



HAL
open science

Subphénotypes de la maladie de Duchenne et caractérisation de la myofibrose dystrophique humaine et expérimentale

Isabelle Desguerre

► **To cite this version:**

Isabelle Desguerre. Subphénotypes de la maladie de Duchenne et caractérisation de la myofibrose dystrophique humaine et expérimentale. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Est, 2008. Français. NNT : 2008PEST0036 . tel-02069345v1

HAL Id: tel-02069345

<https://theses.hal.science/tel-02069345v1>

Submitted on 15 Mar 2019 (v1), last revised 15 Mar 2019 (v2)

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.

UNIVERSITÉ DE PARIS XII - PARIS EST

THESE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR de L'UNIVERSITE PARIS XII

SPÉCIALITÉ: NEUROSCIENCES

**SUBPHÉNOTYPES DE LA MALADIE DE DUCHENNE
ET CARACTÉRISATION DE LA MYOFIBROSE
DYSTROPHIQUE
HUMAINE ET EXPÉRIMENTALE**

Présentée et soutenue publiquement le 21 Novembre 2008

Isabelle Desguerre

Jury

Pr. Denis Duboc, président

Pr. François Rivier, rapporteur

Dr. Gillian Buttler Browne, rapporteur

Pr. Jamel Chelly, examinateur

Pr. Romain Gherardi, directeur de Thèse

Je remercie

Romain Gherardi qui a accepté la lourde tâche de m'initier aux joies de la recherche et d'être mon directeur de thèse

Bénédicte Chazaud dont la rigueur scientifique et l'humour m'ont été d'un grand soutien

Christo Christov pour son initiation aux joies de la statistique et des clusters hiérarchiques en tout genre

Jamel Chelly et France Leturcq pour leur collaboration de longue date et leurs conseils permanents

Ludovic Arnold pour sa patience et sa collaboration dans mon initiation aux manip

Françoise Poron pour son soutien technique et sa gentillesse

Tous les membres de l'équipe 10 qui ont su accueillir une pédiatre dans le monde de la recherche en myologie.....

Olivier Dulac qui m'a encouragé à prendre le chemin escarpé de la thèse de science

Michelle Mayer qui m' a fait découvrir les maladies neuromusculaires et pour notre précieuse collaboration durant 15 ans

Tous mes collègues neuropédiatres et myologues qui m'ont encouragé dans ce choix

Denis Duboc d'avoir accepté de présider ma thèse

François Rivier pour ces conseils avisés et d'avoir accepté d'être mon rapporteur

Gillian Buttler Browne pour ses encouragements et d'avoir accepté d'être mon rapporteur

Benoit, Félix, Philomène et Léopold pour leur soutien moral et technique indéfectible

... *on apprend au milieu des fléaux qu'il y a dans les hommes plus de choses à admirer que de choses à mépriser .Albert Camus La peste*

