien sain (à gauche) avec une courbe obtenue chez un chien GRMD (à droite). Noter l’aspect plus concave de la courbe expiratoire après le pic chez les chiens GRMD, traduit par la chute du DE75/DEP

notamment, et le faible débit inspiratoire de pointe, comparé à celui mesuré en expiration, traduit par la chute du DIP/DEP

B : Illustration de la chute de débit excessive chez le chien GRMD, par un graphe figurant les débits enregistrés à 25, 50 et 75 % du volume expiré, exprimés en pourcentage du débit expiratoire de pointe. Noter la chute de débit, dès 50 % du volume expiré pour certains animaux, chez les chiens GRMD (symboles de couleur) en comparaison des chiens sains (symboles noirs). Les symboles utilisés pour chaque chien sont répertoriés dans le tableau 5.

Evaluation de l'effet de l'âge et de la présence d'une hernie hiatale sur les variables étudiées.

Aucune des variables étudiées ne subit d'effet significatif de l'âge ou de la présence ou non d'une hernie hiatale. Ainsi, les individus présentant les modifications les plus nettes sur les variables précédemment citées ne sont pas nécessairement les plus âgés ou ceux présentant une hernie hiatale. Il est important de souligner que ceci n'implique pas que les valeurs obtenues pour ces variables ne subissent pas d'effet de l'âge chez un animal donné, mais seulement qu'à l'échelle de la population GRMD, examinée à un instant T, les différences d'âge entre individus ne permettent pas d'expliquer les différences observées sur les courbes débit-volume.

Etude de l'influence de lésions de bronchopneumonie sur les variables de spirométrie

L'ANOVA à mesures répétées, réalisée sur cinq chiens GRMD testés durant et hors épisode de bronchopneumonie, n'a révélé aucun effet significatif de la bronchopneumonie sur les variables de spirométrie.

Etude de corrélation avec les variables de cinématique diaphragmatique

Chez les sept chiens GRMD ayant subi la double évaluation cinématique diaphragmatique-spirométrie, aucune corrélation significative n'a pu être mise en évidence entre les variables de cinématique diaphragmatique et les variables de spirométrie. Des corrélations faiblement significatives ont néanmoins été démontrées, entre DE75/DEP et DE50/DEP ($R = 0.8051$, $p = 0.0289$), et entre DE75/DEP et DIP/DEP ($R = 0.7989$, $p = 0.0311$).

Afin d'étudier les relations entre variables, et leur capacité à différencier les individus, une analyse en composantes principales (ACP) a été effectuée, incluant les 5 chiens sains et 7 chiens GRMD, et les 5 variables suivantes :

- Distance parcourue par le diaphragme entre fin d'inspiration et fin d'expiration.
- Index de rétraction caudale du diaphragme.

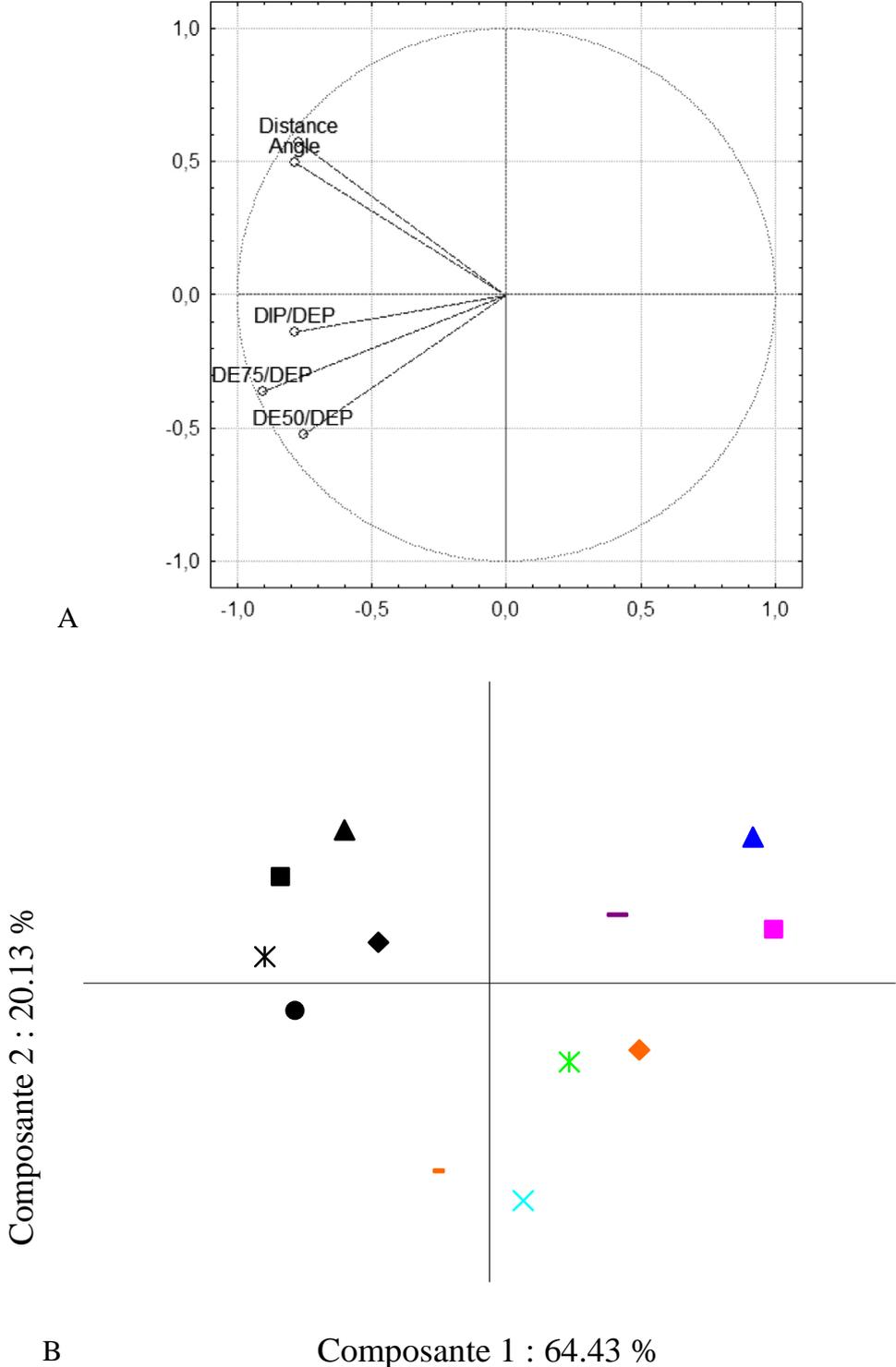
- Débit inspiratoire de pointe rapporté au débit expiratoire de pointe (DIP/DEP)
- Débit expiratoire à 75% du volume expiré, normalisé par le débit expiratoire de pointe (DE75/DEP).
- Débit expiratoire à 50 % du volume expiré, normalisé par le débit expiratoire de pointe (DE50/DEP)

Les débits expiratoires à 50 et 75 % du volume expiré rapportés au débit expiratoire à 25 % du volume expiré n'ont pas été inclus, de par leur signification proche de ces mêmes débits rapportés au débit expiratoire de pointe.

La projection des individus et des variables sur le plan d'ACP sont présentées dans la figure 13. Les deux premières composantes permettent d'expliquer 84.56 % de la variance. Relativement peu d'information est donc perdue par la projection en deux dimensions. La première composante explique 64.43 % de la variance, et est majoritairement expliquée par le DIP/DEP, et dans une moindre mesure par les autres variables, dont les vecteurs se projettent entre les deux axes du plan, tout en restant globalement plus proche de l'axe horizontal, représentant la composante 1. Les vecteurs des variables de cinématique diaphragmatique se projettent de manière assez proche l'un de l'autre, signant une probable corrélation.

Le plan de projection des individus montre que les deux populations sont bien distinguées par l'ensemble des variables considérées. Les chiens sains apparaissent relativement groupés sur la gauche du plan d'ACP, avec des valeurs élevées pour l'ensemble des variables, tandis que les GRMD apparaissent plus dispersés sur le plan, traduisant une hétérogénéité de cette population sur le plan de la fonction respiratoire, quantifiée par ces différents index.

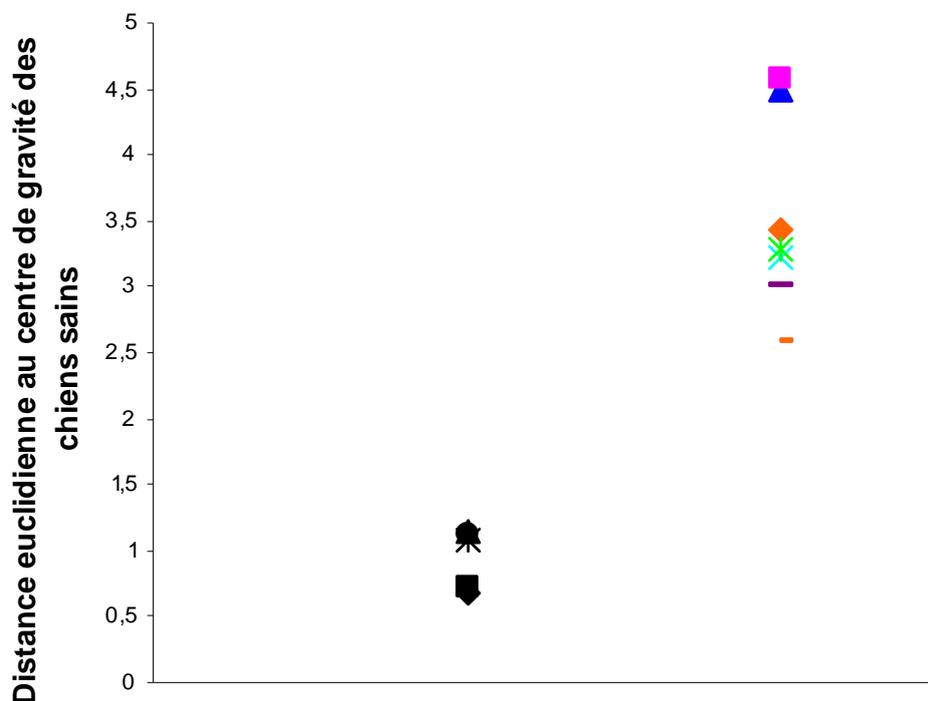
Figure 13 : Cinématique diaphragmatique et Spirométrie – Analyse en composantes principales.



A : projection des variables sur le plan d'ACP ; B : projection des individus sur le plan d'ACP. Les individus sont représentés par leurs symboles, figurant dans le tableau 2 ou le tableau 5.

A l'issue de cette étude chez les chiens adultes, plusieurs variables se sont révélées discriminantes entre chiens sains et chiens GRMD. Afin de rendre l'interprétation des résultats obtenus par les deux méthodes d'évaluation plus facile, le calcul d'un index respiratoire a été proposé. A partir des coordonnées de chaque individu dans l'espace à 5 dimensions déterminé par l'analyse en composantes principales, la distance euclidienne entre chaque chien et le barycentre des chiens sains a été calculée. Cet index s'avère très significativement ($p < 0.0001$) augmenté chez les chiens GRMD, en comparaison des chiens sains. Ce résultat est en adéquation avec les observations faites sur la projection des individus sur le plan d'ACP, qui montrait une distinction des deux populations. Le graphe de la figure 14 montre les valeurs obtenues pour cet index chez les individus GRMD en comparaison des individus sains.

Figure 14 : Cinématique diaphragmatique et spirométrie – analyse en composantes principales – index respiratoire obtenu chez les chiens GRMD, en comparaison des chiens sains.



Les chiens sains sont représentés par des symboles noirs, et figurent sur la gauche du graphe, tandis que les chiens GRMD sont représentés, sur la droite de celui-ci, par des symboles de couleur. Chaque chien est représenté par un symbole ; la correspondance chien-symbole est consignée dans le tableau 5

C. Evaluation de la fonction respiratoire chez de jeunes animaux en cours d'évolution clinique

1) Matériels et méthode

a) Cinématique diaphragmatique

Déroulement des tests

Les tests se sont déroulés conformément à la procédure précédemment décrite pour les chiens adultes. Pour les animaux jeunes de petit format, le champ était réduit à 23 cm, afin de disposer d'une image de meilleure résolution sur la zone d'intérêt.

Analyse des images et calcul des variables

La distance parcourue par le diaphragme au niveau du foramen ventral de la veine cave caudale, entre la fin d'inspiration et la fin d'expiration, ainsi que l'index de rétraction caudale du diaphragme ont été calculés conformément à la procédure énoncée pour les animaux adultes.

Animaux

Cinq chiens sains, et dix chiens GRMD ont été inclus dans cette étude. Une liste détaillée de ces animaux est présentée dans le tableau 9.

Déroulement de l'étude

L'objectif de cette étude était de déterminer l'évolution des deux paramètres de cinématique diaphragmatique, démontrés comme pertinents chez l'adulte, chez des chiots en croissance, de l'âge de 2 mois à l'âge de 9 mois. Huit tests étaient planifiés, soit un test par mois. Dans le tableau 9, figure le détail des tests réalisés par animal.

Tableau 9 : Cinématique diaphragmatique – animaux inclus dans l'étude longitudinale

Nom	Statut	Age (mois)							
		2	3	4	5	6	7	8	9
Dzer Δ	Sain	X	X	X	X	X	X	X	X
Dzastre \circ	Sain	X	X	X	X	X	X	X	X
Euro -	Sain	X	X	X	Adoption				
Ezut \times	Sain	X	X	X	X	Adoption			
Ego \diamond	Sain	Nr	X	X	X	Adoption			
E.T. \times	GRMD	X	X	X	X	X	Décès à 6 mois - anesthésie		
Ebim \bullet	GRMD	X	X	X	X	Décès à 6 mois – euthanasie perte locomotion			
Exon \blacklozenge	GRMD	X	X	X	X	Décès à 6 mois – euthanasie perte locomotion			
Eiffel +	GRMD	X	X	X	X	X	X	X	Décès à 8.5 mois – euthanasie perte locomotion + digestif
Einstein \times	GRMD	X	X	X	X	Décès à 5.5 mois – euthanasie perte locomotion			
Ercule \blacktriangle	GRMD	X	X	X	X	X	X	X	Décès à 8 mois - bronchopneumonie
Eboum \blacksquare	GRMD	X	X	X	X	X	nr	X	X
Ebam -	GRMD	X	X	X	X	X	X	X	X
Eaudvy -	GRMD	X	X	X	X	X	X	nr	X
Eop \bullet	GRMD	X	X	X	X	Décès à 6 mois – euthanasie perte locomotion			

Dans la première colonne figurent les symboles utilisés pour chaque animal dans les graphes. Pour chaque âge, sont indiqués les tests réalisés. Les cases dans lesquelles figure un « X » correspondent aux tests pour lesquels les données sont disponibles. Les cases grisées correspondent aux tests pour lesquels il y a absence de donnée. L'absence de donnée est justifiée dans la case grisée. Abréviation : nr : non réalisé.

Analyse statistique

Une ANOVA à mesures répétées a été effectuée sur les données obtenues chez les chiens sains et GRMD entre 2 et 5 mois (4 tests). Cette restriction de tranche d'âge pour l'analyse a été justifiée par le fait qu'à 6, 7, 8 et 9 mois, seuls deux chiens sains ont pu être testés. L'ANOVA à mesures répétées a été effectuée afin de déterminer l'effet de l'âge et l'effet du groupe (sain versus GRMD) sur l'évolution des deux variables considérées entre 2 et 5 mois. Etant donné le faible nombre d'individus étudiés, le niveau de significativité a été fixé à $p = 0.05$.

b) Spirométrie

Déroulement des tests

Les tests se sont déroulés conformément à la procédure décrite pour les chiens adultes.

Variables calculées à partir des courbes débit-volume

L'ensemble des variables évaluées chez l'adulte ont été étudiées chez les animaux en croissance.

Animaux

Cinq chiens sains et 12 chiens GRMD ont été inclus dans cette étude.

Déroulement de l'étude

L'objectif de cette étude était de déterminer l'évolution des paramètres de spirométrie, démontrés comme pertinents chez l'adulte, chez des chiots en croissance, de l'âge de 2 mois à l'âge de 9 mois. Les variables n'ayant pas démontré de différence entre chiens sains et GRMD adultes ont malgré cela été analysées, afin de ne pas négliger l'éventualité d'une présentation précoce du déficit respiratoire qui pourrait éventuellement différer de la présentation plus tardive précédemment décrite. Huit tests étaient planifiés, soit un test par mois. Dans le tableau 10, figure le détail des tests réalisés par animal.

Tableau 10 : Spirométrie – animaux inclus dans le suivi longitudinal

Nom	Statut	Age (mois)								
		2	3	4	5	6	7	8	9	
Dzer 	Sain	X	X	nr	X	X	X	X	X	
Dzastre 	Sain	X	X	nr	X	X	X	X	X	
Ego 	Sain	nr	nr	X	X	Adoption				
Euro 	Sain	nr	X	X	Adoption					
Ezut 	Sain	na	X	X	X	Adoption				
Ebam 	GRMD	X	X	X	X	X	X	X	X	
Eboum 	GRMD	na	X	X	X	X	X	X	X	
Eaudvy 	GRMD	na	X	X	X	X	X	X	X	
Ebim 	GRMD	X	X	X	X	Décès à 6 mois – euthanasie perte locomotion				
E.T. 	GRMD	na	X	X	X	X	Décès à 6 mois – anesthésie			
Ehouaf 	GRMD	nr	X	X	X	X	Suivi en cours			
Eiffel 	GRMD	X	X	X	X	X	X	X	Décès à 8.5 mois – euthanasie perte locomotion + digestif	
Einstein 	GRMD	na	X	X	X	Décès à 5.5 mois – euthanasie perte locomotion				
Eop 	GRMD	X	X	X	X	X	Décès à 6 mois – euthanasie perte locomotion			
Ercule 	GRMD	na	X	X	X	X	X	X	Décès à 8 mois - bronchopneumonie	
Evian 	GRMD	X	X	X	X	Décès à 6 mois – euthanasie perte locomotion				
Exon 	GRMD	X	X	nr	X	X	Décès à 6 mois – euthanasie perte locomotion			

A la droite du nom de chaque chien, figure le symbole qui lui correspond, employé dans les graphes des figures 17 à 19. Les cases dans lesquelles figure un « X » correspondent aux tests pour lesquels les données sont disponibles. Les cases grisées correspondent aux tests pour lesquels il y a absence de donnée. L'absence de donnée est justifiée dans la case grisée. Abréviation : nr : non réalisé ; na : non analysable

Analyse statistique

Une ANOVA à mesures répétées a été effectuée sur les données obtenues chez les chiens sains et GRMD entre 2 et 5 mois (4 tests). Cette restriction de tranche d'âge pour l'analyse a été justifiée par le fait qu'à 6, 7, 8 et 9 mois, seuls deux chiens sains ont pu être testés, comme c'est le cas pour la cinématique diaphragmatique. L'ANOVA à mesures répétées a été effectuée afin de déterminer l'effet de l'âge et l'effet du groupe (sain versus GRMD) sur l'évolution des variables considérées entre 2 et 5 mois. Etant donné le faible nombre d'individus étudiés, le niveau de significativité a été fixé à $p = 0.05$.

Une matrice de corrélation de Pearson a été effectuée, afin d'étudier les corrélations éventuelles existant entre les différentes variables, de spirométrie ou de cinématique diaphragmatiques.

Afin de déterminer, chez les chiens en croissance, la pertinence de l'index respiratoire, décrit chez les animaux adultes, celui-ci a été calculé, par détermination de la distance euclidienne des chiens GRMD au barycentre de la position des chiens sains du même âge. Dans cet objectif, tous ces animaux ont été projetés, en tant qu'individus supplémentaires, sur le plan d'analyse en composantes principales (ACP) défini par les 5 chiens sains et 7 chiens GRMD adultes. Ce plan d'ACP a été défini par ces 12 individus décrits par 5 variables : la distance parcourue par le diaphragme entre fin d'inspiration et fin d'expiration, l'angle de rétraction diaphragmatique, le débit inspiratoire de pointe, et les débits expiratoires à 50 % et 75 % du volume expiré, normalisés par le débit expiratoire de pointe. Cet index a, comme les autres variables, été soumis à une analyse de variance à mesures répétées.

2) Résultats

a) Cinématique diaphragmatique

Chez les chiens GRMD, tous les tests prévus ont été réalisés, à l'exception d'un test sur Eboum (7 mois) et d'un test sur Eaudvy (8 mois). Par ailleurs, 7 des dix chiens GRMD sont décédés avant la fin du suivi. Parmi ces animaux, quatre chiens ont des données complètes

jusqu'à 5 mois, un chien jusqu'à 6 mois, et deux jusqu'à 8 mois. Seuls 3 chiens GRMD ont donc pu être suivis jusqu'à l'âge de 9 mois (tableau 9)

Le suivi longitudinal, débuté sur 3 des 5 chiens sains, a été interrompu par leur départ du chenil. C'est pourquoi l'analyse statistique ne porte que sur l'intervalle 2-5 mois. Les résultats obtenus de 6 à 9 mois seront néanmoins présentés.

Distance parcourue par le diaphragme

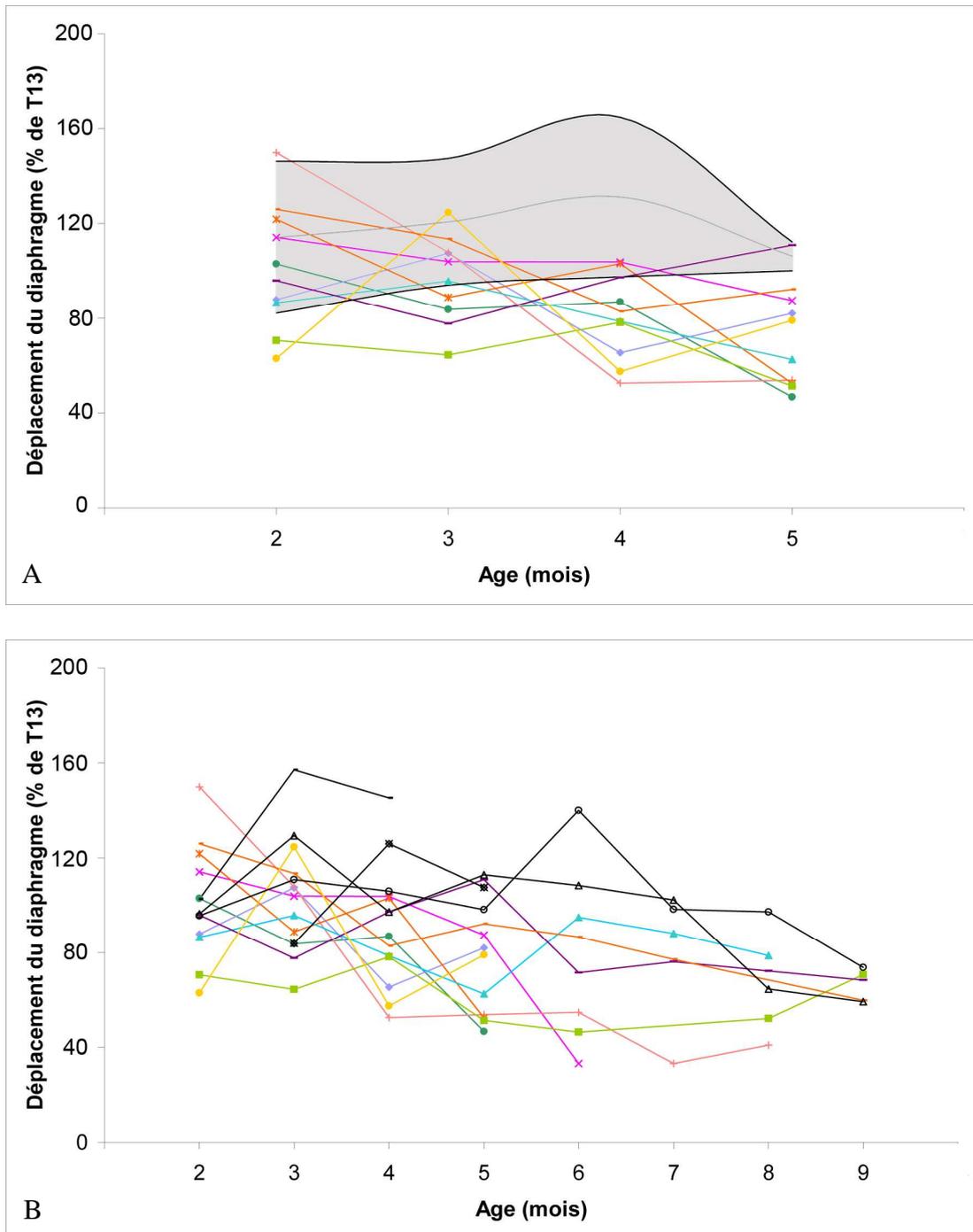
Chez les animaux sains, aucun effet de l'âge ($p = 0.7426$) n'a été mis en évidence entre l'âge de 2 mois et l'âge de 5 mois. La distance moyenne parcourue par le diaphragme entre fin d'inspiration et fin d'expiration, sur ce créneau d'âge et dans ce groupe, est comprise entre 106.2 % (écart-type 6.1 %) et 131.2 % (écart-type 33.6 %) de la treizième vertèbre thoracique. Chez les chiens GRMD par contre, une diminution significative ($p = 0.0116$) de cette variable avec l'âge est détectée par l'analyse de variance à mesures répétées entre 2 et 5 mois. La différence entre chiens sains et chiens GRMD, non significative à 2 ($p = 0.4730$) et à 3 mois ($p = 0.0590$), le devient à 4 mois ($p = 0.0020$), et persiste à 5 mois ($p = 0.0097$). Cette chute de mobilité diaphragmatique dès quatre mois est illustrée par le graphe A de la figure 15. La différence entre les deux populations semble se maintenir jusqu'à 9 mois (figure 15 B), même si l'analyse statistique n'a pas pu être menée jusqu'à cet âge. Les chiens GRMD examinés tardivement montrent une diminution progressive de leur mobilité diaphragmatique, à l'exception d'un chien (Eboum), qui récupère une meilleure mobilité à partir de 8 mois.

Les résultats de l'analyse statistique, ainsi que les moyennes et écarts-types obtenus pour les deux populations à chaque âge, sont présentés dans le tableau 11.

Tableau 11 : Cinématique diaphragmatique – distance parcourue par le diaphragme : suivi longitudinal – résultats de l’analyse statistique

Age (mois)	Moy (ET) sains	Moy (ET) GRMD	Effet groupe
2	114.2 % (32.0 %)	101.9 % (26.7 %)	p = 0.4730
3	120.7 % (26.7 %)	96.8 % (18.3 %)	p = 0.0590
4	131.2 % (33.6 %)	80.6 % (18.1 %)	p = 0.0020
5	106.2 % (6.1 %)	71.8 % (21.6 %)	p = 0.0097
6	124.2 % (22.4 %)	64.6 % (24.0 %)	-
7	100.3 % (2.8 %)	68.7 % (24.3 %)	-
8	80.9 % (23.2 %)	61.0 % (17.5 %)	-
9	66.4 % (10.3 %)	66.3 % (5.7 %)	-

Figure 15 : Cinématique diaphragmatique – évolution de la distance parcourue par le diaphragme avec l'âge chez les chiens GRMD, en comparaison des chiens sains.



A : évolution de la distance parcourue par le diaphragme chez les chiens GRMD de 2 à 5 mois, en comparaison de la moyenne des valeurs obtenues chez les chiens sains (ligne grise) ± 1 écart-type (espace grisé) B : évolution de cette même variable, chez les chiens GRMD de 2 à 9 mois, en comparaison des chiens sains. Les individus sont représentés par leurs propres symboles, qui figurent dans le tableau 9.

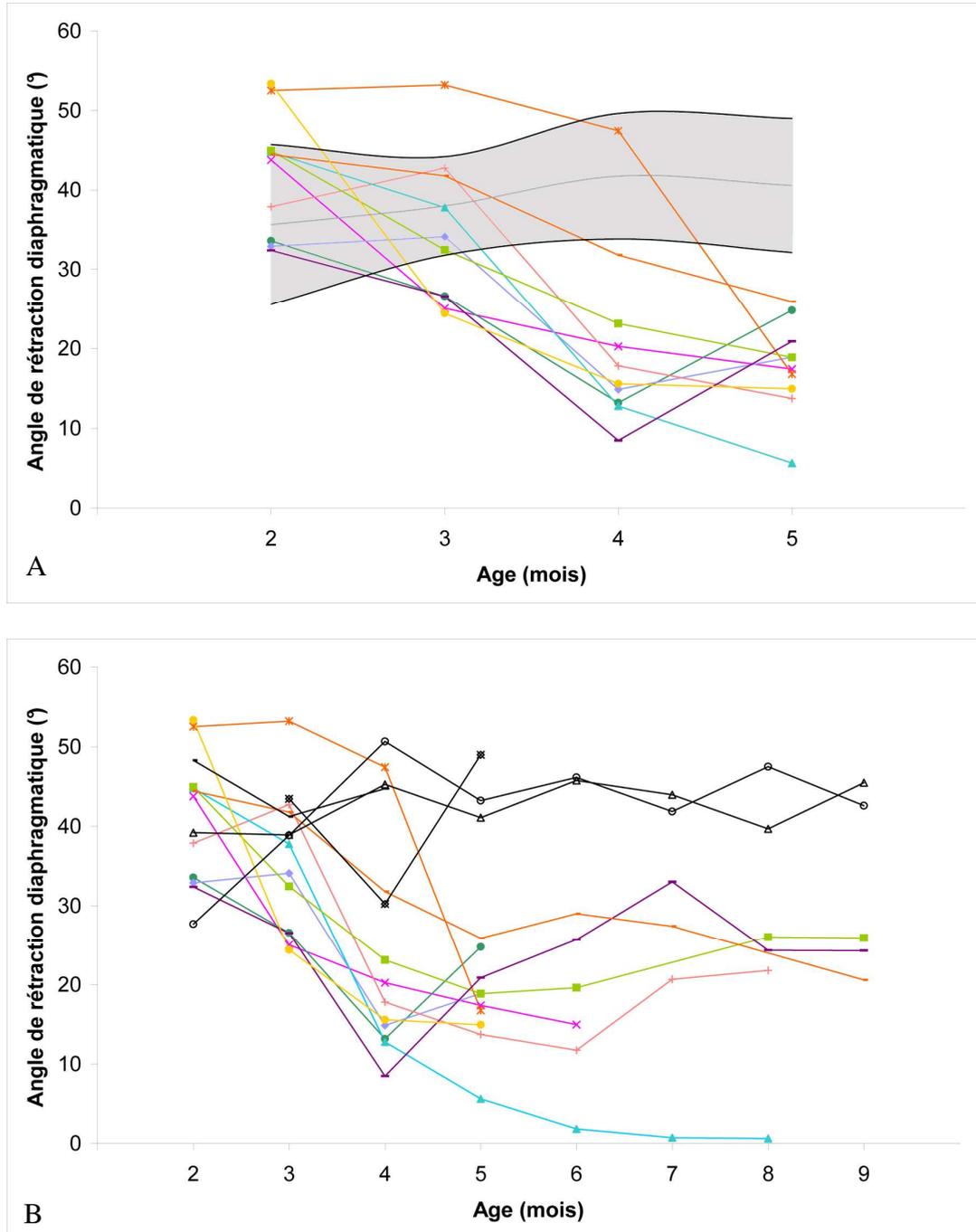
Index de rétraction caudale du diaphragme

Chez les animaux sains, la valeur de l'angle qui constitue l'index de rétraction diaphragmatique montre une discrète augmentation avec l'âge ($p = 0.0360$). Le diaphragme devient donc légèrement plus crânial avec l'âge, l'angle passant d'une valeur moyenne de 35.6° (écart-type : 10.1°) à deux mois, à 40.6° (8.4°) à 5 mois. *A contrario*, chez les chiens GRMD, cet index diminue très significativement avec l'âge ($p < 0.0001$), sur cette même période. Si aucune différence entre les deux populations n'est observée à deux et à trois mois, l'écart se creuse progressivement pour devenir significatif à 4 mois ($p = 0.0027$), et très significatif à 5 mois ($p < 0.0001$). La valeur moyenne de cet index chez les chiens GRMD passe en effet de 42.1° (écart-type 7.7°) à 2 mois, à 17.8° (écart-type 5.8°) à 5 mois. Les graphes A et B de la figure 16 illustrent nettement le recul du diaphragme entre 2 et 5 mois, puisqu'à cet âge il n'existe plus de superposition de valeurs entre les deux populations. En dépit de l'absence d'analyse statistique entre 6 et 9 mois, le graphe B de la figure 16 montre un maintien de la valeur de cet index pour les animaux suivis tardivement. Les résultats de l'analyse statistique, ainsi que les moyennes et écarts-types obtenus pour les deux populations à chaque âge, sont présentés dans le tableau 12.

Tableau 12 : Cinématique diaphragmatique – index de rétraction diaphragmatique : suivi longitudinal – résultats de l'analyse statistique

Age (mois)	Moy (ET) sains	Moy (ET) GRMD	Effet groupe
2	35.6° (10.1°)	42.1° (7.7°)	$p = 0.2170$
3	38.0° (6.2°)	34.5° (9.4°)	$p = 0.4680$
4	41.7° (7.9°)	20.5° (11.5°)	$p = 0.0027$
5	40.6° (8.4°)	17.8° (5.8°)	$p < 0.0001$
6	46.0° (0.27°)	17.2° (9.9°)	-
7	42.9° (1.5°)	20.5° (14.1°)	-
8	43.6° (5.5°)	18.2° (11.8°)	-
9	44.1° (2.0°)	23.6° (2.7°)	-

Figure 16 : Cinématique diaphragmatique – évolution de l'index de rétraction diaphragmatique avec l'âge chez les chiens GRMD, en comparaison des chiens sains.



A : évolution de l'angle de rétraction diaphragmatique chez les chiens GRMD de 2 à 5 mois, en comparaison de la moyenne des valeurs obtenues chez les chiens sains (ligne grise) ± 1 écart-type (espace gris) B : évolution de cette même variable, chez les chiens GRMD de 2 à 9 mois, en comparaison des chiens sains. Les individus sont représentés par leurs propres symboles, qui figurent dans le tableau 9

b) Spirométrie

Le test s'est montré réalisable et bien toléré chez de jeunes animaux. Néanmoins, certaines courbes débit-volume n'ont pas pu être analysées (voir tableau 10). En effet, à l'âge de deux mois, ceci a été le cas pour cinq chiens GRMD sur 11 testés, et un chien sain sur trois. A ce jeune âge, les débits sont faibles et le système spirométrique utilisé s'est montré peu sensible à la détection de cycles respiratoires chez ces petits animaux, ce qui a entraîné des erreurs du logiciel d'analyse sur la sélection des courbes débit-volume. De telles courbes aberrantes n'ont donc pas pu être analysées. Ce problème ne s'est pas représenté au temps suivants.

L'ensemble des résultats obtenus pour les variables listées pour les chiens adultes (23 variables) a été analysé, afin de déterminer si des variables non modifiées chez l'adulte pouvaient subir des modifications à des stades précoces, et afin d'étudier l'évolution des variables démontrées comme modifiées chez les adultes.

L'analyse de variance a démontré que seules les variables modifiées chez l'adulte le sont également chez les chiots, et subissent des modifications liées à l'âge. Seuls les résultats obtenus pour ces variables seront donc présentés.

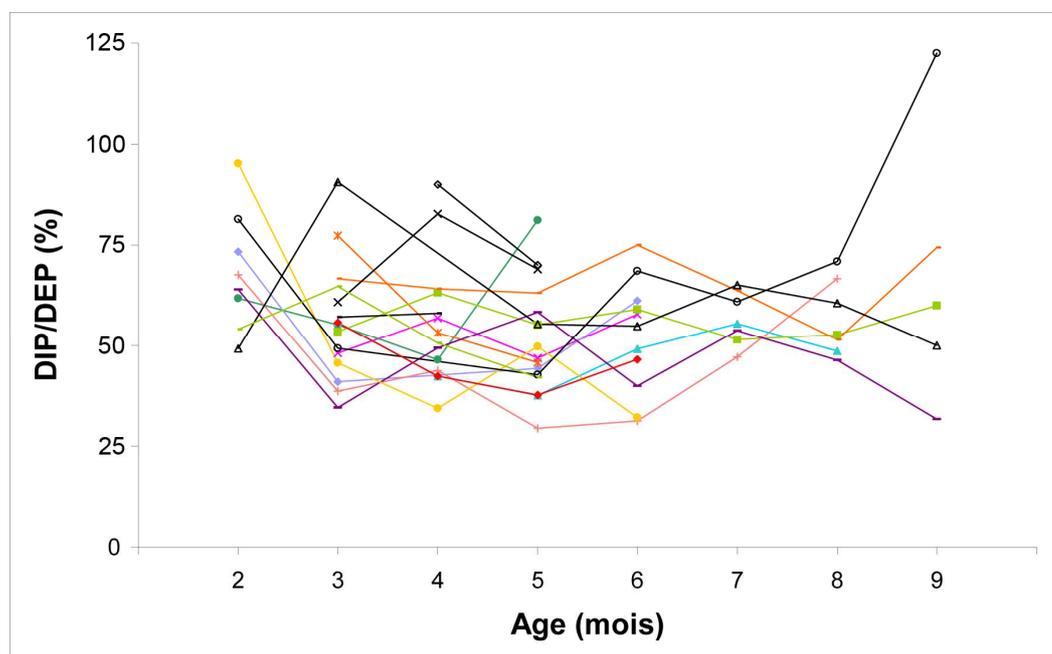
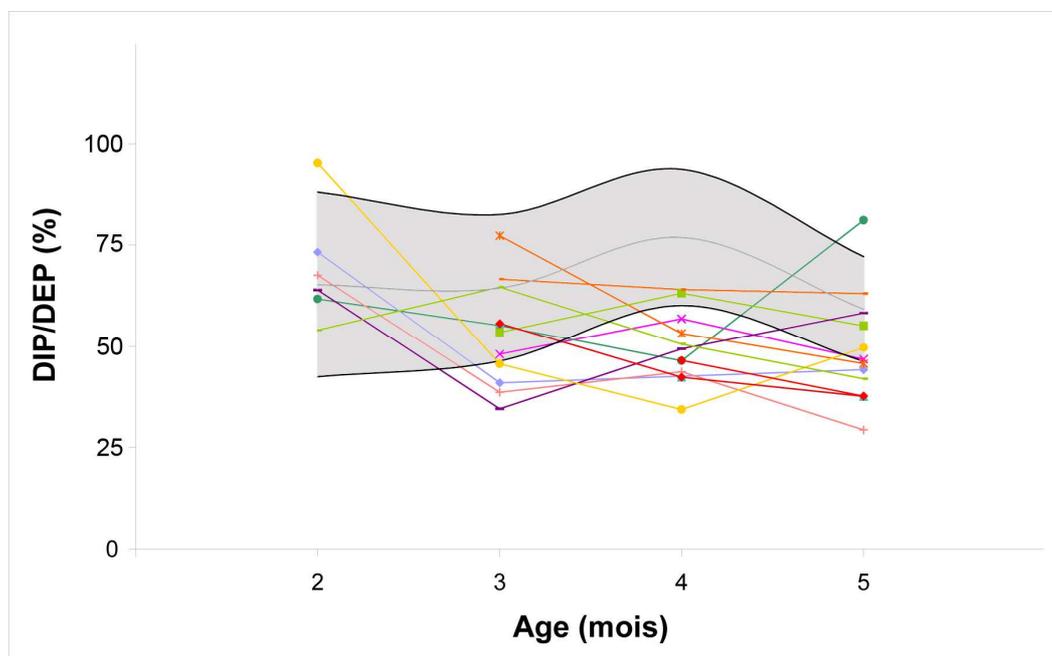
Le débit inspiratoire de pointe normalisé par le débit expiratoire de pointe (DIP/DEP)

Le débit inspiratoire de pointe, exprimé en pourcentage du débit expiratoire de pointe, ne subit pas d'effet significatif ($p = 0.1101$) de l'âge chez les chiens GRMD de 2 à 5 mois. Les valeurs moyennes obtenues pour les chiens sains (tableau 13) sont comparables à celles rapportées plus haut pour les animaux adultes sains (63.0 %, écart-type : 11.1 %). Par contre, la moyenne des valeurs obtenues chez les chiens GRMD (tableau 13) est moins basse que celle des chiens adultes qui était de 44.0 % (écart-type 15.2 %). Ainsi, l'analyse de variance réalisée entre 2 et 5 mois ne révèle une différence significative entre les deux groupes qu'à l'âge de 4 mois ($p = 0.0022$). Les graphes de la figure 17 illustrent le fait que cette variable montre une tendance à la diminution chez les chiens GRMD, avec bien souvent, comme cela était également le cas chez les chiens adultes, une zone de superposition des deux populations. Au sein de la population de chiens GRMD à 9 mois, seul un animal (Ebam) atteint une valeur située dans la tranche basse de celles observées chez les adultes (31.7 %). L'hypothèse selon laquelle la chute de DIP/DEP serait un évènement tardif pourrait donc être formulée.

Tableau 13 : Spirométrie – suivi longitudinal – résultats de l'analyse statistique pour le ratio DIP/DEP

Age (mois)	Moy (ET) sains	Moy (ET) GRMD	Effet groupe
2	65.3 % (22.8 %)	69.3 % (14.2 %)	$p = 0,7663$
3	64.5 % (18.1 %)	52.8 % (12.5 %)	$p = 0.1756$
4	76.9 % (16.7 %)	50.4 % (9.2 %)	$p = 0.0022$
5	59.3 % (12.9 %)	50.3 % (13.8 %)	$p = 0.2222$
6	61.7 % (9.7 %)	50.7 % (14.5 %)	-
7	63.0 % (2.9 %)	54.3 % (6.1 %)	-
8	65.8 % (7.3 %)	53.2 % (8.0 %)	-
9	86.2 % (51.2 %)	55.4 % (21.7 %)	-

Figure 17 : Spirométrie – Evolution du débit inspiratoire de pointe, normalisé par le débit expiratoire de pointe chez les chiens GRMD, en comparaison des chiens sains.



A : évolution du débit inspiratoire de pointe normalisé par le débit expiratoire de pointe chez les chiens GRMD de 2 à 5 mois, en comparaison de la moyenne des valeurs obtenues chez les chiens sains (ligne grise) ± 1 écart-type (espace grisé) B : évolution de cette même variable, chez les chiens GRMD de 2 à 9 mois, en comparaison des chiens sains. Les individus sont représentés par leurs propres symboles, qui figurent dans le tableau 10.

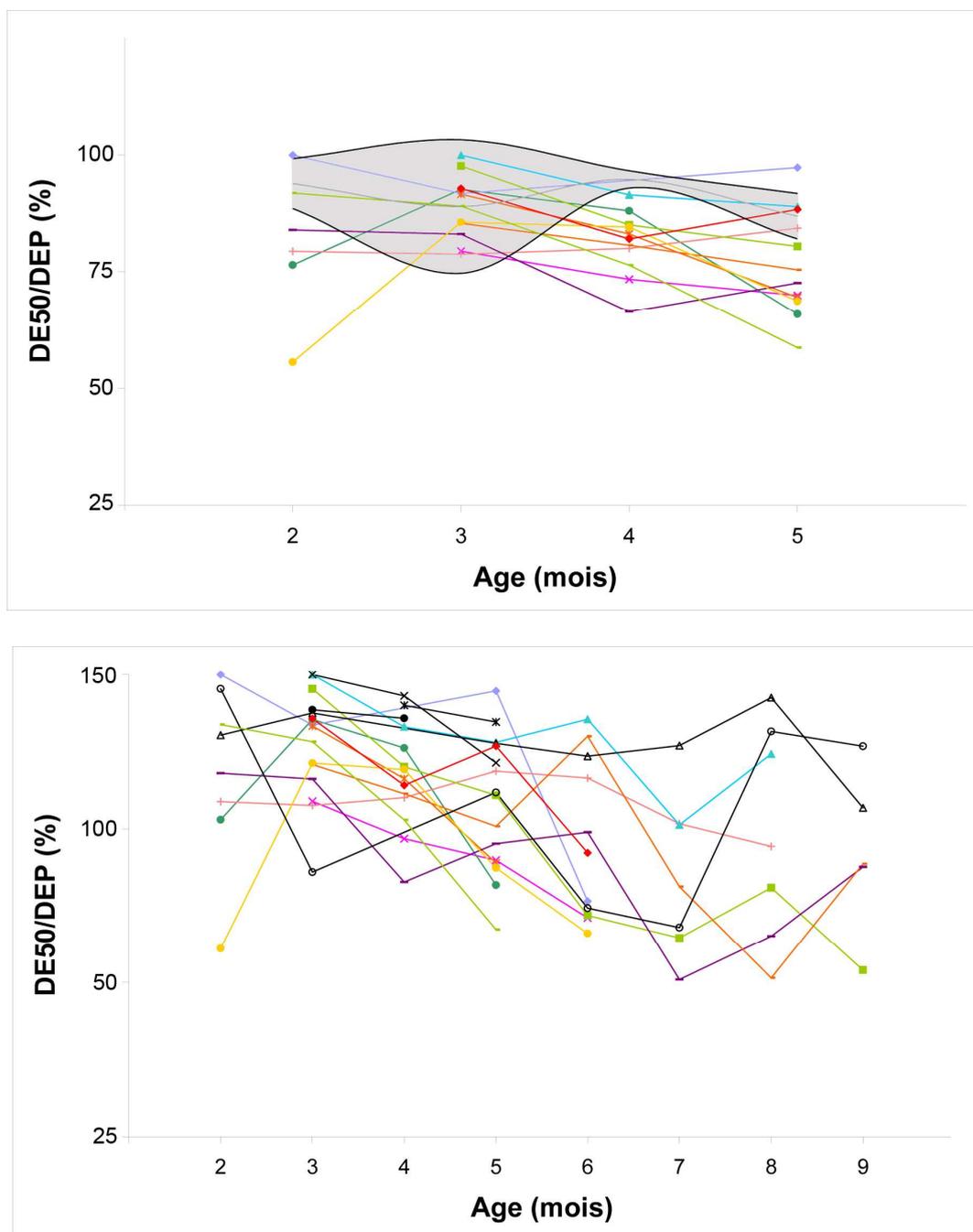
Le débit expiratoire à 50 % du volume expiré, normalisé par le débit expiratoire de pointe (DE50/DEP)

Le ratio du débit expiratoire à 50 % du volume expiré sur le débit expiratoire de pointe, démontré comme discrètement diminué chez les chiens GRMD adultes, montre chez les jeunes chiens GRMD le même type de modification. Si l'effet de l'âge n'est pas significatif ($p = 0.1853$) sur l'évolution de cette variable, il apparaît, à la lecture des graphes de la figure 18, que les chiens GRMD se situent le plus souvent sous la population de chiens sains, dès l'âge de 4 mois, âge auquel la diminution de D50/DEP est significative ($p = 0.0065$).