ACRONYMES ET SIGLES

CK: Créatine Kinase
DMD: Dystrophie Musculaire de Duchenne
MF: Moyen Fessier
GF: Grand Fessier
TFL: Tenseur du Fascia Lata
MMT: Manual Muscle Testing, score manuel de force musculaire
CV: Capacité Vitale
FEVG: Fraction d'éjection du Ventricule Gauche
EFR: Epreuves Fonctionnelles Respiratoires
VR: Volume Résiduel
VNI: Ventilation Non Invasive
IEC: Inhibiteur de l' Enzyme de Conversion
kDa: kilo Dalton
Dp: Dystrophin product
PCR: Polymerase Chain Reaction
ERG: Electrorétinogramme
GABA: Gamma Amino Butyrique Acide
BHE: Barrière Hématoencéphalique
AQP4: Aquaporine 4
ZO1: Zona Ocludens 1
DAP: Dystrophin Associated Protéins
GFAP: Glial Factor Activated Protein
VEGF: Vascular Epidermal Growth Factor,
VEGFR2: Vascular Epidermal Growth Factor Receptor 2
PET: Positron Emission Tensitometry
Pi/ATP: Phosphore inorganique/Adenosine TriPhosphate
Pi/PME: Phosphore inorganique/PhosphoMyoInositol
Pi/PCr: Phosphore inorganique/PhosphoCreatine
NOS: Nitric Oxygen Synthase
GRMD: Golden Retriever Muscular Dystrophy
ECM: Extra Cellular Matrix
 α -SMA: α Smooth Muscular Actin
CAM: molécules d'adhésion cellulaires
MMP: Métalloprotéases matricielles
TGF β : Transforming Growth Factor β
VCAM: Vascular Cell Adhesion Molecule
PDGF: Platelet Derived Growth Factor
INF- γ : Interféron gamma
CTGF: Connective Transforming Growth Factor
LAP: Latency Associated Protein
ILK: Integrin Linked Kinase
DMC: Dystrophie Musculaire Congénitale
TIMPs: Tissue Inhibitors of MetalloProteinases,
MBP 1: Major Basic Protein

1. Myopathie de Duchenne, rappels cliniques

1 - 1/11

1.1.	Introduction	1 - 1/11
1.2.	Rappel historique	1 - 1/11
1.3.	Les grandes séries évolutives	1 - 2/11
1.4.	Évolution motrice et orthopédique	1 - 5/11
1.4.1.	<i>Marche et fonction motrice</i>	
1.4.2.	<i>Testing musculaire et score</i>	
1.4.3.	<i>Prise en charge</i>	
1.5.	Évolution respiratoire	1 - 7/11
1.5.1.	<i>L'atteinte respiratoire</i>	
1.5.2.	<i>Surveillance et prise en charge</i>	
1.6.	Évolution cardiaque	1 - 8/11
1.6.1.	<i>Atteinte cardiaque</i>	
1.6.2.	<i>Le traitement</i>	
1.7.	État nutritionnel	1 - 9/11
1.8.	Prise en charge multidisciplinaire	1 - 10/11
1.9.	Essais thérapeutiques	1 - 10/11
1.9.1.	<i>Corticoïdes</i>	
1.9.2.	<i>Pharmacologiques autres</i>	
2.	Le gène de la dystrophine	2 - 1/15
2.1.	Le gène et ses transcrits	2 - 1/15
2.2.	Mutations dans le gène de la dystrophine	2 - 4/15
2.2.1.	<i>Principaux types de mutation</i>	
2.2.2.	<i>Corrélations génotypes-phénotypes</i>	
2.2.3.	<i>Saut d'exon</i>	
2.2.4.	<i>Formes particulières</i>	
2.2.5.	<i>Thérapie génique</i>	
2.3.	Atteinte cognitive chez les DMD et la génétique	2 - 8/15
2.3.1.	<i>Description des atteintes cognitives</i>	
2.3.2.	<i>Mécanismes de l'atteinte cognitive chez l'homme et la souris MDX</i>	
2.3.3.	<i>Études neuroradiologiques</i>	
2.3.4.	<i>Conclusion</i>	
2.4.	Essai de thérapie génique	2 - 14/15
2.4.1.	<i>Codon stop</i>	
2.4.2.	<i>Saut d'exon</i>	
3.	Atteinte musculaire des patients DMD sur le plan histologique	3 - 1/20
3.1.	Données de la littérature	3 - 1/20

- 3.1.1. *Introduction*
- 3.1.2. *Les fibres nécrotiques*
- 3.1.3. *La prédominance de fibre de type 1*
- 3.1.4. *Les fibres hypercontractées*
- 3.1.5. *Les cellules de l'inflammation*
- 3.1.6. *Les cellules satellites*
- 3.1.7. *Les vaisseaux*
- 3.2. La fibrose musculaire** **3 - 5/20**
- 3.2.1. *La fibrose endomysiale et périmysiale*
- 3.2.2. *Les protéines de la matrice extracellulaire*
- 3.2.3. *Les mécanismes de la fibrose en général*
- 3.2.4. *La fibrose dans le muscle normal et dystrophique*
- 3.2.5. *Le collagène dans le muscle*
- 3.2.6. *Les cytokines profibrosantes dans le muscle*
- 3.2.7. *Les glycanes dans la fibrose musculaire*
- 3.2.8. *Les métalloprotéases*
- 3.2.9. *Les partenaires cellulaires de la fibrose*
 - 3.2.9.1. Les cellules satellites et le cercle vicieux de la fibrose
 - 3.2.9.2. Les macrophages
 - 3.2.9.3. Les cellules T
 - 3.2.9.4. Les mastocytes
- 3.3. Conclusion** **3 - 19/20**
- 4. Les modèles expérimentaux de dystrophie musculaire de type DMD** **1/19**
- 4.1. **La souris MDX un bon modèle de DMD?** **4 - 1/19**
- 4.1.1. *Analyse histologique et fonctionnelle musculaire de la MDX*
- 4.1.2. *Les capacités de régénération après lésion musculaire*
- 4.1.3. *Expressions des différentes cytokines, collagène et métalloprotéases*
 - 4.1.3.1. Expressions de différents gènes dans le muscle MDX
 - 4.1.3.2. Expression du collagène
 - 4.1.3.3. TGF β
 - 4.1.3.4. Les métalloprotéases
- 4.1.4. *Les régulations proposées chez la souris MDX*
 - 4.1.4.1. Hyperexpression IgGF1
 - 4.1.4.2. Les cellules T et leur déplétion
- 4.2. Les modèles expérimentaux de lésions musculaires** **4 - 8/19**
- 4.2.1. *Introduction*
- 4.2.2. *Les lésions cytotoxiques*
- 4.2.3. *Les lésions mécaniques*
- 4.2.4. *Conclusion: nécessité d'un modèle plus proche de la fibrose musculaire de la DMD*
- 4.3. Propositions thérapeutiques et essais chez la MDX** **4 - 15/19**
- 4.3.1. *Action sur entrée du CA²⁺ dans la cellules et autoxydant*
- 4.3.2. *Action sur les cellules satellites des inhibiteurs de la déacetylase*
- 4.3.3. *Action antiinflammatoire et antifibrosante*
 - 4.3.3.1. Halofuginone
 - 4.3.3.2. Anti TNF α

4.3.3.3. <u>Cyclosporine</u>	
4.3.3.4. <u>Interleukine 15</u>	
4.3.3.5. <u>Les corticoïdes</u>	
4.3.4. <i>Le losartan</i>	
5. Les méthodes d'analyse stéréologiques et statistiques utilisées	5 - 1/8
5.1. Les méthodes stéréologiques	5 - 1/8
5.1.1. <i>Définition</i>	
5.1.2. <i>Les règles internationales de l'ISS</i>	
5.1.3. <i>Les principes de la stéréologie</i>	
5.1.4. <i>Les applications à l'étude des tissus</i>	
5.2. Les méthodes d'analyse statistiques multiparamétriques	5 - 5/8
5.2.1. <i>Les principes</i>	
5.2.2. <i>Les applications en médecine et biologie</i>	
6. Mise en évidence de 4 profils évolutifs de Duchenne par HCA sur une série de 75 patients	6 - 1/32
6.1. Résumé du travail et de l'article	6 - 1/32
6.2. Données supplémentaires	6 - 4/32
6.3. Article soumis	6 - 8/32
7. La fibrose endomysiale précoce est un facteur de mauvais pronostic moteur	7 - 1/31
7.1. Résumé du travail et de l'article	7 - 1/31
7.2. Article soumis	7 - 5/31
8. Mise au point d'un modèle expérimental de fibrose musculaire	8 - 1/21
8.1. Résumé du travail	8 - 1/21
8.2. Article en cours	8 - 4/21
9. Conclusion et projets de développement	9 - 1/3
Bibliographie	Bio - 1/16