Tableau 14 : Spirométrie – suivi longitudinal – résultats de l'analyse statistique pour le ratio DE50/DEP

Age (mois)	Moy (ET) sains	Moy (ET) GRMD	Effet groupe
2	93.9 % (5.3 %)	81.2 % (15.2 %)	$p = 0.3112$
3	89.0 % (14.3 %)	88.7 % (6.7 %)	$p = 0.9985$
4	94.8 % (1.8 %)	80.9 % (6.7 %)	$p = 0.0065$
5	86.9 % (4.8 %)	75.6 % (11.3 %)	$p = 0.1062$
6	74.4 % (17.4 %)	72.9 % (13.3 %)	
7	73.7 % (20.9 %)	65.0 % (11.2 %)	
8	93.5 % (3.9 %)	66.6 % (14.0 %)	
9	83.4 % (7.1 %)	63.4 % (9.9 %)	

Figure 18 : Spirométrie – évolution du débit expiratoire à 50 % du volume expiré, normalisé par le débit expiratoire de pointe avec l'âge chez les chiens GRMD en comparaison des chiens sains.



A : évolution du débit expiratoire à 50 % du volume expiré, normalisé par le débit expiratoire de pointe chez les chiens GRMD de 2 à 5 mois, en comparaison de la moyenne des valeurs obtenues chez les chiens sains (ligne grise) ± 1 écart-type (espace grisé) B : évolution de cette même variable, chez les chiens GRMD de 2 à 9 mois, en comparaison des chiens sains. Les individus sont représentés par leurs propres symboles, qui figurent dans le tableau 10.

Suivant l'évolution décrite pour le ratio DE50/DEP, le ratio DE50/DE25 diminue progressivement avec l'âge (effet âge significatif $p = 0.0361$). La différence est également non significative à 2 et 3 mois, pour devenir significative à 4 ($p = 0.0002$) et 5 ($p = 0.0212$) mois.

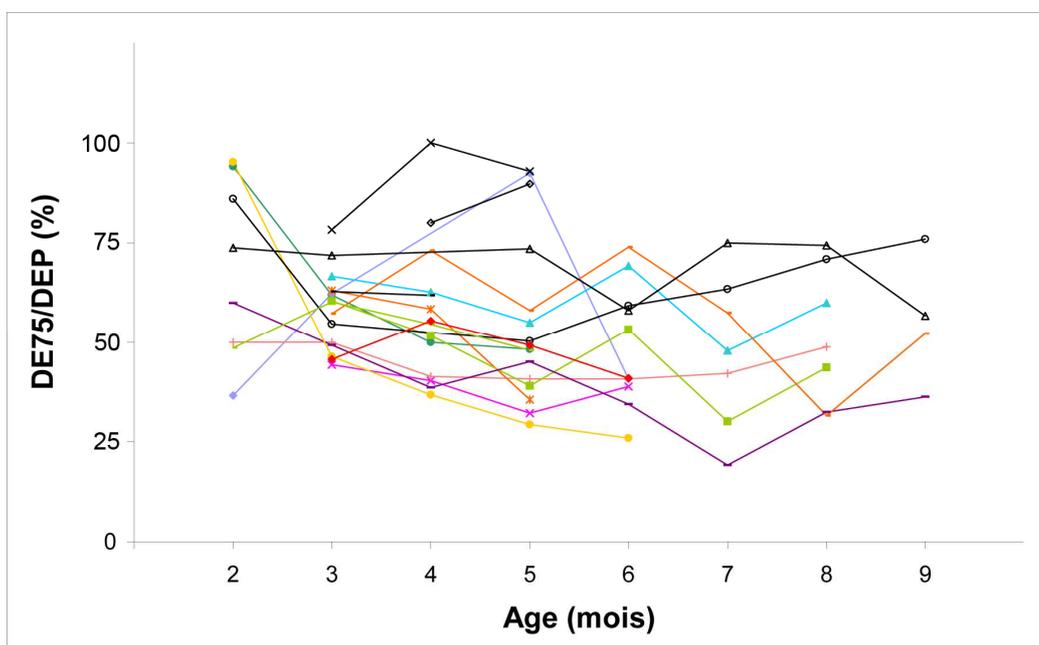
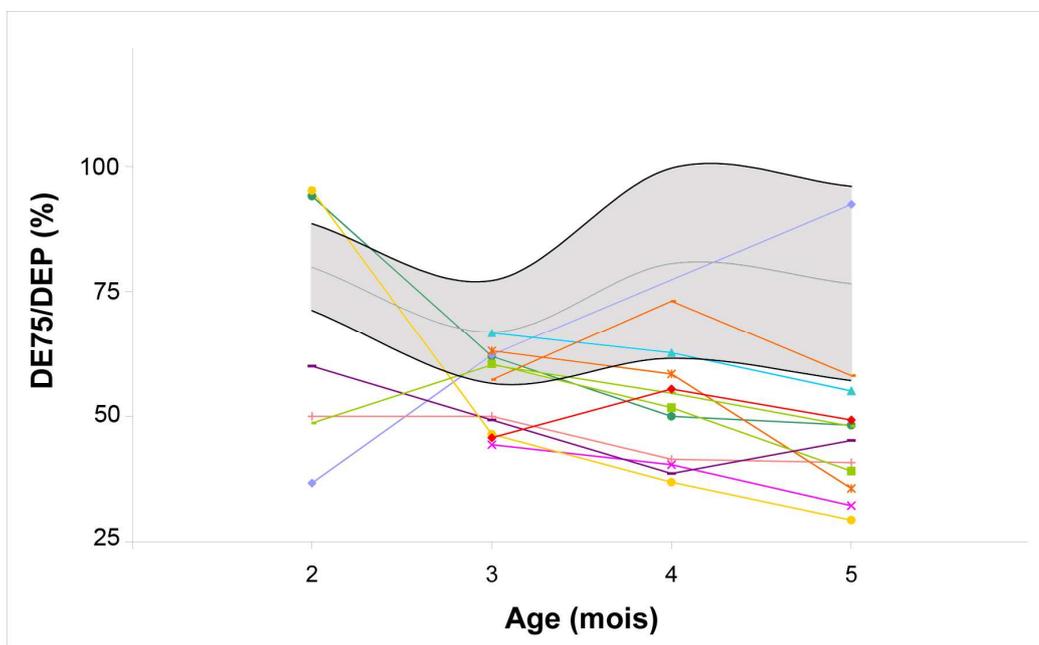
Le débit expiratoire à 75 % du volume expiré, normalisé par le débit expiratoire de pointe (DE75/DEP)

Le débit expiratoire à 75 % du volume expiré, normalisé par le débit expiratoire de pointe, significativement diminué chez le chien GRMD adulte ($p = 0.0008$), n'est, à l'âge de deux mois, pas modifié chez le chien GRMD. Cependant, ce ratio diminue significativement avec l'âge ($p = 0.0256$) chez les chiens GRMD, et la différence avec les valeurs obtenues chez les chiens sains est significative à partir de 3 mois ($p = 0.0377$), différence qui s'accroît par la suite, comme le montrent les résultats de l'analyse statistique figurant dans le tableau 15, ainsi que les graphes de la figure 19.

Tableau 15 : Spirométrie – suivi longitudinal – résultats de l'analyse statistique pour le ratio DE75/DEP

Age (mois)	Moy (ET) sains	Moy (ET) GRMD	Effet groupe
2	79.9 % (8.7 %)	64.1 % (24.8 %)	$p = 0.4310$
3	66.9 % (10.3 %)	56.6 % (7.9 %)	$p = 0.0377$
4	80.6 % (19.0 %)	50.8 % (11.3 %)	$p = 0.0044$
5	76.6 % (19.5 %)	47.6 % (16.6 %)	$p = 0.0117$
6	58.7 % (0.9 %)	47.2 % (16.0 %)	-
7	69.2 % (8.2 %)	39.4 % (15.0 %)	-
8	72.6 % (2.4 %)	43.3 % (11.9 %)	-
9	66.4 % (13.6 %)	40.2 % (10.7 %)	-

Figure 19 : Spirométrie – évolution du débit expiratoire à 75 % du volume expiré, normalisé par le débit expiratoire de pointe avec l'âge chez les chiens GRMD en comparaison des chiens sains.



A : évolution du débit expiratoire à 50 % du volume expiré, normalisé par le débit expiratoire de pointe chez les chiens GRMD de 2 à 5 mois, en comparaison de la moyenne des valeurs obtenues chez les chiens sains (ligne grise) ± 1 écart-type (espace grisé) B : évolution de cette même variable, chez les chiens GRMD de 2 à 9 mois, en comparaison des chiens sains. Les individus sont représentés par leurs propres symboles, qui figurent dans le tableau 10

Le ratio DE75/DE25, exprimant le débit expiratoire à 75 % du volume expiré, en pourcentage du débit expiratoire à 25 % du volume expiré, montre le même type d'évolution que le ratio DE75/DEP. Cependant, l'effet de l'âge sur l'évolution de cet index n'est pas significatif ($p = 0.0564$), et la différence avec la population de chiens sains ne devient significative qu'à l'âge de 4 mois ($p = 0.0002$).

Etude de corrélation entre variables

La matrice de corrélation de Pearson, effectuée sur les chiens GRMD en croissance, montre quelques corrélations significatives. Ainsi, comme le montrent les résultats énoncés dans le tableau 16, l'angle de rétraction diaphragmatique est significativement corrélé avec la distance parcourue par le diaphragme, le débit inspiratoire et le débit à 75 % du volume expiré, rapportés au débit expiratoire de pointe. Il existe également des corrélations entre variables spirométriques : le débit expiratoire à 75 % du volume expiré, normalisé par le débit expiratoire de pointe, est corrélé au débit inspiratoire de pointe et au débit expiratoire à 50 % du volume expiré normalisés par le débit expiratoire de pointe. Par contre, aucune corrélation n'est démontrée entre la distance parcourue par le diaphragme entre fin d'inspiration et fin d'expiration et les variables spirométriques. Il est également important de noter que les corrélations, certes significatives, mises en évidence, restent faibles puisque le coefficient de Pearson le plus élevé est de 0.45 (corrélation entre angle de rétraction diaphragmatique et DIP/DEP).

Tableau 16 : Corrélations entre variables de cinématique diaphragmatique et de spirométrie. Résultats des coefficients de corrélation de Pearson.

	Distance	Angle	DIP/DEP	DE50/DEP	DE75/DEP
Distance		0.32 (p = 0.0223)	0.06 (0.6693)	0.19 (p = 0.1734)	0.21 (p = 0.1386)
Angle	0.32 (p = 0.0223)		0.45 (p = 0.0010)	-0.12 (p = 0.3937)	0.28 (p = 0.0449)
DIP/DEP	0.06 (p = 0.6693)	0.45 (p = 0.0010)		-0.06 (p = 0.6613)	0.38 (p = 0.0056)
DE50/DEP	0.19 (p = 0.1734)	-0.12 (p = 0.3937)	-0.06 (p = 0.6613)		0.35 (p = 0.0124)
DE75/DEP	0.21 (p = 0.1386)	0.28 (p = 0.0449)	0.38 (p = 0.0056)	0.35 (p = 0.0124)	

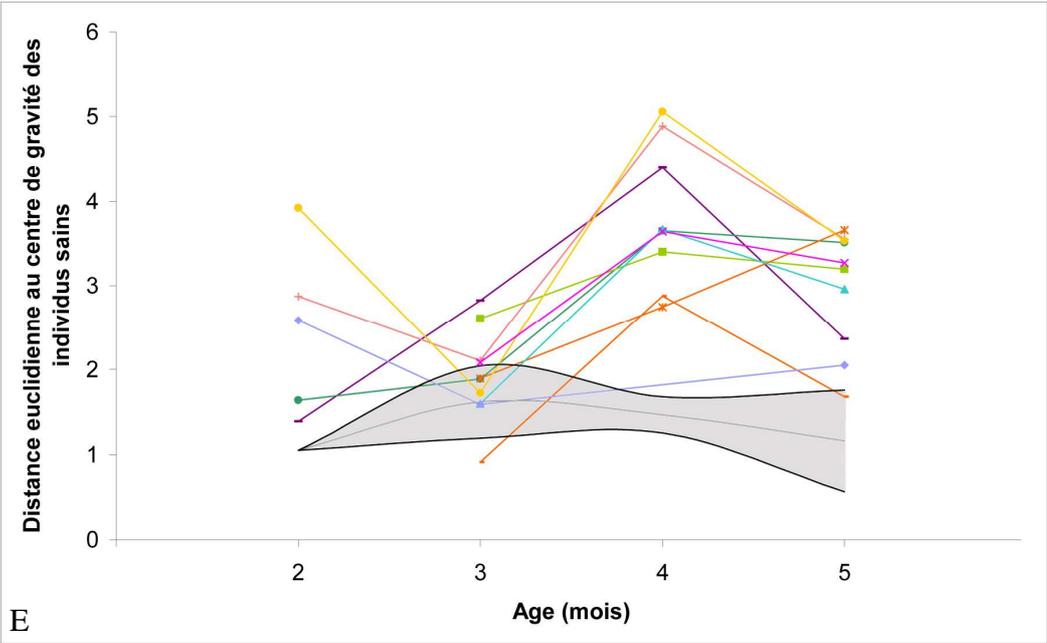
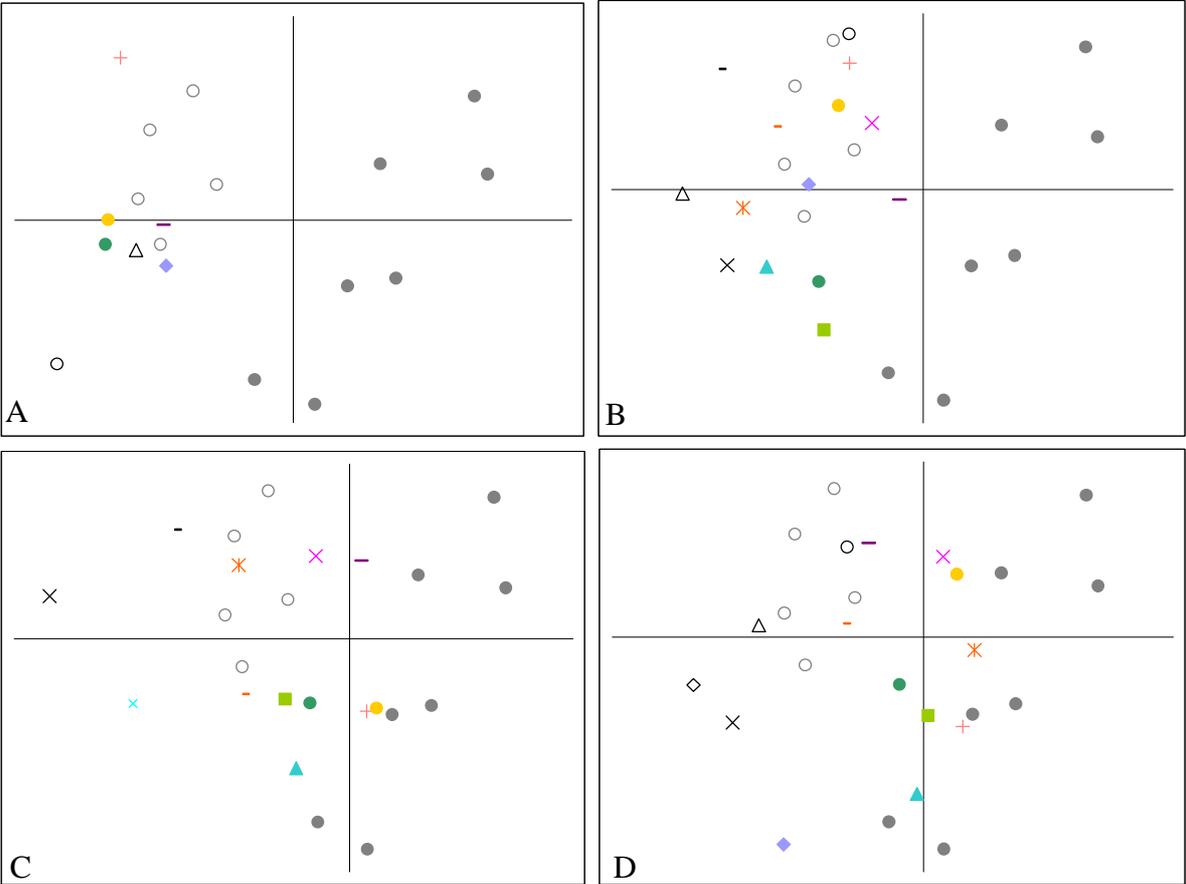
Analyse en composantes principales - index respiratoire

La distance euclidienne entre la position de chaque individu, projeté comme individu supplémentaire sur le plan d'ACP défini par les animaux adultes, et le centre de gravité des positions des chiens sains du même âge a été calculée et nommée index respiratoire. Cet index permet de situer chaque individu, en fonction des valeurs obtenues à un âge donné, pour chacune des cinq variables d'intérêt considérées, obtenues par les deux méthodes d'évaluation que sont cinématique diaphragmatique et spirométrie. Comme pour la plupart des variables étudiée individuellement, cet index n'est pas significativement modifié aux temps précoces de la maladie. Il devient significativement augmenté chez les chiens GRMD à partir de 4 mois ($p = 0.0007$), comme le montrent les résultats de l'analyse statistique figurant dans le tableau 17. Les graphes de la figure 20 illustrent également cette évolution : à 2 et à 3 mois (graphes A et B), les points représentant les individus GRMD se superposent à la population de chiens sains, pour se diriger vers, voire rejoindre, le nuage de points des chiens GRMD adultes à 4 et à 5 mois (graphes C et D). L'augmentation de cet index avec l'âge chez les chiens GRMD est d'ailleurs significative (effet âge : $p = 0.0055$).

Tableau 17 : Index respiratoire – résultats de l'analyse statistique chez les chiens en cours d'évolution, de 2 à 5 mois.

Age (mois)	Moy (ET) sains	Moy (ET) GRMD	Effet groupe
2	1.05 (0)	2.48 (1.02)	$p = 0.1188$
3	1.52 (0.43)	1.92 (0.54)	$p = 0.2120$
4	1.47 (0.21)	3.81 (0.81)	$p = 0.0007$
5	1.16 (0.60)	2.98 (0.70)	$p = 0.0007$

Figure 20 : Analyse en composantes principales – projection des chiens en croissance – évolution de l’index respiratoire entre 2 et 5 mois.



A à D : projection des chiens en croissance sur le plan d'ACP défini par les adultes. La composante 1 (axe horizontal) représente 64.43% de la variance, la composante 2 (axe vertical) 20.13 %. Les chiens GRMD adultes sont représentés par des cercles gris pleins, les chiens sains adultes par des cercles gris vides. Chaque chien en croissance est représenté par son propre symbole (tableaux 9 et 10). A : projection des chiens de 2 mois ; B : projection des chiens de 3 mois ; C : projection des chiens de 4 mois ; D : projection des chiens de 5 mois. Le graphe E représente l'évolution entre deux et cinq mois, pour chaque chien GRMD, de l'index respiratoire, calculé par mesure de la distance euclidienne au centre de gravité des chiens sains du même âge, en comparaison de la moyenne (ligne grise) \pm un écart-type (espace grisé) des valeurs obtenues chez les chiens sains.

D. Discussion

Chez le chien GRMD, une dysfonction musculaire respiratoire est présente, comme en témoignent certains signes cliniques tels que polypnée après un exercice modéré, ou encore discordance, également exacerbée par l'exercice, qui s'installent chez tous les individus atteints, dès quelques mois d'évolution (Valentine et al. 1988). Souvent décrit à l'aide de ces signes cliniques, le déficit de la fonction respiratoire n'a toutefois jamais été quantifié dans ce modèle. L'importance clinique que revêt cette fonction pour les patients, et l'enjeu thérapeutique qu'elle représente, en tant que cause majeure de décès (Manzur et al. 2008), rendent inenvisageable le fait de s'affranchir de l'évaluation de cette fonction dans un modèle pré-clinique tel que le chien GRMD.

Deux méthodes différentes d'évaluation de la fonction respiratoire du chien GRMD ont donc été évaluées, et ont permis d'identifier des variables capables de distinguer de manière quantifiée la fonction respiratoire des chiens GRMD de celle de chiens sains.

La première méthode, nommée cinématique diaphragmatique, et basée sur une analyse d'images radioscopiques, a permis de valider la pertinence de deux variables. L'une, l'index de rétraction caudale du diaphragme, a été calculée afin d'objectiver et de quantifier un recul du diaphragme, classiquement observé sur les clichés radiographiques du thorax de ces animaux (Brumitt et al. 2006). L'autre variable identifiée a été choisie afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle le diaphragme des chiens GRMD serait moins mobile (Brumitt et al. 2006), ce qui est connu chez les patients atteints de DMD (Ayoub et al. 2002). C'est le calcul de cette variable qui a motivé le choix d'employer la radioscopie, méthode utilisée chez

les patients dans le cadre de la détection et du suivi de paralysies diaphragmatiques (Fromageot et al. 2001, Roberts 2009, Toledo et al. 2003). Grâce à ces index, la position anormalement caudale du diaphragme chez les chiens GRMD a été confirmée, associée à une diminution du déplacement de ce muscle durant la respiration. La démonstration a été faite que ces deux anomalies pouvaient être quantifiées à l'aide des index choisis, et ce, de manière répétable, malgré les potentielles variations de positionnement de l'animal au cours de l'acquisition des images.

Le diaphragme, principal muscle inspiratoire (Ayoub et al. 2002, Wilcox and Pardy 1989), montre d'importantes lésions histologiques chez le chien GRMD (Shimatsu et al. 2005, Valentine et al. 1990, Yuasa et al. 2008), même à des stades très précoces (Nguyen et al. 2002), et représente l'un des muscles les plus touchés. Ces modifications histologiques entraînent notamment une diminution du nombre de fibres musculaires, progressivement remplacées par du tissu fibreux ou adipeux (Shimatsu et al. 2005) (Valentine et al. 1990). En relation avec ces lésions, le diaphragme dystrophique présente donc une altération de sa fonction, celle d'assurer une dépression permettant l'inspiration, phase active du cycle respiratoire.

Chez le chien GRMD, une hypokinésie diaphragmatique franche a été mise en évidence. Cette perte de mobilité peut constituer un reflet de l'état lésionnel du diaphragme, de son degré de pseudohypertrophie (Valentine et al. 1990) et de ses propriétés de compliance. Néanmoins, la mesure de mobilité effectuée est probablement biaisée par le recrutement des muscles abdominaux, qui compensent la faiblesse diaphragmatique, par leur contraction en expiration et leur relâchement au moment de l'inspiration (Wilcox and Pardy 1989). La participation de ces muscles peut contribuer à minimiser la perte de mobilité mesurée (Fromageot et al. 2001). Ceci peut être à l'origine de la survenue relativement tardive de l'hypokinésie diaphragmatique, à l'âge de 4 mois. En effet, le diaphragme est lésé bien plus précocement, et la discordance, traduction clinique d'une faiblesse diaphragmatique (Wilcox and Pardy 1989) et du relai pris par les muscles abdominaux, est déjà présente chez beaucoup d'animaux à l'âge de 2 ou 3 mois. Avant l'âge de 4 mois, l'aide de ces muscles est probablement à l'origine d'une mobilité normale ou subnormale du diaphragme au cours du cycle respiratoire, par entraînement passif. Après 4 mois, la contribution de ces muscles ne suffit probablement plus à maintenir une mobilité diaphragmatique, entraînant les différences significatives observées comparativement aux animaux sains.

La parésie diaphragmatique progressive, la diminution probable de compliance de ce muscle, mais aussi la contribution compensatrice des muscles abdominaux d'une part et intercostaux d'autre part, sont très probablement à l'origine de sa position anormalement caudale. En effet, l'hypercontraction et la fibrose des portions musculaires du diaphragme sont à l'origine d'une diminution importante de la surface que représentent ces zones (Valentine et al. 1990). Ce premier élément justifie le terme de rétraction employé ici pour nommer l'index permettant la quantification de la position diaphragmatique. La contribution secondaire des muscles intercostaux serait par ailleurs responsable de l'apparente hyperinflation pulmonaire, et donc également de la position anormalement caudale du diaphragme, visibles sur les clichés radiographiques thoraciques (Brumitt et al. 2006). Ainsi, si l'index de rétraction diaphragmatique devient significativement modifié au même stade que la mobilité diaphragmatique, c'est-à-dire à 4 mois, il n'en reste pas moins le reflet probable d'un évènement plus secondaire.

La survenue de hernies hiatales chez le chien GRMD représente également un signe d'incompétence diaphragmatique. Le mécanisme de survenue de ces hernies n'est pas clairement explicité. Le fait que le diaphragme soit positionné anormalement caudalement, ou encore le peu de mobilité diaphragmatique, associé aux contractions abdominales au cours de la respiration, figurent parmi les hypothèses émises (Brumitt et al. 2006). Cependant, aucune relation entre présence de hernie hiatale et position ou mobilité du diaphragme n'a pu être mise en évidence. Le mécanisme en cause est donc probablement plus complexe que cela, et multifactoriel : il doit également dépendre des pressions exercées par les muscles auxiliaires au niveau de la jonction cardiale.

Le deuxième outil évalué dans cette étude est la spirométrie, appliquée à l'analyse de courbes débit-volume en respiration de Tidal. Cette méthode d'évaluation avait fait l'objet de quelques publications chez le chien et également chez le cheval (Amis et al. 1986, Amis and Kurpershoek 1986, Evans 2007). Dans la mesure où cet outil restait malgré tout peu répandu en clinique canine, et dans un contexte d'évaluation d'animaux de tailles très différentes, une étude de corrélation des débits et volumes mesurés au gabarit de l'animal, déjà partiellement effectuée et publiée, a été conduite ici. Les résultats obtenus confirment les données publiées chez le chien (Amis and Kurpershoek 1986), selon lesquelles volumes et débits sont corrélés au gabarit de l'animal, ce qui n'est pas le cas des rapports de débits. *A contrario*, les différents ratios de débits calculés sont totalement décorrélés des variations de taille.

Ces ratios, calculés afin de décrire quantitativement l'aspect des courbes débit-volume, sont les variables qui se sont révélées avoir un intérêt chez le chien GRMD. Ainsi, le rapport du débit inspiratoire maximal, dit « de pointe », sur le débit expiratoire maximal s'est avéré significativement plus faible chez le chien GRMD. L'effort de dépression appliqué à la cage thoracique durant l'inspiration est donc inférieur chez les animaux malades. Ce point pourrait s'expliquer par la faiblesse diaphragmatique qui existe chez ces animaux. En effet, le diaphragme constitue le principal muscle inspiratoire (Ayoub et al. 2002, Wilcox and Pardy 1989). Il est donc évident qu'une faiblesse de celui-ci impacte directement la fonction inspiratoire, malgré le relai pris par les muscles abdominaux notamment. Cette contribution des muscles auxiliaires inverse la mécanique respiratoire normale : en situation physiologique, le diaphragme exerce une dépression active durant l'inspiration, et son relâchement est responsable de l'expiration, qui n'est donc pas un phénomène actif. Lorsque les muscles abdominaux viennent soutenir une fonction diaphragmatique altérée, leur contraction active permet l'expiration, tandis que leur relâchement soutient l'inspiration (Wilcox and Pardy 1989). C'est donc l'expiration qui devient la phase active du cycle respiratoire. Cette inversion de la mécanique ventilatoire pourrait expliquer le faible débit inspiratoire en comparaison du débit expiratoire chez les chiens GRMD, mais également le creusement de la courbe débit-volume en fin d'expiration, quantifié par les ratios de débit à 75 % et 50 % du volume expiré sur le débit expiratoire de pointe, ou à 25 % du volume expiré. L'hypothèse formulée est donc celle selon laquelle, chez ces animaux, et contrairement à une expiration en situation de fonction diaphragmatique normale, au cours de laquelle le diaphragme se relâche et revient vers l'avant en souplesse, les muscles abdominaux se contracteraient brutalement en début d'expiration et demeureraient contractés jusqu'à la fin de cette phase. Cette contraction brutale, puis maintenue, en opposition avec le relâchement du diaphragme, plus souple, expliquerait que le débit expiratoire ne puisse être maintenu à des niveaux équivalents à ceux produits par une expiration normale. L'observation d'animaux GRMD en respiration de repos va dans ce sens : les mouvements respiratoires discordants sont, chez beaucoup d'individus, accompagnés d'une apparente contraction des muscles de la ceinture abdominale. Néanmoins, cette hypothèse se devrait d'être confirmée, par exemple par enregistrement de l'activité électromyographique des muscles supposés auxiliaires, au cours du cycle respiratoire.

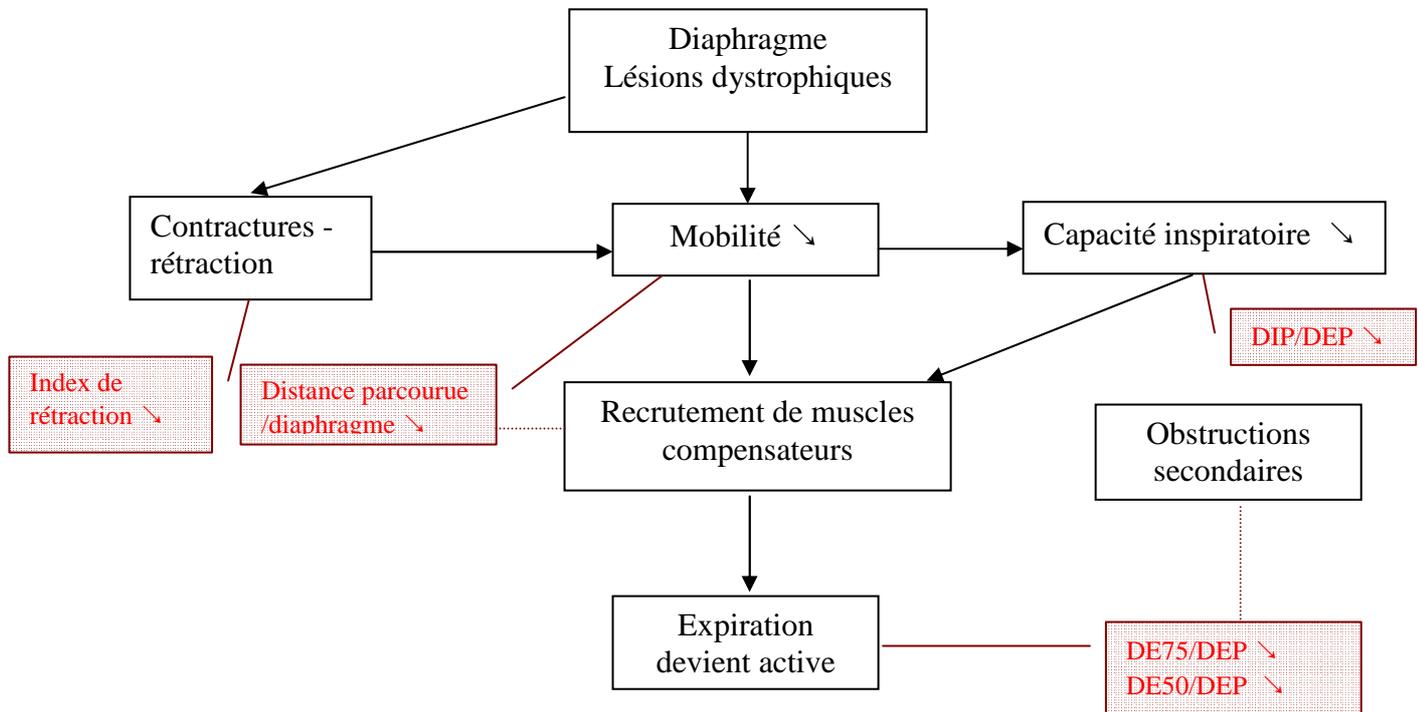
Cependant, une toute autre explication pourrait également être trouvée à ces faibles débits en deuxième partie d'expiration. Ce type de courbe évoque les profils d'expirations forcées de type obstructif, chez des patients asthmatiques par exemple (Pierce 2005). Chez les patients

atteints de DMD, les obstructions par du mucus, non évacué en raison de la faiblesse respiratoire entravant l'efficacité de la toux, sont fréquentes (Beck et al. 2006). Des microatélectasies se forment (Beck et al. 2006), et une hyperinflation pulmonaire, pouvant parfois aller jusqu'à l'emphysème est décrite chez le chien GRMD (Brumitt et al. 2006). Ces phénomènes peuvent être à l'origine d'un syndrome obstructif chez les chiens GRMD, qui peut également contribuer aux faibles débits expiratoires en fin d'expiration.

Toutefois, si ce syndrome obstructif contribue probablement à la chute des index DE75/DEP et DE50/DEP, il n'est probablement pas la cause majeure de ces modifications. En effet, il a été montré que la présence d'un foyer de bronchopneumonie n'a aucun impact significatif sur ces index. Ceci suggère que la première hypothèse explicative énoncée, ayant trait à la contribution des muscles abdominaux, est celle qui est responsable en plus grande partie des modifications de profils de courbes débit-volume observés.

Les différentes variables démontrées comme pertinentes pour l'évaluation respiratoire du chien GRMD quantifient chacune un trait différent de la mécanique ventilatoire de ces animaux, et des phénomènes compensatoires mis en jeu. La figure 21 schématise les différents mécanismes mis en jeu, et positionne les différentes variables utilisées en regard du déficit qu'elles mesurent le plus probablement.

Figure 21 : Fonction respiratoire du chien GRMD – mécanismes hypothétiques mis en jeu



Devant les variables d'intérêt validées, et les altérations différentes qu'elles représentent, un index respiratoire, issu d'une analyse en composantes principales, a été calculé. Il permet de situer les animaux plus facilement les uns par rapport aux autres, suivant les résultats obtenus pour cinq variables d'intérêt. La dispersion des animaux GRMD sur le plan d'ACP, traduite quantitativement par la variabilité de l'index respiratoire, illustre l'hétérogénéité inter-individuelle, qui existe également pour la fonction respiratoire. Cet index, démontré comme fortement discriminant entre chiens sains et chiens GRMD dès 4 mois, pourrait être employé comme index global, permettant de grader la fonction respiratoire grâce à une seule variable composite, rendant ainsi les résultats plus lisibles.

Il est surprenant de noter que la présence d'une bronchopneumonie n'a aucun impact sur les variables spirométriques. Ceci est en contradiction avec les observations faites sur des courbes débit-volume obtenues sur des chiens atteints de différentes affections respiratoires (Amis et

al. 1986, Amis and Kurpershoek 1986), même si la bronchopneumonie ne figurait pas dans ces études. Ce point pourrait suggérer un manque de sensibilité de la méthode choisie, comme cela a été avancé par certains auteurs (Rozanski and Hoffman 1999), mais les différences flagrantes de profils de courbes débit-volume publiées chez des chiens atteints de bronchites chroniques, de collapsus trachéal, ou de paralysie laryngée remettent en cause cette hypothèse de manque de sensibilité (Amis and Kurpershoek 1986). Un point important est que cette étude de l'influence de la présence d'une bronchopneumonie sur les variables spirométriques a été menée sur des chiens GRMD. Ces animaux présentent déjà, à l'état de base, des altérations de leur profil de courbe débit-volume. Etudier l'effet d'une affection pulmonaire sur des animaux tels que des chiens GRMD n'est donc pas aisé, puisque deux problématiques différentes se mêlent, voire même interagissent. Par ailleurs, la capacité de ces animaux à adapter leur mécanique ventilatoire à une situation pathologique pulmonaire est probablement très restreinte, du fait de leur faiblesse respiratoire globale. En tout état de cause, il était nécessaire de mener cette étude, dans un contexte où les complications pulmonaires infectieuses sont fréquentes chez les chiens GRMD. Il était primordial de connaître l'impact de ce type d'affection sur le modèle GRMD, car la probabilité que ce type de complication se produise sur des chiens en cours d'essai pré-clinique est importante. Le fait que les bronchopneumonies ne modifient pas les variables spirométriques d'intérêt constitue un avantage pour le suivi des chiens GRMD et la comparaison des chiens les uns par rapport aux autres. Une nuance doit cependant être apportée : les animaux inclus dans l'étude de l'influence de lésions de bronchopneumonie présentaient des foyers alvéolaires limités en taille sur les clichés radiographiques de thorax. Il n'est donc pas exclu qu'une bronchopneumonie très étendue en phase aiguë puisse entraîner des modifications des variables étudiées.

Une étude menée chez la souris *mdx* en respiration spontanée a montré que les sujets les plus âgés présentaient une chute de leur volume courant, mais maintenaient leur ventilation minute par une polypnée compensatrice (Ishizaki et al. 2008). Cette chute du volume courant, tardive chez les patients, n'a pas été mise en évidence ici chez le chien GRMD, pourtant présenté comme plus touché que la souris. Ceci peut s'expliquer par les différences existant dans la méthodologie d'obtention des données de volume courant. Au cours de ces tests, les souris sont placées dans une chambre dédiée, dans laquelle elles sont libres de leurs mouvements, et explorent leur environnement. Les animaux ne sont donc pas réellement testés au repos, contrairement aux chiens GRMD dans les tests réalisés ici. Il est très probable que les mêmes modifications du volume courant seraient mises en évidence après un exercice modéré chez le

chien GRMD, puisque quelques foulées suffisent souvent à entraîner chez ces animaux une polypnée, probablement compensatrice de la réduction du volume courant (Valentine et al. 1988). L'emploi de méthodes permettant d'exacerber les modifications et de mettre en évidence des déficits non mesurés au repos, telles qu'un exercice standardisé ou encore l'inhalation de CO₂ à un taux de 7 % par exemple auraient pu être envisagées, et auraient probablement permis de déceler d'autres caractéristiques respiratoires du chien GRMD. Néanmoins, la difficulté de standardiser un exercice dans ce modèle a été évoquée plus haut et représente ici encore un point critique. Par ailleurs, une mesure au repos sans stimulation de quelque nature qu'elle soit est un reflet plus exact de la situation physiologique de l'animal.

Dans ce contexte, une critique pourrait être formulée concernant le positionnement des chiens en décubitus latéral droit pour l'acquisition des images radioscopiques. Non seulement cette position est peu physiologique, mais le décubitus est connu en tant que facteur aggravant la fonction respiratoire chez le patient atteint de DMD (Sharma 2009). Il n'est toutefois pas certain que la même différence existe entre la position debout et la position couchée chez le chien GRMD, en raison de sa quadrupédie. Par ailleurs, le repère anatomique choisi pour les analyses d'images, le foramen de la veine cave caudale, nécessite le décubitus latéral droit pour être correctement visualisé sur les clichés, et ce, d'autant plus chez les chiens GRMD qui présentent une asymétrie diaphragmatique, avec un hémidiaphragme gauche plus crânial (Brumitt et al. 2006).

Une limite de la méthode de cinématique diaphragmatique est représentée par l'utilisation de rayons X. La fréquence de répétition de ces examens est donc à modérer, que ce soit pour l'animal ou pour l'opérateur exposés. Le même type de mesure de mobilité diaphragmatique peut être réalisé à partir d'images échographiques (Ayoub et al. 2002, Toledo et al. 2003). Une telle méthodologie pourrait constituer une alternative intéressante à l'usage de la radioscopie, tout en permettant d'obtenir le même type d'information.

Une autre limite de cette méthode est le temps d'analyse. Si le test en lui-même est rapide (quelques minutes), le processus d'analyse des images est plus long. Le transfert des images DICOM vers le logiciel capable de les lire, la sélection et l'export d'images exploitables, en fin d'inspiration et fin d'expiration, et enfin leur traitement dans les logiciels d'analyse d'image (4 cycles respiratoires) peuvent prendre jusqu'à 45 minutes par test. Ce point représente un désavantage conséquent dans le contexte de recherche d'outils simples à manier, et *a fortiori* pour son utilisation au cours d'essais pré-cliniques nécessitant des

résultats rapidement obtenus. Une automatisation de l'analyse serait donc une voie à envisager afin de diminuer le temps d'obtention des résultats.

La spirométrie, quant à elle, a montré une limite lors de son utilisation chez de très jeunes chiots de deux mois : le logiciel s'est avéré incapable de détecter correctement les cycles respiratoires, et donc d'identifier de manière juste les boucles débit-volume. Cet écueil est, de façon très probable, lié à un problème de sensibilité du système (spiromètre et/ou logiciel associé), et devrait pouvoir être surmonté par l'utilisation d'un appareillage plus sensible, destiné à un usage pédiatrique par exemple.

Une limite importante des deux études de suivis longitudinaux, que ce soit par cinématique diaphragmatique ou spirométrie, est le faible nombre d'animaux témoins, limitant l'analyse comparée chien GRMD-chien sain à la tranche d'âge 2-5 mois. L'acquisition de données supplémentaires sur chiens sains est donc absolument nécessaire, afin de disposer de données longitudinales complètes.

Cependant, malgré le faible nombre de sujets sains, les suivis longitudinaux des différentes variables ont permis de déterminer que l'âge de 4 mois est un âge clé, à partir duquel la fonction respiratoire, mesurée par différents index, est altérée significativement. Il est possible que les lésions diaphragmatiques, déjà présentes très tôt dans la vie de l'animal, entraînent dans un premier temps une dysfonction modérée, compensée par la contribution des muscles compensateurs, notamment abdominaux. Cette contribution est détectable dès l'âge de 3 mois par le ratio DE75/DEP. A l'âge de 4 mois, la dysfonction diaphragmatique progressant, et l'aide des muscles compensateurs ne suffisant plus à mobiliser suffisamment le diaphragme, ce dernier perd en mobilité sur les images radioscopiques. La rétraction caudale de ce muscle est également installée à ce stade. L'index respiratoire global, est d'ailleurs lui aussi significativement modifié à l'âge de 4 mois. Cet âge représente donc un seuil à prendre en considération : l'évaluation de la fonction respiratoire doit être réalisée après l'âge de 4 mois, un résultat normal acquis à un temps plus précoce pouvant s'avérer de faible pertinence.

De ce suivi longitudinal ressort également, une fois encore, l'hétérogénéité interindividuelle d'évolution des animaux, qui existe également chez les patients (Phillips et al. 2001). Cette problématique est à considérer dans l'élaboration de protocoles d'essais thérapeutiques. Des outils tels que cinématique diaphragmatique et spirométrie permettent de documenter quantitativement la variabilité inter-individuelle respiratoire, et donc de la maîtriser partiellement.

Chapitre 2 : Identification de marqueurs prédictifs de l'évolution clinique des chiens GRMD

I. Introduction

L'hétérogénéité clinique existant chez les chiens GRMD est une problématique bien connue, inhérente à l'utilisation de ce modèle (Ambrosio et al. 2009, Valentine et al. 1988), et constitue un point critique lorsqu'il s'agit d'évaluer ces animaux (Banks and Chamberlain 2008). Les outils mis en place dans le chapitre 1 ont tous mis en évidence cette hétérogénéité. Néanmoins, ils ont permis de la quantifier de manière précise, ce qui constitue un premier pas vers la maîtrise de cette variabilité inter-individuelle : l'évolution de chiens traités peut être confrontée à celle de la population GRMD, quantifiée par telle ou telle variable, à condition, bien entendu, de raisonner sur le groupe.

Maîtriser totalement cette contrainte qu'est l'hétérogénéité clinique reviendrait à la faire disparaître, et à disposer de groupes homogènes sur le plan de leur évolution. Etre en mesure de prédire l'évolution clinique des animaux de manière précoce, au moment de leur inclusion dans des essais pré-cliniques, pourrait permettre de disposer de ces groupes homogènes au départ, et donc probablement de diminuer le nombre d'animaux à inclure, et d'augmenter la lisibilité des résultats.

Chez les patients atteints de DMD, l'hétérogénéité clinique est également majeure (Desguerre et al. 2009b). L'évaluation de ces patients dans le cadre d'essais cliniques pose donc les mêmes problèmes que celle des chiens GRMD. C'est pourquoi, la recherche de facteurs prédictifs de l'évolution clinique a fait l'objet de récentes publications, qui ont permis d'identifier différents marqueurs, aussi variés que la quantité de cellules souches circulantes

(Marchesi et al. 2008), la fibrose endomysiale précoce dans le muscle quadriceps (Desguerre et al. 2009b), le score de testing musculaire manuel, et le niveau de retard mental (Desguerre et al. 2009a), le score obtenu à la grille MFM (motor function measure) (Vuillerot et al. 2010), ou, plus tardivement, la dysfonction systolique ventriculaire gauche (Corrado et al. 2002).

Liée à cette démarche de recherche de facteurs prédictifs, une démarche de classification des patients a été entreprise, sur la base de nombreux critères. Quatre grandes catégories de patients ont pu être identifiées, et l'évolution d'un individu vers l'une des quatre formes prédite par des critères cliniques simples (Desguerre et al. 2009a). Chez le chien GRMD, une classification en trois groupes phénotypiques a été proposée, à partir d'un groupe de quinze animaux (Ambrosio et al. 2009). Cependant, les critères de classement proposés sont purement qualitatifs, faute d'outils permettant une quantification des altérations fonctionnelles des animaux, ce qui rend subjective et peu précise cette méthode de classification.

Le nombre de chiens GRMD examinés dans le chapitre 1, bien que conséquent pour ce modèle rare (24 animaux inclus dans l'étude de locomotion par exemple), reste insuffisant pour permettre l'établissement d'une classification précise en trois ou quatre groupes. Toutefois, une forme clinique bien particulière a été mise en évidence, et bien documentée par accélérométrie. Il s'agit de la forme qualifiée d'accélérée, en raison de la dégradation rapide de la locomotion, chez des animaux qui, en quelques semaines seulement, présentent une locomotion aussi altérée que des animaux adultes, voire davantage. Ces animaux perdent classiquement la locomotion avant l'âge de six mois, contrairement aux autres chiens GRMD qui maintiennent leur capacité d'ambulation.

Une classification en deux grands types d'évolution, forme accélérée ou non, est donc proposée ici. Bien que grossière, cette classification présente l'avantage d'être simple et difficilement contestable. Par ailleurs, être en mesure de prédire une forme accélérée pourrait présenter l'avantage de pouvoir inclure sélectivement dans les essais pré-cliniques les animaux destinés à évoluer vers ces formes accélérées. Ainsi, l'évaluateur disposerait d'un groupe d'animaux présentant une évolution théoriquement homogène, et serait en mesure de juger de manière plus fiable d'un bénéfice thérapeutique éventuel.

L'objectif de l'étude présentée dans ce chapitre est donc de rechercher des éléments permettant de prédire, de la manière la plus fiable possible, l'évolution des animaux vers une forme accélérée. Identifier un ou plusieurs marqueurs prédictifs permettrait de disposer d'un nouvel outil optimisant l'utilisation du chien GRMD dans des essais pré-cliniques

systémiques, mais aussi, peut-être, d'identifier des mécanismes pathogéniques pouvant représenter des cibles thérapeutiques. Ce dernier point serait plus aisé à identifier dans ce modèle, homogène sur le plan génétique, que chez les patients, chez lesquels les nombreuses mutations sont elles-mêmes à l'origine d'une hétérogénéité, notamment sur le plan du développement mental (Desguerre et al. 2009a).

Dans ce cadre, des marqueurs histologiques ont été recherchés, par analyse multiparamétrique de biopsies musculaires précoces, réalisées de manière systématique à l'âge de deux mois. La valeur prédictive de variables obtenues grâce aux différents outils mis en place, et permettant de caractériser les animaux sur le plan moteur, a également été évaluée.

II. Matériel et Méthodes

A. Recherche de marqueurs prédictifs histologiques

1) Animaux

Vingt-trois chiens GRMD ont été inclus dans cette étude. Tous les animaux ont subi une biopsie musculaire à l'âge de deux mois (âge moyen : 2.12 mois, écart-type : 0.17 mois), puis un suivi clinique de ces animaux a été effectué. Parmi les vingt-trois chiens inclus, neuf ont perdu la locomotion, et ont présenté une forme accélérée de leur maladie. La moyenne d'âge au moment de la biopsie de ces neuf animaux était de 2.19 mois (écart-type : 0.14 mois), tandis qu'elle était de 2.07 mois (écart-type : 0.17) chez les 14 autres individus. (Tableau 1).

Tableau 1 : Animaux inclus dans l'étude de recherche de marqueurs prédictifs histologiques

Nom	Symbole (graphes)	Age	Forme accélérée O/N
Charlot	×	2.07	N
Charly	-	2.07	N
Cobra	✖	2.17	N
Crapule	●	2.37	O
Dbrouille	■	2.03	N
Dfois	×	2.07	O
Dhioptry	▲	2.03	O
Didon	✖	2.17	N
Dk	●	2.13	N
Dlice	+	1.83	N
Dlire	-	1.83	N
Dluge	-	1.83	N
Dmon	■	1.97	N
Dsir	▲	2.03	O
Eaudvy	-	2.03	N
Ebam	-	2.33	N
Ebim	●	2.33	O
Eboum	■	2.33	N
Einstein	✖	2.13	O
Eject	◆	2.33	O
Ercule	▲	2.23	N
Evian	-	2.33	O
Exon	◆	2.10	O

A la droite du nom de chaque chien figure le symbole qui lui correspond et sera employé dans les graphes. Outre l'âge lors de la biopsie, figure, dans la dernière colonne, le type d'évolution clinique de chaque animal. En cas de forme accélérée avec perte de la locomotion, est inscrite la lettre O (oui), en cas de maintien de la locomotion figure la lettre N (non).

2) Procédure chirurgicale

Le muscle qui a été choisi pour cette étude est le muscle biceps fémoral, en raison de la facilité de la voie d'abord, et de son volume important, permettant un prélèvement de taille significative, sans induire de lésion trop étendue sur le muscle prélevé.

Les biopsies ont été réalisées sous anesthésie générale. L'anesthésie a été induite par une injection intraveineuse de propofol, à la dose de 6.5 mg/kg. Les chiens ont été intubés puis placés sous O₂, véhiculant 2 à 3 % d'isoflurane, de manière à assurer le maintien de l'anesthésie. L'analgésie a été assurée par une injection intraveineuse lente de morphine, à la dose de 0.1 mg/kg, en début d'intervention.

Une incision cutanée de 2 à 3 cm de longueur a été pratiquée en regard du muscle biceps fémoral. Une dissection douce du tissu sous-cutané a été pratiquée, de manière à dégager le plan musculaire. Une zone de biopsie d'une taille d'environ 1 cm de longueur, et 0.5 cm de diamètre a ensuite été délimitée au scalpel, puis prélevée aux ciseaux de Metzenbaum. Après hémostase, une suture en trois plans (fascia, sous-cutané et cutané) a été réalisée. Le chiot pouvait ensuite être réveillé. La procédure ainsi décrite avait une durée de 30 minutes environ.

3) Traitement et analyse des biopsies

a) Congélation, stockage et coupe des biopsies

Les biopsies, aussitôt prélevées, ont été liées à un support de liège par de la gomme adraganthe, puis congelées par immersion dans l'isopentane refroidi dans l'azote liquide durant deux minutes. Une fois congelées de cette manière, elles ont été stockées à -80°C.

La coupe, réalisée dans un cryostat à -28°C, a été faite à une épaisseur de 10 µm sur lamelles, pour les coupes destinées à une coloration morphologique, ou à une épaisseur de 7 µm sur lames superfrost® pour les coupes destinées à un marquage immunohistochimique.

b) Quantification lésionnelle globale sur coupes colorées à l'Hématéine-Eosine

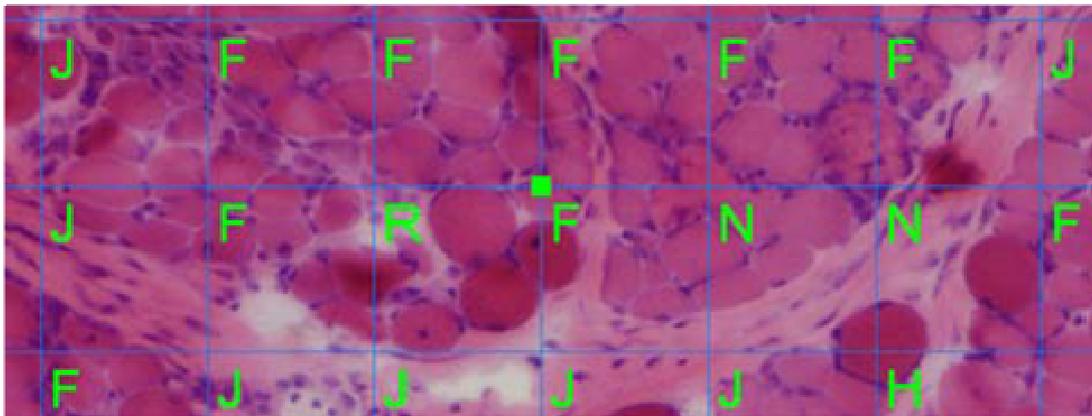
Après séchage 1 heure sous flux laminaire, les coupes ont été colorées 10 minutes dans un bain d'hématéine puis rincées rapidement sous l'eau, et colorées 5 minutes dans un bain

d'Eosine à 1 %. Après un rinçage à l'eau, les coupes ainsi colorées ont été déshydratées dans quatre bains successifs d'éthanol à concentration croissante (70 %, puis 95 %, puis deux fois 100 %). Elles ont enfin été montées au baume du Canada, après passage dans deux bains de Xylène.

Pour chaque animal prélevé, une coupe colorée à l'hématéine-éosine a été photographiée dans son intégralité, en utilisant la platine motorisée d'un microscope ApoTome de Zeiss®, et la fonction MosaiX du logiciel AxioVision®.

L'image ainsi obtenue a été analysée dans le logiciel Visilog 6.4. Une macro spécifique a été développée dans ce logiciel, en collaboration avec la société Noesis, de manière à quantifier les évènements pathologiques présents dans les biopsies de ces animaux. Ainsi, l'exécution du fichier .vba permettait la superposition à l'image d'une grille d'un pas de 100 µm. L'opérateur attribuait ensuite une annotation à chaque intersection de la grille, décrivant l'évènement, pathologique ou non, désigné par cette intersection (figure 1).

Figure 1 : Quantification des éléments pathologiques, sur coupes colorées à l'hématéine et éosine : présentation de la grille d'annotation



Exemple d'une analyse d'image sur coupe colorée à l'hématéine et éosine, par annotations à chaque intersection d'une grille (copie d'écran). Dans cet exemple, les annotations utilisées sont : F : fibre d'aspect normal ; J : tissu conjonctif ; R : régénération ; N : nécrose.

Une fois toutes les intersections annotées, l'opérateur validait le contenu de sa grille, et un compte-rendu était généré par le logiciel, permettant de calculer les variables suivantes :

- Index pathologique : il correspond au pourcentage d'évènements ne correspondant pas à une fibre d'aspect normal.
- Pourcentage de fibres en régénération
- Pourcentage de fibres à noyaux centralisés
- Pourcentage de fibres en nécrose

Les autres évènements pathologiques (inflammation, fibres hypercontractées, calcifications, tissu conjonctif) détectés ne seront pas traités dans cette partie, dans la mesure où ils ont été évalués par des colorations ou marquages plus spécifiques (cf infra).

c) Quantification des fibres surchargées en calcium sur coupes colorées au rouge Alizarine S.

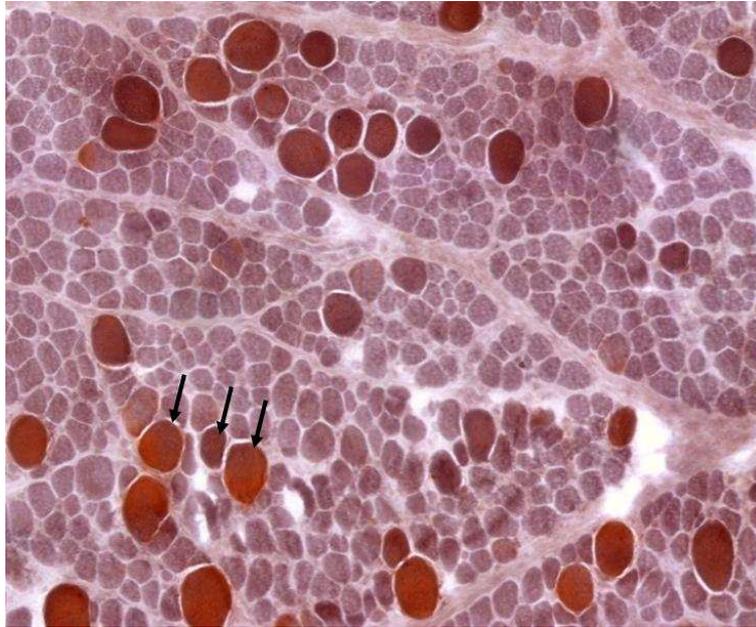
La coloration des coupes au rouge alizarine S a été réalisée, après séchage d'une heure sous flux laminaire, par immersion de celles-ci dans une solution de rouge alizarine S à 2 % ajustée à pH 5.4, durant 5 minutes. Après rinçage à l'eau, les coupes ont été déshydratées dans un bain d'acétone, puis d'acétone-xylène v/v. Elles ont enfin été montées au baume du Canada, après passage dans deux bains de xylène.

Les fibres présentant une surcharge cytoplasmique en calcium sont colorées en rose foncé à rouge vermillon, tandis que les fibres non surchargées apparaissent rose clair (figure 2).

Comme pour la coloration standard à l'hématéine et Eosine, une coupe de chaque animal a été photographiée dans sa totalité. L'analyse, consistant en un simple comptage des fibres surchargées, a été réalisée dans le logiciel Photoshop CS3, à l'aide de l'outil comptage. La superficie de la biopsie a été déterminée dans le logiciel AxioVision et l'outil contour.

Pour chacune des coupes étudiées, le résultat a été exprimé en nombre de fibres surchargées par mm² de tissu.

Figure 2 : Evaluation de la proportion de fibres surchargées en calcium, par coloration au rouge Alizarine S.



Détail de coupe colorée au rouge Alizarine S, montrant de nombreuses fibres surchargées en calcium. Trois d'entre elles sont indiquées par des flèches, en tant qu'exemples.

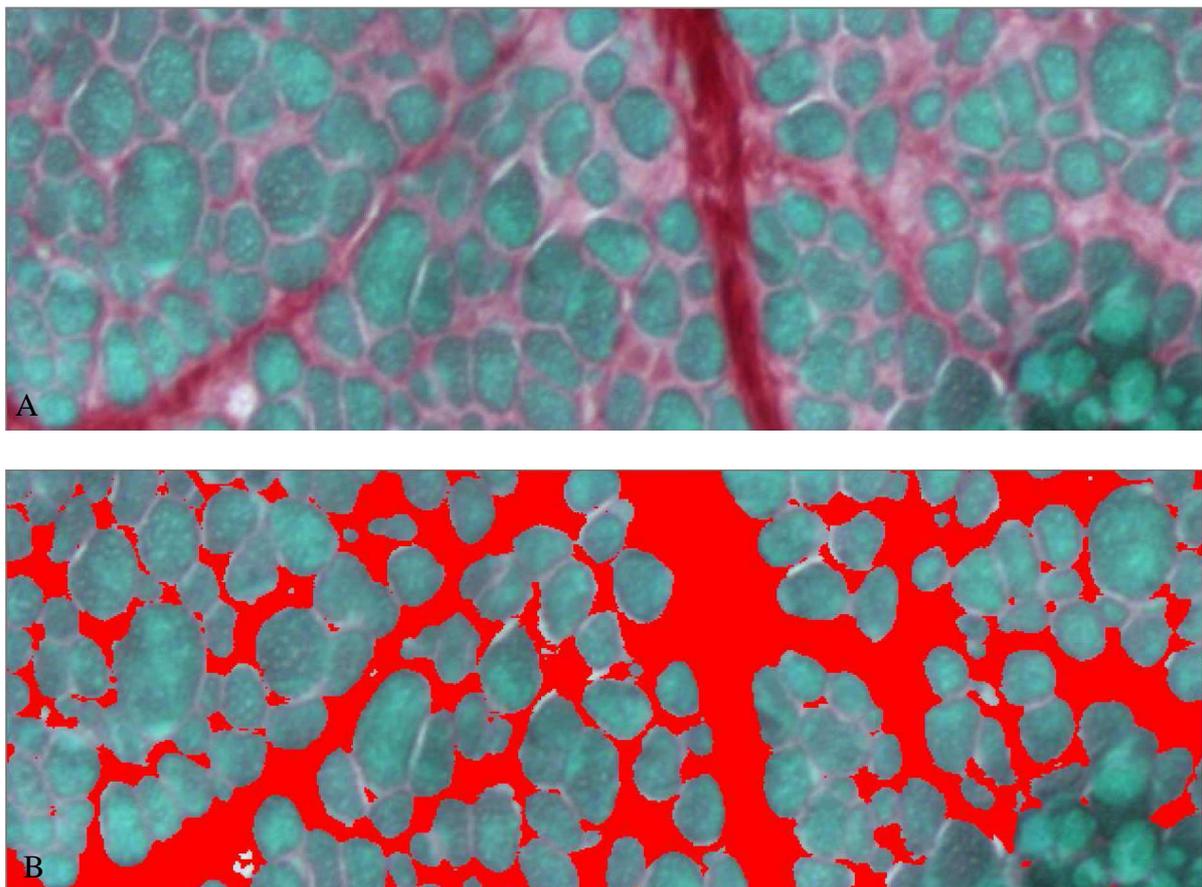
d) Quantification du tissu conjonctif sur coupes colorées au rouge Sirius, contre-coloré au Fast Green.

Afin de faciliter l'analyse d'image automatisée, la coloration classique au picrosirius a été modifiée afin d'obtenir un meilleur contraste, le Fast Green colorant le cytoplasme en vert, et non en jaune clair comme dans le cas du picrosirius.

Les coupes ont donc été colorées, après séchage 1 heure sous flux laminaire, et fixation 30 minutes dans du formaldéhyde à 4%, par immersion dans une solution d'acide picrique à saturation, dans laquelle ont été ajoutés 0.1 % de rouge Sirius, et 0.1 % de fast green. Après rinçage dans de l'eau acidifiée à l'acide acétique 0.5 %, les coupes ont été déshydratées dans quatre bains d'éthanol à concentration croissante (75 %, 95%, puis deux fois 100 %), avant d'être montées au baume du Canada, après passage dans deux bains de Xylène.

Le cytoplasme des fibres musculaires est ainsi coloré en vert, et le tissu conjonctif en rouge. C'est sur ce contraste de couleur que s'est basée l'analyse d'image permettant la quantification du tissu fibreux dans les biopsies des chiens GRMD. Après photographie des coupes entières, les images obtenues ont été analysées dans le logiciel Visilog 6.4. En collaboration avec la société Noesis, une macro a été mise au point, permettant, après un seuillage par l'opérateur sur l'image puis des corrections manuelles éventuelles (défauts de coloration par exemple), l'analyse de l'espace occupé respectivement par le rouge (tissu conjonctif) et le vert (fibres musculaires), le blanc (fond de l'image) étant exclu de l'analyse. (Figure 3)

Figure 3 : Quantification du tissu conjonctif sur coupes colorées au rouge Sirius et fast green : analyse d'image automatisée

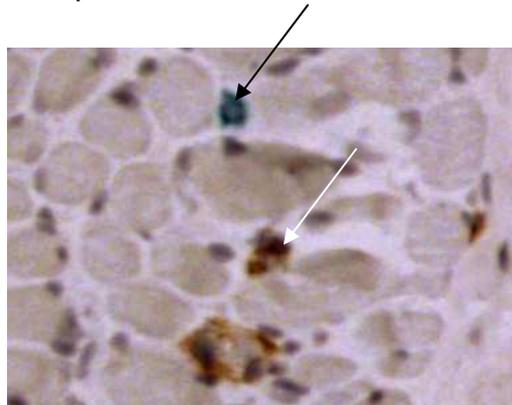


Exemple d'un détail de coupe colorée au rouge Sirius et fast green (copies d'écran). A : avant exécution de la macro d'analyse, les fibres musculaires apparaissent en vert, et le collagène du tissu conjonctif en rouge B : après exécution de la macro : le programme a identifié de manière automatique les zones colorées en rouge (tissu conjonctif).

e) Quantification et caractérisation de l'infiltrat mononucléé par marquages immunohistochimiques

Les coupes de 7 µm sur lames superfrost ont subi deux double marquages différents afin de quantifier leur infiltrat inflammatoire. Un anticorps de souris anti-CD11b canin (macrophages) (Serotec) a été utilisé dilué au 1/50^{ème}, en association avec un anticorps de rat anti CD8 canin (lymphocyte T cytotoxiques), dilué au 1/50^{ème} également. La deuxième association d'anticorps primaires utilisée a été un anticorps de souris anti-CD3 canin (lymphocytes T) (Serotec), dilué au 1/100^{ème}, en comarquage avec un anticorps de rat anti-CD4 canin (lymphocytes T helper) (Serotec), dilué au 1/50^{ème}. La révélation de l'activité de la peroxydase a été réalisée par la DAB (Dako®) dans le cas de l'anticorps de souris, entraînant la formation d'un précipité brun, et par le kit Histogreen (Vector laboratories) dans le cas de l'anticorps de rat, entraînant la formation d'un précipité vert (figure 4). Une contre-coloration des noyaux à l'hématéine (4 minutes) a été réalisée.

Figure 4 : Quantification de l'infiltrat mononucléé : double marquage immunohistochimique en peroxydase



Détail d'une coupe ayant subi un double marquage CD11b – CD8. La flèche noire indique un lymphocyte T CD8+ (marquage vert), tandis que la flèche blanche indique un macrophage CD11b+ (marquage marron).

B. Recherche de marqueurs prédictifs cliniques

1) Evaluation du score clinique moteur en tant que marqueur prédictif

a) Animaux

Vingt-quatre chiens GRMD ont été inclus dans cette partie de l'étude. Leur âge moyen était de 2.08 mois (écart-type : 0.15 mois). Parmi ces 24 chiens, 10 ont par la suite évolué vers une forme accélérée (Tableau 2).

b) Méthode

Un score clinique a été pratiqué sur chaque animal. Seule la valeur du score moteur a été prise en considération pour l'analyse.

Tableau 2 : Animaux inclus dans l'étude de la valeur prédictive du score clinique moteur

Nom	Symbole (graphes)	Age (mois)	Forme accélérée O/N
Dbrouille	■	2.03	N
Didon	✖	2.07	N
Ebam	-	2.33	N
Eboum	■	2.33	N
Eaudvy	-	2.03	N
Ercule	▲	2.23	N
Charlot	×	2.07	N
Charly	-	2.07	N
Dlice	+	1.83	N
Dmon	■	1.97	N
Dluge	-	1.83	N
Dk	●	2.13	N
Dlire	-	1.83	N
E.T.	×	2.07	N
Ebim	●	2.33	O
Einstein	✖	2.13	O
Exon	◆	2.10	O
Eject	◆	2.33	O
Dfois	×	1.97	O
Dhioptry	▲	2.03	O
Evian	-	2.33	O
Dsir	▲	2.03	O
Dchou	▲	1.97	O
Eop	●	2.07	O

A la droite du nom de chaque chien figure le symbole qui lui correspond et sera employé dans les graphes. Outre l'âge lors du score clinique, figure, dans la dernière colonne, le type d'évolution clinique de chaque animal. En cas de forme accélérée avec perte de la locomotion, est inscrite la lettre O (oui), en cas de maintien de la locomotion figure la lettre N (non).

2) Evaluation des anomalies locomotrices en tant que marqueurs prédictifs

a) Animaux

Dix-neuf chiens GRMD ont été inclus dans cette étude. Le suivi clinique ultérieur de ces animaux a permis de déterminer que 9 d'entre eux ont développé une forme accélérée de la maladie. (Tableau 3)

b) Méthode

Les dix-neuf animaux ont subi un test d'accélérométrie à l'âge de 2 mois (âge moyen : 2.06 mois, écart-type : 0.15 mois). Les différentes variables d'accélérométrie décrites plus haut (chapitre 1, II) ont été calculées, à partir des tracés d'accélérations, dans le logiciel Equimetrix.

Tableau 3 : Animaux inclus dans l'étude d'évaluation des anomalies locomotrices en tant que marqueurs prédictifs

Nom	Symbole (graphes)	Age (mois)	Forme accélérée O/N
Dchou	▲	1.93	O
Dfois	×	2.00	O
Dbrouille	■	2.00	N
Dk	●	2.13	N
Dlice	+	1.83	N
Dlire	-	1.83	N
Dluge	—	2.10	N
Dmon	■	1.80	N
Dsir	▲	2.00	O
Didon	✱	2.07	N
Dalton	◆	2.20	N
E.T.	×	2.00	N
Ebim	●	2.30	O
Einstein	✱	2.10	O
Eop	●	2.03	O
Ercule	▲	2.20	N
Evian	-	2.33	O
Exon	◆	2.07	O
Eject	◆	2.17	O

A la droite du nom de chaque chien figure le symbole qui lui correspond et sera employé dans les graphes. Outre l'âge lors du test d'accélérométrie, figure, dans la dernière colonne, le type d'évolution clinique de chaque animal. En cas de forme accélérée avec perte de la locomotion, est inscrite la lettre O (oui), en cas de maintien de la locomotion figure la lettre N (non).

3) Evaluation des anomalies de relaxation en tant que marqueurs prédictifs

a) Animaux

Seize chiens GRMD ont été évalués à l'âge de 4 mois (âge moyen : 4.13 mois ; écart-type : 0.09 mois) (tableau 4).

b) Méthode

La relaxation des seize chiens GRMD a été évaluée au cours d'une mesure de force. La procédure utilisée pour l'obtention et le calcul des indices de relaxation a été énoncée plus haut (chapitre 1, I.).

Tableau 4 : Animaux inclus dans l'étude d'évaluation des anomalies de relaxation en tant que marqueurs prédictifs

Nom	Symbole (graphes)	Age (mois)	Forme accélérée O/N
Exon	◆	3.97	O
Ercule	▲	4.13	N
Einstein	✖	4.27	O
Eaudvy	-	4.17	N
Dlire	-	4.23	N
Dlice	+	4.00	N
Dluge	-	4.10	N
Dalton	◆	4.03	N
Eop	●	4.20	O
E.T.	✖	4.13	N
Dk	●	4.17	N
Didon	✖	4.17	N
Dbrouille	■	4.10	N
Dsir	▲	4.27	O
Dmon	■	4.10	N
Dfois	×	4.10	O

A la droite du nom de chaque chien figure le symbole qui lui correspond et sera employé dans les graphes. Outre l'âge lors de la mesure de force, figure, dans la dernière colonne, le type d'évolution clinique de chaque animal. En cas de forme accélérée avec perte de la locomotion, est inscrite la lettre O (oui), en cas de maintien de la locomotion figure la lettre N (non).

C. Analyse statistique

Une ANOVA à un facteur (type d'évolution) a été réalisée afin de déterminer si les différentes variables étudiées montraient, à ces stades précoces, une différence entre les chiens qui ont par la suite évolué de manière accélérée, et les autres. Un effet intra a été ajouté dans une ANOVA à mesures répétées pour les résultats issus des mesures de force (relaxation), afin de tenir compte de la liaison entre côté gauche et côté droit.

Le seuil de rejet de l'hypothèse nulle a été fixé à $p < 0.05$.

II. Résultats

A. Recherche de marqueurs prédictifs histologiques

1) Quantification lésionnelle globale

Une moyenne de 1621 (écart-type : 596) annotations ont été réalisées par coupe colorée à l'hématéine et éosine. Une grande variabilité entre animaux a été mise en évidence, ce qui montre que pour un même muscle, à un même âge, la quantité globale de lésions ainsi que leur nature est extrêmement variable d'un individu à l'autre.

Néanmoins, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les deux groupes d'animaux GRMD classés suivant leur évolution, que ce soit pour l'index pathologique, pour le pourcentage de fibres en régénération, en nécrose ou à noyau centralisé (tableau 5). Les graphes A, B, C et D de la figure 5 montrent qu'en effet la superposition entre les deux populations est très nette. Les chiens GRMD qui présenteront une forme accélérée avec perte de la locomotion n'ont donc pas, à deux mois, un muscle biceps fémoral globalement plus lésé, ni présentant davantage de nécrose, de centralisations nucléaires ou de régénération. Ces indices ne peuvent donc pas constituer des marqueurs prédictifs.

2) Quantification des fibres surchargées en calcium

De la même manière, le nombre de fibres surchargées en calcium par mm² de coupe, mises en évidence par la coloration au rouge Alizarine S, n'est pas différent entre les deux groupes d'animaux, comme le montre le graphe E de la figure 5, ainsi que les résultats figurant dans le tableau 5 ($p = 0.2826$). La variabilité entre animaux est, ici encore, très importante, mais ne peut pas être mise en relation avec le devenir clinique des chiens GRMD. La quantité de fibres surchargées en calcium dans le biceps fémoral à 2 mois ne peut pas constituer un marqueur prédictif.

3) Quantification du tissu conjonctif

Pour cet indice également, la superposition entre les deux populations est très nette, et aucune tendance ne semble se dessiner à la lecture du graphe F de la figure 5. En effet, aucune différence significative entre chiens ayant par la suite présenté une forme accélérée et chiens n'ayant pas évolué vers une forme accélérée, n'a été mise en évidence ($p = 0.5984$). La quantité de tissu conjonctif dans les biopsies de biceps fémoral à deux mois ne peut donc pas constituer un marqueur prédictif.

4) Quantification de l'infiltrat mononucléé

L'infiltrat mononucléé des biopsies analysées était à composante majoritairement macrophagique (CD11b+) (tableau 5). Secondairement, l'infiltrat lymphocytaire était composé principalement de lymphocytes T CD4+, et dans une moindre mesure, de lymphocytes T CD8+, très rares dans les biopsies analysées, à l'exception de celle du chien Exon. Même si un triple marquage CD3-CD4-CD8 n'a pas pu être réalisé, étant donné que l'espèce dans laquelle sont produits les anticorps CD4 et CD8 est identique, il apparaît assez nettement qu'il existe très probablement une population de lymphocytes T CD3+, mais CD4- et CD8- dans les muscles du chien GRMD. Le nombre de cellules CD3+ dans les biopsies étudiées est en effet très nettement plus important que la somme des cellules CD4+ et CD8+.

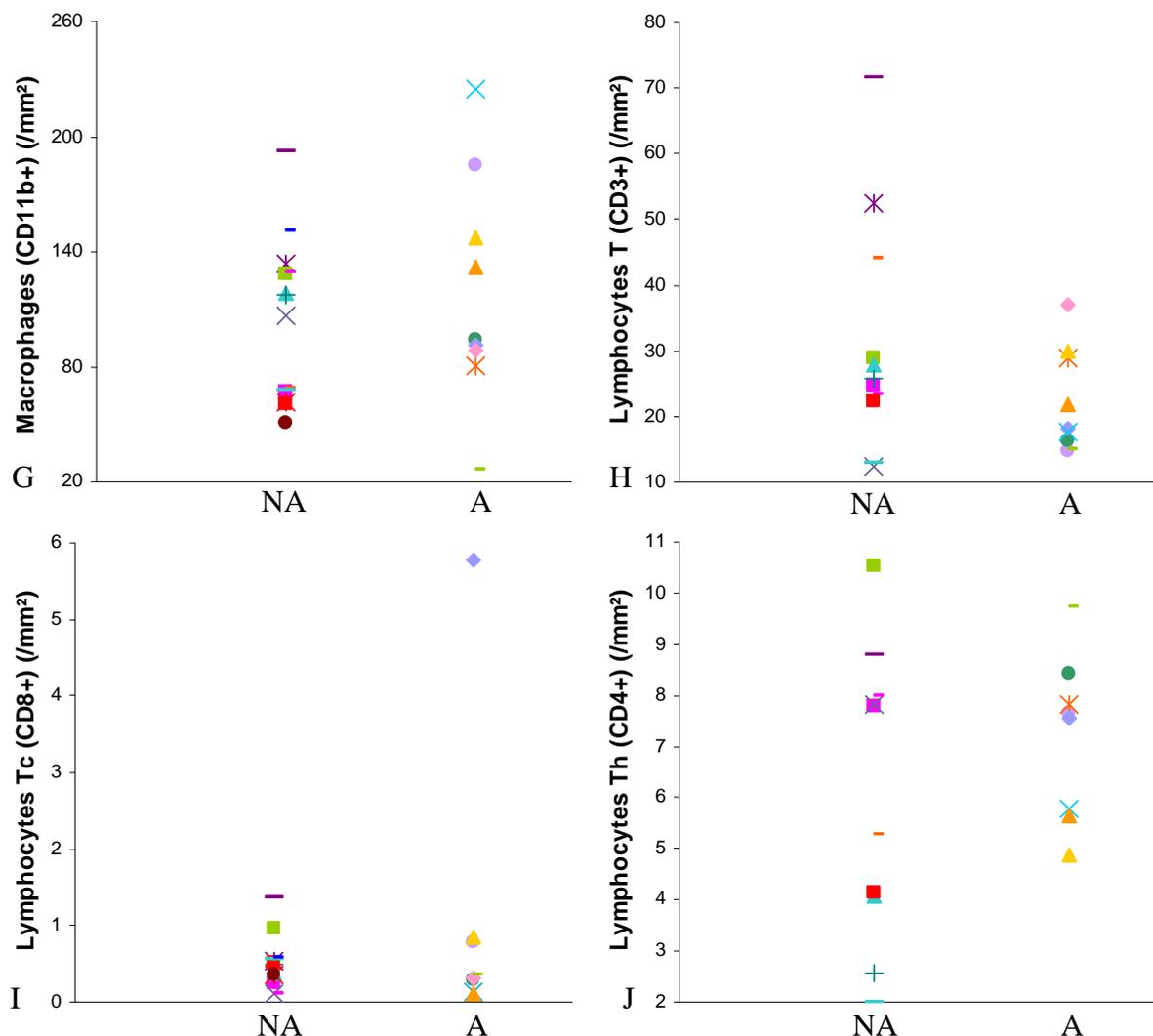
Outre cette description de l'infiltrat mononucléé dans le biceps fémoral du chien GRMD à 2 mois, cette étude montre qu'aucun dénombrement de quelque type de cellule que ce soit n'est significativement différent en fonction de l'évolution des animaux (tableau 5, figure 5, G à J). Ces quatre index ne peuvent donc pas, eux non plus, constituer des marqueurs prédictifs.

A l'issue de cette étude sur 23 biopsies de biceps fémoral sur des chiens GRMD âgés de deux mois, aucun marqueur prédictif histologique n'a pu être identifié. Les résultats de l'analyse statistique, ainsi que les moyennes et écart-types obtenus dans chaque groupe sont consignés dans le tableau 5. La figure 5 illustre par des graphes l'absence de différences entre les deux populations, ainsi que la grande variabilité existant entre animaux.

Tableau 5 : Recherche de marqueurs prédictifs histologiques : résultats de l'analyse statistique

	Effet évolution	Moy (ET) évolution accélérée	Moy (ET) évolution « classique »
Index pathologique	p = 0.6259	41.8 (6.3)	40.7 (4.3)
Régénérations (%)	p = 0.7372	0.95 (0.68)	1.08 (0.94)
Nécroses (%)	p = 0.3730	0.86 (0.54)	1.21 (1.03)
Centralisations (%)	p = 0.1426	1.40 (1.23)	0.77 (0.76)
Surcharges calciques (Fibres/mm²)	p = 0.2826	30.1 (8.0)	26.3 (8.1)
Tissu conjonctif (%)	p = 0.5984	48.1 (10.9)	46.2 (5.4)
Macrophages (CD11b+) (/mm²)	p = 0.4838	118.9 (60.2)	103.8 (42.1)
Lymphocytes T (CD3 +) (/mm²)	p = 0.1655	22.1 (7.9)	31.4 (17.8)
Lymphocytes T CD4+ (/mm²)	p = 0.3647	7.8 (2.4)	6.6 (3.2)
Lymphocytes T CD8+ (/mm²)	p = 0.3744	0.97 (1.82)	0.51 (0.34)

Les résultats de l'effet du type d'évolution, calculés par l'ANOVA, figurent dans ce tableau, pour chacun des indices histologiques, ainsi que la moyenne et l'écart-type obtenus dans chacun des deux groupes. Abréviations : Moy : moyenne ; ET : écart-type. Les résultats significatifs figurent en gras.



Les points représentés à la gauche des graphes représentent les valeurs obtenues après analyse des biopsies des chiens n'ayant pas présenté de forme accélérée (NA : non accélérée), en comparaison des chiens ayant présenté une forme accélérée (A : accélérée), à droite. A : index pathologique (%) ; B : fibres en régénération (%) ; C : fibres en nécrose (%) ; D : fibres à noyau(x) centralisé(s) ; E : Fibres surchargées en calcium (/mm²) ; F : Tissu conjonctif (%) ; G : Macrophages (CD11b+) (/mm²) ; H : Lymphocytes T (CD3+) (/mm²) ; I : Lymphocytes T cytotoxiques (CD8+) (/mm²) ; J : Lymphocytes T helper (CD4+) (/mm²)

B. Recherche de marqueurs prédictifs cliniques

1) Evaluation du score clinique moteur en tant que marqueur prédictif

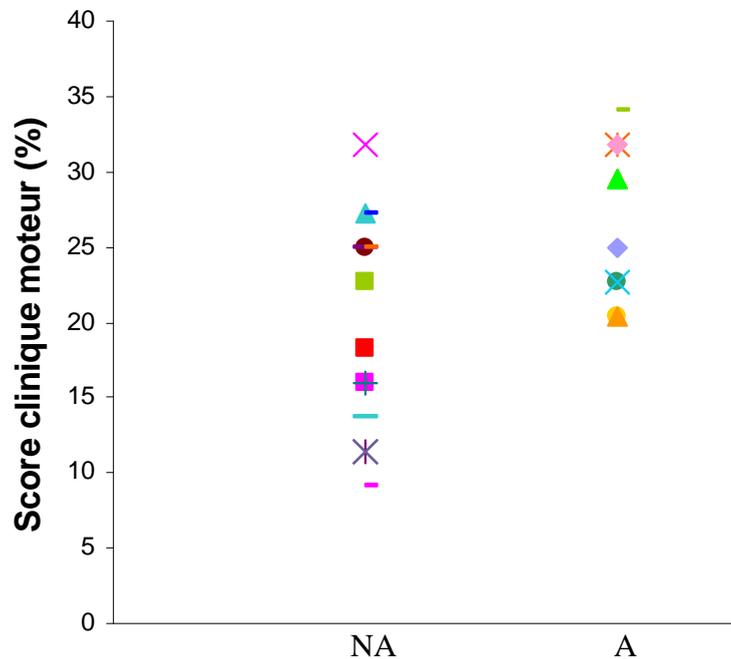
Le score clinique moteur, mesuré à l'âge de 2 mois, est significativement ($p = 0.0173$) plus élevé dans le groupe de chiens ayant évolué vers une forme accélérée (Tableau 6). Le graphe de la figure 6 montre que ces animaux ont en effet des scores moteurs élevés, mais superposés aux scores les plus importants des animaux n'ayant pas perdu la locomotion. L'emploi du score clinique en tant que marqueur prédictif paraît donc difficile. Au vu de la population de 24 chiens étudiée, il peut néanmoins être établi qu'en dessous d'un score moteur de 20 % à l'âge de deux mois, un chien GRMD n'évoluera pas vers une forme accélérée (spécificité de 100 %), mais au-dessus de 20 %, il est impossible de prédire une évolution dans un sens ou dans l'autre (sensibilité de seulement 50 %)

Tableau 6 : Evaluation du score clinique moteur en tant que marqueur prédictif : résultats de l'analyse statistique

	Effet évolution	Moy (ET) évolution accélérée	Moy (ET) évolution « classique »
Score clinique moteur (%)	$p = 0.0173$	26.8 (5.1)	20.0 (7.2)

Le résultat de l'effet du type d'évolution sur le score clinique moteur à deux mois, calculé par l'ANOVA, figure dans ce tableau, ainsi que la moyenne et l'écart-type obtenus dans chacun des deux groupes. Abréviations : Moy : moyenne ; ET : écart-type. Les résultats significatifs figurent en gras.

Figure 6 : Valeur prédictive du score clinique moteur illustrée par un graphe



A la gauche du graphe figurent les valeurs de score clinique moteur mesurées sur les chiens n'ayant pas évolué vers une forme accélérée (NA : non accélérée) ; à la droite du graphe se trouvent celles des chiens ayant évolué vers une forme accélérée A : accélérée). Les symboles utilisés figurent dans le tableau 2.

2) Evaluation des anomalies locomotrices en tant que marqueurs prédictifs

Parmi les 9 chiens testés ayant évolué vers une forme accélérée, 2 ont évolué au galop (bonds), et 7 au trot ; parallèlement, parmi les 10 chiens testés n'ayant pas évolué vers une forme accélérée, 4 ont évolué au galop (bonds), et 6 au trot.

L'ensemble des variables d'accélérométrie décrites plus haut ont été calculées chez les 19 chiens GRMD de deux mois, et leur valeur prédictive potentielle évaluée (tableau 7). La fréquence des cycles locomoteurs est significativement ($p = 0.0070$) plus faible chez les chiens qui ont, par la suite, évolué vers une forme accélérée. Ceci est très probablement à

l'origine d'une diminution de la vitesse ($p = 0.0223$), et de la puissance ($p = 0.0489$) chez ces mêmes animaux. La perte de puissance apparaît comme uniquement liée à la perte de vitesse, dans la mesure où la force n'est pas différente entre les deux groupes ($p = 0.1326$).

La diminution de fréquence, non significative chez les chiens GRMD toutes évolutions confondues, en comparaison des chiens sains, à l'âge de deux mois, a été décrite plus haut comme une modification tardive de la locomotion. Cependant, chez les animaux présentant une forme accélérée, cette modification apparaît comme étant déjà présente à l'âge de deux mois. Comme le montre le graphe A de la figure 7, il existe peu de superposition entre les deux populations sur les valeurs de fréquence, permettant de proposer cette variable comme marqueur prédictif. A partir de la population de 19 chiens étudiée ici, la détermination d'un seuil en-dessous duquel une évolution accélérée pourrait être prédite, peut être effectuée, même si l'effectif demande à être étoffé, afin d'être en mesure d'effectuer des tests de type ROC par exemple. Sept des neuf chiens ayant perdu la locomotion avaient une fréquence de cycle à deux mois inférieure à 2.3/s ; parallèlement, 9 des 10 chiens n'ayant pas perdu la locomotion avaient une valeur supérieure à 2.3 cycles/s. Ce seuil de 2.3 cycles par seconde a donc, au vu de cette population de 19 chiens, et en tant que marqueur prédictif, une sensibilité de 78 % (7/9), et une spécificité de 90 % (9/10).

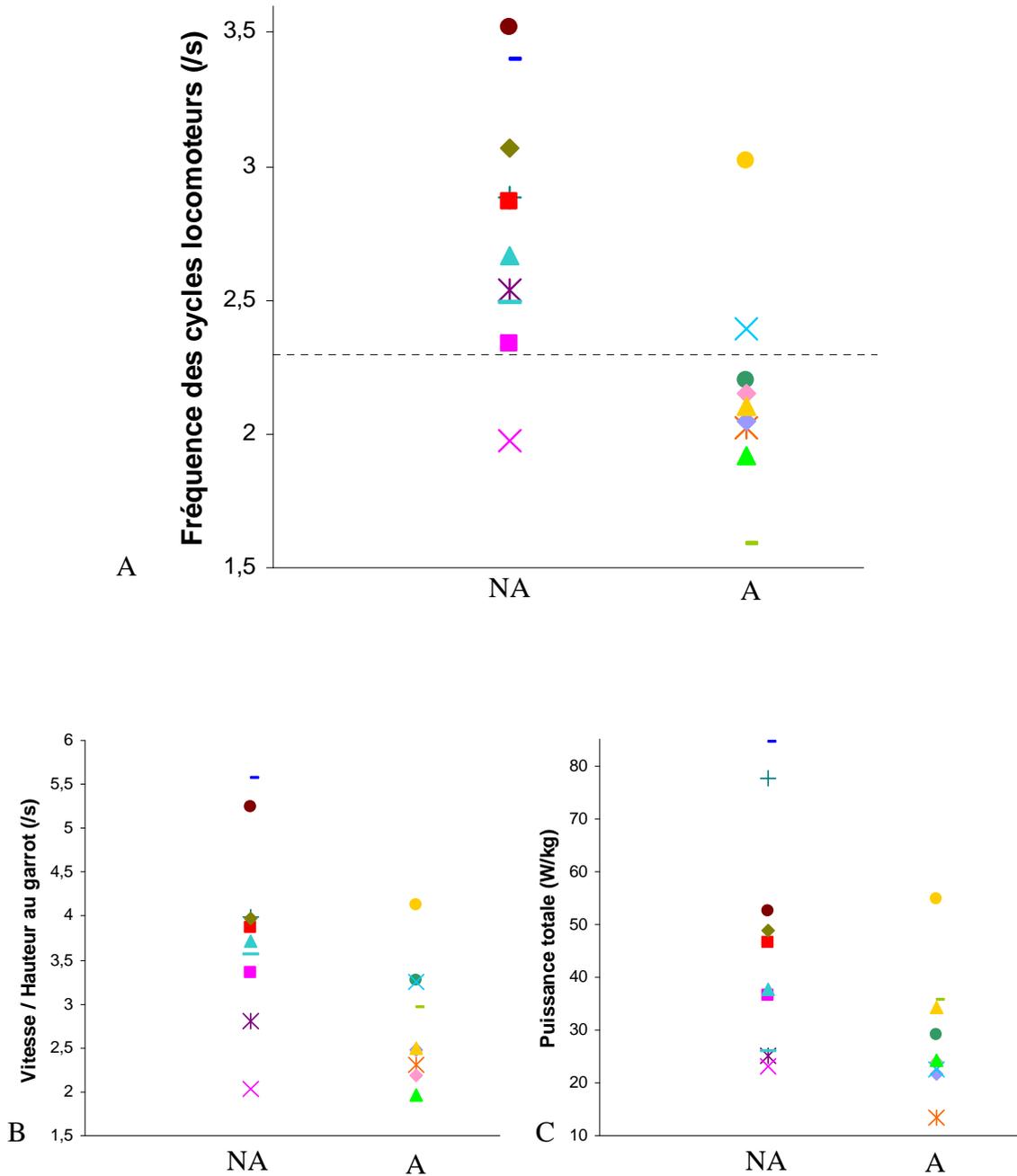
Les graphes de la figure 7 montrent que la vitesse et la puissance totale, bien que diminuées chez les chiens à formes accélérées, ne pourraient être utilisées en tant que marqueurs prédictifs, la zone de superposition entre les deux populations étant trop importante.

Tableau 7 : Anomalies locomotrices : recherche de marqueurs prédictifs - résultats de l'analyse statistique

	Effet évolution	Moy (ET) évolution accélérée	Moy (ET) évolution « classique »
Vitesse/HG (/s)	p = 0.0223	2.78 (0.68)	3.81 (1.04)
Fréquence des cycles (/s)	p = 0.0070	2.16 (0.39)	2.77 (0.47)
Longueur des foulées/HG	p = 0.6098	1.30 (0.27)	1.35 (0.18)
Régularité	p = 0.7584	199.3 (42.7)	207.2 (64.6)
Puissance totale (W/kg)	p = 0.0489	28.9 (11.8)	45.8 (21.1)
Puissance dorso-ventrale/PT (%)	p = 0.2799	35.5 (8.1)	41.5 (14.2)
Puissance cranio-caudale/PT (%)	p = 0.4452	49.9 (14.3)	44.4 (16.0)
Puissance médio-latérale/PT (%)	p = 0.8781	14.6 (8.9)	14.0 (6.3)
Force (N/kg)	p = 0.1326	31.5 (11.5)	42.5 (17.7)
D_{eucl}	p = 0.3514	3.20 (0.81)	2.86 (0.75)

Les résultats de l'effet du type d'évolution, calculés par l'ANOVA, figurent dans ce tableau, pour chacune des variables d'accélérométrie, ainsi que la moyenne et l'écart-type obtenus dans chacun des deux groupes. Abréviations : HG : hauteur au garrot ; PT : puissance totale ; D_{eucl} : distance euclidienne au barycentre des chiens sains sur le plan d'ACP ; Moy : moyenne ; ET : écart-type. Les résultats significatifs figurent en gras.

Figure 7 : Valeur prédictive de la fréquence des cycles, de la vitesse et de la puissance totale illustrée par des graphes.



Valeurs comparées de la fréquence des cycles (A), de la vitesse, normalisée par la hauteur au garrot (B), et de la puissance totale (C), entre chiens à évolution non accélérée (NA, à la gauche des graphes) et chiens à évolution accélérée (A, à la droite des graphes). Sur le graphe A, le seuil proposé de fréquence des cycles (2.3/s), permettant de prédire le type d'évolution clinique, est illustré par une droite en pointillés noire.

3) Evaluation des anomalies de relaxation en tant que marqueurs prédictifs

Cette étude a été réalisée *a posteriori* sur des mesures de force réalisées sur le groupe le plus jeune, c'est-à-dire à l'âge de 4 mois. Il s'agit donc du temps le plus précoce auquel des données sur la relaxation sont disponibles.

Les cinq animaux ayant évolué vers une forme accélérée montrent des valeurs de contraction résiduelle post-tétanique significativement supérieures à celles des chiens n'ayant pas perdu la locomotion ($p = 0.0043$). De plus, leur vitesse de relaxation est également significativement diminuée ($p = 0.0132$), comme le montrent les valeurs obtenues pour la relaxation à 100 ms en pourcentage de la relaxation post-tétanique. Les valeurs de relaxation après 100 ms, en pourcentage de la force tétanique, sont donc *de facto* significativement diminuées ($p = 0.0034$), puisqu'elles reflètent la vitesse et le niveau de relaxation post-tétanique. (Tableau 8)

Les graphes de la figure 7 illustrent les différences existant entre les deux groupes pour ces 3 indices de relaxation.