Les thérapies dans la myopathie de Duchenne sont un enjeu majeur dans les maladies neuromusculaires de l'enfant. La découverte du gène de la dystrophine, premier gène identifié dans les maladies neuromusculaires, a d'emblée fait envisager différentes voies thérapeutiques: pharmacologie, greffe de myoblastes, thérapie génique, et plus récemment correction génique in situ par saut d'exon ou fuitage de codon stop. En fait, ces différents projets sont limités par une méconnaissance de l'évolution naturelle de la maladie dans ces subtilités où des facteurs épigénétiques et physiologiques interviennent dans l'installation du processus de dystrophie musculaire et de l'atteinte cognitive des patients expliquant la variabilité clinique des patients DMD avec des entités de pronostic différent. Notre travail a eu trois objectifs complémentaires en vue d'essais thérapeutiques futurs.

Tout d'abord, nous avons essayé de définir des endo-phénotypes de patients DMD homogènes à partir d'une cohorte de 75 patients suivis et pris en charge de façon identique sur 15 ans à l'hôpital Saint Vincent de Paul en analysant par différentes méthodes statistiques les variables cliniques, sociologiques et génétiques. L'objectif était d'identifier des facteurs prédictifs précoces permettant une identification des endo-phénotypes suspectés.

Dans un second temps, une analyse spécifique des composants cellulaires et interstitiels des biopsies musculaires initiales de ces patients a été réalisée afin d'identifier des facteurs musculaires prédictifs de gravité et des mécanismes physiologiques conduisant à la fibrose musculaire. La fibrose musculaire en tant que facteur prédictif de gravité et aussi de facteur limitant la diffusion de thérapie génique ou cellulaire nous a paru un partenaire essentiel à considérer. La fibrose et l'angiogénèse musculaire sont deux clés thérapeutiques qui interagissent entre elles dans la DMD.

La troisième partie de mon travail s'est focalisée sur la mise au point d'un modèle de fibrose musculaire endomysiale expérimentale chez la souris *mdx*, modèle murin de DMD. Ce modèle devrait nous permettre de mieux analyser le rôle de la dystrophine et des différents partenaires cellulaires dans la constitution de la fibrose musculaire et d'envisager des thérapies antifibrosantes.

Myopathie de Duchenne, rappels cliniques

1.1 Introduction

La myopathie de Duchenne est à ce jour la maladie neuromusculaire la plus fréquente chez l'enfant avec une évolution inexorable, progressive conduisant au décès dans la troisième décennie. L'amélioration de la survie est liée à l'amélioration de la prise en charge orthopédique, au dépistage précoce des complications cardiaques et respiratoires mais aucune thérapeutique curative n'est applicable à ce jour.

La connaissance du gène et de la protéine impliquée, la dystrophine, a permis une amélioration du conseil génétique, un diagnostic prénatal et une meilleure compréhension des mécanismes conduisant à la destruction progressive du muscle. Toutefois, le degré variable d'évolutivité musculaire, d'atteinte cognitive et cardiaque des patients n'est pas totalement expliqué par la génétique moléculaire.

Les mécanismes précoces cellulaires et biochimiques favorisant la fibrose musculaire en lieu et place de la fibre musculaire après des cycles de nécrose régénération ne sont pas tous identifiés, limitant les perspectives thérapeutiques pharmacologiques ou de correction génique.

1.2 Rappel historique

En 1851, Edward Meryon rapporte dans *Lancet*, le cas de 9 garçons issus de trois familles différentes atteints d'une faiblesse musculaire progressive. Il décrit une pseudo hypertrophie musculaire, une marche un peu tardive, des difficultés à se relever du sol à 6 ans. La marche décrite comme dandinante avec un abdomen proéminent et une bascule du bassin est perdue entre 9 et 11 ans. L'atrophie musculaire progressive conduit au décès au plus tard à 16 ans. A l'autopsie d'un des patients, il décrit des rétractions tendineuses et une déformation du rachis; il confirme l'intégrité de la moelle épinière et des nerfs et l'origine musculaire primitive probable de la paralysie avec destruction des fibres musculaires et remplacement par une adipeuse. Il évoque une

origine nutritionnelle carentielle.