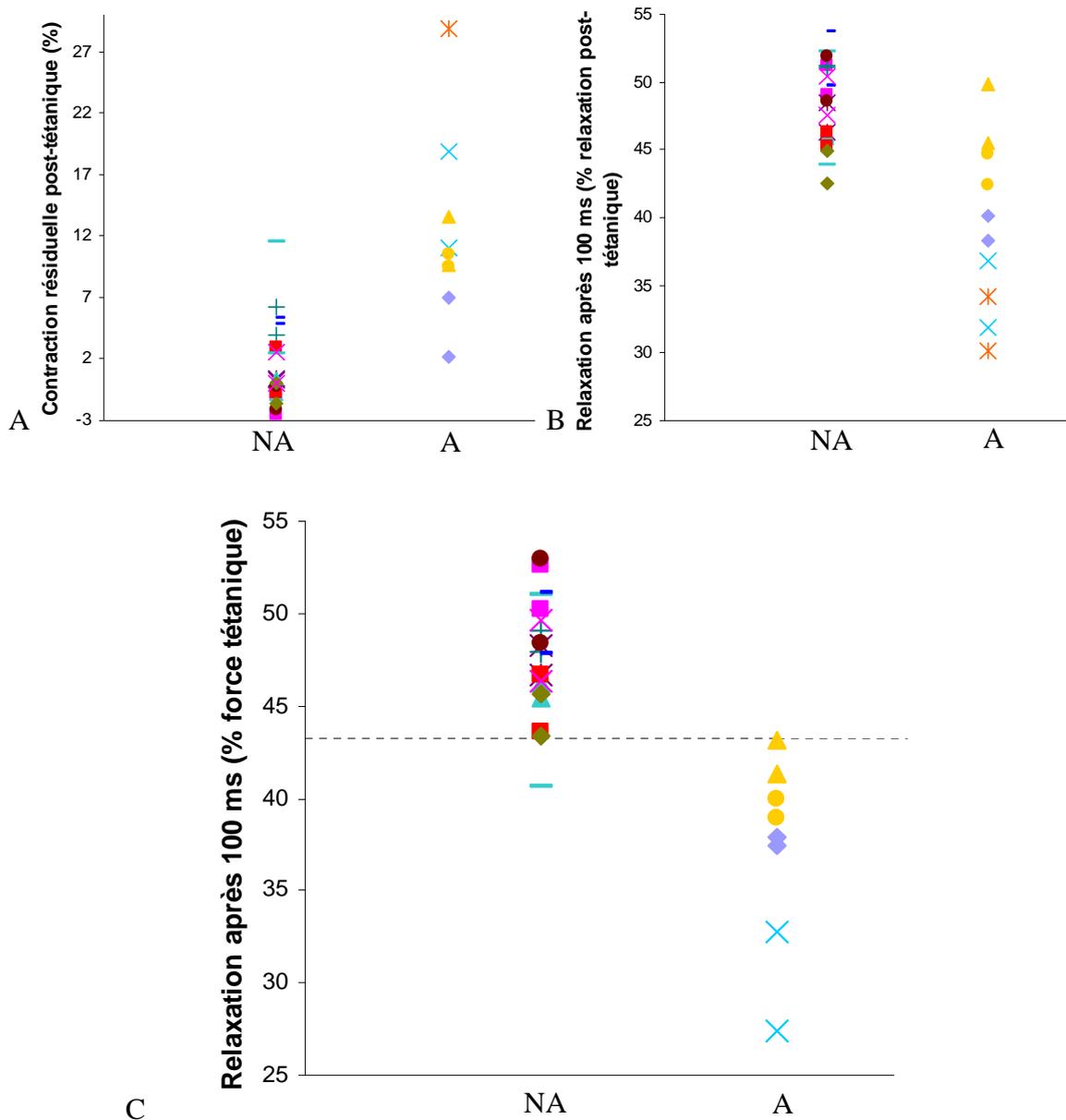
Ils montrent également que seule la relaxation après 100 ms, exprimée en pourcentage de la force tétanique, montre une zone de superposition assez limitée pour permettre de déterminer un seuil en-dessous duquel il serait possible de prédire une forme accélérée. Ainsi, cinq chiens sur les cinq ayant évolué vers une forme accélérée présentent une relaxation après 100 ms inférieure à 43.2% de la force tétanique. Parmi les 11 chiens n'ayant pas perdu la locomotion, seul un (Dluge, postérieur droit) présente une valeur inférieure à 43.2 %. En tant que marqueur prédictif, sur cette population de 16 animaux, ce seuil de 43.2 % aurait donc une sensibilité de 100 %, et une spécificité de 90.9 %.

Tableau 8 : Anomalies de la relaxation : recherche de marqueurs prédictifs - résultats de l'analyse statistique

	Effet évolution	Moy (ET) évolution accélérée	Moy (ET) évolution « classique »
Contraction résiduelle P-T (%)	p = 0.0043	14.3 (9.4)	2.6 (4.6)
Relaxation 100 ms (% relaxation P-T)	p = 0.0132	39.4 (6.4)	47.2 (4.7)
Relaxation 100 ms (% force tétanique)	p = 0.0034	34.4 (7.7)	46.2 (5.6)

Les résultats de l'effet du type d'évolution, calculés par l'ANOVA, figurent dans ce tableau, pour chacun des trois indices de relaxation, ainsi que la moyenne et l'écart-type obtenus dans chacun des deux groupes. Abréviations : P-T : post-tétanique ; Moy : moyenne ; ET : écart-type. Les résultats significatifs figurent en gras.

Figure 8 : Valeur prédictive des trois indices de relaxation, illustrée par des graphes.



Valeurs comparées de la contraction résiduelle post-tétanique (A), de la relaxation après 100 ms, en pourcentage de la relaxation post-tétanique (B), et de la relaxation après 100 ms, en pourcentage de la force tétonique (C), entre chiens à évolution non accélérée (NA, à la gauche des graphes) et chiens à évolution accélérée (A, à la droite des graphes). Sur le graphe C, le seuil proposé de relaxation à 100 ms en pourcentage de la force tétonique (43.2 %), permettant de prédire le type d'évolution clinique, est illustré par une droite en pointillés noire.

IV. Discussion

La valeur prédictive de nombreux indices histologiques, cliniques et fonctionnels a été évaluée, et certains d'entre eux ont montré leur capacité à anticiper les formes cliniques accélérées. Chez les patients atteints de DMD, une fibrose endomysiale précoce, éloignant les fibres musculaires de leurs capillaires, a montré sa valeur prédictive des formes cliniques plus prononcées. Une corrélation forte entre fibrose endomysiale et faiblesse musculaire du muscle étudié (le quadriceps) a par ailleurs été mise en évidence. Chez les chiens GRMD, aucune tentative de corrélation de l'état histologique des muscles au phénotype clinique n'a réellement fait l'objet de publications spécifiques. Les quelques observations publiées suggèrent que les biopsies musculaires de chiens fortement touchés ne sont pas systématiquement les plus lésées (Ambrosio et al. 2009).

Les résultats obtenus sur l'analyse histologique des biopsies précoces n'ont permis de mettre en évidence aucune lésion histologique spécifique chez les chiens ayant évolué vers une forme clinique accélérée. La variabilité des lésions observées s'est pourtant avérée importante, mais non reliée au devenir des animaux, ou même à leur état clinique lors de la biopsie. Le développement de la fibrose s'est notamment avéré hautement variable, mais sans lien avec la survenue des formes cliniques accélérées. Il s'agit là d'un point de discordance avec l'étude menée chez les patients, qui pourrait, outre les variations interspécifiques, être lié à une différence méthodologique : ici, seule la fibrose globale (périmysiale et endomysiale) a été évaluée. D'éventuelles différences dans le développement de la fibrose endomysiale ont donc pu être masquées par la fibrose périmysiale, très majoritaire dans ce type d'analyse (Desguerre et al. 2009b).

Par ailleurs, le muscle choisi, le biceps fémoral, est un muscle décrit comme peu lésé en début d'évolution, et notamment à l'âge de deux mois, chez le chien GRMD (Valentine and Cooper 1991). En tant que fléchisseur, et également parce qu'il subit peu les nécroses massives mises en évidence dans certains groupes musculaires durant les premiers jours à semaines, ce muscle est donc relativement épargné en comparaison d'extenseurs tels que le sartorius crânial par exemple (Kornegay et al. 1999, Valentine and Cooper 1991). Or, cette étude l'a démontré, les animaux évoluant vers une forme accélérée, présentent déjà, à l'âge de 2 mois, une atteinte clinique plus marquée. Il serait envisageable de supposer que ces animaux ont, durant leur période néonatale, présenté davantage de lésions que les autres animaux, dans les muscles touchés à ce stade. Dans ce contexte, une analyse histologique d'un muscle tel que le

sartorius crânial pourrait conduire à identifier des marqueurs histologiques, et à corrélérer davantage l'état lésionnel du muscle à l'état clinique. L'étude menée chez les patients atteints de DMD portait d'ailleurs sur des biopsies du muscle quadriceps, muscle très touché dans cette maladie (Desguerre et al. 2009b).

L'âge de deux mois, considéré comme l'âge de début des symptômes locomoteurs chez les chiens GRMD (Valentine et al. 1988), a été choisi pour la mise en évidence de facteurs prédictifs, et car il constitue un âge pertinent pour une sélection éventuelle d'animaux pour un essai pré-clinique. Toutefois, bien que cet âge soit considéré comme le début de la maladie canine, l'hétérogénéité clinique est déjà perceptible par l'opérateur qui réalise le score clinique, puisque les scores obtenus chez les animaux évoluant vers des formes accélérées sont plus élevés. L'analyse plus précise de la locomotion par accélérométrie va dans le même sens. Ainsi, les chiens GRMD évoluant vers une forme accélérée ne parviennent pas à maintenir une fréquence de cycles locomoteurs équivalente à celle des chiens ne perdant pas la locomotion, ce qui entraîne une diminution de leur vitesse. Cette chute précoce de la fréquence des cycles, pourtant décrite plus haut comme un évènement tardif dans la population générale de chiens GRMD, est une altération déjà présente chez ces animaux au premier test. Cet élément renforce la notion de forme clinique accélérée.

L'origine de cette diminution de fréquence des cycles est difficile à déterminer avec certitude. Cependant, il serait envisageable de la relier à un défaut précoce de relaxation chez ces animaux. La diminution de vitesse de relaxation, mise en évidence chez les animaux évoluant vers des formes accélérées, pourrait expliquer le ralentissement des cycles locomoteurs. Par ailleurs, le défaut de relaxation, également mis en évidence chez ces animaux, pourrait être à l'origine de contractures, entravant la souplesse de locomotion, et se traduisant par une fréquence réduite. Le fait que la diminution de fréquence et les défauts de relaxation soient tous deux des évènements tardifs dans la population GRMD globale suggère également qu'un lien pourrait exister entre ces deux déficits.

La relaxation, évaluée au cours des mesures de force, s'est montrée corrélée à l'atteinte clinique mesurée par le score moteur (chapitre 1, I). C'est pourquoi, même si les mesures de relaxation n'ont pas été réalisées chez les chiens GRMD de 2 mois, le choix a été fait ici d'étudier les valeurs obtenues au premier test, à 4 mois. A cet âge, la relaxation après 100 ms, en pourcentage de la force post-tétanique, peut être considérée comme un marqueur prédictif de qualité. Néanmoins, si les chiens à évolution accélérée étudiés n'avaient pas encore perdu la locomotion à ce stade, leur fonction motrice était déjà altérée de façon majeure, comme en

témoigne leur score clinique moteur, très augmenté ($p = 0.0003$). Par ailleurs, 4 mois est un âge déjà avancé, auquel un marqueur prédictif conditionnant l'inclusion des animaux dans un essai pré-clinique serait de peu d'utilité. Les résultats obtenus à 4 mois pour la relaxation sont toutefois prometteurs, et justifieraient une étude sur la valeur prédictive de ces mêmes mesures à l'âge de 2 mois.

Outre ces différences entre les deux groupes de chiens GRMD, mises en évidence à 2 mois et témoignant d'une séparation de ces deux groupes déjà active à ce stade précoce de la maladie, cette étude a permis de mettre à la disposition de l'évaluateur un nouvel outil, permettant une maîtrise de l'hétérogénéité clinique souvent reprochée au chien GRMD. Ainsi, si le groupe étudié nécessite d'être étoffé, il semble toutefois envisageable de prédire, à l'âge de 2 mois, suite au premier test d'accélérométrie, quels chiens évolueront vers une forme accélérée avec perte de la locomotion. Ainsi, la valeur de fréquence de cycle pourrait devenir un critère d'inclusion dans un essai pré-clinique.

Sélectionner uniquement des animaux évoluant à une fréquence inférieure à 2.3 cycles par seconde permettrait de disposer d'un groupe homogène d'animaux, tout en étant en mesure de démontrer de manière fiable un bénéfice apporté par le traitement. En effet, si les animaux traités, devant évoluer vers une forme accélérée, ne perdent pas la locomotion, le bénéfice est alors clair, lisible et peu contestable. Cependant, la mise en place de stratégies thérapeutiques chez ce type d'animaux peut soulever des interrogations. Ainsi, si le traitement à tester doit être initié très tôt dans le cours de la maladie, les chiens évoluant vers des formes accélérées ne sont probablement pas les bons candidats. En pareil cas, une sélection des chiens ne perdant pas la locomotion peut également être proposée, conduisant à l'utilisation d'un groupe plus homogène que la population totale de chiens GRMD.

Les résultats de cette étude suggèrent par ailleurs qu'à un même âge, tous les chiens GRMD ne sont pas au même stade de leur maladie. Débuter un traitement à 2 mois chez un chien compris dans le groupe des formes accélérées n'équivaut probablement pas à le débiter chez un chien GRMD sans perte de locomotion. Au-delà, la question de l'utilisation de l'âge seul comme critère de début d'essai peut être posée. Y associer un critère clinique tel que le seuil de fréquence défini ici semble intéressant.

Si ce chapitre a permis d'identifier des facteurs prédictifs, nouveaux outils permettant d'optimiser l'utilisation des chiens GRMD dans le cadre d'essais pré-cliniques, la question de l'origine des formes accélérées n'a pas trouvé de réponse au travers de l'étude histologique, et reste donc en suspens. L'hétérogénéité du chien GRMD, présentée comme un obstacle à son

utilisation au début de ce travail a tout d'abord été quantifiée à l'aide d'outils d'évaluation, puis maîtrisée par la mise en évidence de facteurs prédictifs. Reste à en faire un atout, et à l'exploiter : comprendre pourquoi certains de ces animaux évoluent vers une perte totale de la locomotion pourrait permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Chapitre 3 : Etude des effets d'un traitement immunosuppresseur chez le chien GRMD

I. Introduction

Parmi les essais pré-cliniques déjà menés sur le chien GRMD, nombreux sont ceux qui ont nécessité la mise en place d'une immunosuppression, afin d'éviter un rejet de greffe de cellules (Dell'Agnola et al. 2004, Sampaolesi et al. 2006), ou une réponse immune contre un vecteur (Cerletti et al. 2003, Wang et al. 2007). Parmi ces études, l'une, menée à l'école vétérinaire d'Alfort, en collaboration avec le stem cell research institute de Milan (Sampaolesi et al. 2006), a vu ses conclusions critiquées (Bretag 2007). Les chiens ayant reçu des greffes hétérologues de mésoangioblastes, sous traitement immunosuppresseur, montraient notamment une augmentation de la force musculaire du membre injecté, en comparaison du membre controlatéral (Sampaolesi et al. 2006). Les critiques formulées à l'égard de cette étude ont remis en cause le fait que le bénéfice fonctionnel observé soit lié aux greffes de cellules, et ont suggéré que cette amélioration pourrait être uniquement liée au traitement immunosuppresseur administré.

Ces critiques sont fondées sur le fait que le traitement utilisé était une association de cyclosporine A et de corticostéroïdes, molécules décrites comme apportant un bénéfice fonctionnel aux patients atteints de DMD.

Les stéroïdes, prednisone, prednisolone, ou deflazacort, sont d'ailleurs largement utilisés chez les patients, puisqu'il s'agit de la seule famille pharmacologique ayant clairement démontré son efficacité dans cette maladie (Wong and Christopher 2002). Si les nombreuses publications sur le sujet sont très hétérogènes quant aux molécules utilisées, aux doses

choisies, au rythme d'administration, à la durée du traitement, et aux méthodes d'évaluation, elles aboutissent quasiment toutes aux mêmes conclusions. Les corticostéroïdes augmentent la force musculaire (Connolly et al. 2002, Merlini et al. 2003), améliorent la fonction motrice (Merlini et al. 2003) et respiratoire (Daftary et al. 2007, Fenichel et al. 1991), permettent de retarder l'âge de perte de la marche jusqu'à 3 ans (Pradhan et al. 2006) (Carter and McDonald 2000), et le développement de la dysfonction ventriculaire gauche (Markham et al. 2008). Les mêmes observations ont pu être faites dans le modèle murin *mdx* (Baltgalvis et al. 2009, Keeling et al. 2007). Les mécanismes impliqués ne sont cependant pas connus avec certitude.

Les stéroïdes permettraient de renforcer la membrane des fibres musculaires et de diminuer les dommages créés durant la contraction (Jacobs et al. 1996). Ils auraient également un effet bénéfique sur l'homéostasie calcique, permettant de diminuer l'activation des protéases liée aux surcharges calciques cytoplasmiques (Alderton and Steinhardt 2000, Metzinger et al. 1995). Cet effet a néanmoins été contesté, au profit d'une augmentation des capacités régénératives (Vandebrouck et al. 1999). La myogénèse, et le nombre de cellules satellites seraient augmentées par les stéroïdes (Hussein et al. 2010, Passaquin et al. 1993). Par ailleurs, ils pourraient augmenter la fréquence des fibres révertantes, et de protéines dites analogues à la dystrophine, de type utrophine, ainsi que les protéines du complexe associé (Hardiman et al. 1993, Passaquin et al. 1993). Enfin, par leur effet anti-inflammatoire à immunosuppresseur, ils diminueraient le nombre de cellules dendritiques dans le tissu musculaire, ainsi que l'infiltrat inflammatoire présent dans le tissu dystrophique (Hussein et al. 2006, Kissel et al. 1991, Kissel et al. 1993). Cette dernière hypothèse a cependant été remise en question par le fait qu'un immunosuppresseur tel que l'azathioprine, bien qu'ayant les mêmes effets sur le nombre de cellules inflammatoires dans le tissu musculaire, n'a aucun effet clinique sur les patients atteints de DMD (Kissel et al. 1991). De la même façon, un effet bénéfique de la prednisone a été mis en évidence dans un modèle dépourvu de système immunitaire, *Caenorhabditis elegans* (Gaud et al. 2004).

La cyclosporine A, immunosuppresseur également utilisé chez le chien GRMD (Dell'Agnola et al. 2004, Sampaolesi et al. 2006), a fait l'objet de moins d'études, mais certaines d'entre elles démontrent que cette molécule apporte également un bénéfice, en terme de force musculaire, aux patients atteints de DMD (Miller et al. 1997, Sharma et al. 1993). Une récente étude à plus grande échelle sur l'intérêt de la cyclosporine A pour DMD n'a pas pu mettre en évidence de bénéfice clair, apporté par ce traitement (Kirschner et al. 2010).

Etant donné le nombre d'études démontrant que les deux molécules, utilisées en association chez les chiens GRMD ayant reçu des greffes de mésoangioblastes, apportent un bénéfice fonctionnel aux patients DMD, la critique formulée à l'égard de cette étude peut être comprise. Néanmoins, les doses employées chez les patients et entraînant ce bénéfice sont très inférieures à celles utilisées dans le cadre d'une immunosuppression. Or, à ces hautes doses, un effet négatif de ces deux principes actifs pourrait être envisagé : les corticoïdes à doses élevée peuvent induire une myopathie (Owczarek et al. 2005), et la cyclosporine A bloque l'activité de la calcineurine, dont les voies sont notamment impliquées dans la régénération et la croissance musculaires (Michel et al. 2004).

Quoi qu'il en soit, une étude des effets de cette association d'immunosuppresseurs chez le chien GRMD se devait d'être réalisée, afin de disposer de chiens « témoins » des animaux greffés. Seule une étude sur les effets de la prednisone à deux doses différentes avait en effet été réalisée chez le chien GRMD (Liu et al. 2004). Elle a montré une augmentation de la force des extenseurs, et une diminution de la force des fléchisseurs du tarse, aux deux doses testées. Parallèlement, des lésions musculaires plus prononcées ont été mises en évidence dans le groupe de chiens traités à haute dose.

L'étude présentée ici a donc pour objectif principal de déterminer si l'association de la cyclosporine et des corticostéroïdes, à dose immunosuppressive, influe sur l'évolution de la maladie chez le chien GRMD. Si tel s'avère être le cas, le second objectif est de décrire de manière quantifiée l'évolution d'une population témoin, pouvant être utilisée comme base de comparaison pour des essais nécessitant une immunosuppression. Enfin, cette étude peut également être considérée comme un essai thérapeutique pilote, permettant d'éprouver les différents outils mis au point, en situation d'évaluation d'un effet fonctionnel, apporté par un traitement.

II. Matériel et méthode

Sept chiens mâles GRMD ont été inclus dans cette étude, qui s'est déroulée sur 28 mois, au cours desquels les méthodes d'évaluation des chiens GRMD ont évolué, et les outils décrits dans le chapitre 1 se sont progressivement mis en place. L'étude comprenait initialement un suivi clinique (scores clinique réguliers), biochimique, ainsi que des mesures de force et des biopsies musculaires. L'évaluation de la locomotion et de la fonction respiratoire a été

implémentée au protocole de suivi, sur les animaux inclus plus tardivement. De la même façon, la gestion du protocole d'immunosuppression a connu des évolutions qui seront détaillées plus bas.

A. Immunosuppression par une association de prednisolone et de cyclosporine A

Un traitement immunosuppresseur associant la prednisolone (Mégasolone ®), à la dose de 2 mg/kg/j, à la cyclosporine A (Néoral ®), à la dose de 20 mg/kg/j a été mis en place chez les 7 chiens, à l'âge de 2 mois et jusqu'à l'âge de 9 mois. Le traitement a été administré sans interruption durant cette période de 7 mois. La distribution des traitements avait lieu de manière biquotidienne, les deux prises étant espacées d'une douzaine d'heures, afin de stabiliser au mieux la pharmacocinétique de la cyclosporine. La pesée quotidienne des animaux a permis un ajustement de la dose au poids, chez ces animaux en croissance.

Les sept chiens ont subi un contrôle de leur cyclosporinémie. Un prélèvement sanguin a pour cela été réalisé, au moins une fois par semaine, juste avant la prise du matin, soit douze heures après la prise du soir. Néanmoins, sur les cinq premiers animaux traités, les échantillons ont été stockés, puis dosés *a posteriori*. De très importantes variations de la cyclosporinémie ont été observées entre chiens et pour le même chien, d'un dosage à l'autre, à la dose fixe de 20 mg/kg/j. La gestion de l'administration de cyclosporine a donc été modifiée pour les deux derniers chiens : les dosages étaient réalisés dans la journée suivant le prélèvement, et les doses de cyclosporine ont été ajustées afin d'atteindre une cyclosporinémie comprise entre 200 et 300 ng/ml, concentrations sériques limites permettant un blocage de la prolifération lymphocytaire (Lennon et al. 1987). Chez ces deux animaux, cette nouvelle procédure, plus conforme au suivi réalisé chez les patients humains, a conduit à des modifications régulières de la posologie de la cyclosporine, qui a atteint chez ces deux chiens 40 mg/kg/j, soit le double de la dose initialement choisie.

B. Suivis clinique et biochimique

1) Suivi clinique

Les sept animaux ont fait l'objet d'un suivi clinique classique de chien GRMD (pesée quotidienne, examens cliniques réguliers, radiographie thoracique mensuelle...), et d'une attention particulière à la survenue d'effets secondaires du traitement.

2) Suivi biochimique

Un prélèvement de sang a été réalisé de manière hebdomadaire, toute la durée du traitement. Un bilan biochimique a été réalisé sur les échantillons collectés, afin de détecter une éventuelle toxicité rénale ou hépatique du traitement administré.

Par ailleurs, un dosage des créatine kinases (CK) a également été réalisé, afin de disposer d'un indice biochimique des lésions musculaires de ces animaux.

C. Quantification de la pathologie musculaire par étude de biopsies du muscle tibial crânial

Les chiens traités ont subi une biopsie musculaire du muscle tibial crânial, à l'âge de 6 mois et de 9 mois, après mesure de force du groupe musculaire dont le tibial crânial est le principal représentant.

Leurs biopsies ont été comparées à des biopsies de ce même muscle, réalisées chez cinq chiens GRMD de 6 mois, et 5 chiens GRMD de 9 mois.

1) Procédure chirurgicale

Les biopsies musculaires ont été réalisées sous anesthésie générale, à l'issue des mesures de force à 6 et 9 mois. Une incision cutanée a été pratiquée en regard du muscle tibial crânial. Après dissection douce du tissu sous-cutané, les fascias ont été incisés, et le muscle mis en évidence. Une biopsie de 0.5 cm de diamètre et 1 cm de longueur environ a été prélevée. Après hémostase, le site a été suturé par surjets du fascia, du sous-cutané, puis de la peau.

L'analgésie a été assurée par une injection de morphine, à la dose de 0.1 mg/kg par voie intraveineuse avant incision cutanée.

2) Traitement et analyse des biopsies

a) Congélation, stockage et coupe des biopsies

Comme décrit plus haut (chapitre 2), les biopsies ont été aussitôt congelées dans l'isopentane refroidi dans l'azote liquide, puis stockées à -80°C avant d'être traitées. Des coupes de 10 µm ont été réalisées pour les colorations morphologiques, et des coupes de 7 µm pour l'immunohistochimie.

b) Quantification lésionnelle globale sur coupes colorées à l'Hématéine-Eosine

Pour chaque animal traité ou non traité, une coupe colorée à l'hématéine-éosine, comme décrit plus haut (chapitre 2) a été photographiée dans son intégralité. L'image ainsi obtenue a été analysée dans le logiciel Visilog 6.4, à l'aide de la macro spécifique d'annotation de grille, et conformément à la procédure énoncée dans le chapitre 2.

Les variables suivantes ont été utilisées pour l'analyse statistique :

- Index pathologique : il correspond au pourcentage d'évènements ne correspondant pas à une fibre d'aspect normal.
- Pourcentage de fibres en régénération
- Pourcentage de fibres à noyaux centralisés
- Pourcentage de fibres en nécrose
- Pourcentage de fibres ayant subi une métaplasie adipeuse

c) Quantification des fibres surchargées en calcium sur coupes colorées au rouge Alizarine S.

La coloration des coupes au rouge alizarine S a été réalisée, conformément à la procédure énoncée dans le chapitre 2.

Une coupe de chaque animal à chacun des deux âges a été photographiée dans son intégralité, et analysée par simple comptage des fibres surchargées, dans le logiciel Photoshop CS3. Une

distinction a été réalisée entre fibres légèrement surchargées (coloration rose foncé) et fibres très surchargées à calcifiées (rouge vif).

La superficie de chaque coupe a été déterminée, ainsi que sa densité en fibres musculaires. Cette dernière a été estimée par comptage du nombre de fibres musculaires contenues dans cinq zones prises au hasard sur la coupe, et d'une aire connue (cf e)). Ainsi, le nombre de fibres contenues dans la biopsie a pu être estimé.

d) Quantification du tissu conjonctif sur coupes colorées au rouge Sirius, et contre-colorées au Fast Green.

Les coupes colorées au rouge sirius et fast green, conformément à la procédure énoncée dans le chapitre 2, ont été photographiées dans leur intégralité, et analysées dans le logiciel Visilog 6.4, à l'aide la macro permettant la distinction rouge-vert (voir chapitre 2 pour davantage de détails).

La proportion de la surface occupée par le tissu conjonctif ainsi obtenue a été utilisée pour l'analyse statistique.

e) Quantification des fibres de type I, par marquage immunohistochimique de la myosine lente

Pour chaque biopsie, un marquage immunohistochimique de la myosine lente a été réalisé, afin de déterminer la proportion de fibres de type I dans les biopsies.

Un anticorps de souris anti myosine lente (NCL-MHCs, Novocastra) a été utilisé, dilué au 1/80^{ème}. Un anticorps secondaire HRP (Horseradish peroxidase, Dako ®) de lapin anti-souris a été ensuite appliqué sur les coupes. La révélation du marquage immunohistochimique a été effectuée par réaction avec la DAB, laissée en contact avec les coupes durant une minute.

Les coupes ainsi marquées ont été photographiées dans leur intégralité. Cinq zones prises au hasard ont été délimitées sur l'image, et leur aire mesurée. Le nombre de fibres marquées positivement a été déterminé par comptage dans le logiciel Photoshop CS3. Le nombre total de fibres contenues dans ces zones a également été déterminé.

La proportion de fibres exprimant la myosine lente, en %, a été utilisée pour l'analyse statistique.

f) Quantification des fibres révertantes, par marquage immunohistochimique de la dystrophine

Un anticorps de souris anti-dystrophine, partie C-terminale, (NCL-Dys2), a été utilisé, dilué au 1/20^{ème}. Un anticorps secondaire HRP (Horseradish peroxidase, Dako ®) de lapin anti-souris a été ensuite appliqué sur les coupes. La révélation du marquage immunohistochimique a été effectuée par réaction avec la DAB, laissée en contact avec les coupes durant cinq minutes. Ce marquage a été réalisé en co-marquage avec l'anticorps anti-CD4 canin (cf infra). Les coupes ainsi marquées ont été photographiées dans leur intégralité. L'image ainsi obtenue a été analysée dans le logiciel photoshop CS3, par comptage des fibres montrant un marquage positif sur plus de la moitié de leur contour. Le nombre de fibres dites « révertantes » a été exprimé en proportion du nombre total de fibres contenues dans la biopsie, lui-même estimé grâce à un calcul de densité réalisé sur les coupes ayant subi un immunomarquage de la myosine lente (cf e)), et extrapolé à la coupe entière, dont l'aire a été mesurée.

g) Quantification et caractérisation de l'infiltrat mononucléé par marquages immunohistochimiques

Les coupes de 7 µm sur lames superfrost ont subi deux double marquages différents afin de quantifier leur infiltrat inflammatoire. Un anticorps de souris anti-CD11b canin (macrophages) (Serotec) a été utilisé dilué au 1/50^{ème}, en association avec un anticorps de rat anti CD8 canin (lymphocyte T cytotoxiques) (Serotec), dilué au 1/50^{ème} également. Un anticorps de rat anti-CD4 canin (lymphocytes T helper) (Serotec), dilué au 1/50^{ème} a par ailleurs été utilisé en co-marquage avec l'anticorps anti-dystrophine (voir f)). La révélation de l'activité de la peroxydase a été réalisée par la DAB (Dako®) dans le cas de l'anticorps de souris, entraînant la formation d'un précipité brun, et par le kit Histogreen (Vector laboratories) dans le cas des anticorps de rat, entraînant la formation d'un précipité vert. Une contre-coloration des noyaux à l'hématéine (4 minutes) a été réalisée.

Le dénombrement des macrophages et des deux types de lymphocytes T a été réalisé sur images de coupes entières, dans le logiciel Photoshop CS3, à l'aide de l'outil comptage. Le

nombre de cellules ainsi calculé a été exprimé par unité de surface (nombre de cellules par mm²), après détermination de l'aire de la coupe.

D. Mesure de la force musculaire

La force musculaire des animaux a été évaluée, sur le module de première génération, à l'âge de 4, 6 et 9 mois, conformément à la procédure énoncée plus haut (chapitre 1, D). Ont été analysées les variables suivantes :

- Force tétanique maximale relative (/kg)
- Fatigue au cours de la quatrième séquence

Les données obtenues ont été comparées à celles de la population GRMD témoin, présentées plus haut (chapitre 1, I, B)

Les deux derniers chiens inclus (Doc et Doodle) ont également été évalués sur le module de seconde génération, à l'âge de 4, 6 et 9 mois, une semaine après la mesure sur le premier module. Pour ces deux animaux, les variables suivantes ont été analysées :

- Force tétanique maximale relative (/kg et /m)
- Fatigue au cours de la quatrième séquence
- Relaxation post-tétanique après 100 ms
- Contraction résiduelle post-tétanique

Chez ces deux animaux, l'amplitude des potentiels d'action composés a également été examinée.

Les données obtenues ont été comparées à celles de la population GRMD témoin, présentées plus haut (chapitre 1, I, C)

E. Evaluation de l'atteinte motrice globale par réalisation de scores cliniques

Un score clinique a été effectué sur les animaux traités, chaque mois, pendant toute la durée du traitement (de l'âge de 2 mois à l'âge de 9 mois). Le score moteur, exprimé en pourcentage du score maximal (situation la plus défavorable) a été utilisé pour l'analyse.

Les données obtenues ont été confrontées à celles obtenues chez les vingt-quatre chiens GRMD témoins, inclus dans l'étude d'évaluation de la locomotion par accélérométrie (chapitre 1, II).

F. Evaluation de la locomotion par accélérométrie

Les quatre derniers chiens inclus (Cushing, Cvite, Doc et Doodle) ont pu être évalués par accélérométrie, de l'âge de 2 mois à l'âge de 9 mois, à raison d'un test toutes les deux semaines, conformément à la procédure de suivi longitudinal énoncée dans le chapitre 1, II, C. Néanmoins, les deux premiers chiens évalués par cette méthode (Cushing et Cvite) l'ont été, pour le début de leur suivi, alors que la méthode était en cours de mise en place. Certaines variables n'ont donc pas pu être calculées pour les premiers tests chez ces deux animaux. Ainsi, la vitesse de Cushing n'a été déterminée qu'à partir du test réalisé à l'âge de 5.5 mois, et sa hauteur au garrot à 6.5 mois. De la même façon, Cvite n'a été chronométré qu'à partir de l'âge de 4 mois, et sa hauteur au garrot mesurée à partir de 5 mois. Les données de vitesse et de longueur des foulées, normalisées par la hauteur au garrot ne sont donc disponibles pour ces deux animaux qu'aux âges respectifs de 6.5 et de 5 mois. Les autres variables d'accélérométrie (cf chapitre 1, II) ont pu être calculées dès l'âge de 2 mois.

Toutes ces variables ont été analysées, et confrontées à celles obtenues pour la population de 24 chiens GRMD témoins, et présentées dans le chapitre 1, II, C.

G. Evaluation de la fonction respiratoire par cinématique diaphragmatique et spirométrie

Les deux derniers chiens inclus (Doc et Doodle) ont été évalués par les deux méthodes d'évaluation respiratoire mises au point (chapitre 1, III).

Des acquisitions radioscopiques ont été effectuées à 3, 4, 6 et 8 mois chez les deux animaux. La distance parcourue par le diaphragme entre fin d'inspiration et fin d'expiration, ainsi que l'index de rétraction caudale du diaphragme ont été calculées, conformément à la méthode énoncée plus haut (chapitre 1, III). Ces données ont été confrontées à celles obtenues sur les 10 chiens GRMD témoins décrits dans le chapitre 1, III, C.

Des tests de sipométrie ont été effectués à 3, 4, 5, 6, et 7 mois sur les deux animaux, et à 9 mois seulement sur Doodle. Les variables suivantes ont été calculées et analysées :

- DIP/DEP (débit inspiratoire de pointe / débit expiratoire de pointe)
- DE50/DEP (débit expiratoire à 50 % du volume expiré / débit expiratoire de pointe)
- DE75/DEP (débit expiratoire à 75 % du volume expiré / débit expiratoire de pointe)
- DE50/DE25 (débit expiratoire à 50 % du volume expiré / débit expiratoire à 25 % du volume expiré)
- DE75/DE25 (débit expiratoire à 75 % du volume expiré / débit expiratoire à 25 % du volume expiré)

Ces données ont été confrontées à celles obtenues pour la population de 12 chiens GRMD témoins décrits dans le chapitre 1, III, C.

H. Analyse statistique

Les valeurs de chacune des variables étudiées, obtenues chez les chiens traités, ont été comparées à celles obtenues chez des chiens GRMD non traités du même âge, par ANOVA à un facteur (traité versus non traité). Une ANOVA à mesures répétées à un effet intra (gauche versus droite) a été utilisée pour l'analyse des résultats de mesures de forces.

Les chiens traités ont par ailleurs été projetés en tant qu'individus supplémentaires sur les deux plans d'ACP définis dans le chapitre 1, et élaborés à partir des variables d'accélérométrie pour l'un, et des variables de spirométrie et de cinématique diaphragmatique pour l'autre. La distance euclidienne de chacun des individus traités, au barycentre des chiens sains du même âge sur le plan d'ACP, a été calculée conformément à la méthode énoncée dans le chapitre 1. Ces deux index fonctionnels globaux, l'un locomoteur, l'autre respiratoire, ont également fait l'objet d'une ANOVA à un facteur inter (traité versus non traité).

Le seuil de rejet de l'hypothèse nulle a été fixé à $p < 0.05$ pour l'ensemble des tests.

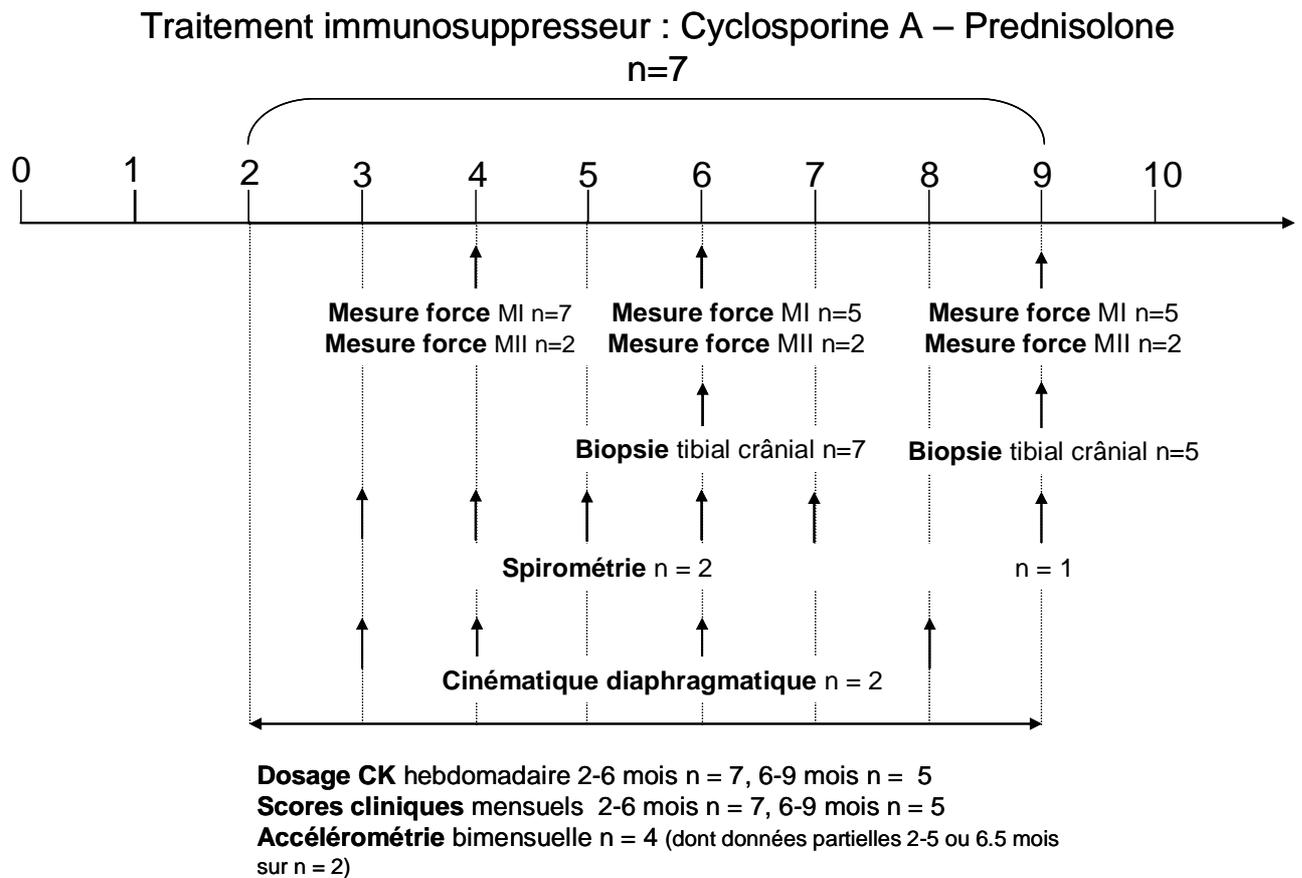
Le tableau 1 et la figure 1 offrent une synthèse des différents examens réalisés sur les sept animaux en cours de traitement.

Tableau 1 : Animaux inclus et méthodes d'évaluation utilisées

	Nom [ordre d'inclusion] (symbole graphes)						
	Celsius [1] (+)	Clappy [2] (✖)	Clim [3] (✕)	Cushing [4] (◆)	Cvite [5] (●)	Doc [6] (■)	Doodle [7] (▲)
Prednisolone (dose)	2 mg/kg/j	2 mg/kg/j	2 mg/kg/j	2 mg/kg/j	2 mg/kg/j	2 mg/kg/j	2 mg/kg/j
CsA (dose fixe ou ajustée)	F (20 mg/kg/j)	F (20 mg/kg/j)	F (20 mg/kg/j)	F (20 mg/kg/j)	F (20 mg/kg/j)	A (8.5 à 40 mg/kg/j)	A (20 à 40 mg/kg/j)
Dosage CK sériques hebdomadaire	X (2-9 mois)	X (2-6 mois)	X (2-6 mois)	X (2-9 mois)	X (2-9 mois)	X (2-9 mois)	X (2-9 mois)
Biopsie 6 mois		X	X	X	X	X	X
Biopsie 9 mois	X	Décès 6 mois	Décès 6 mois	X	X	X	X
Mesure de force 4 mois (module)	X (MI)	X (MI)	X (MI)	X (MI)	X (MI)	X (MI+MII)	X (MI+MII)
Mesure de force 6 mois (module)	X (MI)	Décès 6 mois	Décès 6 mois	X (MI)	X (MI)	X (MI+MII)	X (MI+MII)
Mesure de force 9 mois (module)	X (MI)	Décès 6 mois	Décès 6 mois	X (MI)	X (MI)	X (MI)	X (MI+MII)
Score clinique mensuel	X (2-9 mois)	X (2-6 mois)	X (2-6 mois)	X (2-9 mois)	X (2-9 mois)	X (2-9 mois)	X (2-9 mois)
Accélérométrie bimensuelle 2-9 mois				X (données complètes à partir 6.5 mois)	X (données complètes à partir 5 mois)	X (données complètes)	X (données complètes)
Cinématique diaphragmatique						X (3, 4, 6, 8 mois)	X (3, 4, 6, 8 mois)
Spirométrie						X (3, 4, 5, 6, 7 mois)	X (3, 4, 5, 6, 7, 9 mois)

Pour chaque chien sont indiqués le symbole lui correspondant et qui sera utilisé dans les graphes (sous le nom), ainsi que les tests effectués, et méthodes d'évaluation employées. Une croix (X) figure dans la case correspondante lorsque le test a été effectué. Dans le cas contraire, la case est grisée. Abréviations : CsA : cyclosporine A, F : fixe, A : ajustée, MI : module de première génération, MII : module de seconde génération.

Figure 1 : Protocole schématisé sous forme d'un diagramme de gantt



Sous l'axe représentant l'âge en mois, sont indiqués les principaux examens réalisés sur les animaux, ainsi que le nombre de chiens concernés.

III. Résultats

A. Suivis clinique et biochimique

1) Suivi clinique

Cinq des sept chiens inclus ont pu être examinés jusqu'à la fin du traitement à l'âge de 9 mois. Les deux autres chiens sont décédés à l'âge de 6 mois de bronchopneumonie aiguë, avant de pouvoir subir la mesure de force prévue à ce stade dans le protocole.

Le traitement de cyclosporine a dû être interrompu sur le chien Doc durant 48 heures, à l'âge de 8.5 mois, en raison de très fortes valeurs de cyclosporinémie liées à un défaut de métabolisation hépatique de cette molécule, s'inscrivant dans le cadre d'une insuffisance hépatique développée par cet animal dans son dernier mois de traitement.

Les complications habituelles de la maladie ont été observées sur la quasi-totalité des animaux. Ainsi, 4 d'entre eux ont développé une hernie hiatale. En particulier, chez le chien Cushing, l'estomac s'est totalement engagé dans une hernie hiatale, et une dilatation aérique de celui-ci, comprimant les poumons, a nécessité une intervention en urgence à l'âge de 6 mois, permettant la réduction de la hernie, et la pose d'un tube de gastrostomie. Des bronchopneumonies ont été observées chez trois des sept chiens, et ont entraîné le décès de deux d'entre eux. Enfin, des luxations ou ankyloses articulaires vicieuses ont été observées chez trois des sept chiens traités.

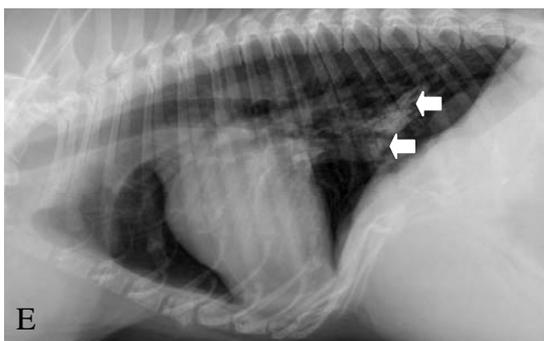
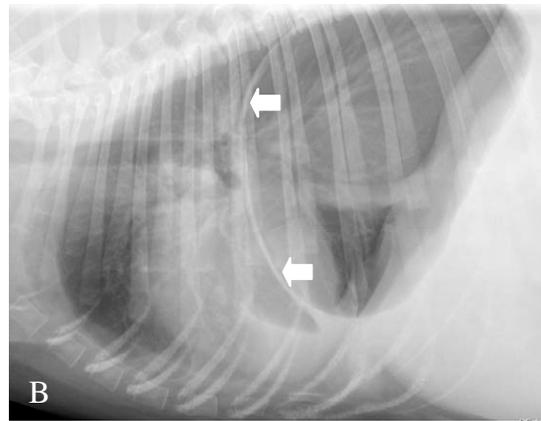
Des effets secondaires du traitement ont été observés sur tous les animaux, à des degrés différents. Un retard de croissance a été observé sur les sept animaux. La hauteur au garrot, mesurée sur quatre chiens, s'est en effet avérée significativement inférieure ($p < 0.01$) à celle des chiens GRMD non traités, dès l'âge de 5 mois. Cinq des sept chiens ont développé une obésité, qui s'est résolue par l'alimentation par sonde chez le chien Cushing.

Deux chiens (Cvite et Doc) ont développé des troubles de la coagulation, qui ont entraîné une hémorragie pulmonaire consécutive à l'anesthésie générale qu'ils ont subie pour leur mesure de force à 9 mois. Cette hémorragie pulmonaire a entraîné le décès des deux animaux.

Des infections opportunistes se sont également développées. Le chien Cvite a présenté une uvéite ayant nécessité une énucléation, qui a été suivie d'une importante complication infectieuse bactérienne. Chez cinq des sept chiens, des papillomes viro-induits ont été observés. Chez l'un d'entre eux (Celsius), ces papillomes se sont étendus de manière spectaculaire, notamment en région interdigitée des deux membres antérieurs, entravant la locomotion de ce chien en fin de traitement. Enfin, des calcifications ectopiques ont été mises en évidence chez les sept animaux, avec pour localisation préférentielle la zone sublinguale, mais également le tissu sous-cutané, ou encore les poumons.

La figure 2 illustre ces différents aspects de l'évolution clinique des chiens traités.

Figure 2 : Complications cliniques et effets secondaires illustrés par quelques photos.



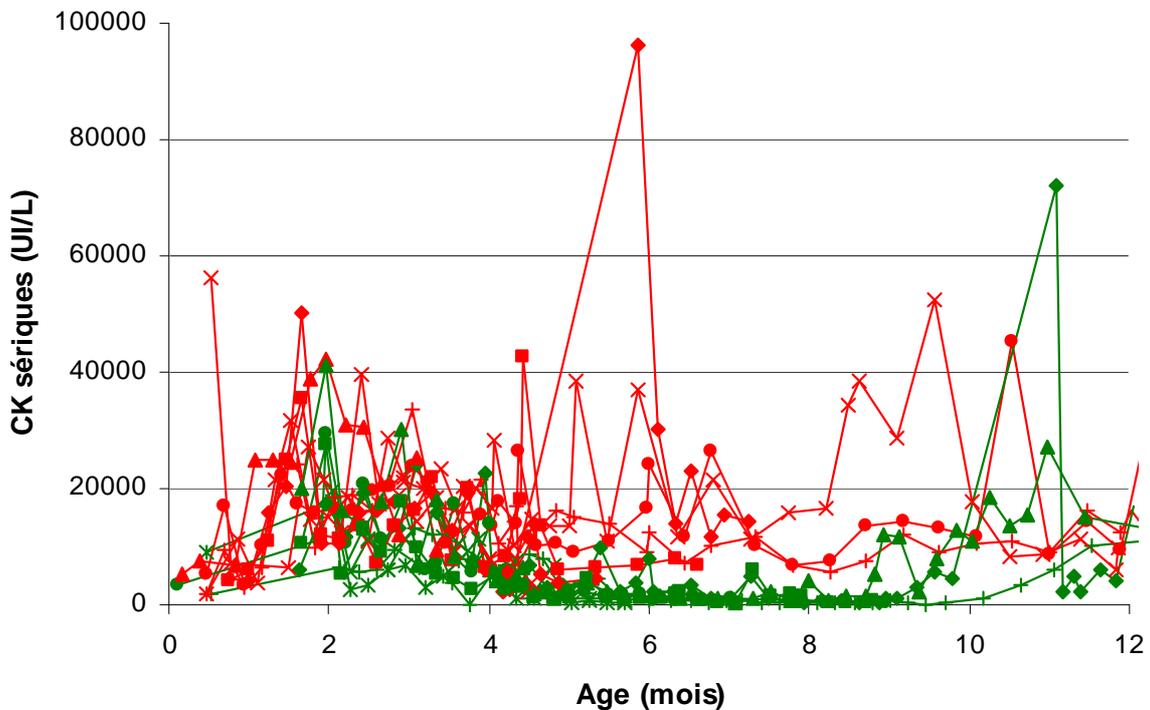
Les photos A et B illustrent quelques unes des complications cliniques classiquement rencontrées chez les chiens GRMD, et observées chez les animaux traités. A : ankylose vicieuse des deux carpes (Clim) B : hernie hiatale volumineuse (flèches blanches), dilatée par de l'air (Cushing).

Les photos C à G illustrent quelques effets secondaires du traitement. C : retard de croissance et surpoids, aspect cushingoïde (Cvite), D : abdomen d'un chien traité (Cvite), noter son aspect pléthorique, et la finesse de la peau, rendant bien visible les vaisseaux sous-cutanés, E : calcifications pulmonaires (flèches blanches) visibles sur une radiographie de profil du thorax (Clim), F : calcifications sublinguales (Cvite), G : papillome volumineux sur un membre antérieur (Celsius)

2) Suivi biochimique

Les créatine kinases, très augmentées en début de traitement, comme dans la population GRMD témoin, diminuent progressivement, pour devenir significativement diminuées, à partir de l'âge de 5 mois. Cet effondrement des CK en cours de traitement est illustré par le graphe de la figure 3. Il est également intéressant de noter que les trois animaux ayant survécu ont montré une élévation progressive de leurs valeurs de CK après l'arrêt du traitement, pour rejoindre des valeurs très augmentées, comparables à celles observées classiquement chez les chiens GRMD.

Figure 3 : Evolution des valeurs de concentration sérique en créatine kinases avec l'âge chez les chiens traités, en comparaison de chiens GRMD non traités.



En rouge, sont représentées les valeurs de CK sériques obtenues chez les 8 chiens GRMD témoins. En vert, et avec les symboles correspondant à chaque chien et indiqués dans le tableau 1, figurent les chiens traités.

B. Quantification de la pathologie musculaire par étude de biopsies du muscle tibial crânial

1) Quantification lésionnelle globale

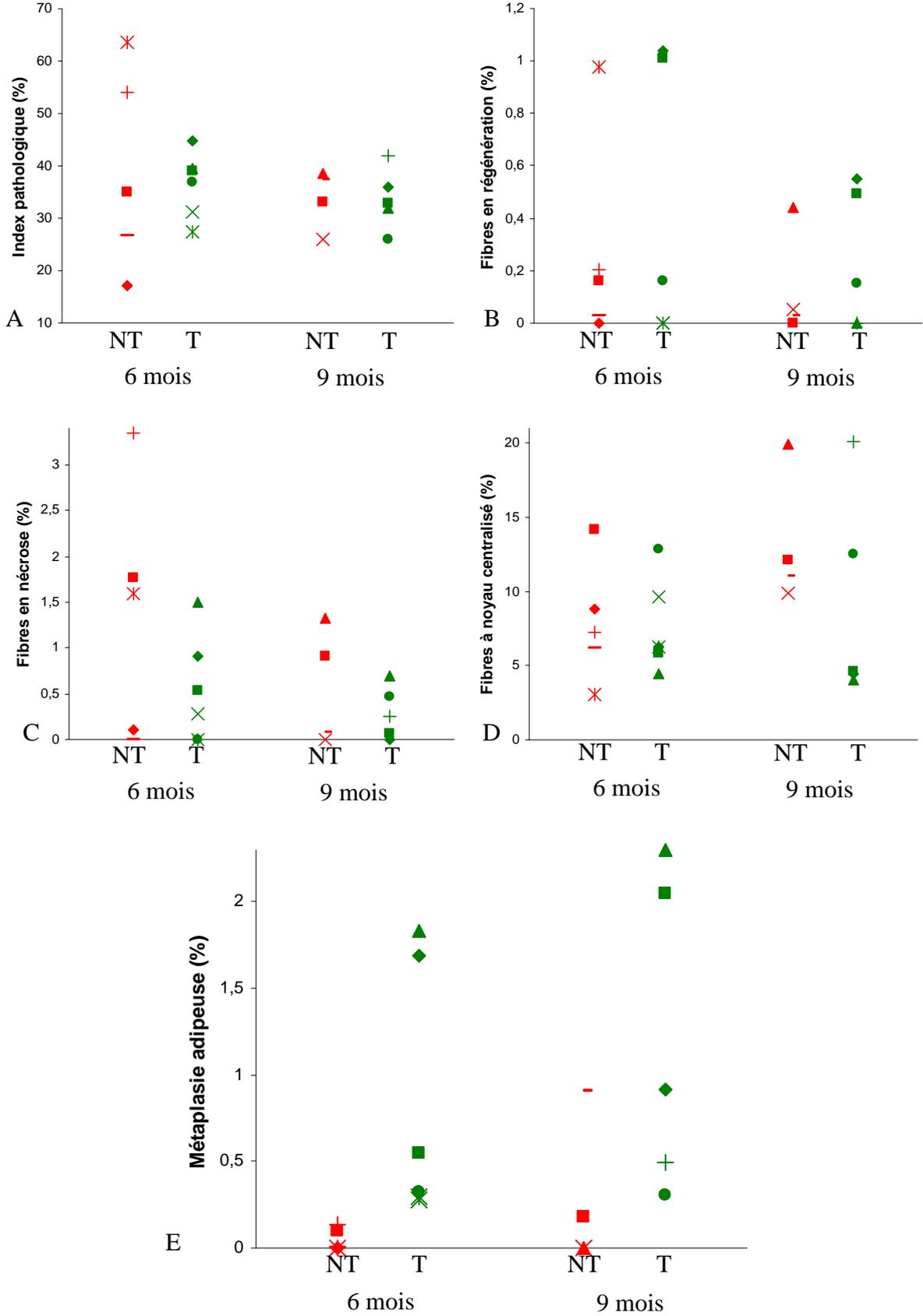
Les coupes des chiens traités, colorées à l'hématéine et éosine, puis annotées, ne s'avèrent pas différentes de coupes de chiens non traités du même âge, en termes d'index pathologique, d'évènements de régénération, de nécrose ou de centralisations nucléaires.

En revanche, les muscles des chiens traités présentent significativement plus d'évènements de métaplasie adipeuse que les muscles des chiens GRMD témoins, à l'âge de 6 mois ($p =$

0.0427). La métaplasie adipeuse représente, chez les chiens traités, 0.83 % des évènements comptés en moyenne (écart-type : 0.73 %), tandis qu'elle ne représente que 0.05 % (écart-type 0.07 %) chez les chiens GRMD témoins. A 9 mois, cette métaplasie adipeuse augmente dans les deux groupes, puisque la moyenne calculée chez les chiens traités atteint 1.22 % des annotations (écart-type : 0.91 %), soit davantage que chez les chiens non traités, pour lesquels cette moyenne est de 0.27 % (écart-type : 0.43 %). A cet âge, la différence n'est cependant plus significative ($p = 0.1001$).

Les graphes de la figure 4 illustrent ces résultats. Ils montrent également qu'il existe une grande variabilité de résultats entre animaux, chez les chiens traités comme chez les chiens témoins.

Figure 4 : Quantification lésionnelle chez les chiens GRMD traités, en comparaison de chiens GRMD témoins.



Pour chacune des 5 variables étudiées par annotation de coupes colorées à l'hématéine et éosine (A : index pathologique, B : fibres en régénération, C : fibres en nécrose, D : fibres à noyau centralisé, E : métaplasie adipeuse), sont représentées les valeurs obtenues pour les chiens non traités (en rouge), et les chiens traités (en vert, avec le symbole leur correspondant, et indiqué dans le tableau 1). A la gauche des graphes figurent les valeurs obtenues à 6 mois, et à la droite des graphes celles obtenues à 9 mois. Abréviations : NT : non traité, T : traité.

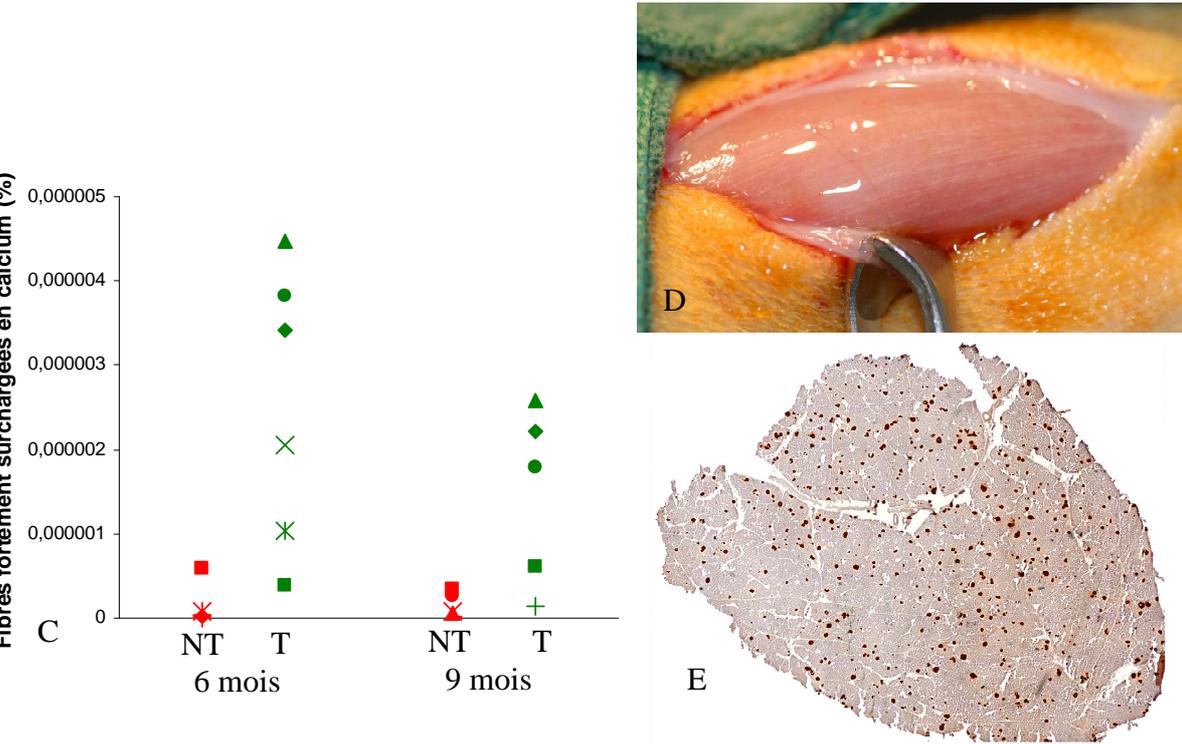
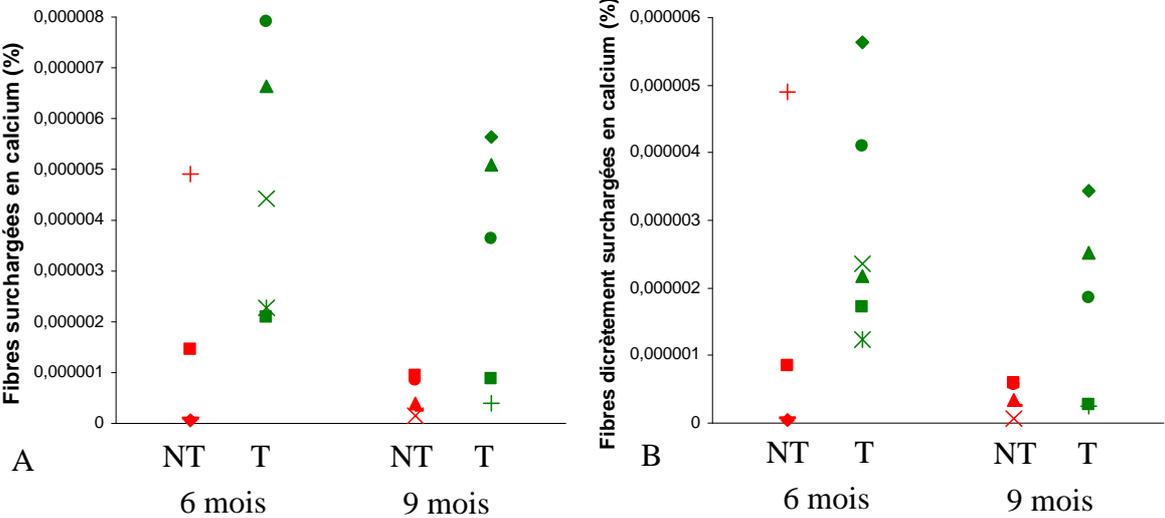
2) Quantification des fibres surchargées en calcium

Les biopsies des chiens traités ne diffèrent pas de celles des chiens non traités quant à la proportion de fibres légèrement surchargées, ou à la proportion totale de fibres surchargées en calcium. En revanche, les biopsies des animaux traités contiennent significativement plus de fibres fortement surchargées à calcifiées, que ce soit à 6 ($p = 0.0106$) ou à 9 mois ($p = 0.0244$).

Ces données corroborent ce que l'aspect macroscopique des muscles des chiens traités suggérait : lors des biopsies, des travées blanches évoquant des calcifications intramusculaires étaient en effet visibles (figure 5, D).

La figure 5 illustre ces résultats.

Figure 5 : Quantification des surcharges calciques chez les chiens traités, en comparaison de chiens GRMD non traités.



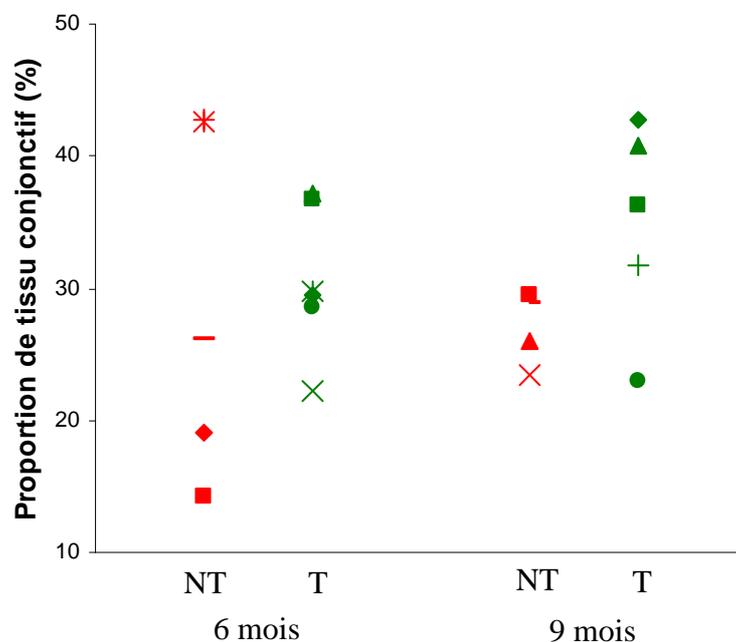
Représentation graphique des valeurs de proportion de fibres surchargées en calcium (A), et de fibres discrètement surchargées (B), et fortement surchargées (C). Les chiens traités sont représentés en vert, par les symboles leur correspondant et figurant dans le tableau 1. Les chiens non traités sont représentés en rouge. A la gauche des graphes sont représentées les valeurs

obtenues à 6 mois, et à la droite des graphes celles obtenues à 9 mois. D : aspect macroscopique du muscle tibial crânial du chien Cvite à 9 mois. Noter les travées blanchâtres, correspondant à des calcifications. E : photographie d'une coupe entière de chien traité (Clim, 6 mois), colorée au rouge Alizarine S. Noter les nombreuses fibres calcifiées (colorées en rouge). Abréviations : NT : non traité, T : traité.

3) Quantification du tissu conjonctif

Le développement du tissu conjonctif, quantifié sur coupes colorées au rouge sirius, n'est pas significativement différent chez les chiens traités. Le graphe de la figure 6 montre qu'à 6 mois les deux populations sont bien superposées ($p = 0.7889$), tandis qu'à 9 mois, une tendance à l'augmentation de l'espace occupé par du tissu conjonctif chez les chiens traités se dessine, mais de manière non significative ($p = 0.0975$).

Figure 6 : Proportion de tissu conjonctif, chez les chiens traités en comparaison de chiens GRMD non traités



Les valeurs de pourcentage de l'espace occupé par du tissu conjonctif sont représentées en rouge pour les chiens non traités, et en vert pour les chiens traités, avec les symboles leur correspondant et figurant dans le tableau 1. A

gauche du graphe, figurent les valeurs obtenues à 6 mois, et à droite celles obtenues à 9 mois. Abréviations : NT : non traité, T : traité.

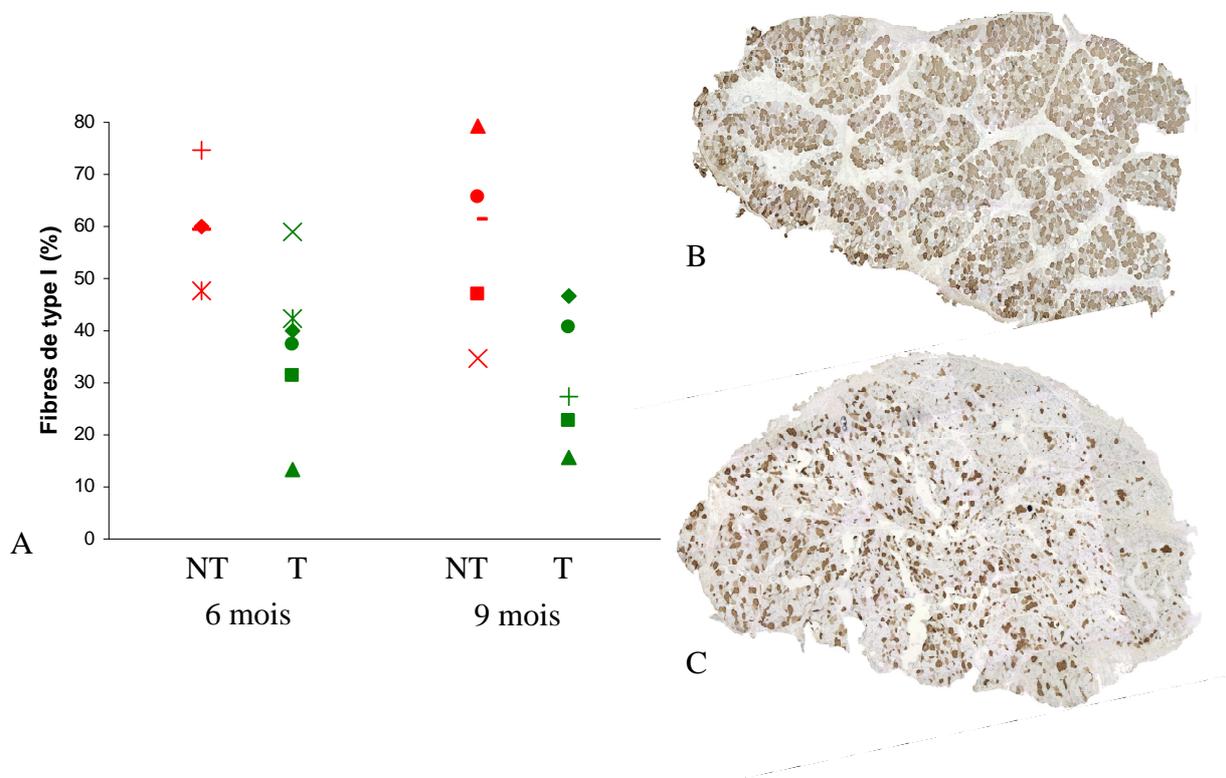
4) Quantification des fibres de type I

A 6 et à 9 mois, les chiens traités présentent significativement ($p = 0.0297$ et $p = 0.0225$ respectivement) moins de fibres de type I que les chiens GRMD témoins. A 6 mois, les animaux traités présentent en effet 37.2 % de fibres lentes en moyenne (écart-type : 14.9 %), tandis que les chiens non traités en présentent en moyenne 60.4 % (écart-type : 11.0 %). A 9 mois, les chiens traités ne présentent plus que 30.6 % de fibres lentes en moyenne (écart-type : 12.7 %), alors que les chiens GRMD témoins en comptent 57.6 % en moyenne (écart-type : 17.2 %).

Le muscle tibial crânial de chiens GRMD témoins est donc à prédominance de fibres lentes à métabolisme oxydatif, tandis qu'à l'inverse, ce même muscle chez les chiens traités comporte une prédominance de fibres rapides à métabolisme glycolytique.

Cette différence est illustrée dans la figure 7.

Figure 7 : Proportion de fibres de type I : comparaison entre chiens traités et chiens GRMD témoins



A : représentation des valeurs de proportion de fibres de type I obtenues chez les chiens GRMD traités (en vert, symboles individuels indiqués dans le tableau 1), en comparaison des chiens GRMD témoins (symboles rouges). A gauche, sont représentées les valeurs obtenues à 6 mois, et à droite, celles obtenues à 9 mois. B : photographie d'une coupe entière de chien GRMD non traité, à 9 mois, ayant subi un immunomarquage de la myosine lente. Noter la forte proportion de fibres marquées positivement C : photographie d'une coupe entière de chien GRMD traité, à 9 mois, ayant subi ce même marquage. Noter la faible proportion de fibres marquées. Abréviations : NT : non traité, T : traité.

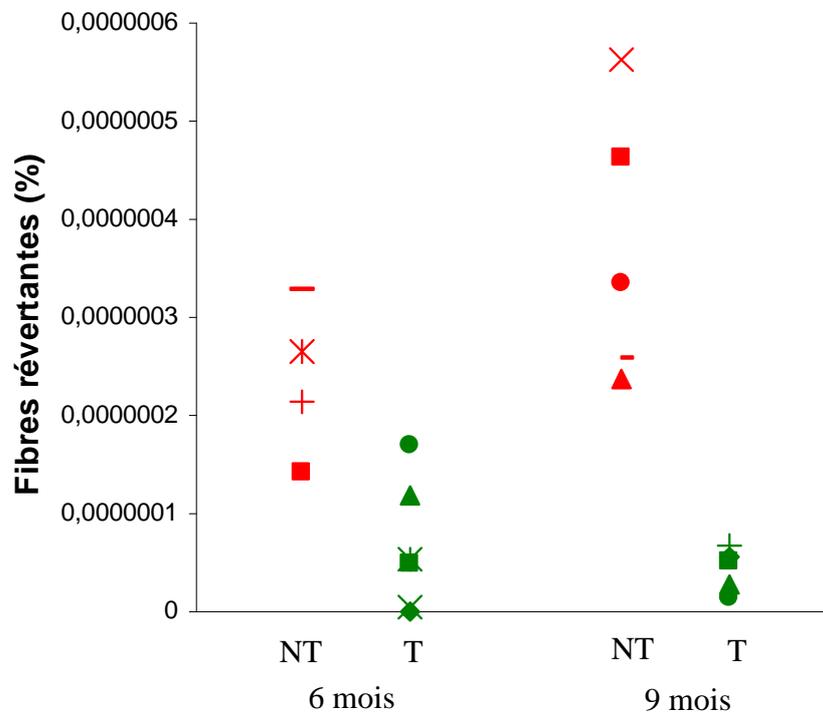
5) Quantification des fibres révertantes

Chez les chiens traités, le nombre de fibres exprimant une dystrophine révertante, comparable à celui obtenu chez les chiens GRMD non traités à 6 mois ($p = 0.1237$), est significativement inférieur à l'âge de 9 mois ($p = 0.0008$). Néanmoins, si la différence est très nette, le nombre

de fibres révertantes reste très faible, dans les deux populations, puisqu'il est en moyenne de $3.7.10^{-7}$ % (écart-type : $1.4.10^{-7}$ %) chez les chiens GRMD témoins, et de seulement $0.4.10^{-7}$ % en moyenne (écart-type : $0.2.10^{-7}$ %) chez les chiens traités.

Ces résultats sont illustrés dans le graphe de la figure 8, qui montre qu'une tendance à la diminution de la proportion de fibres révertantes se dessine à 6 mois, pour se confirmer à 9 mois. Cette proportion, semblant augmenter avec l'âge chez les chiens GRMD témoins, paraît connaître l'évolution inverse chez les chiens traités.

Figure 8 : Proportion de fibres révertantes chez les chiens traités, en comparaison de chiens GRMD non traités.

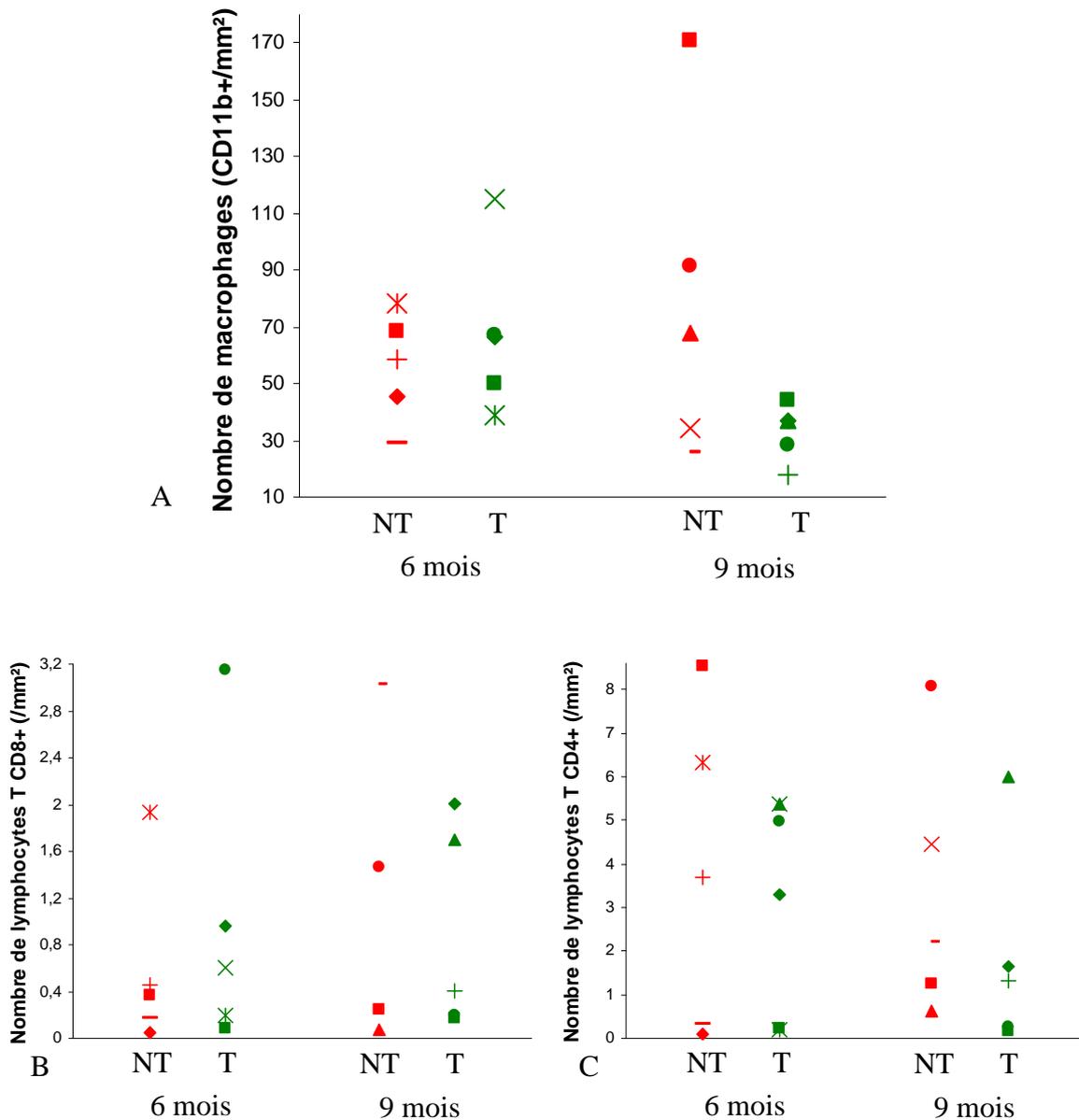


Représentation des valeurs de proportion de fibres révertantes, obtenues chez les chiens traités (symboles verts, correspondance individuelle consultable dans le tableau 1), en comparaison de chiens GRMD non traités (symboles rouges). A la gauche du graphe, figurent les valeurs obtenues à 6 mois, et à sa droite, celles obtenues à 9 mois. Abréviations : NT : non traité, T : traité.

6) Quantification de l'infiltrat mononucléé

Dans les deux populations étudiées, et conformément à ce qui a été précédemment décrit pour le muscle biceps fémoral à 2 mois (chapitre 2), la population de cellules mononucléées largement majoritaire est celle des macrophages (CD11b+). Les lymphocytes T CD4+ sont présents en quantité plus importantes que les lymphocytes T CD8+. Aucune différence significative dans ces proportions, ou dans les quantités de cellules dénombrées n'a pu être mise en évidence chez les chiens traités, même si le nombre de macrophages à 9 mois se situe dans les valeurs basses des chiens témoins, pour l'ensemble des animaux traités ($p = 0.1266$ à cet âge), comme le montre le graphe A de la figure 9.

Figure 9 : Quantification des cellules mononucléées CD11b+, CD8+ et CD4+ chez les chiens traités, en comparaison de chiens GRMD témoins.



Valeurs de nombres de macrophages (A), Lymphocytes T CD8+ (B) et CD4+ (C), par unité de surface, chez les chiens traités (symboles verts indiqués dans le tableau 1), en comparaison de chiens GRMD non traités (symboles rouges). Les résultats obtenus à 6 mois figurent sur la gauche des graphes, tandis que ceux obtenus à 9 mois sont représentés à droite. Abréviations : NT : non traité, T : traité.

C. Mesure de la force musculaire

Les potentiels d'action musculaires composés, d'amplitude significativement diminuée chez les chiens GRMD en comparaison des chiens sains, sont, chez les deux chiens traités dont cette variable a été analysée, d'amplitude significativement augmentée en comparaison des chiens GRMD témoins, à l'âge de 4 ($p = 0.0198$), et de 6 mois ($p = 0.0064$).

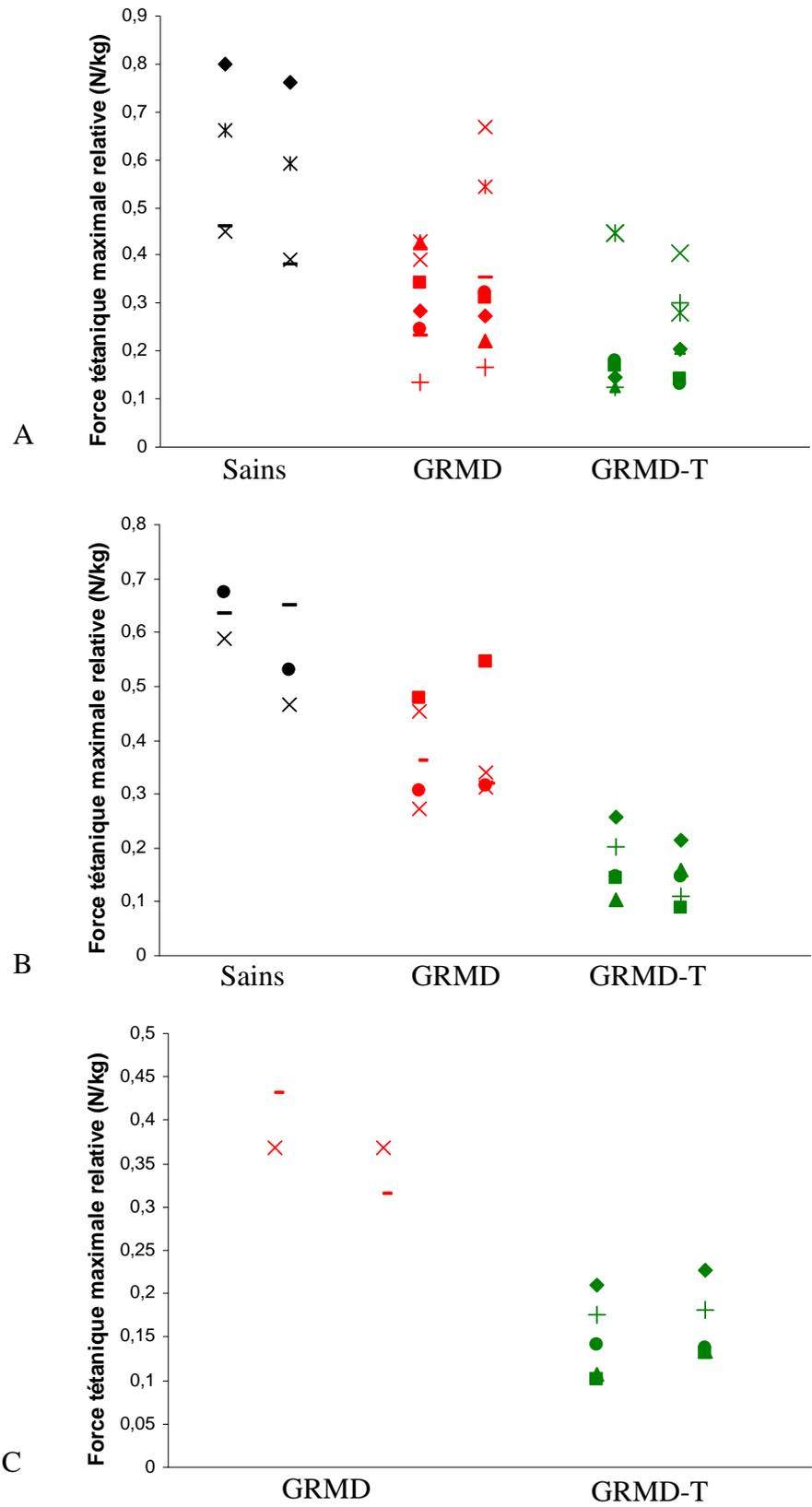
1) Force tétanique maximale

La force tétanique maximale des 7 chiens traités, mesurée à l'âge de 4 mois sur le module de première génération n'est pas significativement différente de celle mesurée chez les chiens GRMD non traités ($p = 0.1281$). Le graphe A de la figure 10 montre qu'effectivement, la superposition entre les deux groupes d'animaux est très nette, même si les chiens traités se situent dans les valeurs basses de la population témoin.

A 6 et à 9 mois en revanche, la force tétanique maximale relative des chiens traités est significativement diminuée ($p = 0.0014$ et $p = 0.0011$ respectivement). Ainsi, par exemple, la force tétanique maximale relative moyenne à 6 mois est, chez les chiens traités, de 0.17 N/kg (écart-type : 0.06 N/kg), soit un peu moins de la moitié de la moyenne mesurée chez les chiens GRMD non traités (0.37, écart-type : 0.09).

Cet effondrement de la force tétanique est illustré dans les graphes de la figure 10.

Figure 10 : Force tétanique maximale relative à 4, 6 et 9 mois chez les chiens GRMD traités en comparaison des chiens sains et GRMD témoins, mesurée avec le module de première génération.

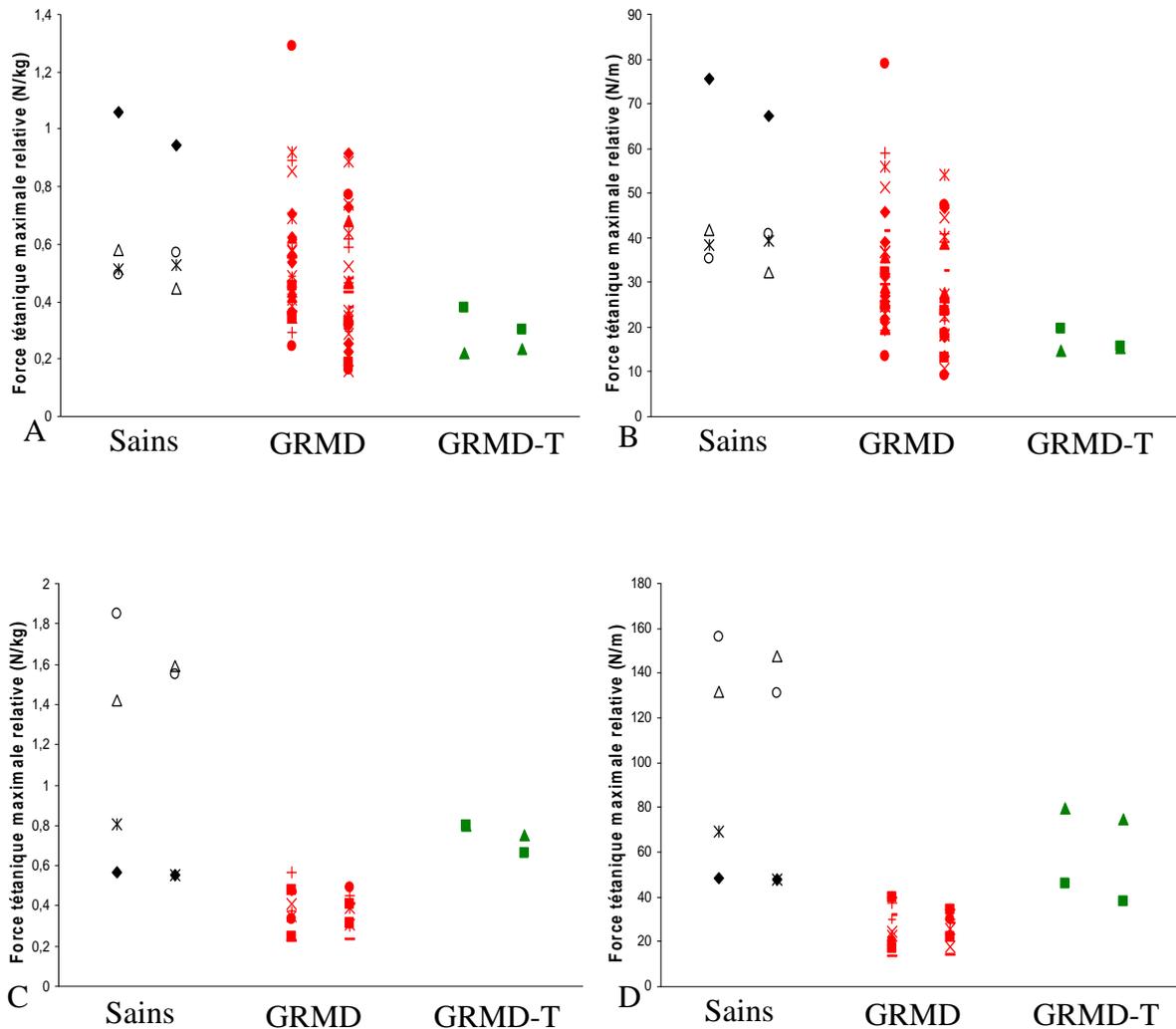


Représentation des valeurs de force tétanique maximale relative (N/kg), obtenues sur le module de première génération, chez les chiens traités (symboles verts, correspondance individuelle indiquée dans le tableau 1), les chiens sains (symboles noirs) et GRMD (symboles rouges). Pour chaque groupe, les points de gauche représentent les résultats obtenus sur le postérieur gauche, et ceux de droite sur le postérieur droit. A : résultats à 4 mois, B : résultats à 6 mois, C : résultats à 9 mois ; à cet âge aucune donnée sur chien sain n'est disponible. Abréviations : GRMD-T : GRMD traité.

Les données obtenues sur les deux chiens traités, également évalués sur le module de seconde génération, sont divergentes. En effet, aux deux âges auxquels les données sur les deux chiens sont disponibles (4 et 6 mois), aucune différence significative avec la population GRMD témoin n'est mise en évidence ($p = 0.1374$ et $p = 0.1279$ respectivement). Le graphe A de la figure 11 montre qu'à 4 mois, les valeurs obtenues chez ces deux animaux se superposent aux valeurs basses de la population GRMD témoin, comme cela était le cas avec le module de première génération. Cependant, à l'âge de 6 mois, la tendance n'est plus du tout la même, puisque les deux chiens montrent des valeurs supérieures à celles obtenues chez les chiens non traités. Cette différence à 6 mois devient d'ailleurs significative ($p = 0.0376$) lorsque la force relative est exprimée en N/m.

Ces observations sont illustrées par les graphes de la figure 11.

Figure 11 : Force tétanique maximale relative mesurée à 4 et 6 mois sur le module de seconde génération, chez les chiens traités, en comparaison des chiens sains, et GRMD témoins.



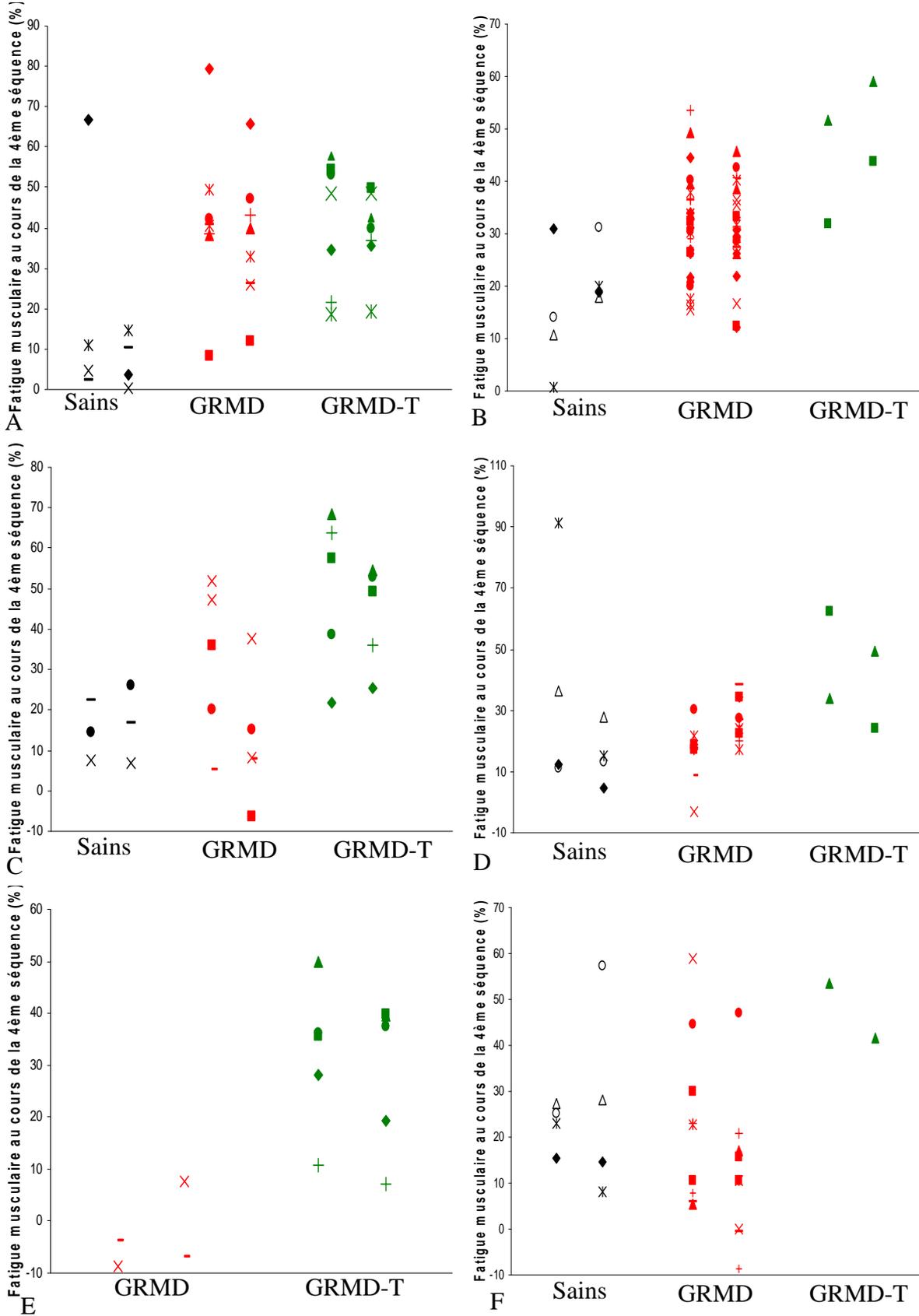
Représentation des valeurs de force tétanique maximale relative, exprimée en N/kg (graphes de gauche A et C) ou en N/m (graphes de droite B et D), à 4 (graphes du haut A et B) et 6 mois (graphes du bas C et D). Les symboles noirs représentent les valeurs obtenues chez les chiens sains, les symboles rouges celles obtenues chez les chiens GRMD témoins, et les symboles verts celles obtenues chez les deux chiens GRMD traités. Pour chaque groupe, les points de gauche représentent les valeurs obtenues pour le postérieur gauche, et les points de droite celles obtenues pour le postérieur droit. Abréviations : GRMD-T : GRMD traité.

2) Fatigue

La fatigue musculaire, mesurée au cours de la dernière séquence de 40 stimulations téaniques espacées de 3 secondes, est significativement augmentée chez les chiens traités évalués sur le module de première génération, à l'âge de 6 ($p = 0.0281$) et de 9 mois ($p = 0.0266$). Les données obtenues sur les deux chiens évalués en doublon sur le module de seconde génération vont dans le même sens : la fatigue est significativement plus importante à 4 ($p = 0.0112$) et à 6 mois ($p = 0.0010$).

Ces résultats sont illustrés dans les graphes de la figure 12.

Figure 12 : Fatigue musculaire chez les chiens GRMD traités, en comparaison des chiens sains et GRMD témoins.



Représentation des valeurs de fatigue mesurée au cours de la quatrième séquence de stimulations téaniques, à 4 (A et B), 6 (C et D) et 9 (E et F) mois, sur le module de première génération (A, C et E), et sur le module de seconde génération (B, D et F). Les symboles noirs représentent les valeurs obtenues chez les chiens sains, les symboles rouges celles obtenues chez les chiens GRMD témoins, et les symboles verts celles obtenues chez les deux chiens GRMD traités. Pour chaque groupe, les points de gauche représentent les valeurs obtenues pour le postérieur gauche, et les points de droite celles obtenues pour le postérieur droit. A 9 mois, les résultats obtenus sur le module de seconde génération ne concernent qu'un seul animal traité, mais ont néanmoins été présentées (F) en comparaison de celles obtenues au même âge sur le module de première génération (E), pour lesquelles aucune donnée de chien sain n'est disponible. Abréviations : GRMD-T : GRMD traité.