En 1868, Duchenne décrit dans les Archives Générales de Médecine une nouvelle forme de maladie musculaire à propos d'une série personnelle de 13 cas de garçons qui développent durant l'enfance une faiblesse musculaire progressive avec un aspect initial pseudo hypertrophique et un décès par insuffisance respiratoire vers 15 ans. Il établit des critères diagnostiques:

- diminution de la force musculaire débutant aux ceintures,
- hyperlordose et marche dandinante,
- pseudohypertrophie des muscles épargnés (mollets),
- perte progressive de la force musculaire,
- diminution de la contraction musculaire aux stimuli électriques à un stade avancé.

Il confirme l'atteinte musculaire primitive en 1868 avec le remplacement des fibres musculaires par du tissu fibreux et graisseux. En 1886, Gowers signale la fréquence des cas familiaux et le mode de transmission maternelle. Il décrit le fameux signe de Gowers qui correspond à la façon de se relever du sol des patients du fait du déficit pelvien. En 1891, Erb dans sa série de dystrophie musculaire signale des patients atteints de myopathie de Duchenne dont certains présentaient une atteinte cognitive.

Durant un siècle, la description reste clinique avec la découverte de l'élévation de la Créatine Kinase sérique, la confirmation de la transmission liée à l'X et la description plus précise des lésions neuropathologiques par Bell [Bell, 1968]. La localisation du gène [Kunkel, 1985], la découverte du gène [Koenig, 1987], de la protéine dystrophine et de sa structure [Hoffman, 1987; Koenig, 1988] et du complexe glycosarcolemmique dont fait partie la dystrophine [Ervasti, 1990] va permettre de comprendre en partie les mécanismes moléculaires et cellulaires à l'origine de cette dystrophie musculaire et d'élaborer des stratégies thérapeutiques.

1.3 Les grandes séries évolutives

Les grandes séries évolutives sont rares et il n'existe pas de suivi longitudinal des patients en dehors des études de Brooke [Brooke, 1989]. Le plus souvent, seul un point de la

maladie est abordé, force musculaire et testing musculaire, scoliose, évolution de la fonction cardiaque ou respiratoire [Emery, 2003].

L'incidence de la dystrophie musculaire de Duchenne est évaluée à 1/3500 naissances mâles au pays de Galles [Emery, 1991]. Ces données sont confortées par celles de la base de Leyden avec une prévalence de 23,7/100000 naissances mâles (1/4213) [Van Essen, 2004]. L'incidence des mutations dans le gène de la dystrophine est de l'ordre de 1/10000. La prévalence du statut de transmettrice de dystrophinopathie (Becker et Duchenne) est estimée à 40/100000 [Norman, 1989].

La description clinique évolutive dans quelques grandes séries confirme les grandes caractéristiques cliniques. Les constantes néonatales sont normales et le développement staturopondéral initial aussi, même si un certain nombre de patients atteints de DMD ont une petite taille dès 2 ans [Eiholzer, 1998]. Les premiers symptômes rapportés par les parents sont le retard psychomoteur, la difficultés à courir et monter les escaliers, les chutes fréquentes [Firth, 1983]. Sur une série de 283 DMD avec un suivi de 2 à 10 ans une hétérogénéité clinique est indiscutable en terme de force musculaire mais aussi de fonction cardiaque et respiratoire [Brooke, 1989]. Globalement, les enfants de la série perdent la marche après 8 ans avec plutôt un plateau entre 3 et 6 ans mais une certaine hétérogénéité évolutive se confirme. Il faut noter que ces études ont été réalisées avant la découverte du gène et de la protéine et que le diagnostic est clinique incluant probablement des patients avec un peu de dystrophine résiduelle et donc de possible formes intermédiaires [Brooke, 1983].