3) Relaxation

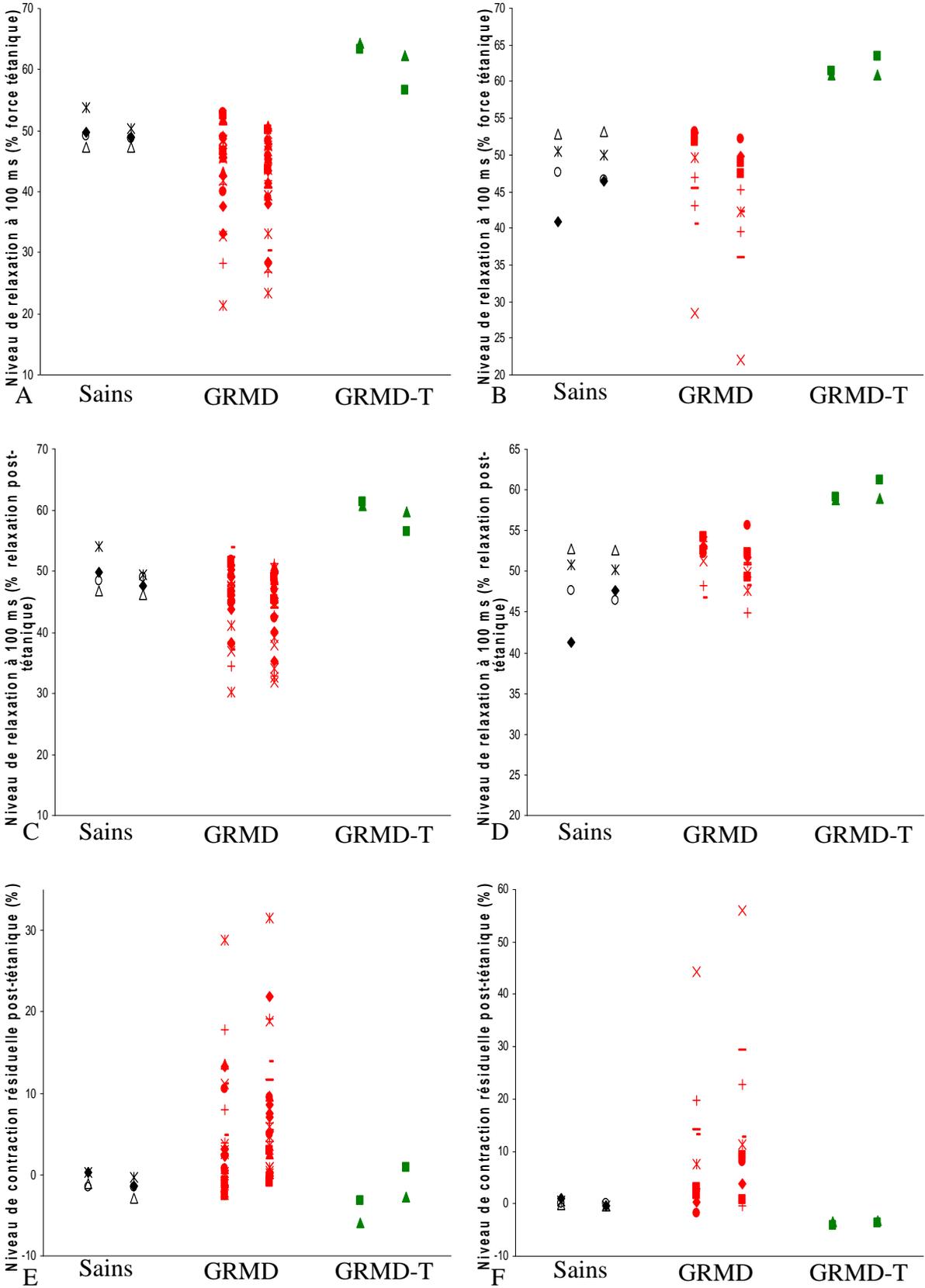
Les données de relaxation, obtenues pour les deux chiens traités, évalués sur le module de seconde génération, montrent une nette augmentation de la vitesse et du niveau de relaxation post-tétanique, à 4 et à 6 mois. Les graphes de la figure 13 montrent en effet que le niveau de relaxation après 100 ms, que ce soit en proportion de la force téanique ou de la relaxation post-tétanique, est augmenté en comparaison des chiens GRMD non traités. Cette différence est significative pour ces deux variables, à 4 mois ($p = 0.0013$ et $p = 0.0009$ respectivement) et à 6 mois ($p = 0.0164$ et $p = 0.0006$ respectivement). Sur les graphes de la figure 13, il apparaît même que ce niveau de relaxation à 100 ms est supérieur à celui observé chez les chiens sains ($p = 0.0025$ et $p = 0.0033$ respectivement à 4 mois, et $p = 0.0242$ et $p = 0.0011$ respectivement à 6 mois).

Ainsi, le niveau moyen de relaxation à 100 ms atteint 58.1 % de la relaxation post-tétanique (écart-type : 2.3 %) chez les chiens traités, tandis qu'il n'est que de 50.2 % (écart-type : 2.9 %) chez les chiens sains, et 48.1 % (écart-type : 1.5 %) chez les chiens GRMD témoins à 4 mois. Les chiens GRMD traités présentent donc une relaxation post-tétanique plus rapide que les chiens GRMD non traités, et même que les chiens sains.

Par ailleurs, le niveau de contraction résiduelle post-tétanique apparaît, sur les graphes de la figure 13, normalisé, sans que la différence avec les chiens GRMD non traités soit significative ($p = 0.1166$ à 4 mois et $p = 0.1696$ à 6 mois).

La relaxation est donc plus rapide et plus complète chez les chiens GRMD traités.

Figure 13 : Relaxation à 4 et 6 mois chez les chiens GRMD traités, en comparaison des chiens sains et GRMD témoins.



Les graphes de gauche (A, C et E) représentent les valeurs obtenues à 4 mois, et les graphes de droite (B, D et F) celles obtenues à 6 mois. A et B : valeurs de niveau de relaxation après 100 ms, en proportion de la force tétanique, C et D : valeurs de niveau de relaxation après 100 ms, en proportion du niveau de relaxation post-tétanique, E et F : valeurs de niveau de contraction résiduelle post-tétanique. Les symboles noirs représentent les valeurs obtenues chez les chiens sains, les symboles rouges celles obtenues chez les chiens GRMD témoins, et les symboles verts celles obtenues chez les deux chiens GRMD traités. Pour chaque groupe, les points de gauche représentent les valeurs obtenues pour le postérieur gauche, et les points de droite celles obtenues pour le postérieur droit. Abréviations : GRMD-T : GRMD traité.

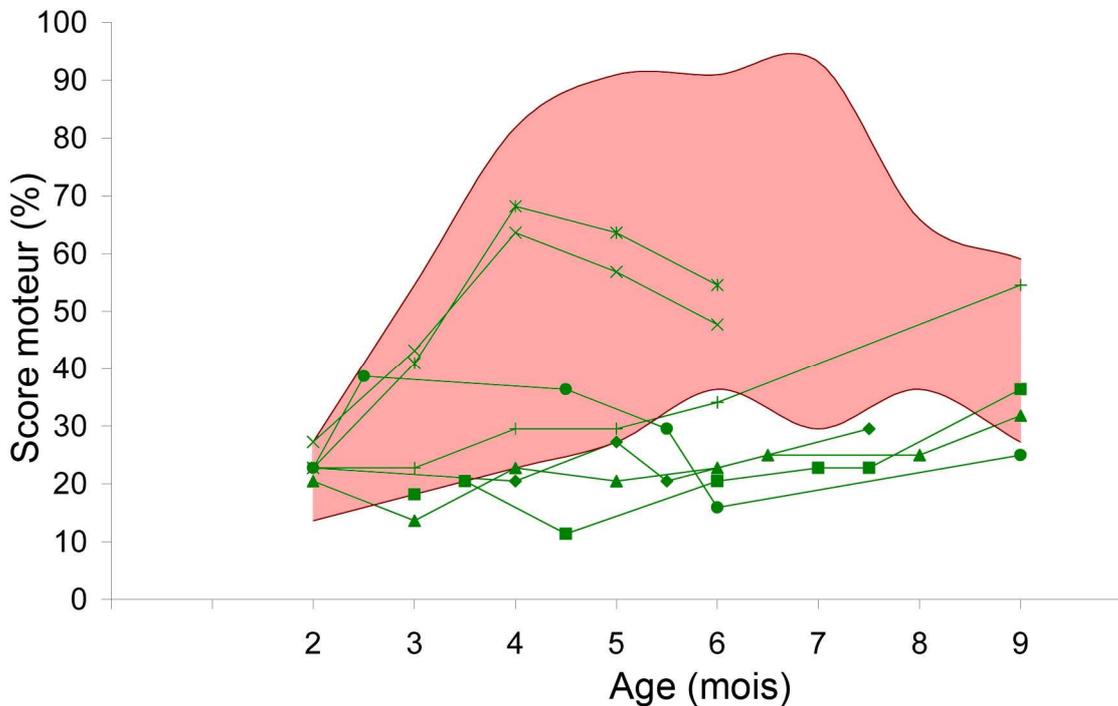
D. Evaluation de l'atteinte motrice globale par réalisation de scores cliniques

Les scores cliniques réalisés sur les sept chiens traités ont mis en évidence deux grands types d'évolution. Deux chiens (Clim et Clappy) ont montré une augmentation rapide du score clinique entre deux et quatre mois (figure 14), traduisant une dégradation franche de ces animaux en début de traitement. Les scores obtenus se situent dans les valeurs hautes de celles mesurées chez les chiens témoins. Cependant, élément inhabituel, le score clinique de ces deux animaux diminue après 4 mois, pour rejoindre, à 6 mois, avant leur décès, des valeurs intermédiaires.

Les cinq autres animaux montrent des scores cliniques se maintenant dans des valeurs basses (figure 14), voire inférieures à celles de chiens GRMD du même âge, à l'âge de 6 mois par exemple, âge auquel la différence entre chiens traités et chiens témoins est significative ($p = 0.0027$). Un maintien de cette tendance tout au long du traitement a été observé. Seul le chien Celsius montre une augmentation de ce score en fin de traitement, à mettre en relation avec les papillomes étendus gênant considérablement sa locomotion.

Ces éléments suggèrent que le traitement apporte un bénéfice, sur le plan moteur, aux chiens GRMD.

Figure 14 : Evolution du score clinique moteur chez les chiens traités, en comparaison des chiens GRMD témoins



Evolution du score moteur chez les chiens traités (symboles verts, voir correspondance individuelle dans le tableau 1), en comparaison des valeurs obtenues dans la population de 24 chiens GRMD témoins, représentées par l'étendue rosée, comprise entre deux courbes rouges, qui correspondent aux scores minimaux et maximaux obtenus dans cette population, à chaque âge.

E. Evaluation de la locomotion par accélérométrie

Une première étude globale de l'évolution de la locomotion chez les chiens traités a été réalisée, par analyse de leur déplacement sur le plan d'ACP de référence, décrit dans le chapitre 1, II, et quantifié à l'aide de la distance euclidienne les séparant, sur ce plan, du barycentre des chiens sains du même âge.

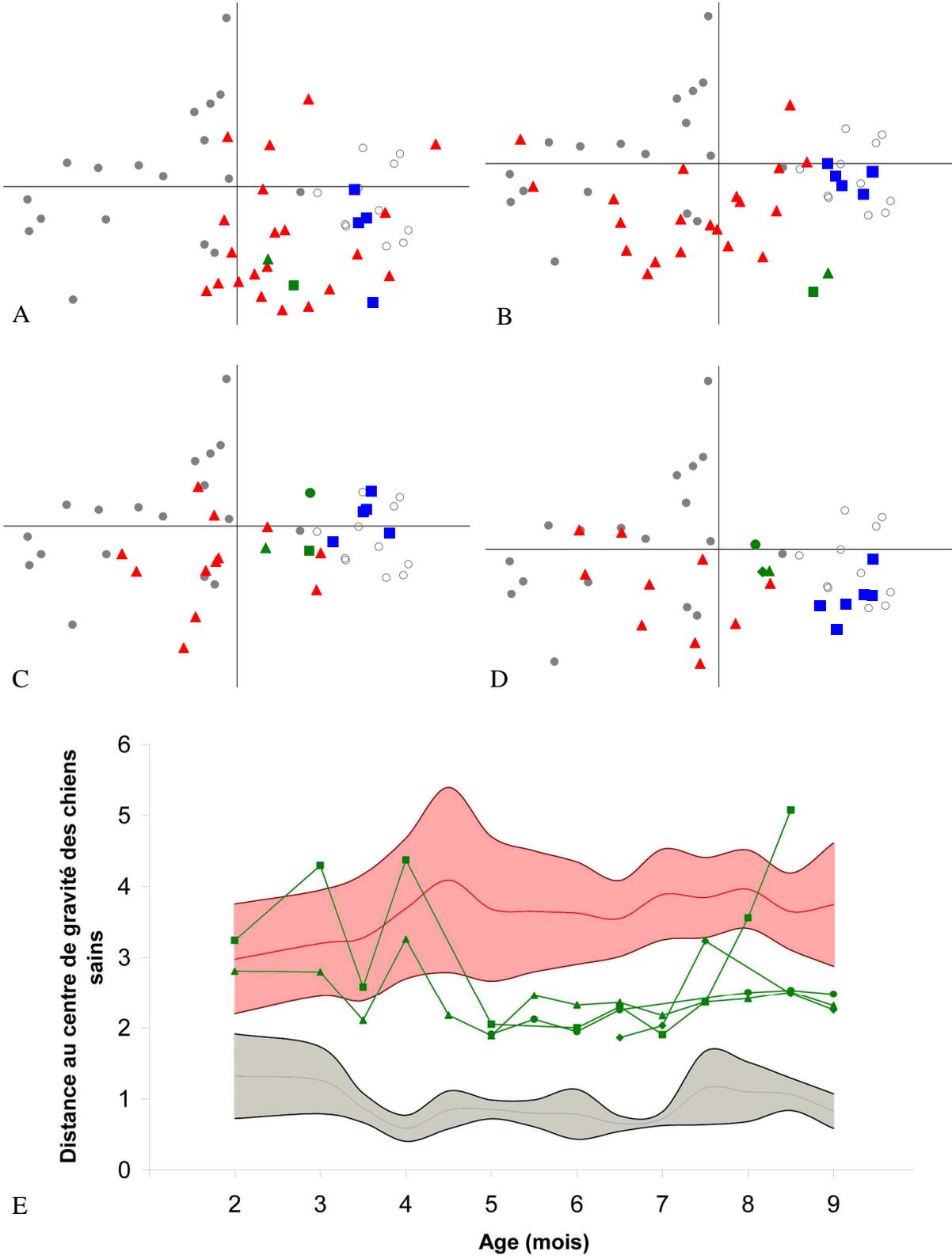
Les plans d'ACP présentés dans la figure 15 montrent qu'à l'âge de 2 mois, les chiens traités se confondent dans le nuage de points des chiens GRMD. A l'âge de 4 mois, ils s'éloignent du nuage des chiens sains, mais restent distincts de celui des chiens GRMD témoins : leur position est particulière, et évoque celle des chiens CNM. Aux temps suivants, les chiens

traités se rapprochent du nuage de chiens sains, et restent situés entre les populations GRMD et saine, comme des chiens très peu touchés, tels que le chien T-Fal (chapitre 1, II).

La distance euclidienne, indice global de qualité de la locomotion, est significativement diminuée dès l'âge de 5 mois, en comparaison des chiens GRMD. Ceci suggère qu'un bénéfice locomoteur est apporté par le traitement. Si cette distance se maintient jusqu'aux derniers tests chez la majorité des chiens examinés, l'un d'entre eux (Doc) montre une forte et brutale augmentation de cette valeur peu de temps avant la fin du traitement. Ceci traduit une dégradation locomotrice, qui a accompagné une dégradation de l'état général dans le dernier mois de traitement de cet animal, ayant d'ailleurs empêché la réalisation du test à 9 mois.

Les graphes de la figure 15 illustrent ces observations et résultats.

Figure 15 : Evolution des animaux traités sur le plan d'ACP de référence, et de la distance les séparant des chiens sains du même âge



A à D : projection des chiens traités, sains et GRMD témoins en tant qu'individus supplémentaires sur le plan d'ACP de référence défini par les chiens adultes. Les individus adultes sont représentés par des cercles gris, vides pour les chiens sains, pleins pour les chiens GRMD. Les chiens GRMD témoins sont représentés par des symboles rouges, et les chiens sains témoins par des symboles bleus. Les chiens traités sont représentés par leurs symboles verts, décrits dans le tableau 1. A : Projection des animaux à 2 mois, B : projection des animaux à 4 mois, C : projection des animaux à 6 mois, D : projection des animaux à 9 mois. E : évolution de la distance euclidienne sur le plan d'ACP, séparant les chiens GRMD traités (symboles verts) des animaux sains du même âge. Cette même variable, obtenue chez les chiens sains est représentée par la moyenne de la population (courbe grise) +/- un écart-type (courbes noires, espace grisé). Cette variable, obtenue chez les chiens GRMD témoins, est représentée par la moyenne du groupe (courbe rouge), +/- un écart-type (courbes rouges foncées, espace rosé).

Afin de mieux caractériser ce bénéfice locomoteur, une analyse plus approfondie, variable par variable, a été réalisée. La première observation faite est qu'à l'âge de 2 mois, en début de traitement, les valeurs obtenues chez les chiens traités sont comparables à celles décrites dans la population GRMD témoin. Cependant, nombre des variables étudiées évoluent par la suite différemment chez les chiens traités.

La fréquence des cycles locomoteurs, comparable à celle des chiens GRMD à l'âge de deux mois, est inférieure au seuil prédictif de 2.3 cycles par seconde pour deux des quatre chiens examinés (Cushing, fréquence = 1.88 cycles/s, et Doc, fréquence = 2.29 cycles/s). Il était donc probable que ces deux animaux évoluent vers une forme accélérée, avec perte de la locomotion. Or, ceci ne s'est pas produit, ce qui suggère que l'association de cyclosporine et de prednisolone pourrait prévenir ce type d'évolution.

La diminution de la fréquence des cycles, décrite comme une modification tardive de la locomotion chez les chiens GRMD, présente également, logiquement, des modifications tardives chez les chiens traités. Ainsi, la fréquence est, chez ces animaux, significativement augmentée par rapport aux chiens GRMD témoins à l'âge de 7.5 (p = 0.0029) et de 8 mois (p = 0.0425). La dégradation locomotrice du chien Doc, puis son décès avant le dernier test, sont

probablement à l'origine d'une différence non significative à 8.5 et 9 mois, même si les 3 animaux restants apparaissent dans les valeurs hautes de la population GRMD.

La longueur des foulées, normalisée par la hauteur au garrot, montre une évolution intéressante chez ces quatre animaux. Indistingables des valeurs des chiens GRMD témoins à 2 mois, dont la longueur de foulée est déjà significativement diminuée, les deux animaux suivis par cette variable dans leurs premiers mois augmentent leur longueur de foulée, dont les valeurs viennent se situer entre celles des populations saine et GRMD. La longueur de foulée est donc significativement augmentée à l'âge de 4 mois ($p < 0.0001$), de 5.5 mois ($p = 0.0144$), de 6 mois ($p = 0.0089$), et de 7 à 9 mois (p compris entre 0.0010 et 0.0299). La diminution de longueur de foulée, considérée comme une altération primaire de la locomotion du chien GRMD, peut donc être modulée par le traitement.

L'augmentation de longueur de foulée, associée au maintien tendant à l'augmentation de la fréquence des cycles locomoteurs, conduisent à une augmentation de la vitesse de locomotion, chez la majorité des animaux, qui viennent, pour cette variable également se positionner entre les populations saine et GRMD. Seul le chien Cushing montre une vitesse basse, ainsi que le chien Doc lors de ses deux derniers tests. La vitesse, normalisée par la hauteur au garrot est donc significativement augmentée entre 7 et 9 mois (p compris entre 0.0323 et 0.0034), ainsi qu'à 4 ($p < 0.0001$) et 5 ($p = 0.0417$) mois.

Cette augmentation de vitesse contribue probablement à l'augmentation de puissance totale également constatée. Cette variable augmente en début de traitement jusqu'à l'âge de 4 mois environ, pour diminuer par la suite, mais en restant dans des valeurs intermédiaires entre celles de chiens sains et celles de chiens GRMD, exception faite du chien Doc, dont la dégradation locomotrice à 8 et 8.5 mois est également clairement décrite par cette variable. Dès l'âge de 3 mois, la puissance totale des chiens traités est significativement supérieure à celle des chiens GRMD témoins, et ce, jusqu'à l'âge de 7.5 mois inclus (p compris entre < 0.0001 , et 0.0234). Aux temps suivants, la différence n'est plus significative, probablement en lien avec l'évolution défavorable du chien Doc, et avec la diminution globale de la puissance totale des autres chiens traités. Il est par ailleurs intéressant de noter que le chien Cushing, malgré une vitesse faible, présente une puissance totale augmentée, au même titre que les autres animaux traités.

Les valeurs de force relative montrent en effet que l'augmentation de puissance n'est pas uniquement liée à une augmentation de vitesse. Les valeurs obtenues pour les chiens traités sont en effet augmentées de manière spectaculaire, puisqu'elles sont parfois supérieures à

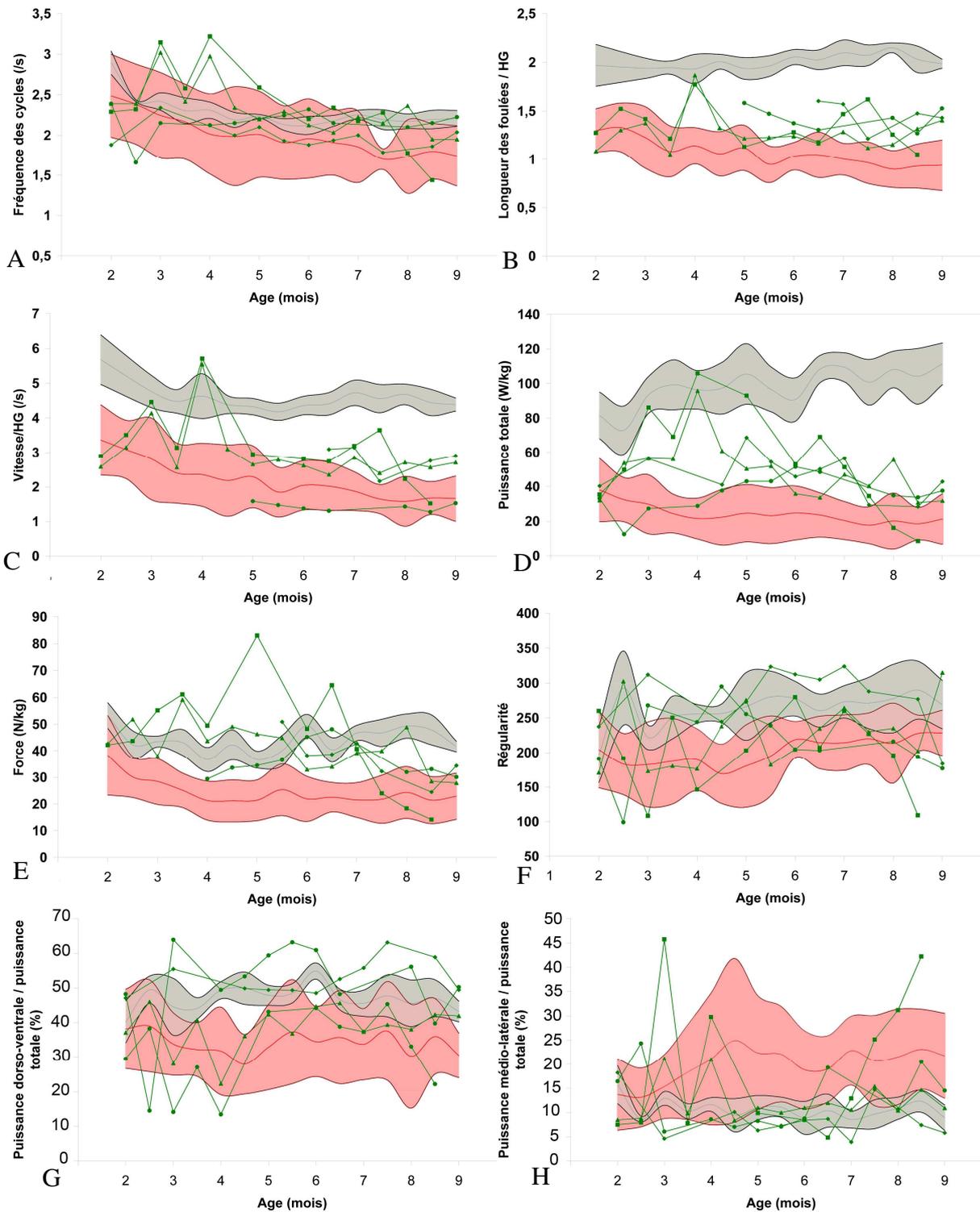
celles obtenues chez les chiens sains. Comme pour les autres variables, la force relative chute cependant en fin de traitement. Elle n'est donc augmentée de manière très significative qu'entre 3 et 7 mois (p compris entre < 0.0001 et 0.0099).

L'évolution de la régularité montre un intérêt moindre. Les valeurs obtenues sont, pour certains chiens traités, comparables à celles de chiens GRMD non traités, et pour d'autres, superposées à la population saine. Cette disparité entre chiens est probablement responsable du fait que cette variable n'est significativement augmentée qu'à 4.5 ($p = 0.0027$), 5 ($p = 0.0345$) et 7 mois ($p = 0.0186$). Une chute importante de la régularité chez le chien Doc à 8 et 8.5 mois est notée, et pourrait évoquer le type d'évolution de cette variable, observé avant une perte de locomotion.

Comme la régularité, la puissance dorso-ventrale relative est modifiée de manière hétérogène chez les chiens traités. Deux d'entre eux montrent en effet une diminution de cette variable, conforme à ce qui est classiquement observé chez les chiens GRMD en début d'évolution, tandis que les deux autres maintiennent des valeurs normales. L'augmentation de puissance dorso-ventrale, traduisant une propulsion améliorée, n'est donc significative qu'à 4.5 ($p = 0.0030$), 5 ($p = 0.0268$), 6 ($p = 0.0174$) et 9 mois ($p = 0.0016$).

Enfin, les valeurs de puissance médio-latérale relative, parfois élevées en début d'évolution chez les chiens traités, regagnent des valeurs superposées à celles des chiens sains à partir de 5 mois. Reflétant une nouvelle fois sa brutale dégradation, la puissance médio-latérale du chien Doc augmente lors de ses deux derniers tests, pour atteindre une valeur très élevée à 8.5 mois. La diminution de puissance médio-latérale chez les chiens traités, traduisant un moindre balancement au cours de la locomotion, est significative à 5 ($p = 0.0375$), 5.5 ($p = 0.0311$), 6 ($p = 0.0355$) et 7 mois ($p = 0.0082$).

Figure 16 : Evolution des différentes variables d'accélérométrie avec l'âge chez les chiens GRMD traités



Chacun des graphes représente l'évolution, entre 2 et 9 mois, et pour 8 variables, de la moyenne +/- un écart-type des chiens sains (courbe grise et espace grisé entre deux courbes noires), et des chiens GRMD témoins (courbe

rouge, et espace rosé entre deux courbes rouge foncé). Sont superposées les valeurs obtenues chez quatre chiens traités, représentés par leurs symboles verts, indiqués dans le tableau 1. A : évolution de la fréquence des cycles locomoteurs ; B : évolution de la longueur des foulées, normalisée par la hauteur au garrot ; C : évolution de la vitesse, normalisée par la hauteur au garrot ; D : évolution de la puissance totale ; E : évolution de la force relative ; F : évolution de la régularité ; G : évolution de la puissance dorso-ventrale, normalisée par la puissance totale ; H : évolution de la puissance médio-latérale, normalisée par la puissance totale. Abréviations : HG : hauteur au garrot.

F. Evaluation de la fonction respiratoire par cinématique diaphragmatique et spirométrie

Dans la même démarche que pour l'analyse de locomotion, une analyse globale des résultats obtenus sur les deux chiens évalués a été réalisée, par analyse de leur déplacement sur le plan d'ACP décrit plus haut (chapitre 1, III).

Ces deux chiens ont été projetés, en tant qu'individus supplémentaires, sur le plan d'ACP défini par les adultes, et les 5 variables de cinématique diaphragmatique et de spirométrie, à 3, 4 et 6 mois, temps auxquels les deux méthodes d'évaluation ont été employées. Ces plans, présentés dans la figure 17, montrent que les deux chiens traités, à l'instar des chiens GRMD témoins qui progressivement se dirigent vers la zone occupée par les chiens GRMD adultes, restent superposés au nuage de points représentant les chiens sains adultes. Ceci suggère un bénéfice apporté par le traitement sur la fonction respiratoire, décrite par les cinq variables identifiées plus haut. La distance euclidienne au barycentre des chiens sains, nommée index respiratoire, n'a pu être calculée qu'à 3 et 4 mois (nombre de chiens sains insuffisant à 6 mois), et ne diffère pas significativement de celle obtenue chez les chiens GRMD témoins.

A à C : projection des chiens traités, sains et GRMD témoins en tant qu'individus supplémentaires sur le plan d'ACP respiratoire de référence défini par les chiens adultes. Les individus adultes sont représentés par des cercles gris, vides pour les chiens sains, pleins pour les chiens GRMD. Les chiens GRMD témoins sont représentés par des symboles rouges, et les chiens sains témoins par des symboles bleus. Les chiens traités sont représentés par leurs symboles verts, décrits dans le tableau 1. A : Projection des animaux à 3 mois, B : projection des animaux à 4 mois, C : projection des animaux à 6 mois

Afin de mieux caractériser la fonction respiratoire des chiens traités, l'évolution de chacune des cinq variables a été examinée indépendamment.

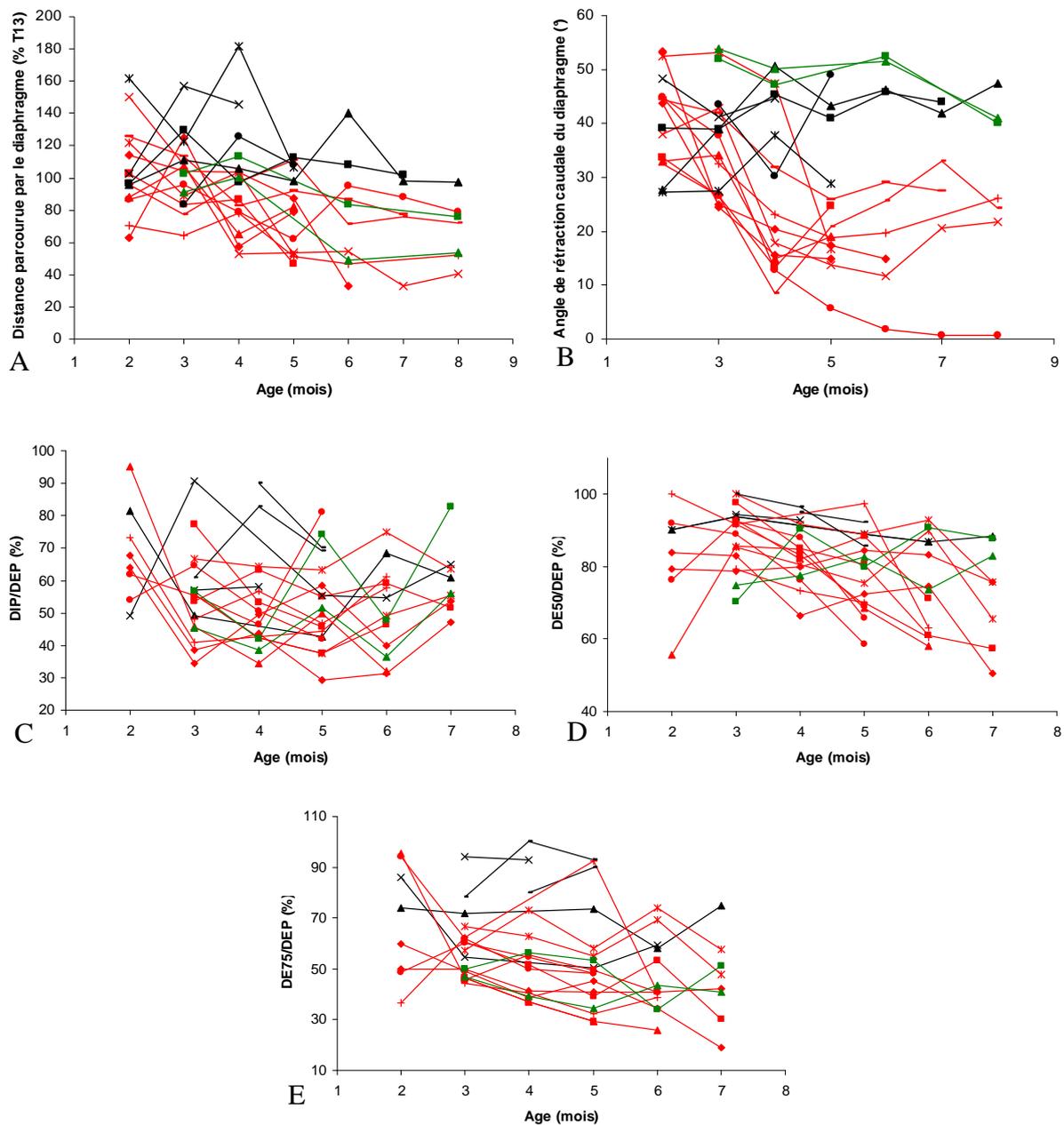
La distance parcourue par le diaphragme, variable de cinématique, montre le même type d'évolution que chez les chiens GRMD témoins : elle diminue avec l'âge, et ses valeurs se superposent à celles de la population GRMD témoin, indiquant que le défaut de mobilité diaphragmatique n'est pas corrigé chez les chiens traités. Les valeurs obtenues pour cette variable ne sont, à aucun des temps étudiés, significativement différentes de celles obtenues chez les chiens non traités.

En revanche, l'index de rétraction caudale du diaphragme, deuxième variable calculée par analyse d'images radioscopiques, est significativement augmenté chez les chiens traités, dès l'âge de 3 mois. Les valeurs mesurées se superposent à celles obtenues chez les chiens sains (figure 18). La rétraction caudale du diaphragme est donc prévenue par le traitement.

Aucune des variables de spirométrie étudiées ne montre une évolution significativement différente de celle des chiens GRMD non traités, même si les valeurs obtenues en fin de traitement se superposent plutôt aux valeurs hautes des chiens GRMD témoins (figure 18).

La position particulière des chiens traités sur le plan d'ACP est donc principalement liée à la normalisation de l'index de rétraction caudale du diaphragme, et très secondairement à une altération modérée des quatre autres variables.

Figure 18 : Evolution des deux variables de cinématique diaphragmatique, et des trois principales variables de spirométrie, chez les chiens GRMD traités.



L'évolution des deux chiens traités est représentée en vert, superposée à celle des deux populations témoins (saine, en noir, et GRMD, en rouge), pour les variables suivantes : A : distance parcourue par le diaphragme, B : angle de rétraction caudale du diaphragme, C : Débit inspiratoire de pointe, rapporté au débit expiratoire de pointe, D : débit expiratoire à 50 % du volume expiré,

normalisé par le débit expiratoire de pointe, E : débit expiratoire à 75 % du volume expiré, normalisé par le débit expiratoire de pointe. Abréviations : T13 : treizième vertèbre thoracique, DIP : débit inspiratoire de pointe, DEP : débit expiratoire de pointe, DE50 : débit expiratoire à 50 % du volume expiré, DE75 : débit expiratoire à 75 % du volume expiré.

IV. Discussion

A la question de l'existence d'un effet de ce traitement immunosuppresseur sur l'évolution clinique, les résultats permettent, avec certitude, de répondre de manière affirmative.

Nombreux sont les arguments militant en faveur d'une amélioration clinique. Le score clinique moteur de cinq animaux sur sept a atteint des valeurs anormalement basses pour des chiens GRMD. Les deux animaux dont l'évolution clinique, évaluée par cet indice, s'est avérée très rapide en début de traitement, s'est améliorée par la suite, élément également inhabituel pour des chiens GRMD.

Cette tendance est confirmée par une nette amélioration de la locomotion quantifiée par accélérométrie, et ce, sur l'ensemble des variables étudiées. Ainsi, des altérations précoces de la locomotion du chien GRMD, telles que chute de la longueur des foulées, de la puissance totale et de la force, sont progressivement améliorées par le traitement. Parallèlement, le traitement semble exercer un effet préventif sur la survenue des altérations plus tardives, dites secondaires, telles que puissance médio-latérale relative ou fréquence des cycles locomoteurs. Ce groupe de variable sont supposées traduire le développement des ankyloses et des contractures. Dans ce contexte, il est intéressant de constater que le score clinique moteur, reflétant ces contractures pour la plupart de ses items, est amélioré concomitamment, ainsi que la relaxation, dont le défaut a été proposé plus haut, comme pouvant contribuer à la survenue de ces contractures. L'association prednisolone-cyclosporine A permettrait donc d'améliorer les altérations primaires de la locomotion, et de stopper sa dégradation, probablement en prévenant les contractures.

Ceci est renforcé par le fait que, selon la valeur de la fréquence des cycles à 2 mois, identifiée comme marqueur prédictif, deux des chiens évalués auraient probablement, sans traitement, évolué vers une forme accélérée, avec perte de la locomotion. La chute spectaculaire des

valeurs de créatine kinases sériques, chez des animaux plus mobiles, dont la locomotion est améliorée, est également un argument fort en faveur d'un bénéfice apporté par le traitement immunosuppresseur. La chute des créatine kinases traduit le fait que moins de fibres musculaires sont lésées, donc reflète probablement une moindre fragilité membranaire.

Néanmoins, l'analyse des biopsies musculaires réalisées ne montre pas d'amélioration de la dystrophie musculaire sur le plan pathologique. Aucune des nombreuses explications avancées pour expliquer le bénéfice apporté chez les patients n'a pu trouver confirmation chez les chiens GRMD traités à dose immunosuppresseive. Ainsi, le nombre de fibres révertantes (Hardiman et al. 1993), très faibles chez les chiens traités comme chez les chiens non traités, n'est pas augmenté par l'administration du traitement, puisqu'au contraire, il apparaît diminué en fin de traitement. Une augmentation de l'activité de régénération (Hussein et al. 2010, Vandebrouck et al. 1999) n'a pas non plus été mise en évidence. Le nombre de fibres en nécrose n'est pas modifié. Le développement de la fibrose (De et al. 2005, Gosselin and McCormick 2004), bien que la distinction entre endomysium et perimysium n'ait pas été réalisée dans cette analyse, n'apparaît pas non plus prévenu par les deux molécules associées. Enfin, bien que le traitement utilisé soit immunosuppresseur, et comme le suggèrent certaines études (Gaud et al. 2004, Kissel et al. 1993), il semble que les effets fonctionnels observés ne soient pas liés à cette propriété, puisque l'infiltrat inflammatoire n'est pas modifié.

Aucun des bénéfices rapportés à l'échelle histologique chez les patients ou les souris *mdx* n'est donc constaté ici, et ne permet d'expliquer le bénéfice thérapeutique rapporté sur le plan fonctionnel. A l'inverse, les seules modifications observées vont dans le sens d'une aggravation des lésions. En effet, la prédominance du type I, observée dans les muscles dystrophiques (Yuasa et al. 2008), et mise en évidence ici chez les chiens GRMD non traités, est abolie par le traitement, et leur proportion se rapproche de celle de chiens sains. Alors que le tibial crânial est un muscle à dominante rapide chez le chien (27 % de fibres lentes chez les chiens sains (Toniolo et al. 2007, Yuasa et al. 2008)), les chiens GRMD non traités inversent cette prédominance, puisque ceux étudiés ici montrent 60 % de fibres de type I dans leurs biopsies. A l'inverse, les chiens traités n'en présentent que 30-35 %. Même s'il s'agit là d'une formule plus proche de celle d'animaux sains, l'absence de prédominance du type I dans un contexte où les lésions dystrophiques sont encore présentes pourrait être considérée comme un élément pouvant aggraver les lésions musculaires. En effet, les fibres de type II sont davantage fragilisées par l'absence de dystrophine que celles de type I, et ces mêmes fibres

montrent, sans dystrophine, une altération plus importante de leur force (Sampaolesi et al. 2006, Webster et al. 1988). Il s'agit là d'une première hypothèse permettant d'expliquer la diminution de la force de flexion du tarse, observée suite aux mesures effectuées sur le module de première génération, et déjà décrite par ailleurs (Liu et al. 2004). Ce changement dans le typage des fibres permet également d'expliquer l'augmentation de la fatigue musculaire, mise en évidence sur les deux modules.

La réversion de la prédominance du type I chez les chiens traités peut probablement être mise en relation avec l'inhibition de l'activité de la calcineurine par la cyclosporine A. En effet, les voies de la calcineurine sont impliquées dans la régulation de la transcription des ARNm des myosines : elles activent la transcription des gènes spécifiques des fibres lentes, et répriment celle des gènes spécifiques des fibres rapides (Chin et al. 1998, Giger et al. 2004). La cyclosporine A, utilisée à des doses permettant le blocage de cette voie, augmente donc la proportion de fibres de type II (Chin et al. 1998). Un effet bénéfique des corticostéroïdes dans le cadre de la DMD a été attribué à l'activation, par ces molécules, de la voie calcineurine-NFAT (St-Pierre et al. 2004). Le blocage de cette voie par la cyclosporine A a donc très probablement, au vu des modifications dans le typage de fibres, annulé cet effet potentiellement bénéfique des corticostéroïdes.

Ces mêmes voies de la calcineurine ont de nombreuses autres implications dans le tissu musculaire. Notamment, elles interviennent dans la régénération, au sein du tissu dystrophique. Une dose bloquante de cyclosporine A (30 mg/kg/j) augmente la pathologie musculaire, et diminue la force chez la souris *mdx* (Stupka et al. 2004). Un défaut de régénération musculaire a donc pu être responsable de la métaplasie adipeuse exacerbée observée chez les chiens GRMD traités. Par ailleurs, la transcription de l'ARNm de la myostatine, inhibiteur de la croissance musculaire, est inhibée par ces mêmes voies de la calcineurine. La cyclosporine A, en bloquant l'activité de la calcineurine, est donc capable d'inhiber la croissance musculaire induite par l'exercice (Michel et al. 2004). Dans le cas des chiens GRMD traités, l'inhibition de l'activité de la calcineurine pourrait avoir entraîné une atrophie musculaire, de même que l'administration de glucocorticoïdes (Gilson et al. 2007, Ma et al. 2003). Cette action des corticostéroïdes serait médiée par une augmentation de la protéolyse, liée à l'activation du facteur de transcription FOXO3 (Gilson et al. 2007). De plus, comme la cyclosporine A, ils contribuent à activer l'expression du gène de la myostatine (Ma et al. 2003). Tous ces éléments indiquent qu'une atrophie musculaire a très probablement été induite par le traitement chez les chiens GRMD. Cette atrophie n'a pas été évaluée de manière

quantitative, mais la physionomie des animaux traités était fortement évocatrice. Une atrophie des fibres musculaires, médiée par ces deux molécules de manière conjointe, peut également avoir été à l'origine de la diminution de force tétanique observée.

Toutefois, l'atrophie musculaire, énoncée comme l'une des hypothèses permettant d'expliquer la diminution d'amplitude des potentiels d'action musculaire composés (Botelho et al. 1960, Sharma et al. 1995), si elle a effectivement été induite chez les chiens GRMD traités, est en contradiction avec l'augmentation de l'amplitude de ces mêmes potentiels constatée ici. Une seconde hypothèse permettant d'expliquer cette chute d'amplitude, chez les chiens GRMD comme chez les patients, est une altération des propriétés électriques des fibres musculaires (potentiel membranaire de repos notamment) (Botelho et al. 1960). Chez les chiens GRMD non traités, ces deux phénomènes agissent probablement de concert. L'amélioration de ce défaut d'amplitude, dans le cadre d'un traitement associant cyclosporine A et prednisolone, est à attribuer préférentiellement à une correction des défauts électriques présents dans les fibres déficientes en dystrophine, et liés à une perméabilité membranaire accrue, et à un dysfonctionnement de certains canaux ioniques du réticulum (Bellinger et al. 2009). Les défauts de l'homéostasie ionique, et notamment calcique, étant très probablement à l'origine de la nécrose des fibres musculaires dans le cadre de cette maladie, une amélioration de cette homéostasie peut expliquer la chute des valeurs de créatine kinases sériques observée. Elle peut également expliquer la normalisation des défauts de relaxation, et la disparition de la composante myotonique mise en évidence chez les chiens GRMD.

Dans ce contexte, les surcharges calciques exacerbées, observées dans les biopsies de muscle des chiens traités, paraissent en contradiction avec une amélioration de l'homéostasie calcique. Néanmoins, les fibres légèrement surchargées en calcium, dites hypercontractées, ne sont pas présentes en plus grande quantité chez les chiens traités. Dans ce cadre, il serait possible d'expliquer la présence de si nombreuses fibres calcifiées par la diminution de l'activité macrophagique dans le tissu musculaire suite au traitement immunosuppresseur. Cette hypothèse a également été émise suite à l'observation de ce type de lésions chez des chiens GRMD traités à des doses immunosuppresseuses de prednisone, mais absentes lorsque ces doses sont moins fortes (Liu et al. 2004). La quantification des macrophages dans les muscles des chiens traités n'a pas permis de confirmer cette hypothèse. Néanmoins, étant donné le grand nombre de fibres calcifiées, il paraît surprenant que le nombre de macrophages se situe plutôt dans les valeurs basses de la population GRMD témoin. Par ailleurs, il serait probablement intéressant de quantifier de manière distincte la population de macrophages

activés, et de macrophages anti-inflammatoires, toutes deux décrites comme présentes dans des tissus musculaires soumis à des cycles de nécrose et régénération (Arnold et al. 2007), mais ayant des fonctions bien différentes.

En tout état de cause, la présence de nombreuses fibres calcifiées, éléments non contractiles, constitue une voie d'explication supplémentaire à la diminution de la force musculaire tétanique, mesurée sur le module de première génération. Toutefois, cette diminution de force musculaire démontrée, doit être nuancée. Les animaux traités ont quasiment tous développé une obésité, effet secondaire connu des corticostéroïdes. Or, les données de force obtenues sur le module de première génération ont été normalisées par la masse corporelle, et comparées aux données obtenues sur les chiens GRMD témoins, décrits plus haut comme maigres. Cette normalisation a donc pu contribuer à séparer artificiellement les deux populations, comme cela a également été suggéré dans l'étude sur l'effet de la prednisonne chez les chiens GRMD (Liu et al. 2004). Cette obésité est également probablement en partie responsable des résultats obtenus pour l'index de rétraction caudale du diaphragme : la normalisation de cet index doit être considérée avec précaution, car elle trouve probablement en partie son origine dans la réplétion abdominale majeure observée chez ces animaux.

Par ailleurs, le retard de croissance observé chez les animaux traités, qui est également un effet secondaire des corticostéroïdes, a très probablement induit une diminution de la taille des membres, et notamment du segment métatarso-phalangien. Or, il a été envisagé, et partiellement démontré, que le module de première génération, de par sa conception, tendait à minimiser la force produite, et ce d'autant plus que le membre évalué est de petite taille, car éloigné des capteurs. Tous ces éléments viennent nuancer la diminution de force de flexion observée, et également publiée sur un module de conception proche (Liu et al. 2004). Les résultats obtenus chez les deux chiens évalués sur le second module, et normalisés par la longueur du segment tibial, tendent à confirmer cela. En effet, à 4 mois, aucune différence de force n'est mise en évidence, tandis qu'à 6 mois, la tendance inverse se dessine : les deux animaux traités montrent une augmentation significative de leur force musculaire, alors même que cette même variable, mesurée sur le premier module une semaine auparavant montrait des valeurs effondrées. Ces résultats contradictoires montrent à quel point la réflexion menée sur la normalisation, ainsi que les caractéristiques techniques des outils de mesure jouent un rôle primordial sur les résultats obtenus.

Les résultats obtenus renforcent par ailleurs la faible corrélation entre force musculaire et atteinte clinique, démontré précédemment. L'état histologique, ainsi que la force d'un groupe

musculaire donné, du moins celui étudié ici, ne permettent pas de présumer du phénotype clinique des individus. La corrélation solide entre variables d'accélérométrie, propriétés de relaxation et score moteur a ici été démontrée une nouvelle fois, dans un contexte d'amélioration clinique, possiblement médiée par une stabilisation des canaux ioniques, permettant de diminuer les lésions des fibres musculaires à l'échelle de la musculature globale, comme en témoignent les valeurs effondrées de CK. Au-delà de cela, cette étude a permis de démontrer que les outils d'évaluation mis en place permettent un suivi longitudinal d'animaux dans le cadre d'un essai thérapeutique, et sont capables de mettre en évidence un bénéfice fonctionnel.

Si l'évaluation des animaux n'a pas été homogène dans cette étude, étant donné qu'elle s'est déroulée concomitamment à la mise en place des différents outils, elle a néanmoins permis de dessiner une tendance à l'amélioration des chiens sur le plan moteur. Toutefois, les résultats obtenus sur le module de première génération ne permettent pas d'expliquer l'augmentation de force musculaire au cours du temps, et d'autant plus sur un membre, plus que sur son témoin controlatéral. Ainsi, si l'amélioration de l'état général, décrite suite à des greffes de mésoangioblastes (Sampaolesi et al. 2006) ne peut pas, avec certitude, être attribuée aux greffes de cellules, le gain de force dans le membre injecté peut, quant à lui, être expliqué par l'expression de dystrophine permise par les cellules souches. L'amélioration fonctionnelle locale est donc incontestable.

L'amélioration de la fonction motrice, mise en évidence à l'issue de cette étude, doit donc être prise en considération, avant de décider de la mise en place d'une immunosuppression chez des chiens GRMD, dans le cadre d'un essai pré-clinique systémique. Si une population témoin est désormais disponible, son phénotype clinique est amélioré à un tel niveau que le traitement testé devra espérer une quasi-guérison pour montrer son efficacité. Au-delà de cela, les modifications observées à tous niveaux suggèrent que le modèle GRMD est modifié à un tel point par ce traitement que le contexte pathologique s'en trouve modifié, ainsi, donc, que sa pertinence en tant que modèle pré-clinique. Par ailleurs, l'expression des intégrines, élément essentiel dans la migration de cellules souches vers le compartiment musculaire, est très probablement modifiée par ce type de traitements (Torrente et al. 2007). Dans le contexte de greffes de cellules souches par injections intra-vasculaires, un tel traitement peut donc conduire à modifier les résultats des greffes elles-mêmes, avant même de modifier leur effet sur le plan fonctionnel.

S'il apporte un bénéfice sur le plan fonctionnel, il est inenvisageable d'appliquer un tel traitement à des patients atteints de DMD, en raison de ses effets secondaires. Les perspectives thérapeutiques apportées par cette étude sont donc minces. Cependant, elle a démontré que bloquer les voies de la calcineurine dans le modèle animal le plus représentatif de la DMD n'est pas néfaste, et, au contraire, apporte un bénéfice. Ceci pose la question de la dimension du rôle de la myostatine dans cette maladie, et de l'intérêt de l'inhibition de l'action de cette hormone comme solution thérapeutique pour DMD. Par ailleurs, les résultats obtenus semblent indiquer que cibler l'homéostasie ionique des fibres musculaires pourrait constituer un axe thérapeutique intéressant. De récents travaux conduits chez la souris *mdx* montrent qu'en effet, stabiliser les canaux calcium du réticulum (RyR1) permet de prévenir les fuites calciques depuis ce compartiment, dans le cytoplasme, et d'améliorer la fonction musculaire (Bellinger et al. 2009).

Malgré ces hypothèses formulées, le mode d'action précis du traitement immunosuppresseur utilisé ici, et conduisant à une amélioration motrice, reste à déterminer, comme celui des corticostéroïdes chez les patients. Il s'agit là également d'un des rôles et intérêts du chien GRMD : permettre d'offrir des explications sur les mécanismes pathogéniques impliqués dans cette maladie homologue de la DMD, et aboutir ainsi à identifier des pistes thérapeutiques.

Conclusion

Différents outils d'évaluation ont été développés, et ont permis d'identifier des variables pertinentes pour l'évaluation des chiens GRMD.

Comme cela était souhaité, les outils développés sont non invasifs, et simples de mise en œuvre. Aucun d'entre eux ne nécessite de dispositif implanté, et seule la mesure de force demande une anesthésie générale, mais sans geste invasif associé. La simplicité de mise en œuvre et la non-invasivité constituent deux éléments permettant *a priori* un transfert aisé de ces méthodes de mesure dans les différents centres amenés à évaluer des chiens GRMD, dans un contexte d'harmonisation des méthodes d'évaluation. Ces outils sont par ailleurs, pour la plupart, employés chez les patients atteints de DMD. Il s'agit donc d'utiliser des outils cliniques, adaptés au chien, au stade pré-clinique. Ce dernier point s'inscrit dans la même démarche que celle suivie pour l'administration de traitements dans le cadre d'essais thérapeutiques chez les chiens GRMD : les voies et méthodes d'administration sont choisies en veillant à leur applicabilité directe au stade clinique. En tant qu'homologue canin du patient atteint de DMD, le chien GRMD doit occuper une position particulière et se distinguer du modèle murin pour se rapprocher du patient : ces animaux doivent être gérés sur le plan clinique, traités et évalués de la manière la plus proche possible de ce qui sera, si le traitement s'avère efficace, réalisé chez le patient.

Les chiens GRMD ont cependant les défauts de leurs qualités. Comme les patients dont ils sont le plus proche modèle, les chiens GRMD présentent une grande hétérogénéité clinique inter-individuelle. Cette caractéristique, les rapprochant encore un peu du contexte humain, représente néanmoins un défaut de taille pour un modèle animal, qui lui vaut d'être critiqué. Les outils développés ont permis de décrire de manière quantifiée cette hétérogénéité. Cette description, ainsi que la capacité d'évaluer le modèle de manière objective et multi-paramétrique, constituent un pas vers la maîtrise de la variabilité de ce modèle.

Il est désormais possible de déterminer le nombre d'animaux nécessaires à la démonstration d'un bénéfice thérapeutique donné. Le tableau de l'annexe 1 fournit le nombre d'animaux à inclure dans un essai pour démontrer une guérison, une amélioration de 100 ou de 50 %, suivant les variables considérées. Il apparaît que, pour la plupart des variables, excepté par exemple la longueur des foulées, l'effet recherché doit être conséquent, si le nombre d'animaux inclus est inférieur ou égal à 5. Ceci est bien entendu à relier aux forts écarts-types

mesurés, reflétant la variabilité inter-individuelle. Les outils mis en place ne gomment donc pas l'hétérogénéité, et ce n'est d'ailleurs pas leur objectif, puisqu'ils se veulent un reflet quantitatif de l'état clinique des animaux. Néanmoins, ils permettent, en la quantifiant, de la maîtriser partiellement. De plus, les traitements testés sur le chien GRMD sont parmi les plus prometteurs, et, pour une pertinence dans le cadre d'une application clinique potentielle, l'effet attendu doit donc être majeur. Par ailleurs, l'étude menée sur les chiens GRMD placés sous protocole d'immunosuppression a montré la capacité des différents outils à démontrer des différences, même avec un faible nombre d'individus.

Ainsi, par exemple, à 6 mois, les 3 chiens traités montrent une distance euclidienne moyenne (variables d'accélérométrie) de 2.09 (écart-type : 0.20), soit une amélioration de 75 % par rapport à la population GRMD témoin ($p = 0.0035$). Or, d'après les calculs de taille d'échantillon, la mesure d'une telle amélioration devrait nécessiter d'inclure 6 animaux. Un bénéfice significatif a pu être démontré ici, avec seulement la moitié de cet effectif. Ceci est lié au fait que l'écart-type de la population traitée est fortement réduit, en comparaison de la population témoin, dont l'écart-type est utilisé pour ce calcul de taille d'échantillon. Si les traitements testés parviennent, comme l'association de cyclosporine A et de prednisolone, à estomper l'hétérogénéité clinique, le nombre d'animaux à inclure pour espérer démontrer un bénéfice diminuera logiquement. Les valeurs fournies dans le tableau de l'annexe 1 constituent donc probablement un maximum.

Une autre voie permettant de mieux maîtriser l'hétérogénéité clinique du chien GRMD a été envisagée. Des marqueurs prédictifs ont été recherchés, permettant de déterminer à un stade précoce quelle sera l'évolution d'un individu donné. La fréquence des cycles locomoteurs à l'âge de deux mois s'est avérée constituer un marqueur potentiellement intéressant, puisque 78 % des chiens évoluant vers une perte de marche avant l'âge de 6 mois ont une fréquence inférieure à 2.3 cycles/s à ce stade. Sélectionner les individus précocement suivant ce critère pourrait permettre de travailler sur des groupes d'animaux plus homogènes, en terme d'évolution clinique, que la population entière. Le tableau de l'annexe 2 fournit les tailles d'échantillon calculées, sur des populations triées sur la valeur de leur fréquence de cycle locomoteur à l'âge de 2 mois.

Ces données montrent que sélectionner la population de chiens évoluant vers une forme accélérée permet, sur certaines variables (score clinique, vitesse, puissance totale...), de diminuer le nombre d'animaux à inclure, pour obtenir un bénéfice mesurable à 4 mois. A l'âge de 6 mois, le nombre d'animaux à inclure pour démontrer une diminution du score

clinique est fortement réduit. Les variables d'accélérométrie ne pouvant pas être mesurées dans la population témoin à ce stade, le seul fait de pouvoir les mesurer dans la population traitée représente un bénéfice. Sélectionner, à l'inverse, la population dont la fréquence de cycles locomoteurs dépasse le seuil prédictif défini, permet de diminuer légèrement le nombre d'animaux à inclure pour mesurer un bénéfice à 4 mois. Aux stades ultérieurs, le nombre d'animaux reste identique, dans la mesure où la population totale correspond dans son intégralité, à partir de 6 mois, à celle sélectionnée.

Dans la même démarche, des calculs de taille d'échantillon ont été effectués afin de déterminer combien d'animaux il était nécessaire d'inclure lors d'essais réalisés sous protocole d'immunosuppression. Deux éléments ressortent de ces calculs. D'une part, le nombre d'animaux à inclure est, pour beaucoup de variables, relativement faible, étant donné que l'écart-type de la population de départ (chiens GRMD sous immunosuppression seule) est également faible. D'autre part, pour beaucoup de variables également, la marge de bénéfice est assez réduite, étant donnée l'amélioration décrite chez les animaux immunosupprimés, et c'est la guérison qui doit alors être visée.

L'ensemble de ce travail a permis de contribuer à une optimisation de l'exploitation du modèle GRMD dans le cadre d'essais pré-cliniques, et à démontrer qu'il était possible de faire face à la variabilité inter-individuelle, en employant des outils de mesure adaptés. L'étape suivante est de faire de cette variabilité un atout, et d'utiliser le chien GRMD pour mettre en évidence des facteurs modulateurs du phénotype clinique, et ainsi, peut-être, ouvrir de nouvelles voies thérapeutiques pour la DMD.

Annexe 1 : Utilisation du chien GRMD dans des essais pré-cliniques : tailles d'échantillons nécessaires, en fonction des variables utilisées, et de l'effet fonctionnel attendu.

	Variable	4 mois			6 mois			Adultes		
		+50%	+100%	=Sains	+50%	+100%	=Sains	+50%	+100%	=Sains
	Score moteur	28	13	5	20	10	4	9	5	3
ACCELEROMETRIE	Vitesse/HG	14	5		12	4	4	15	5	3
	FC									
	LF/HG	4	3		3	2		10	4	3
	Régularité			11			6			11
	PT	27	8	3	35	10	3	28	8	2
	PML/PT							39	18	11
	Force			6	14	4		9	4	
	D _{eucl}	15	8	4	9	5	3	17	8	5
FORCE	FT _{r(kg)} M _I	13	7		4	3		2	2	
	Fatigue ₄ M _I	24	7							
	FT _{r(m)} M _{II}			9	16	5	2	28	8	3
	Fatigue ₄ M _{II}	9	6							
	CRes P-T							53	24	6
RESPIRATION	Distance	6	4		13	5		5	3	
	Angle	28	8		29	9	4	178	45	4
	DIP/DEP			4			16			15
	DE75/DEP	6	5				42	15	9	
	D _{eucl}	5	4					10	6	4
CARDIO (Chetboul et al. 2004b)	MVG _s				3	2	2			
	MVGE				78	21	3			
	MVGA				8	5	4			
	MVGE/MVGA				160	41	3			
ETAT CORPO- REL	Poids			11			7			7
	HG			19			10			14
	IMC			19			7			6

Face à chaque variable, est indiqué le nombre d'animaux nécessaires pour démontrer un bénéfice de 50 ou 100 % par rapport à la population GRMD témoin, ou une amélioration à hauteur des animaux sains, à 4, 6 et 9 mois. Les situations requérant 5 chiens GRMD ou moins figurent en gras. Abréviations : HG : hauteur au garrot, FC : fréquence des cycles, LF : longueur des foulées, PT : puissance totale, PML : puissance médio-latérale, Deucl : distance euclidienne sur le plan d'ACP, FTr : force tétanique relative, MI : module de première génération, MII : module de seconde génération, CresP-T : contraction résiduelle post-tétanique, DIP : débit inspiratoire de pointe, DEP : débit expiratoire de pointe, DE75 : débit expiratoire à 75 % du volume expiré, MVGs : gradient de vitesse myocardique systolique, MVGE : gradient de vitesse myocardique diastolique précoce, MVGA : gradient de vitesse atrial, IMC : indice de masse corporelle

Annexe 2 : Utilisation du chien GRMD dans des essais pré-cliniques : tailles d'échantillons nécessaires, en fonction des variables utilisées, et de l'effet fonctionnel attendu, après sélection des chiens suivant un marqueur prédictif.

	Variable	4 mois			6 mois					
		+50%	+100%	=Sains	+50%	+100%	=Sains			
FREQUENCE DES CYCLES < 2.3 s ⁻¹ à 2 mois	Score mot	15	8	3	3	3	2			
	ACCELEROMETRIE	Vitesse/HG	16	5	4	Incapables d'effectuer le test ou décédés				
		FC								
		LF/HG	4	3						
		Régularité			17					
		PT	33	9	2					
		PML/PT								
		Force			9					
		D _{eucl}	19	9	4					
	FORCE	FT _{r(m)} M _{II}			120					
		Fatigue ₄ M _{II}	5	4						
		Rel _{100ms} /FT			10					
	FREQUENCE DES CYCLES > 2.3 s ⁻¹ à 2 mois	Score mot	17	8	4				16	8
ACCELEROMETRIE		Vitesse/HG	16		5				Voir tableau annexe 1	
		FC								
		LF/HG	4	3						
		Régularité			10					
		PT	21	6	3					
		PML/PT				55				
		Force			7					
		D _{eucl}	9	5	3					
FORCE		FT _{r(m)} M _{II}			11					
		Fatigue ₄ M _{II}			9					
		Rel _{100ms} /FT			37					

**Annexe 3 : Utilisation du chien GRMD immunosupprimé
(CsA + prednisolone) dans des essais pré-cliniques :
tailles d'échantillons nécessaires, en fonction des
variables utilisées, et de l'effet fonctionnel attendu.**

	Variable	4 mois			6 mois			9 mois			
		+50%	+100 %	=Sains	+50%	+100 %	=Sains	+50%	+100 %	=Sains	
	Score mot	52	24	7	46	21	7	24	11	4	
ACCELEROMETRIE	Vitesse/HG							3			3
	FC									23	
	LF/HG		10		2		2			2	
	Régularité			13			85			68	
	PT			98	4	3		4	3	2	
	PML/PT										
	Force						16			4	
	D _{eucl}	10	5	3	4	3	3	3	2	2	
FOR CE	FT _{r/(kg)} M _I	16	3		7	3	2	6	3		
	Fatigue ₄ M _I	17	5		17	8	5	24	11		

Références bibliographiques

Alderton, J. M. and R. A. Steinhardt. 2000. Calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes. *J. Biol. Chem.* 275:9452-9460.

Allen, D. G., O. L. Gervasio, E. W. Yeung, and N. P. Whitehead. 2010. Calcium and the damage pathways in muscular dystrophy. *Can. J. Physiol Pharmacol.* 88:83-91.

Allen, K., C. E. DeCamp, T. D. Braden, and M. Bahns. 1994. Kinematic gait analysis of the trot in healthy mixed breed dogs. *Veterinary and comparative orthopaedics and traumatology* 7:148-153.

Ambrosio, C. E., L. Fadel, T. P. Gaiad, D. S. Martins, K. P. Araujo, E. Zucconi, M. P. Brolio, R. F. Giglio, A. C. Morini, T. Jazedje, T. R. Froes, M. L. Feitosa, M. C. Valadares, P. C. Beltrao-Braga, F. V. Meirelles, and M. A. Miglino. 2009. Identification of three distinguishable phenotypes in golden retriever muscular dystrophy. *Genet. Mol. Res.* 8:389-396.

Ambrosio, C. E., M. C. Valadares, E. Zucconi, R. Cabral, P. L. Pearson, T. P. Gaiad, M. Canovas, M. Vainzof, M. A. Miglino, and M. Zatz. 2008. Ringo, a Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) dog with absent dystrophin but normal strength. *Neuromuscul. Disord.* 18:892-893.

Amis, T. C. and C. Kurpershoek. 1986. Tidal breathing flow-volume loop analysis for clinical assessment of airway obstruction in conscious dogs. *Am. J. Vet. Res.* 47:1002-1006.

Amis, T. C., M. M. Smith, C. E. Gaber, and C. Kurpershoek. 1986. Upper airway obstruction in canine laryngeal paralysis. *Am. J. Vet. Res.* 47:1007-1010.

Andriacchi, T. P. and E. J. Alexander. 2000. Studies of human locomotion: past, present and future. *J. Biomech.* 33:1217-1224.

Armand, S., M. Mercier, E. Watelain, K. Patte, J. Pelissier, and F. Rivier. 2005. A comparison of gait in spinal muscular atrophy, type II and Duchenne muscular dystrophy. *Gait. Posture.* 21:369-378.

Arnold, L., A. Henry, F. Poron, Y. Baba-Amer, R. N. van, A. Plonquet, R. K. Gherardi, and B. Chazaud. 2007. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J. Exp. Med.* 204:1057-1069.

artsma-Rus, A., A. A. Janson, W. E. Kaman, M. Bremmer-Bout, G. J. Van Ommen, J. T. den Dunnen, and J. C. van Deutekom. 2004. Antisense-induced multiexon skipping for Duchenne muscular dystrophy makes more sense. *Am. J. Hum. Genet.* 74:83-92.

- Audigie, F., P. Pourcelot, C. Degueurce, D. Geiger, and J. M. Denoix. 2002.** Fourier analysis of trunk displacements: a method to identify the lame limb in trotting horses. *J. Biomech.* 35:1173-1182.
- Auvinet, B., G. Berrut, C. Touzard, L. Moutel, N. Collet, D. Chaleil, and E. Barrey. 2002.** Reference data for normal subjects obtained with an accelerometric device. *Gait Posture.* 16:124-134.
- Ayoub, J., J. Milane, R. Targhetta, J. Prioux, K. Chamari, P. Arbeille, O. Jonquet, J. M. Bourgeois, and C. Prefaut. 2002.** Diaphragm kinetics during pneumatic belt respiratory assistance: a sonographic study in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* 12:569-575.
- Baligand, C., C. Wary, J. C. Menard, E. Giacomini, J. Y. Hogrel, and P. G. Carlier. 2010.** Measuring perfusion and bioenergetics simultaneously in mouse skeletal muscle: a multiparametric functional-NMR approach. *NMR Biomed.*
- Baltgalvis, K. A., J. A. Call, J. B. Nikas, and D. A. Lowe. 2009.** Effects of prednisolone on skeletal muscle contractility in mdx mice. *Muscle Nerve* 40:443-454.
- Baltzer, W. I., D. V. Calise, J. M. Levine, G. D. Shelton, J. F. Edwards, and J. M. Steiner. 2007.** Dystrophin-deficient muscular dystrophy in a Weimaraner. *J. Am. Anim Hosp. Assoc.* 43:227-232.
- Bamman, M. M., B. R. Newcomer, D. E. Larson-Meyer, R. L. Weinsier, and G. R. Hunter. 2000.** Evaluation of the strength-size relationship in vivo using various muscle size indices. *Med. Sci. Sports Exerc.* 32:1307-1313.
- Banks, G. B. and J. S. Chamberlain. 2008.** The value of mammalian models for duchenne muscular dystrophy in developing therapeutic strategies. *Curr. Top. Dev. Biol.* 84:431-453.
- Barrey, E. 1999.** Methods, applications and limitations of gait analysis in horses. *Vet. J.* 157:7-22.
- Barrey, E., P. Galloux, J. P. Valette, B. Auvinet, and R. Wolter. 1993.** Stride characteristics of overground versus treadmill locomotion in the saddle horse. *Acta Anat. (Basel)* 146:90-94.
- Barthelemy, I., E. Barrey, J. L. Thibaud, A. Uriarte, T. Voit, S. Blot, and J. Y. Hogrel. 2009.** Gait analysis using accelerometry in dystrophin-deficient dogs. *Neuromuscul. Disord.* 19:788-796.
- Barthelemy, I., Thibaud, J. L., Carelle, N., Tiret, L., Vulin, A., Drougard, C., Garcia, L., Kaplan, J. C., Leturcq, F., and Blot, S. 2007a.** Clinical Description and Molecular Analysis of a Promising Model of DMD, the LRMD Dog. *Neuromuscul. Disord.* 17:776 Abstract
- Barthelemy, I., Thibaud, J. L., Vulin, A., Bertoldi, D., Goyenvalle, A., Lorain, S., Dreyfus, P., Carlier, P. G., Garcia, L., and Blot, S. 2007b.** Functional evaluation of dystrophic dogs treated by exon-skipping. *Neuromuscul. Disord.* 17:898 Abstract
- Bartlett, R. J., N. J. Winand, S. L. Secore, J. T. Singer, S. Fletcher, S. Wilton, D. J. Bogan, J. R. Metcalf-Bogan, W. T. Bartlett, J. M. Howell, B. J. Cooper, and J. N.**

- Kornegay. 1996.** Mutation segregation and rapid carrier detection of X-linked muscular dystrophy in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 57:650-654.
- Beck, J., J. Weinberg, C. H. Hamnegard, J. Spahija, J. Olofson, G. Grimby, and C. Sinderby. 2006.** Diaphragmatic function in advanced Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* 16:161-167.
- Bellinger, A. M., S. Reiken, C. Carlson, M. Mongillo, X. Liu, L. Rothman, S. Matecki, A. Lacampagne, and A. R. Marks. 2009.** Hypernitrosylated ryanodine receptor calcium release channels are leaky in dystrophic muscle. *Nat. Med.* 15:325-330.
- Bellinger, A. M., S. Reiken, M. Dura, P. W. Murphy, S. X. Deng, D. W. Landry, D. Nieman, S. E. Lehnart, M. Samaru, A. Lacampagne, and A. R. Marks. 2008.** Remodeling of ryanodine receptor complex causes "leaky" channels: a molecular mechanism for decreased exercise capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105:2198-2202.
- Benchouir, R., M. Meregalli, A. Farini, G. D'Antona, M. Belicchi, A. Goyenville, M. Battistelli, N. Bresolin, R. Bottinelli, L. Garcia, and Y. Torrente. 2007.** Restoration of human dystrophin following transplantation of exon-skipping-engineered DMD patient stem cells into dystrophic mice. *Cell Stem Cell* 1:646-657.
- Bergman, R. L., K. D. Inzana, W. E. Monroe, L. G. Shell, L. A. Liu, E. Engvall, and G. D. Shelton. 2002.** Dystrophin-deficient muscular dystrophy in a Labrador retriever. *J. Am. Anim Hosp. Assoc.* 38:255-261.
- Biau, S., O. Couve, S. Lemaire, and E. Barrey. 2002.** The effect of reins on kinetic variables of locomotion. *Equine Vet. J. Suppl*359-362.
- Blazevich, A. J., D. R. Coleman, S. Horne, and D. Cannavan. 2009.** Anatomical predictors of maximum isometric and concentric knee extensor moment. *Eur. J. Appl. Physiol* 105:869-878.
- Blot, S., N. Carelle, JL. Beroud, J. L. Thibaud, N. Deburgrave, C. Escriou, V. Chetboul, J. C. Kaplan, and F. Leturcq. LRMD, an new canine model of dystrophinopathy in a Labrador Retriever strain. Poster ICNMD Congress . 2002.**
- Bodensteiner, J. B. and A. G. Engel. 1978.** Intracellular calcium accumulation in Duchenne dystrophy and other myopathies: a study of 567,000 muscle fibers in 114 biopsies. *Neurology* 28:439-446.
- Bogdanovich, S., T. O. Krag, E. R. Barton, L. D. Morris, L. A. Whittemore, R. S. Ahima, and T. S. Khurana. 2002.** Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature* 420:418-421.
- Bonifati, M. D., G. Ruzza, P. Bonometto, A. Berardinelli, K. Gorni, S. Orcesi, G. Lanzi, and C. Angelini. 2000.** A multicenter, double-blind, randomized trial of deflazacort versus prednisone in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 23:1344-1347.
- Bonilla, E., C. E. Samitt, A. F. Miranda, A. P. Hays, G. Salviati, S. DiMauro, L. M. Kunkel, E. P. Hoffman, and L. P. Rowland. 1988.** Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin at the muscle cell surface. *Cell* 54:447-452.

- BOTELHO, S. Y., S. B. BECKETT, and E. BENDLER. 1960.** Mechanical and electrical responses of intact thenar muscles to indirect stimuli: study of patients with pseudohypertrophic muscular dystrophy. *Neurology* 10:601-612.
- Brebner, N. S., N. M. Moens, and J. R. Runciman. 2006.** Evaluation of a treadmill with integrated force plates for kinetic gait analysis of sound and lame dogs at a trot. *Vet. Comp Orthop. Traumatol.* 19:205-212.
- Bretag, A. H. 2007.** Stem cell treatment of dystrophic dogs. *Nature* 450:E23-E25.
- Brumitt, J. W., S. C. Essman, J. N. Kornegay, J. P. Graham, W. J. Weber, and C. R. Berry. 2006.** Radiographic features of Golden Retriever muscular dystrophy. *Vet. Radiol. Ultrasound* 47:574-580.
- Buchner, H. H., H. H. Savelberg, H. C. Schamhardt, H. W. Merkens, and A. Barneveld. 1994.** Kinematics of treadmill versus overground locomotion in horses. *Vet. Q.* 16 Suppl 2:S87-S90.
- Bulfield, G., W. G. Siller, P. A. Wight, and K. J. Moore. 1984.** X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 81:1189-1192.
- Bushby, K., R. Finkel, D. J. Birnkrant, L. E. Case, P. R. Clemens, L. Cripe, A. Kaul, K. Kinnett, C. McDonald, S. Pandya, J. Poysky, F. Shapiro, J. Tomezsko, and C. Constantin. 2010a.** Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol.* 9:77-93.
- Bushby, K., R. Finkel, D. J. Birnkrant, L. E. Case, P. R. Clemens, L. Cripe, A. Kaul, K. Kinnett, C. McDonald, S. Pandya, J. Poysky, F. Shapiro, J. Tomezsko, and C. Constantin. 2010b.** Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: implementation of multidisciplinary care. *Lancet Neurol.* 9:177-189.
- Carpenter, J. L., E. P. Hoffman, F. C. Romanul, L. M. Kunkel, R. K. Rosales, N. S. Ma, J. J. Dasbach, J. F. Rae, F. M. Moore, M. B. McAfee, and . 1989.** Feline muscular dystrophy with dystrophin deficiency. *Am. J. Pathol.* 135:909-919.
- Carter, G. T. and C. M. McDonald. 2000.** Preserving function in Duchenne dystrophy with long-term pulse prednisone therapy. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* 79:455-458.
- Cerletti, M., T. Negri, F. Cozzi, R. Colpo, F. Andreetta, D. Croci, K. E. Davies, F. Cornelio, O. Pozza, G. Karpati, R. Gilbert, and M. Mora. 2003.** Dystrophic phenotype of canine X-linked muscular dystrophy is mitigated by adenovirus-mediated utrophin gene transfer. *Gene Ther.* 10:750-757.
- Chakkalakal, J. V., J. Thompson, R. J. Parks, and B. J. Jasmin. 2005.** Molecular, cellular, and pharmacological therapies for Duchenne/Becker muscular dystrophies. *FASEB J.* 19:880-891.
- Chamberlain, J. S., K. Corrado, J. A. Rafael, G. A. Cox, M. Hauser, and C. Lumeng. 1997.** Interactions between dystrophin and the sarcolemma membrane. *Soc. Gen. Physiol Ser.* 52:19-29.

- Chelly, J., J. C. Kaplan, P. Maire, S. Gautron, and A. Kahn. 1988.** Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissue. *Nature* 333:858-860.
- Chetboul, V., S. Blot, C. C. Sampedrano, J. L. Thibaud, N. Granger, R. Tissier, P. Bruneval, F. Gaschen, V. Gouni, A. P. Nicolle, and J. L. Pouchelon. 2006.** Tissue Doppler imaging for detection of radial and longitudinal myocardial dysfunction in a family of cats affected by dystrophin-deficient hypertrophic muscular dystrophy. *J. Vet. Intern. Med.* 20:640-647.
- Chetboul, V., C. Carlos, S. Blot, J. L. Thibaud, C. Escriou, R. Tissier, J. L. Retortillo, and J. L. Pouchelon. 2004a.** Tissue Doppler assessment of diastolic and systolic alterations of radial and longitudinal left ventricular motions in Golden Retrievers during the preclinical phase of cardiomyopathy associated with muscular dystrophy. *Am. J. Vet. Res.* 65:1335-1341.
- Chetboul, V., C. Escriou, D. Tessier, V. Richard, J. L. Pouchelon, H. Thibault, F. Lallemand, C. Thuillez, S. Blot, and G. Derumeaux. 2004b.** Tissue Doppler imaging detects early asymptomatic myocardial abnormalities in a dog model of Duchenne's cardiomyopathy. *Eur. Heart J.* 25:1934-1939.
- Chin, E. R., E. N. Olson, J. A. Richardson, Q. Yang, C. Humphries, J. M. Shelton, H. Wu, W. Zhu, R. Bassel-Duby, and R. S. Williams. 1998.** A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes Dev.* 12:2499-2509.
- Clements, D. N., M. R. Owen, S. Carmichael, and S. W. Reid. 2005.** Kinematic analysis of the gait of 10 labrador retrievers during treadmill locomotion. *Vet. Rec.* 156:478-481.
- Colborne, G. R., A. M. Walker, A. J. Tattersall, and C. J. Fuller. 2006.** Effect of trotting velocity on work patterns of the hind limbs of Greyhounds. *Am. J. Vet. Res.* 67:1293-1298.
- Connolly, A. M., J. Schierbecker, R. Renna, and J. Florence. 2002.** High dose weekly oral prednisone improves strength in boys with Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* 12:917-925.
- Constantin, B., S. Seville, and C. Cognard. 2006.** New insights in the regulation of calcium transfers by muscle dystrophin-based cytoskeleton: implications in DMD. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 27:375-386.
- Cooper, B. J., N. J. Winand, H. Stedman, B. A. Valentine, E. P. Hoffman, L. M. Kunkel, M. O. Scott, K. H. Fischbeck, J. N. Kornegay, R. J. Avery, and . 1988.** The homologue of the Duchenne locus is defective in X-linked muscular dystrophy of dogs. *Nature* 334:154-156.
- Cordazzo M.-C.** Mise au point d'outils pour l'évaluation clinique de chiens atteints de myopathie dystrophique. Thèse vétérinaire - ENVA . 2007.
- Corrado, G., A. Lissoni, S. Beretta, L. Terenghi, G. Tadeo, G. Foglia-Manzillo, L. M. Tagliagambe, M. Spata, and M. Santarone. 2002.** Prognostic value of electrocardiograms, ventricular late potentials, ventricular arrhythmias, and left ventricular systolic dysfunction in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Am. J. Cardiol.* 89:838-841.
- Cozzi, F., M. Cerletti, G. C. Luvoni, R. Lombardo, P. G. Brambilla, S. Faverzani, F. Blasevich, F. Cornelio, O. Pozza, and M. Mora. 2001.** Development of muscle pathology in

canine X-linked muscular dystrophy. II. Quantitative characterization of histopathological progression during postnatal skeletal muscle development. *Acta Neuropathol.* 101:469-478.

Cuddon, P. A. 2002. Electrophysiology in neuromuscular disease. *Vet. Clin. North Am. Small Anim Pract.* 32:31-62.

Cullen, M. J. and E. Jaros. 1988. Ultrastructure of the skeletal muscle in the X chromosome-linked dystrophic (mdx) mouse. Comparison with Duchenne muscular dystrophy. *Acta Neuropathol.* 77:69-81.

Cutlip, R. G., W. T. Stauber, R. H. Willison, T. A. McIntosh, and K. H. Means. 1997. Dynamometer for rat plantar flexor muscles in vivo. *Med. Biol. Eng Comput.* 35:540-543.

D'Angelo, M. G., M. Berti, L. Piccinini, M. Romei, M. Guglieri, S. Bonato, A. Degrate, A. C. Turconi, and N. Bresolin. 2009. Gait pattern in Duchenne muscular dystrophy. *Gait Posture.* 29:36-41.

Daftary, A. S., M. Crisanti, M. Kalra, B. Wong, and R. Amin. 2007. Effect of long-term steroids on cough efficiency and respiratory muscle strength in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Pediatrics* 119:e320-e324.

De, L. A., B. Nico, A. Liantonio, M. P. Didonna, B. Fraysse, S. Pierno, R. Burdi, D. Mangieri, J. F. Rolland, C. Camerino, A. Zallone, P. Confalonieri, F. Andreetta, E. Arnoldi, I. Courdier-Fruh, J. P. Magyar, A. Frigeri, M. Pisoni, M. Svelto, and C. D. Conte. 2005. A multidisciplinary evaluation of the effectiveness of cyclosporine a in dystrophic mdx mice. *Am. J. Pathol.* 166:477-489.

Dell'Agnola, C., Z. Wang, R. Storb, S. J. Tapscott, C. S. Kuhr, S. D. Hauschka, R. S. Lee, G. E. Sale, E. Zellmer, S. Gisburne, J. Bogan, J. N. Kornegay, B. J. Cooper, T. A. Gooley, and M. T. Little. 2004. Hematopoietic stem cell transplantation does not restore dystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy dogs. *Blood* 104:4311-4318.

Desguerre, I., C. Christov, M. Mayer, R. Zeller, H. M. Becane, S. Bastuji-Garin, F. Leturcq, C. Chiron, J. Chelly, and R. K. Gherardi. 2009a. Clinical heterogeneity of duchenne muscular dystrophy (DMD): definition of sub-phenotypes and predictive criteria by long-term follow-up. *PLoS. One.* 4:e4347.

Desguerre, I., M. Mayer, F. Leturcq, J. P. Barbet, R. K. Gherardi, and C. Christov. 2009b. Endomysial fibrosis in Duchenne muscular dystrophy: a marker of poor outcome associated with macrophage alternative activation. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 68:762-773.

Dingwell, J. B. and P. R. Cavanagh. 2001. Increased variability of continuous overground walking in neuropathic patients is only indirectly related to sensory loss. *Gait Posture.* 14:1-10.

Eagle, M., S. V. Baudouin, C. Chandler, D. R. Giddings, R. Bullock, and K. Bushby. 2002. Survival in Duchenne muscular dystrophy: improvements in life expectancy since 1967 and the impact of home nocturnal ventilation. *Neuromuscul. Disord.* 12:926-929.

Edwards, R. H., S. J. Chapman, D. J. Newham, and D. A. Jones. 1987. Practical analysis of variability of muscle function measurements in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 10:6-14.

Emery, A. H. 1993. Duchenne Muscular Dystrophy, Second edition, Oxford University Press ed.

Evans, D. L. 2007. Physiology of equine performance and associated tests of function. *Equine Vet. J.* 39:373-383.

Evans, R., C. Horstman, and M. Conzemius. 2005. Accuracy and optimization of force platform gait analysis in Labradors with cranial cruciate disease evaluated at a walking gait. *Vet. Surg.* 34:445-449.

Fanchon, L. Biomécanique Canine Développement de l'Analyse de Mouvement sur Tapis Roulant Application à l'Etude de Chiens Atteints d'une Myopathie Dystrophique. Thèse vétérinaire - ENVA . 2003.

Fanchon, L., J. P. Valette, M. Sanaa, and D. Grandjean. 2006. The measurement of ground reaction force in dogs trotting on a treadmill: an investigation of habituation. *Vet. Comp Orthop. Traumatol.* 19:81-86.

Fenichel, G. M., J. M. Florence, A. Pestronk, J. R. Mendell, R. T. Moxley, III, R. C. Griggs, M. H. Brooke, J. P. Miller, J. Robison, W. King, and . 1991. Long-term benefit from prednisone therapy in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 41:1874-1877.

Fromageot, C., F. Lofaso, D. Annane, L. Falaize, M. Lejaille, B. Clair, P. Gajdos, and J. C. Raphael. 2001. Supine fall in lung volumes in the assessment of diaphragmatic weakness in neuromuscular disorders. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 82:123-128.

Gaschen, F. and J. M. Burgunder. 2001. Changes of skeletal muscle in young dystrophin-deficient cats: a morphological and morphometric study. *Acta Neuropathol.* 101:591-600.

Gaschen, F., L. Gaschen, G. Seiler, M. Welle, V. B. Jaunin, D. G. Jmaa, G. Neiger-Aeschbacher, and M. de-Damilano. 1998. Lethal peracute rhabdomyolysis associated with stress and general anesthesia in three dystrophin-deficient cats. *Vet. Pathol.* 35:117-123.

Gaschen, F. P., E. P. Hoffman, J. R. Gorospe, E. W. Uhl, D. F. Senior, G. H. Cardinet, III, and L. K. Pearce. 1992. Dystrophin deficiency causes lethal muscle hypertrophy in cats. *J. Neurol. Sci.* 110:149-159.

Gaud, A., J. M. Simon, T. Witzel, M. Carre-Pierrat, C. G. Wermuth, and L. Segalat. 2004. Prednisone reduces muscle degeneration in dystrophin-deficient *Caenorhabditis elegans*. *Neuromuscul. Disord.* 14:365-370.

Gaudreault, N., D. Gravel, and S. Nadeau. 2009. Evaluation of plantar flexion contracture contribution during the gait of children with Duchenne muscular dystrophy. *J. Electromyogr. Kinesiol.* 19:e180-e186.

Giger, J. M., F. Haddad, A. X. Qin, and K. M. Baldwin. 2004. Effect of cyclosporin A treatment on the in vivo regulation of type I MHC gene expression. *J. Appl. Physiol* 97:475-483.

Gillette, R. L. and T. C. Angle. 2008. Recent developments in canine locomotor analysis: a review. *Vet. J.* 178:165-176.

- Gillette, R. L. and C. J. Zebas. 1999.** A two-dimensional analysis of limb symmetry in the trot of Labrador retrievers. *J. Am. Anim Hosp. Assoc.* 35:515-520.
- Gilson, H., O. Schakman, L. Combaret, P. Lause, L. Grobet, D. Attaix, J. M. Ketelslegers, and J. P. Thissen. 2007.** Myostatin gene deletion prevents glucocorticoid-induced muscle atrophy. *Endocrinology* 148:452-460.
- Gomez Alvarez, C. B., M. Rhodin, A. Bystrom, W. Back, and P. R. van Weeren. 2009.** Back kinematics of healthy trotting horses during treadmill versus over ground locomotion. *Equine Vet. J.* 41:297-300.
- Gordon, T. and R. B. Stein. 1988.** Comparison of force and stiffness in normal and dystrophic mouse muscles. *Muscle Nerve* 11:819-827.
- Gorospe, J. R., M. D. Tharp, J. Hinckley, J. N. Kornegay, and E. P. Hoffman. 1994.** A role for mast cells in the progression of Duchenne muscular dystrophy? Correlations in dystrophin-deficient humans, dogs, and mice. *J. Neurol. Sci.* 122:44-56.
- Gosselin, L. E. and K. M. McCormick. 2004.** Targeting the immune system to improve ventilatory function in muscular dystrophy. *Med. Sci. Sports Exerc.* 36:44-51.
- Goyenville, A., A. Vulin, F. Fougerousse, F. Leturcq, J. C. Kaplan, L. Garcia, and O. Danos. 2004.** Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science* 306:1796-1799.
- Guralnik, J. M., L. Ferrucci, C. F. Pieper, S. G. Leveille, K. S. Markides, G. V. Ostir, S. Studenski, L. F. Berkman, and R. B. Wallace. 2000.** Lower extremity function and subsequent disability: consistency across studies, predictive models, and value of gait speed alone compared with the short physical performance battery. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 55:M221-M231.
- Hamed, S. A. 2006.** Drug evaluation: PTC-124--a potential treatment of cystic fibrosis and Duchenne muscular dystrophy. *IDrugs.* 9:783-789.
- Hansen, B. D., B. D. Lascelles, B. W. Keene, A. K. Adams, and A. E. Thomson. 2007.** Evaluation of an accelerometer for at-home monitoring of spontaneous activity in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 68:468-475.
- Hardiman, O., R. M. Sklar, and R. H. Brown, Jr. 1993.** Methylprednisolone selectively affects dystrophin expression in human muscle cultures. *Neurology* 43:342-345.
- Hausdorff, J. M., H. K. Edelberg, S. L. Mitchell, A. L. Goldberger, and J. Y. Wei. 1997.** Increased gait unsteadiness in community-dwelling elderly fallers. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 78:278-283.
- Hoffman, A. M. 2007.** Airway physiology and clinical function testing. *Vet. Clin. North Am. Small Anim Pract.* 37:829-43, v.
- Hoffman, E. P., R. H. Brown, Jr., and L. M. Kunkel. 1987.** Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51:919-928.

Hogrel, J. Y., G. Ollivier, and C. Desnuelle. 2006. [Manual and quantitative muscle testing in neuromuscular disorders. How to assess the consistency of strength measurements in clinical trials?]. *Rev. Neurol. (Paris)* 162:427-436.

Huebner, K. D., D. S. Jassal, O. Halevy, M. Pines, and J. E. Anderson. 2008. Functional resolution of fibrosis in mdx mouse dystrophic heart and skeletal muscle by halofuginone. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 294:H1550-H1561.

Hussein, M. R., E. E. bu-Dief, N. F. Kamel, and M. G. Mostafa. 2010. Steroid therapy is associated with decreased numbers of dendritic cells and fibroblasts, and increased numbers of satellite cells, in the dystrophic skeletal muscle. *J. Clin. Pathol.* 63:805-813.

Hussein, M. R., S. A. Hamed, M. G. Mostafa, E. E. bu-Dief, N. F. Kamel, and M. R. Kandil. 2006. The effects of glucocorticoid therapy on the inflammatory and dendritic cells in muscular dystrophies. *Int. J. Exp. Pathol.* 87:451-461.

Ishizaki, M., T. Suga, E. Kimura, T. Shiota, R. Kawano, Y. Uchida, K. Uchino, S. Yamashita, Y. Maeda, and M. Uchino. 2008. Mdx respiratory impairment following fibrosis of the diaphragm. *Neuromuscul. Disord.* 18:342-348.

Iwashita, S., Y. Takeno, K. Okazaki, J. Itoh, Y. Kamijo, S. Masuki, Y. Yanagidaira, and H. Nose. 2003. Triaxial accelerometry to evaluate walking efficiency in older subjects. *Med. Sci. Sports Exerc.* 35:1766-1772.

Jacobs, S. C., A. L. Bootsma, P. W. Willems, P. R. Bar, and J. H. Wokke. 1996. Prednisone can protect against exercise-induced muscle damage. *J. Neurol.* 243:410-416.

Jeannet, P. Y., K. Aminian, C. Bloetzer, B. Najafi, and A. Paraschiv-Ionescu. 2010. Continuous monitoring and quantification of multiple parameters of daily physical activity in ambulatory Duchenne muscular dystrophy patients. *Eur. J. Paediatr. Neurol.*

Jeannet, P. Y., Ganea, R., Spehrs-Ciaffi, V., Goemans, N. M., Aminian, K., and Paraschiv-Ionescu, A. 2008. Gait Pattern Assessment Over 200 m in Duchenne Muscular Dystrophy (DMD). *Neuromuscul. Disord.* 18:739 Abstract

Johnson, B. D., T. Scheuer, and W. A. Catterall. 2005. Convergent regulation of skeletal muscle Ca²⁺ channels by dystrophin, the actin cytoskeleton, and cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102:4191-4196.

Jones, B. R., S. Brennan, C. T. Mooney, J. J. Callanan, H. McAllister, L. T. Guo, P. T. Martin, E. Engvall, and G. D. Shelton. 2004. Muscular dystrophy with truncated dystrophin in a family of Japanese Spitz dogs. *J. Neurol. Sci.* 217:143-149.

Kavanagh, J. J. and H. B. Menz. 2008. Accelerometry: a technique for quantifying movement patterns during walking. *Gait. Posture.* 28:1-15.

Keeling, R. M., P. T. Golumbek, E. M. Streif, and A. M. Connolly. 2007. Weekly oral prednisolone improves survival and strength in male mdx mice. *Muscle Nerve* 35:43-48.

Kerkis, I., C. E. Ambrosio, A. Kerkis, D. S. Martins, E. Zucconi, S. A. Fonseca, R. M. Cabral, C. M. Maranduba, T. P. Gaiad, A. C. Morini, N. M. Vieira, M. P. Brolio, O. A. Sant'Anna, M. A. Miglino, and M. Zatz. 2008. Early transplantation of human immature

dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: Local or systemic? *J. Transl. Med.* 6:35.

Kinali, M., V. rechavala-Gomez, L. Feng, S. Cirak, D. Hunt, C. Adkin, M. Guglieri, E. Ashton, S. Abbs, P. Nihoyannopoulos, M. E. Garralda, M. Rutherford, C. McCulley, L. Popplewell, I. R. Graham, G. Dickson, M. J. Wood, D. J. Wells, S. D. Wilton, R. Kole, V. Straub, K. Bushby, C. Sewry, J. E. Morgan, and F. Muntoni. 2009. Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658 in Duchenne muscular dystrophy: a single-blind, placebo-controlled, dose-escalation, proof-of-concept study. *Lancet Neurol.* 8:918-928.