La série de Leyden porte sur 473 DMD nés entre 1961 et 1982. Les patients ont été séparés en 2 groupes, G1 (1961-1974) où le diagnostic est uniquement clinique et G2 (1975-1982) où le diagnostic est génétique. En pratique les données globales diffèrent peu entre les deux groupes, confirmant la sensibilité du diagnostic clinique. Les renseignements ont été obtenus par questionnaire auprès des médecins traitants sans suivi longitudinal et donc assez globaux.

Age de	Moyen (ans)	Écart (ans)
survenue	2,4	0,5-7
acquisition de la marche	1,7	0,8-4,5
du diagnostic	5,3	0-10
confinement au fauteuil	9	6-13
décès	16,8	3,1-21,3

Tableau 1: Principales caractéristiques de la série de Leyden [van Essen, 2004]

Le diagnostic est plus précoce quand l'enfant a un retard psychomoteur global témoignant d'une atteinte cognitive (4,6 ans vs 5,8 ans). Les principaux symptômes conduisant au diagnostic étaient:

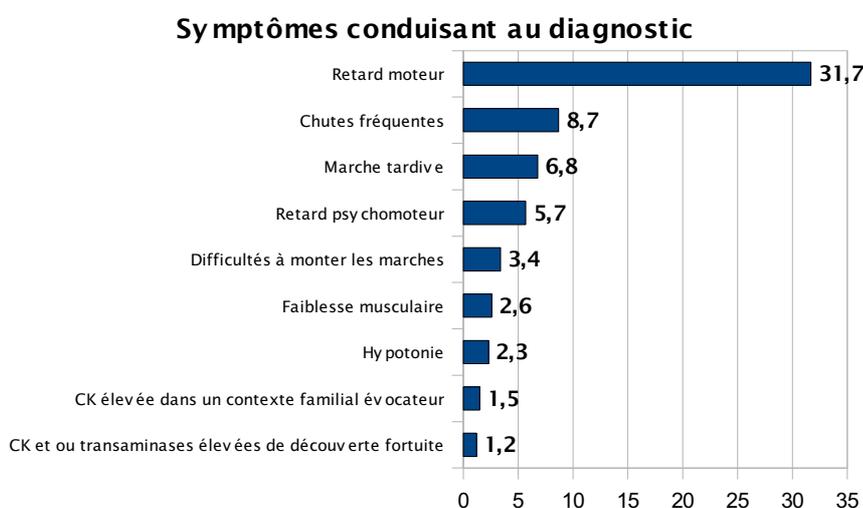


Figure 1: Fréquences des principaux symptômes d'après Van Essen [Van Essen, 2004]

Les 3 principales causes du décès sont cardiaques 30%, insuffisance respiratoire 25% et infection pulmonaire 18,6%.

Cette étude confirme les grandes étapes de la maladie et les grands repères mais n'insiste pas sur l'hétérogénéité des patients car il s'agit d'une observation à un temps donné mais non d'un suivi de long terme régulier.

Nous allons donc aborder chaque point de l'évolution clinique de cette maladie, les mécanismes sous-jacents et les différentes propositions de prise en charge proposées.

1.4 Évolution motrice et orthopédique

1.4.1 Marche et fonction motrice

La marche est acquise le plus souvent dans les limites supérieures de l'âge normal même si ensuite 50% des enfants en général n'ont jamais couru de façon déliée. Entre 3 et 6 ans, la marche est en hyperlordose, dandinante et le signe de Gowers apparaît témoignant du déficit musculaire pelvien. Entre 6 et 11 ans la force musculaire au niveau des ceintures décroît de façon quasi linéaire [Allstop, 1981] avec une atteinte symétrique mais prédominante dans certains muscles conduisant à des déséquilibres et des rétractions tendineuses asymétriques:

- fléchisseurs de nuque < extenseurs de nuque,
- biceps et triceps < deltoïde,
- extenseurs de hanches (Moyen Fessier et Grand Fessier) < fléchisseurs de hanches (TFL),
- quadriceps < ischiojambiers
- tibialis antérieur et péronéen < tibialis postérieur et soleus.