Kirschner, J., J. Schessl, U. Schara, B. Reitter, G. M. Stettner, E. Hobbiebrunken, E. Wilichowski, G. Bernert, S. Weiss, F. Stehling, G. Wiegand, W. Muller-Felber, S. Thiele, U. Grieben, H. M. von der, J. Lutschg, C. Schmoor, G. Ihorst, and R. Korinthenberg. 2010. Treatment of Duchenne muscular dystrophy with ciclosporin A: a randomised, double-blind, placebo-controlled multicentre trial. *Lancet Neurol.*

Kissel, J. T., K. L. Burrow, K. W. Rammohan, and J. R. Mendell. 1991. Mononuclear cell analysis of muscle biopsies in prednisone-treated and untreated Duchenne muscular dystrophy. CIDDD Study Group. *Neurology* 41:667-672.

Kissel, J. T., D. J. Lynn, K. W. Rammohan, J. P. Klein, R. C. Griggs, R. T. Moxley, III, V. A. Cwik, M. H. Brooke, and J. R. Mendell. 1993. Mononuclear cell analysis of muscle biopsies in prednisone- and azathioprine-treated Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 43:532-536.

Klarenbeek, S., M. J. Gerritzen-Bruning, A. J. Rozemuller, and J. J. van der Lugt. 2007. Canine X-linked muscular dystrophy in a family of Grand Basset Griffon Vendeen dogs. *J. Comp Pathol.* 137:249-252.

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

Kohler, M., C. F. Clarenbach, L. Boni, T. Brack, E. W. Russi, and K. E. Bloch. 2005. Quality of life, physical disability, and respiratory impairment in Duchenne muscular dystrophy. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 172:1032-1036.

Kornegay, J. N., D. J. Bogan, J. R. Bogan, M. K. Childers, D. D. Cundiff, G. F. Petroski, and R. O. Schueler. 1999. Contraction force generated by tarsal joint flexion and extension in dogs with golden retriever muscular dystrophy. *J. Neurol. Sci.* 166:115-121.

Kornegay, J. N., D. D. Cundiff, D. J. Bogan, J. R. Bogan, and C. S. Okamura. 2003. The cranial sartorius muscle undergoes true hypertrophy in dogs with golden retriever muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* 13:493-500.

Kornegay, J. N., J. Li, J. R. Bogan, D. J. Bogan, C. Chen, H. Zheng, B. Wang, C. Qiao, J. F. Howard, Jr., and X. Xiao. 2010. Widespread Muscle Expression of an AAV9 Human Mini-dystrophin Vector After Intravenous Injection in Neonatal Dystrophin-deficient Dogs. *Mol. Ther.*

- Kornegay, J. N., N. J. Sharp, D. J. Bogan, S. D. Van Camp, J. R. Metcalf, and R. O. Schueler. 1994.** Contraction tension and kinetics of the peroneus longus muscle in golden retriever muscular dystrophy. *J. Neurol. Sci.* 123:100-107.
- Kornegay, J. N., S. M. Tuler, D. M. Miller, and D. C. Levesque. 1988a.** Muscular dystrophy in a litter of golden retriever dogs. *Muscle Nerve* 11:1056-1064.
- Kornegay, J. N., S. M. Tuler, D. M. Miller, and D. C. Levesque. 1988b.** Muscular dystrophy in a litter of golden retriever dogs. *Muscle Nerve* 11:1056-1064.
- Lascelles, B. D., K. Findley, M. Correa, D. Marcellin-Little, and S. Roe. 2007.** Kinetic evaluation of normal walking and jumping in cats, using a pressure-sensitive walkway. *Vet. Rec.* 160:512-516.
- Lascelles, B. D., S. C. Roe, E. Smith, L. Reynolds, J. Markham, D. Marcellin-Little, M. S. Bergh, and S. C. Budsberg. 2006.** Evaluation of a pressure walkway system for measurement of vertical limb forces in clinically normal dogs. *Am. J. Vet. Res.* 67:277-282.
- Le, R. E., S. J. Winder, and J. F. Hubert. 2010.** Dystrophin: more than just the sum of its parts. *Biochim. Biophys. Acta* 1804:1713-1722.
- Leleu, C., E. Gloria, G. Renault, and E. Barrey. 2002.** Analysis of trotter gait on the track by accelerometry and image analysis. *Equine Vet. J. Suppl*344-348.
- Lennon, T. P., G. C. Yee, M. S. Kennedy, B. Torok-Storb, S. A. Burstein, and H. J. Deeg. 1987.** Monitoring of cyclosporine therapy with in vitro biological assays. *Transplantation* 44:799-804.
- Li, K., D. J. Hewson, J. Duchene, and J. Y. Hogrel. 2010.** Predicting maximal grip strength using hand circumference. *Man. Ther.*
- Liu, J. M., C. S. Okamura, D. J. Bogan, J. R. Bogan, M. K. Childers, and J. N. Kornegay. 2004.** Effects of prednisone in canine muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 30:767-773.
- Ma, K., C. Mallidis, S. Bhasin, V. Mahabadi, J. Artaza, N. Gonzalez-Cadavid, J. Arias, and B. Salehian. 2003.** Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 285:E363-E371.
- Malik, V., L. R. Rodino-Klapac, L. Violette, C. Wall, W. King, R. Al-Dahhak, S. Lewis, C. J. Shilling, J. Kota, C. Serrano-Munuera, J. Hayes, J. D. Mahan, K. J. Campbell, B. Banwell, M. Dasouki, V. Watts, K. Sivakumar, R. Bien-Willner, K. M. Flanigan, Z. Sahenk, R. J. Barohn, C. M. Walker, and J. R. Mendell. 2010.** Gentamicin-induced readthrough of stop codons in Duchenne muscular dystrophy. *Ann. Neurol.* 67:771-780.
- Manzur, A. Y., M. Kinali, and F. Muntoni. 2008.** Update on the management of Duchenne muscular dystrophy. *Arch. Dis. Child* 93:986-990.
- Maquet, D., F. Lekeu, E. Warzee, S. Gillain, V. Wojtasik, E. Salmon, J. Petermans, and J. L. Croisier. 2010.** Gait analysis in elderly adult patients with mild cognitive impairment

and patients with mild Alzheimer's disease: simple versus dual task: a preliminary report. *Clin. Physiol Funct. Imaging* 30:51-56.

Marchesi, C., M. Belicchi, M. Meregalli, A. Farini, A. Cattaneo, D. Parolini, M. Gavina, L. Porretti, M. G. D'Angelo, N. Bresolin, G. Cossu, and Y. Torrente. 2008. Correlation of circulating CD133+ progenitor subclasses with a mild phenotype in Duchenne muscular dystrophy patients. *PLoS. One.* 3:e2218.

Markham, L. W., K. Kinnett, B. L. Wong, B. D. Woodrow, and L. H. Cripe. 2008. Corticosteroid treatment retards development of ventricular dysfunction in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* 18:365-370.

Marsh, A. P., J. D. Eggebeen, J. N. Kornegay, C. D. Markert, and M. K. Childers. 2010. Kinematics of gait in golden retriever muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* 20:16-20.

Martigne, L., D. Seguy, N. Pellegrini, D. Orlikowski, J. M. Cuisset, A. Carpentier, V. Tiffreau, D. Guimber, and F. Gottrand. 2010. Efficacy and tolerance of gastrostomy feeding in Duchenne muscular dystrophy. *Clin. Nutr.* 29:60-64.

Mattar, F. L. and C. Sobreira. 2008. Hand weakness in Duchenne muscular dystrophy and its relation to physical disability. *Neuromuscul. Disord.* 18:193-198.

Maurissen, J. P., B. R. Marable, A. K. Andrus, and K. E. Stebbins. 2003. Factors affecting grip strength testing. *Neurotoxicol. Teratol.* 25:543-553.

Mayagoitia, R. E., A. V. Nene, and P. H. Veltink. 2002. Accelerometer and rate gyroscope measurement of kinematics: an inexpensive alternative to optical motion analysis systems. *J. Biomech.* 35:537-542.

McLaughlin, R. M. 2001. Kinetic and kinematic gait analysis in dogs. *Vet. Clin. North Am. Small Anim Pract.* 31:193-201.

Mendell, J. R., K. Campbell, L. Rodino-Klapac, Z. Sahenk, C. Shilling, S. Lewis, D. Bowles, S. Gray, C. Li, G. Galloway, V. Malik, B. Coley, K. R. Clark, J. Li, X. Xiao, J. Samulski, S. W. McPhee, R. J. Samulski, and C. M. Walker. 2010. Dystrophin immunity in Duchenne's muscular dystrophy. *N. Engl. J. Med.* 363:1429-1437.

Mercuri, E., A. Mayhew, F. Muntoni, S. Messina, V. Straub, G. J. Van Ommen, T. Voit, E. Bertini, and K. Bushby. 2008. Towards harmonisation of outcome measures for DMD and SMA within TREAT-NMD; report of three expert workshops: TREAT-NMD/ENMC workshop on outcome measures, 12th--13th May 2007, Naarden, The Netherlands; TREAT-NMD workshop on outcome measures in experimental trials for DMD, 30th June--1st July 2007, Naarden, The Netherlands; conjoint Institute of Myology TREAT-NMD meeting on physical activity monitoring in neuromuscular disorders, 11th July 2007, Paris, France. *Neuromuscul. Disord.* 18:894-903.

Merlini, L., A. Cicognani, E. Malaspina, M. Gennari, S. Gnudi, B. Talim, and E. Franzoni. 2003. Early prednisone treatment in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 27:222-227.

Mettler, J. A. and L. Griffin. 2010. What are the stimulation parameters that affect the extent of twitch force potentiation in the adductor pollicis muscle? *Eur. J. Appl. Physiol.*

- Metzinger, L., A. C. Passaquin, W. J. Leijendekker, P. Poindron, and U. T. Ruegg. 1995.** Modulation by prednisolone of calcium handling in skeletal muscle cells. *Br. J. Pharmacol.* 116:2811-2816.
- Michel, R. N., S. E. Dunn, and E. R. Chin. 2004.** Calcineurin and skeletal muscle growth. *Proc. Nutr. Soc.* 63:341-349.
- Miller, R. G., K. R. Sharma, G. K. Pavlath, E. Gussoni, M. Mynhier, A. M. Lanctot, C. M. Greco, L. Steinman, and H. M. Blau. 1997.** Myoblast implantation in Duchenne muscular dystrophy: the San Francisco study. *Muscle Nerve* 20:469-478.
- Miura, P. and B. J. Jasmin. 2006.** Utrophin upregulation for treating Duchenne or Becker muscular dystrophy: how close are we? *Trends Mol. Med.* 12:122-129.
- Mok, E., G. Letellier, J. M. Cuisset, A. Denjean, F. Gottrand, C. Alberti, and R. Hankard. 2009.** Lack of functional benefit with glutamine versus placebo in Duchenne muscular dystrophy: a randomized crossover trial. *PLoS. One.* 4:e5448.
- Monaco, A. P., R. L. Neve, C. Colletti-Feener, C. J. Bertelson, D. M. Kurnit, and L. M. Kunkel. 1986.** Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature* 323:646-650.
- Morine, K. J., L. T. Bish, J. T. Selsby, J. A. Gazzara, K. Pendrak, M. M. Sleeper, E. R. Barton, S. J. Lee, and H. L. Sweeney. 2010.** Activin IIB receptor blockade attenuates dystrophic pathology in a mouse model of duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve.*
- Mosher, D. S., P. Quignon, C. D. Bustamante, N. B. Sutter, C. S. Mellersh, H. G. Parker, and E. A. Ostrander. 2007.** A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. *PLoS. Genet.* 3:e79.
- Neri, M., S. Torelli, S. Brown, I. Ugo, P. Sabatelli, L. Merlini, P. Spitali, P. Rimessi, F. Gualandi, C. Sewry, A. Ferlini, and F. Muntoni. 2007.** Dystrophin levels as low as 30% are sufficient to avoid muscular dystrophy in the human. *Neuromuscul. Disord.* 17:913-918.
- Nguyen, F., Y. Cherel, L. Guigand, I. Goubault-Leroux, and M. Wyers. 2002.** Muscle lesions associated with dystrophin deficiency in neonatal golden retriever puppies. *J. Comp Pathol.* 126:100-108.
- Nicolas-Metral, V., E. Raddatz, P. Kucera, and U. T. Ruegg. 2001.** Mdx myotubes have normal excitability but show reduced contraction-relaxation dynamics. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 22:69-75.
- Owczarek, J., M. Jasinska, and D. Orszulak-Michalak. 2005.** Drug-induced myopathies. An overview of the possible mechanisms. *Pharmacol. Rep.* 57:23-34.
- Paola, J. P., M. Podell, and G. D. Shelton. 1993.** Muscular Dystrophy in a Miniature Schnauzer. *Progress in Veterinary Neurology* 4:14-18.
- Paquet, J. M., B. Auvinet, D. Chaleil, and E. Barrey. 2003.** [Analysis of gait disorders in Parkinson's disease assessed with an accelerometer]. *Rev. Neurol. (Paris)* 159:786-789.

- Parreira, S. L., M. B. Resende, P. M. la Corte, S. K. Marie, M. S. Carvalho, and U. C. Reed. 2007.** Quantification of muscle strength and motor ability in patients with Duchenne muscular dystrophy on steroid therapy. *Arq Neuropsiquiatr.* 65:245-250.
- Passaquin, A. C., L. Metzinger, J. J. Leger, J. M. Warter, and P. Poindron. 1993.** Prednisolone enhances myogenesis and dystrophin-related protein in skeletal muscle cell cultures from mdx mouse. *J. Neurosci. Res.* 35:363-372.
- Pastoret, C. and A. Seville. 1995b.** mdx mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. *J. Neurol. Sci.* 129:97-105.
- Pastoret, C. and A. Seville. 1995a.** mdx mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. *J. Neurol. Sci.* 129:97-105.
- Perez, T. 2006.** [Neuromuscular disorders - assessment of the respiratory muscles]. *Rev. Neurol. (Paris)* 162:437-444.
- Petrof, B. J., J. B. Shrager, H. H. Stedman, A. M. Kelly, and H. L. Sweeney. 1993.** Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90:3710-3714.
- Pfau, T., J. J. Robilliard, R. Weller, K. Jespers, E. Eliashar, and A. M. Wilson. 2007.** Assessment of mild hindlimb lameness during over ground locomotion using linear discriminant analysis of inertial sensor data. *Equine Vet. J.* 39:407-413.
- Phillips, M. F. and R. Quinlivan. 2008.** Calcium antagonists for Duchenne muscular dystrophy. *Cochrane. Database. Syst. Rev.* CD004571.
- Phillips, M. F., R. C. Quinlivan, R. H. Edwards, and P. M. Calverley. 2001.** Changes in spirometry over time as a prognostic marker in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 164:2191-2194.
- Pichavant, C., P. Chapdelaine, D. G. Cerri, J. C. Bizario, and J. P. Tremblay. 2010a.** Electrotransfer of the Full Length Dog Dystrophin in Mouse and Dystrophic Dog Muscles. *Hum. Gene Ther.*
- Pichavant, C., P. Chapdelaine, D. G. Cerri, J. C. Dominique, S. P. Quenneville, D. Skuk, J. N. Kornegay, J. C. Bizario, X. Xiao, and J. P. Tremblay. 2010b.** Expression of dog microdystrophin in mouse and dog muscles by gene therapy. *Mol. Ther.* 18:1002-1009.
- Pierce, R. 2005.** Spirometry: an essential clinical measurement. *Aust. Fam. Physician* 34:535-539.
- Pinto-Mariz, F., L. R. Carvalho, M. W. de, A. Q. Araujo, M. G. Ribeiro, M. C. Cunha, T. Voit, G. Butler-Browne, S. D. Silva-Barbosa, and W. Savino. 2010.** Differential integrin expression by T lymphocytes: potential role in DMD muscle damage. *J. Neuroimmunol.* 223:128-130.
- Poy, N. S., C. E. DeCamp, R. L. Bennett, and J. G. Hauptman. 2000.** Additional kinematic variables to describe differences in the trot between clinically normal dogs and dogs with hip dysplasia. *Am. J. Vet. Res.* 61:974-978.

- Pradhan, S., D. Ghosh, N. K. Srivastava, A. Kumar, B. Mittal, C. M. Pandey, and U. Singh. 2006.** Prednisolone in Duchenne muscular dystrophy with imminent loss of ambulation. *J. Neurol.* 253:1309-1316.
- Presthus, J. and K. Nordstoga. 1993.** Congenital Myopathy in a Litter of Samoyed Dogs. *Progress in Veterinary Neurology* 4:37-40.
- Quinlan, J. G., H. S. Hahn, B. L. Wong, J. N. Lorenz, A. S. Wenisch, and L. S. Levin. 2004.** Evolution of the mdx mouse cardiomyopathy: physiological and morphological findings. *Neuromuscul. Disord.* 14:491-496.
- Quinlan, J. G., S. R. Johnson, M. K. McKee, and S. P. Lyden. 1992.** Twitch and tetanus in mdx mouse muscle. *Muscle Nerve* 15:837-842.
- Roberts, H. C. 2009.** Imaging the diaphragm. *Thorac. Surg. Clin.* 19:431-50, v.
- Rocha-Barbosa, O., M. F. De Castro Loguercio, S. Renous, and J.-P. Gasc. 2005.** Limb joints kinematics and their relation to increasing speed in the guinea pig *Cavia porcellus* (Mammalia: Rodentia). *J. Zool.* 266:293-305.
- Romei, M., M. Galli, F. Motta, M. Schwartz, and M. Crivellini. 2004.** Use of the normalcy index for the evaluation of gait pathology. *Gait. Posture.* 19:85-90.
- Romero, N. B., S. Braun, O. Benveniste, F. Leturcq, J. Y. Hogrel, G. E. Morris, A. Barois, B. Eymard, C. Payan, V. Ortega, A. L. Boch, L. Lejean, C. Thioudellet, B. Mourot, C. Escot, A. Choquel, D. Recan, J. C. Kaplan, G. Dickson, D. Klatzmann, V. Molinier-Frenckel, J. G. Guillet, P. Squiban, S. Herson, and M. Fardeau. 2004.** Phase I study of dystrophin plasmid-based gene therapy in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Hum. Gene Ther.* 15:1065-1076.
- Rozanski, E. A. and A. M. Hoffman. 1999.** Pulmonary function testing in small animals. *Clin. Tech. Small Anim Pract.* 14:237-241.
- Sacco, P., D. A. Jones, J. R. Dick, and G. Vrbova. 1992.** Contractile properties and susceptibility to exercise-induced damage of normal and mdx mouse tibialis anterior muscle. *Clin. Sci. (Lond)* 82:227-236.
- Salarian, A., H. Russmann, F. J. Vingerhoets, C. Dehollain, Y. Blanc, P. R. Burkhard, and K. Aminian. 2004.** Gait assessment in Parkinson's disease: toward an ambulatory system for long-term monitoring. *IEEE Trans. Biomed. Eng* 51:1434-1443.
- Sampaolesi, M., S. Blot, G. D'Antona, N. Granger, R. Tonlorenzi, A. Innocenzi, P. Mognol, J. L. Thibaud, B. G. Galvez, I. Barthelemy, L. Perani, S. Mantero, M. Guttinger, O. Pansarasa, C. Rinaldi, M. G. Cusella De Angelis, Y. Torrente, C. Bordignon, R. Bottinelli, and G. Cossu. 2006.** Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature* 444:574-579.
- Sander, M., B. Chavoshan, S. A. Harris, S. T. Iannaccone, J. T. Stull, G. D. Thomas, and R. G. Victor. 2000.** Functional muscle ischemia in neuronal nitric oxide synthase-deficient skeletal muscle of children with Duchenne muscular dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97:13818-13823.

Schatzberg, S. J., L. V. Anderson, S. D. Wilton, J. N. Kornegay, C. J. Mann, G. G. Solomon, and N. J. Sharp. 1998. Alternative dystrophin gene transcripts in golden retriever muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 21:991-998.

Schatzberg, S. J., N. J. Olby, M. Breen, L. V. Anderson, C. F. Langford, H. F. Dickens, S. D. Wilton, C. J. Zeiss, M. M. Binns, J. N. Kornegay, G. E. Morris, and N. J. Sharp. 1999. Molecular analysis of a spontaneous dystrophin 'knockout' dog. *Neuromuscul. Disord.* 9:289-295.

Schutte, L. M., U. Narayanan, J. L. Stout, P. Selber, J. R. Gage, and M. H. Schwartz. 2000. An index for quantifying deviations from normal gait. *Gait. Posture.* 11:25-31.

Sharma, G. D. 2009. Pulmonary function testing in neuromuscular disorders. *Pediatrics* 123 Suppl 4:S219-S221.

Sharma, K. R., M. A. Mynhier, and R. G. Miller. 1993. Cyclosporine increases muscular force generation in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 43:527-532.

Sharma, K. R., M. A. Mynhier, and R. G. Miller. 1995. Muscular fatigue in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 45:306-310.

Sharp, N. J., J. N. Kornegay, S. D. Van Camp, M. H. Herbstreith, S. L. Secore, S. Kettle, W. Y. Hung, C. D. Constantinou, M. J. Dykstra, A. D. Roses, and . 1992. An error in dystrophin mRNA processing in golden retriever muscular dystrophy, an animal homologue of Duchenne muscular dystrophy. *Genomics* 13:115-121.

Shimatsu, Y., K. Katagiri, T. Furuta, M. Nakura, Y. Tanioka, K. Yuasa, M. Tomohiro, J. N. Kornegay, I. Nonaka, and S. Takeda. 2003. Canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMDJ). *Exp. Anim* 52:93-97.

Shimatsu, Y., M. Yoshimura, K. Yuasa, N. Urasawa, M. Tomohiro, M. Nakura, M. Tanigawa, A. Nakamura, and S. Takeda. 2005. Major clinical and histopathological characteristics of canine X-linked muscular dystrophy in Japan, CXMDJ. *Acta Myol.* 24:145-154.

Shin, R. H., T. Vathana, G. A. Giessler, P. F. Friedrich, A. T. Bishop, and A. Y. Shin. 2008. Isometric tetanic force measurement method of the tibialis anterior in the rat. *Microsurgery* 28:452-457.

Sicinski, P., Y. Geng, A. S. Ryder-Cook, E. A. Barnard, M. G. Darlison, and P. J. Barnard. 1989. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science* 244:1578-1580.

Simon, S. R. 2004. Quantification of human motion: gait analysis-benefits and limitations to its application to clinical problems. *J. Biomech.* 37:1869-1880.

Smith, B. F., Y. Yue, P. R. Woods, J. N. Kornegay, J. H. Shin, R. R. Williams, and D. Duan. 2010. An intronic LINE-1 element insertion in the dystrophin gene aborts dystrophin expression and results in Duchenne-like muscular dystrophy in the corgi breed. *Lab Invest.*

Spencer, M. J. and J. G. Tidball. 2001. Do immune cells promote the pathology of dystrophin-deficient myopathies? *Neuromuscul. Disord.* 11:556-564.

Spurney, C. F., H. Gordish-Dressman, A. D. Guerron, A. Sali, G. S. Pandey, R. Rawat, J. H. Van Der Meulen, H. J. Cha, E. E. Pistilli, T. A. Partridge, E. P. Hoffman, and K. Nagaraju. 2009. Preclinical drug trials in the mdx mouse: assessment of reliable and sensitive outcome measures. *Muscle Nerve* 39:591-602.

St-Pierre, S. J., J. V. Chakkalakal, S. M. Kolodziejczyk, J. C. Knudson, B. J. Jasmin, and L. A. Megeney. 2004. Glucocorticoid treatment alleviates dystrophic myofiber pathology by activation of the calcineurin/NF-AT pathway. *FASEB J.* 18:1937-1939.

Stedman, H. H., H. L. Sweeney, J. B. Shrager, H. C. Maguire, R. A. Panettieri, B. Petrof, M. Narusawa, J. M. Leferovich, J. T. Sladky, and A. M. Kelly. 1991. The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 352:536-539.

Strathy, G. M., E. Y. Chao, and R. K. Laughman. 1983. Changes in knee function associated with treadmill ambulation. *J. Biomech.* 16:517-522.

Stupka, N., P. Gregorevic, D. R. Plant, and G. S. Lynch. 2004. The calcineurin signal transduction pathway is essential for successful muscle regeneration in mdx dystrophic mice. *Acta Neuropathol.* 107:299-310.

Sutherland, D. H., R. Olshen, L. Cooper, M. Wyatt, J. Leach, S. Mubarak, and P. Schultz. 1981. The pathomechanics of gait in Duchenne muscular dystrophy. *Dev. Med. Child Neurol.* 23:3-22.

Thibaud, J. L., A. Monnet, D. Bertoldi, I. Barthelemy, S. Blot, and P. G. Carlier. 2007. Characterization of dystrophic muscle in golden retriever muscular dystrophy dogs by nuclear magnetic resonance imaging. *Neuromuscul. Disord.* 17:575-584.

Toledo, N. S., S. K. Kodaira, P. C. Massarollo, O. I. Pereira, and S. Mies. 2003. Right hemidiaphragmatic mobility: assessment with US measurement of craniocaudal displacement of left branches of portal vein. *Radiology* 228:389-394.

Toniolo, L., L. Maccatrozzo, M. Patrino, E. Pavan, F. Caliaro, R. Rossi, C. Rinaldi, M. Canepari, C. Reggiani, and F. Mascarello. 2007. Fiber types in canine muscles: myosin isoform expression and functional characterization. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 292:C1915-C1926.

Torrente, Y., M. Belicchi, C. Marchesi, G. Dantona, F. Cogiamanian, F. Pisati, M. Gavina, R. Giordano, R. Tonlorenzi, G. Fagiolari, C. Lamperti, L. Porretti, R. Lopa, M. Sampaolesi, L. Vicentini, N. Grimoldi, F. Tiberio, V. Songa, P. Baratta, A. Prella, L. Forzenigo, M. Guglieri, O. Pansarasa, C. Rinaldi, V. Mouly, G. S. Butler-Browne, G. P. Comi, P. Biondetti, M. Moggio, S. M. Gaini, N. Stocchetti, A. Priori, M. G. D'Angelo, A. Turconi, R. Bottinelli, G. Cossu, P. Rebullia, and N. Bresolin. 2007. Autologous transplantation of muscle-derived CD133+ stem cells in Duchenne muscle patients. *Cell Transplant.* 16:563-577.

Torres, L. F. and L. W. Duchon. 1987. The mutant mdx: inherited myopathy in the mouse. Morphological studies of nerves, muscles and end-plates. *Brain* 110 (Pt 2):269-299.

Turgeman, T., Y. Hagai, K. Huebner, D. S. Jassal, J. E. Anderson, O. Genin, A. Nagler, O. Halevy, and M. Pines. 2008. Prevention of muscle fibrosis and improvement in muscle performance in the mdx mouse by halofuginone. *Neuromuscul. Disord.* 18:857-868.

Valentine, B. A. and B. J. Cooper. 1991. Canine X-linked muscular dystrophy: selective involvement of muscles in neonatal dogs. *Neuromuscul. Disord.* 1:31-38.

Valentine, B. A., B. J. Cooper, J. F. Cummings, and L. A. de. 1990. Canine X-linked muscular dystrophy: morphologic lesions. *J. Neurol. Sci.* 97:1-23.

Valentine, B. A., B. J. Cooper, L. A. de, R. O'Quinn, and J. T. Blue. 1988. Canine X-linked muscular dystrophy. An animal model of Duchenne muscular dystrophy: clinical studies. *J. Neurol. Sci.* 88:69-81.

van Bockel, E. A., J. S. Lind, J. G. Zijlstra, P. J. Wijkstra, P. M. Meijer, M. P. van den Berg, R. H. Slart, L. P. Aarts, and J. E. Tulleken. 2009. Cardiac assessment of patients with late stage Duchenne muscular dystrophy. *Neth. Heart J.* 17:232-237.

van Deutekom, J. C., A. A. Janson, I. B. Ginjaar, W. S. Frankhuizen, A. artsma-Rus, M. Bremmer-Bout, J. T. den Dunnen, K. Koop, A. J. van der Kooi, N. M. Goemans, S. J. de Kimpe, P. F. Ekhart, E. H. Venneker, G. J. Platenburg, J. J. Verschuuren, and G. J. Van Ommen. 2007. Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *N. Engl. J. Med.* 357:2677-2686.

Van Ham, L. M. L., M. Desmidt, M. Tshamala, J. K. Hoorens, and D. R. G. Mattheeuws. 1993. Canine X-linked Muscular Dystrophy in Belgian Groenendaeler Shepherds. *J. Am. Anim Hosp. Assoc.* 29:570-574.

Van Ham, L. M. L., S. L. M. F. Roels, and J. K. Hoorens. 1995. Congenital Dystrophy-like Myopathy in a Brittany Spaniel Puppy. *Progress in Veterinary Neurology* 6:135-138.

Vandebrouck, C., N. Imbert, G. Duport, C. Cognard, and G. Raymond. 1999. The effect of methylprednisolone on intracellular calcium of normal and dystrophic human skeletal muscle cells. *Neurosci. Lett.* 269:110-114.

Vuillerot, C., F. Girardot, C. Payan, J. Fermanian, J. Iwaz, C. De Lattre, and C. Berard. 2010. Monitoring changes and predicting loss of ambulation in Duchenne muscular dystrophy with the Motor Function Measure. *Dev. Med. Child Neurol.* 52:60-65.

Walmsley, G. L., V. rechavala-Gomez, M. Fernandez-Fuente, M. M. Burke, N. Nagel, A. Holder, R. Stanley, K. Chandler, S. L. Marks, F. Muntoni, G. D. Shelton, and R. J. Piercy. 2010. A duchenne muscular dystrophy gene hot spot mutation in dystrophin-deficient cavalier king charles spaniels is amenable to exon 51 skipping. *PLoS. One.* 5:e8647.

Walter, R. M. and D. R. Carrier. 2007. Ground forces applied by galloping dogs. *J. Exp. Biol.* 210:208-216.

Wang, Z., C. S. Kuhr, J. M. Allen, M. Blankinship, P. Gregorevic, J. S. Chamberlain, S. J. Tapscott, and R. Storb. 2007. Sustained AAV-mediated dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy with a brief course of immunosuppression. *Mol. Ther.* 15:1160-1166.

- Watt, J. R., J. R. Franz, K. Jackson, J. Dicharry, P. O. Riley, and D. C. Kerrigan. 2010.** A three-dimensional kinematic and kinetic comparison of overground and treadmill walking in healthy elderly subjects. *Clin. Biomech. (Bristol. , Avon.)* 25:444-449.
- Waxman, A. S., D. A. Robinson, R. B. Evans, D. A. Hulse, J. F. Innes, and M. G. Conzemius. 2008.** Relationship between objective and subjective assessment of limb function in normal dogs with an experimentally induced lameness. *Vet. Surg.* 37:241-246.
- Webster, C., L. Silberstein, A. P. Hays, and H. M. Blau. 1988.** Fast muscle fibers are preferentially affected in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 52:503-513.
- Wentink, G. H., J. S. Van Der Linde-Sipman, A. E. F. H. Meijer, H. A. C. Kamphuisen, C. J. A. H. V. Van Vorstenbosch, W. Hartman, and H. J. Hendricks. 1972.** Myopathy with a Possible Recessive X-linked Inheritance in a Litter of Irish Terriers. *Vet. Pathol.* 9:328-349.
- Wetterman, C. A., K. R. Harkin, W. C. Cash, J. C. Nietfield, and G. D. Shelton. 2000.** Hypertrophic Muscular Dystrophy in a Young Dog. *JAVMA* 216:878-881.
- Wilcox, P. G. and R. L. Pardy. 1989.** Diaphragmatic weakness and paralysis. *Lung* 167:323-341.
- Willmann, R., S. Possekel, J. Dubach-Powell, T. Meier, and M. A. Ruegg. 2009.** Mammalian animal models for Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* 19:241-249.
- Winand, N. J., M. Edwards, D. Pradhan, C. A. Berian, and B. J. Cooper. 1994.** Deletion of the dystrophin muscle promoter in feline muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* 4:433-445.
- Wong, B. L. and C. Christopher. 2002.** Corticosteroids in Duchenne muscular dystrophy: a reappraisal. *J. Child Neurol.* 17:183-190.
- Wood, D. S., M. M. Sorenson, A. B. Eastwood, W. E. Charash, and J. P. Reuben. 1978.** Duchenne dystrophy: abnormal generation of tension and Ca⁺⁺ regulation in single skinned fibers. *Neurology* 28:447-457.
- Yamada, M. and M. Tokuriki. 2000.** Spontaneous activities measured continuously by an accelerometer in beagle dogs housed in a cage. *J. Vet. Med. Sci.* 62:443-447.
- Yiu, E. M. and A. J. Kornberg. 2008.** Duchenne muscular dystrophy. *Neurol. India* 56:236-247.
- Yokota, T., Q. L. Lu, T. Partridge, M. Kobayashi, A. Nakamura, S. Takeda, and E. Hoffman. 2009.** Efficacy of systemic morpholino exon-skipping in Duchenne dystrophy dogs. *Ann. Neurol.* 65:667-676.
- Yuasa, K., A. Nakamura, T. Hijikata, and S. Takeda. 2008.** Dystrophin deficiency in canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMDJ) alters myosin heavy chain expression profiles in the diaphragm more markedly than in the tibialis cranialis muscle. *BMC. Musculoskelet. Disord.* 9:1.

Zubrzycka-Gaarn, E. E., D. E. Bulman, G. Karpati, A. H. Burghes, B. Belfall, H. J. Klamut, J. Talbot, R. S. Hodges, P. N. Ray, and R. G. Worton. 1988. The Duchenne muscular dystrophy gene product is localized in sarcolemma of human skeletal muscle. *Nature* 333:466-469.

Publications – Congrès

Functional evaluation of dystrophic dogs treated by exon-skipping

Barthélémy I., Thibaud J-L., Vulin A., Bertoldi D., Goyenvallé A., Lorain S., Dreyfus P., Carlier P., Garcia L., Blot S. *Neuromuscular Disorders* 2007 Vol 17, 9-10, p 898. Abstract. Présentation orale (Stéphane Blot), congrès de la World Muscle Society 2007.

DMD is an X-linked recessive disorder due to mutations in the dystrophin gene, most of them being large deletions leading to out of frame transcripts. About 80% of the out-of-frame mutations could theoretically be rescued after restoring the translational frame by using exon skipping strategies. The GRMD dog, a large model of DMD, presents a punctual mutation in the acceptor splice site of the dystrophin gene's intron 6, leading to the out of frame elimination of exon 7. We had already proven the dramatic efficacy of the AAV2/1 U7smOPT ESE6 & ESE8 to induce the skipping of exons 6, 7 and 8 allowing production of an in-frame mRNA, to transduce myofibers and to restore at their level expression of a quasi-dystrophin. Functionality of quasi-dystrophin had been demonstrated at the histological scale by restoring the dystrophin associated protein complex, and stopping spontaneous muscle damages. To assess muscle function improvement, we have injected intramuscularly two GRMD dogs at the age of 3 weeks in the whole hind limbs anterior compartment with a total dose of $3,5 \cdot 10^{12}$ vg. After two months, normal levels of quasi-dystrophin were recovered throughout the treated muscles. NMR imaging of both hindlimbs was performed at 3T before and after intravenous bolus of Gadolinium-DTPA. Maximal relative enhancement, a parameter we have found to be significantly lower in healthy than in GRMD dogs, was shown to be lower in treated limbs. Functional recovery was assessed by measuring the tetanic force of treated vs untreated muscles after maximal stimulation of the common peroneal nerve. Since tetanic force values were identical for both legs in healthy and control GRMD dogs, they were improved by a factor of 1,6 and 1,4 in treated compared to contralateral untreated legs. Our results point up muscle function recovery after multi exon skipping gene therapy in a large size animal model that recapitulates the main phenotypic features of DMD. These data give all its sense to our strategy and are milestones in perspectives of generalization of the administration.

Assessment of gait quality in dystrophin-deficient dogs using accelerometry

Ines Barthélémy, Eric Barrey, Jean-Laurent Thibaud, Ane Uriarte, Stéphane Blot, Jean-Yves Hogrel. Abstract

Poster, congrès Myology 2008.

Dystrophin-deficient dogs (GRMD, LRMD) exhibit similar pathophysiological and clinical features as Duchenne patients and represent therefore the best animal model to evaluate a therapeutic benefit. Emerging systemic approaches and the associate necessity to assess their clinical efficiency have led us to develop a quantitative, discriminating and non-invasive method to analyse locomotion. Accelerometry, a gait analysis technique based on 3D recording of accelerations, seems to be easy to perform in dogs and a source of several quantified parameters.

In order to test this method, 11 dystrophin-deficient and 5 healthy adult dogs were encouraged to walk or trot along a 20 metres corridor, as spontaneously as possible. Three axial accelerations were recorded close to the center of gravity, the accelerometer being placed under the sternum, using a light elastic belt tightened around the thorax (Equimetrix device ®). Recorded data were then analysed using specific gait analysis software on ten seconds-samples of steady state locomotion.

The accelerometer device was well tolerated by the dogs. The trot was spontaneously adopted by healthy, and by less affected dystrophic dogs, whereas gait of severely affected animals was restricted to walk. The mean regularity of dorso-ventral accelerations was found to be significantly higher in healthy than in trotting dystrophic dogs. Total mechanical power of gait (W/kg) was also observed to be significantly decreased in dystrophic dogs. Interestingly, the medio-lateral component of the power was significantly increased in dystrophic dogs, demonstrating a swaying component in the gait of these dogs.

These preliminary results show that accelerometry is a simple and non-invasive method of functional evaluation of dog's gait and is efficient to quantitatively discriminate dystrophic from healthy dogs, using specific signal processing methods. Longitudinal studies are ongoing in order to describe gait evolutions of healthy versus dystrophic dogs at various ages, with various phenotypes and after treatment.

Accelerometry, a new tool to assess gait quality of dystrophin-deficient dogs

Inès Barthélémy, Eric Barrey, Jean-Laurent Thibaud, Ane Uriarte, Stéphane Blot, Jean-Yves Hogrel. *Neuromuscular disorders*, 2008, Vol 18, 9-10, p 785, Abstract
Poster, congrès de la World Muscle Society, 2008.

Dystrophin-deficient dogs, as canine replicas of DMD patients, represent the choice model to evaluate systemic therapeutic strategies. In this context, the development of a quantitative, discriminating and non-invasive method of gait quality assessment is essential. Accelerometry, a technique based on 3D recording of accelerations, is the method we have chosen to develop, because it seems to be easy to perform in dogs and a source of several quantified parameters.

In this aim, dystrophic and healthy dogs were encouraged to walk as spontaneously as possible along a 20 metres corridor, and timed over 5 metres. Three axial accelerations were recorded close to the center of gravity, the accelerometer being placed under the sternum, using a light elastic belt tightened around the thorax (Equimetrix device ®). Recorded data were analysed using specific gait analysis software on ten seconds-samples of steady state locomotion.

Eleven dystrophic and 7 healthy adult dogs were used to validate parameters able to discriminate these two groups. The mean regularity of dorso-ventral accelerations was found to be significantly higher in healthy than in dystrophic dogs. The frequency and length of strides were considerably reduced in dystrophic dogs, as well as the total mechanical power of gait (W/kg). Interestingly, the medio-lateral component of the power was significantly increased in dystrophic animals, demonstrating a swaying component in the gait of these dogs.

Longitudinal studies in puppies show that the total power of gait is early reduced at 2 months of age in dystrophic animals, whereas the increase of the medio-lateral component of the power and the decrease of regularity progressively occur with age.

These results validate accelerometry as a useful tool of functional evaluation of dystrophic dogs, since it is simple, non-invasive and efficient to quantitatively discriminate them from healthy dogs. Moreover, they provide reference data on healthy and untreated dystrophic dogs at different ages, representing comparison points for dogs receiving systemic treatments.

Immunosuppressive regimen fails to improve dystrophic phenotype and impairs muscle function in the dog model of Duchenne muscular Dystrophy

Barthélémy I., Uriarte A., Thibaud JL, Blot S. *Neuromuscular disorders* 2008, Vol 18, 9-10, p784.

Poster, congrès de la World Muscle Society 2008.

Many therapeutic strategies for DMD tested in dogs suffering from Golden Retriever muscular dystrophy require immune response modulation. Cyclosporin and corticosteroids are known to improve dystrophic phenotype at anti-inflammatory dosages. However, the effects of this association at immunosuppressive levels must be characterized in GRMD dogs.

In this aim, 5 GRMD dogs underwent CsA (20 mg/kg/d) and Prednisone (2 mg/kg/d) treatment starting at 2 up to 9 months of age. The consequences of the treatment on the dystrophic phenotype were assessed by clinical scoring and muscle biopsies. Effects on muscular function were examined using force measurements at 4, 6 and 9 months.

Many side effects were observed, including growth retardation, overweight, extended papilloma, ectopic calcifications notably in the lungs, and luxations impairing locomotion. No evident influence of treatment on the clinical dystrophic phenotype was observed. Indeed, the clinical scoring evolution appeared heterogeneous, and superimposable to the range of scores of untreated GRMD dogs. Moreover, the treatment did not prevent hiatal hernias, a frequent consequence of diaphragmatic damages. The histological phenotype was not clearly improved, and intracellular calcifications were predominant. Force measurements showed that tetanic contraction force of the anterior compartment of the leg was decreased in comparison to untreated GRMD dogs. Moreover, the force decreased over time whereas it remained stable in untreated GRMD dogs, and increased in healthy dogs. This could be due to reversion of the type I predominance in treated dogs muscles, since the absence of dystrophin is known to impair type II more than type I fibers function. A muscle growth inhibition, due to calcineurin pathway blockade and corticosteroids could also be responsible for this loss of force.

This study highlights deleterious repercussions of the association of CsA+Prednisone at immunosuppressive levels on GRMD dogs. These data are a keystone for the analysis of results in therapeutic trials. Thus, a force improvement can be interpreted with certainty as a gain of function due to the specific treatment, and not to the immunosuppressive regimen.

Evaluation des biothérapies chez les modèles canins de DMD : développement et validation d'outils

Inès Barthélémy, Eric Barrey, Jean-Laurent Thibaud, Jean-Yves Hogrel, Stéphane Blot

Présentation orale, journée de l'Institut Mondor de Recherche Biomédicale, 2009.

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une myopathie grave et invalidante, qui touche l'ensemble de la musculature striée squelettique. Liée au chromosome X, et due à une absence de la protéine dystrophine en position sub-sarcolemmale des fibres musculaires, cette maladie touche 1 garçon sur 3500. A ce jour, aucun traitement n'est encore disponible, même si de nombreuses stratégies de thérapie génique, cellulaire ou pharmacologique approchent ou en sont au stade de l'essai clinique.

Si découvrir une stratégie thérapeutique pour la DMD constitue un défi, de par la taille colossale de la protéine à restaurer, et de par l'étendue du tissu cible, l'existence d'un modèle canin pertinent constitue un atout précieux dans cette recherche. En effet, outre une taille proche de celle d'un jeune garçon, le chien dystrophique, comme le patient, présente une mutation dans le gène de la dystrophine, un processus dystrophique affectant ses muscles striés, une locomotion précocement altérée, une insuffisance respiratoire puis cardiaque, et de graves complications de la maladie. Ces similitudes frappantes sont à l'origine de la place prépondérante occupée par ce modèle dans les essais pré-cliniques.

Cependant, ces nombreuses altérations fonctionnelles nécessitent d'être évaluées, afin d'objectiver d'éventuelles améliorations suite à l'administration d'un traitement. A ce jour pourtant, peu de méthodes d'évaluation de ces animaux ont été validées. C'est pourquoi nous travaillons au développement d'outils d'évaluation des différentes fonctions touchées. Ce développement et notamment le choix de ces outils fait appel à des exigences que nous nous sommes fixées. Les outils choisis doivent avoir une pertinence clinique, et permettre ainsi une meilleure extrapolation au patient. Par ailleurs, ils doivent pouvoir être aisément appliqués par d'autres équipes, ceci afin de rendre comparables les différents résultats obtenus. Enfin, ils doivent fournir des informations quantitatives, et objectives. La validation de ces outils passe d'un point de vue méthodologique par la démonstration d'une différence significative entre animaux malades et sains, puis par des études longitudinales visant à décrire l'évolution des variables mesurées avec la progression de la maladie. Nous présentons ici les différents outils développés et validés à ce jour ainsi que les obstacles rencontrés.

La fonction première d'un muscle est de générer de la force, et c'est donc logiquement la première fonction supposée altérée dans le contexte d'une dystrophie musculaire. Nous avons donc développé un outil d'enregistrement de force musculaire pour chiens, que nous employons pour le membre postérieur et plus précisément pour les muscles de la jambe. L'intérêt de cet outil est son utilisation potentielle dans la validation de stratégies administrées de manière systémique, comme localement, et dans ce cadre nous avons pu démontrer la fonctionnalité du saut d'exon thérapeutique à l'échelle d'un muscle. Cependant, réduire un bénéfice à la seule force musculaire est réducteur et nous le montrerons au travers des résultats d'une étude que nous avons menée sur l'effet d'un traitement immunosuppresseur.

La deuxième fonction que nous avons choisi d'évaluer est la locomotion. L'outil choisi, l'accélérométrie, répond parfaitement à notre cahier des charges, et s'est révélé très efficace pour mettre en évidence et quantifier des caractéristiques de la démarche spontanée de ces animaux : peu puissante, elle est faite de petits pas, à faible cadence, et balancée médio-latéralement. L'accélérométrie représente le premier outil développé pour évaluer la démarche du chien dystrophique, et il s'agit également de la première utilisation de l'accélérométrie chez le chien comme outil d'analyse de la locomotion.

Enfin, des outils d'évaluation de la fonction respiratoire sont en cours de validation. Il s'agit de l'évaluation de la distance parcourue par le diaphragme au cours d'un cycle respiratoire à l'aide d'un outil radioscopique d'une part, et de la spirométrie d'autre part.

Un dernier paramètre, extrêmement simple à mesurer, et très discriminant, est le poids normalisé par la hauteur au garrot. Cet indice est très diminué chez le chien dystrophique, et reflète de manière quantitative l'amyotrophie, et la maigreur de ces animaux, conséquence des troubles digestifs.

L'ensemble de ces outils permettra d'évaluer, de manière objective et multi-paramétrique, le bénéfice apporté par les stratégies thérapeutiques testées chez ces animaux et renforcera la valeur clinique de ce modèle pré-clinique.

Article 1, publié dans Neuromuscular Disorders en Novembre 2009, intitulé « Gait analysis using accelerometry in dystrophin-deficient dogs »

Auteurs : Inès Barthélémy, Eric Barrey, Jean-Laurent Thibaud, Ane Uriarte, Thomas Voit, Stéphane Blot, Jean-Yves Hogrel.

Article 2, soumis à BMC Musculoskeletal disorders en octobre 2010, intitulé « Longitudinal ambulatory measurements of gait abnormality in dystrophin-deficient dogs »

Auteurs : Inès Barthélémy, Eric Barrey, Pablo Aguilar, Ane Uriarte, Matthias Le Chevoir, Jean-Laurent Thibaud, Thomas Voit, Stéphane Blot, Jean-Yves Hogrel.