Les muscles de la face et oculo-moteurs sont respectés longtemps en dehors du sternocléidomastoïdien. Les réflexes ostéotendineux disparaissent dans 50% des cas après l'âge de 10 ans. Des rétractions au niveau des fléchisseurs de hanches et tendons d'Achille s'installent parfois avant 6 ans, toujours entre 6 et 11 ans [Brooke, 1983]. La perte de la force musculaire n'est pas corrélée de façon linéaire à la perte de fonction telle que la montée des escaliers avec ou sans aide, la distance de marche, le relevé de la position assise à debout [Brooke, 1983]. Le score de Vignos côté de 1 à 9 montre une perte de ces fonctions en 2-3 ans [Allstop, 1981]. La diminution des muscles abdominaux et paraspinaux conduit à un effondrement en cyphose après 10 ans lors de la perte de la marche puis à une scoliose dorsolombaire. Le score de Brooke teste aussi la fonction des membres supérieurs et atteste d'une hétérogénéité évolutive sur une série de 114 patients DMD. Ce score indicateur de force musculaire globale décroît de 0,4 unité par an avec une échelle de 0 à 10 [Brooke, 1983].

1.4.2 *Testing musculaire et score*

L'utilisation du score manuel de force musculaire (Manual Muscle Testing ou MMT) par différentes équipes pour de futurs essais thérapeutiques a montré sa puissance mais aussi ses

limites. En 1987, Mendell réalise 5000 scores de MMT sur 170 patients DMD âgés de 2 à 23 ans avec un suivi très variable sans homogénéité de prise en charge dans l'objectif d'avoir une base de données [Mendell, 1987]. Sur un score MMT obtenu à partir de 34 muscles, Kilmer, en 1983, retrouve une relation linéaire et une perte de 0.26 unités internationales (UI) MMT par an entre l'âge de 10 et 14 ans sur une série poolée de 63 patients DMD [Kilmer, 1993]. En fait la variabilité évolutive des patients, leur compréhension et collaboration selon l'âge et l'atteinte cognitive ainsi que celle de la technique selon l'examineur a rendu plus prudent sur l'usage de la MMT en vue d'essais thérapeutiques [Mayhew, 2006; Escolar, 2001]. Les auteurs suggèrent l'utilisation de la QMT, mesure quantitative de la force musculaire avec une jauge de contrainte, qui demandent une bonne compréhension et collaboration du patient et un plateau technique plus lourd. Par contre, si le patient est son propre témoin avec un investigateur constant, avec ou sans atteinte cognitive, la MMT est bien corrélée aux autres échelles de fonction telles que la MIF (Motor Infantile Fonction) et prédictive de l'autonomie du patient [Uchikama, 2004].

1.4.3 *Prise en charge*

La prise en charge des rétractions tendineuses des membres inférieurs reste difficile et contestée sur certains points. L'usage d'orthèses de nuit, mollets plantes ou cruropédieuses est préconisée par certaines équipes dès le début de l'enraidissement du tendon d'Achille. Pour d'autres, les orthèses sont uniquement indiquées de jour pour permettre une marche aidée lorsque la force musculaire décroît ou l'usage de série de plâtre réducteurs en cas de rétractions modérées [Main, 2007]. Les ténotomies des membres inférieurs lors de rétractions des tendons d'Achille, des fléchisseurs de hanches ou des tenseurs du fascia lata ne permettent pas de reprendre une marche perdue mais sont proposées par certaines équipes après la perte de marche pour éviter le bassin oblique et permettre de poursuivre une verticalisation passive [Bakker, 2000].

La scoliose est quasi constante. Sur une série de 123 DMD, dont 1/3 étaient sous corticoïdes, 77% des patients avaient une scoliose avec un angle supérieur à 30° à un âge moyen de

12 ans. Seuls 50% d'entre eux ont été arthrodesés et la survenue de la scoliose est corrélée à l'âge de perte de marche [Kinali, 2007]. La prise en charge chirurgicale améliore la durée et la qualité de vie des patients de façon indiscutable ainsi que la fonction respiratoire si elle est réalisée au bon moment avant une déformation orthopédique trop importante et avec une fonction respiratoire (Capacité Vitale (CV)>1litre) et cardiaque encore préservée (Fraction d'Ejection du Ventricule Gauche (FEVG)>50%) [Velasco, 2007; Eagle, 2007]. Notre expérience clinique et les données de la littérature [Bridwell, 1999] s'opposent aux assertions de l'analyse de la base de donnée de Cochrane qui ne retrouve aucune évidence de bénéfice de l'arthrodèse du rachis [Cheuk, 2007].

1.5 Évolution respiratoire

1.5.1 *Atteinte respiratoire*

L'atteinte des muscles respiratoires a été notée très tôt par Duchenne et se confirme dans toutes les séries. Elle est la cause principale du décès en l'absence de prise en charge. L'atteinte des muscles respiratoires ne s'exprime sur le plan clinique que tardivement, après 12 ans en moyenne, alors qu'elle est précoce si on analyse finement la physiologie et la capacité de travail des muscles respiratoires. La capacité résiduelle fonctionnelle est normale jusqu'à 12-14 ans témoignant d'un volume pulmonaire initial normal et d'une croissance pulmonaire préservée. Dès l'âge de 6 ans, la capacité de travail des muscles expiratoires est abaissée alors que les épreuves fonctionnelles respiratoires (EFR) classiques (Capacité Vitale(CV) et Volume résiduel(VR)) sont normales. La capacité de travail des muscles expiratoires est abaissée de 50% alors que la mesure de la CV est normale. L'augmentation du volume résiduel par rapport à la théorique dans un second temps témoigne de l'atteinte prédominante des muscles expiratoires. La diminution de la CV à partir de 10 ans en moyenne de 200 ml/an est régulière, conduisant à un syndrome restrictif franc à l'âge de 15 ans. L'usage du Sniff Nasal Pressure est un moyen non invasif de mesurer la pression maximale inspiratoire et un meilleur reflet de la capacité de travail des muscles inspiratoires que la CV. D'excellentes corrélations ont été réalisées chez les patients atteints de maladies neuromusculaires

[Stefanutti, 2000].

1.5.2 *Les surveillances et prises en charge*

La surveillance et les prises en charge respiratoires proposées sont assez standardisées. Les EFR (CV et VR, Sniff test si possible) sont réalisées tous les ans jusqu'à 12 ans puis tous les 6 mois. Une surveillance de l'oxymétrie nocturne sera réalisée dès que la CV est inférieure à 1,25 l ou que le patient a plus de 15 ans ou qu'il présente de signes d'hypoventilation alvéolaire. L'existence d'une CV inférieure à 680 ml expose à un fort risque d'hypercapnie nocturne et nécessite donc un support ventilatoire nocturne [Toussaint, 2007]. L'usage de la ventilation non invasive (VNI) chez les patients atteints de DMD a fortement amélioré la survie des patients de l'ordre de 10 ans [Jepessen, 2003] et encore davantage si le patient a été arthrodesé [Eagle, 2007].

Les équipes anglo saxonnes, en particulier celle de Bach, sont par contre très hostiles au support ventilatoire sur trachéotomie qui est proposé chez les patients atteints de DMD en France dès que l'autonomie ventilatoire du patient est inférieure à 6 heures sur 26 heures. En effet Bach a montré sur une série de 45 DMD (24 en VNI et assistance à la toux versus 22 trachéotomisés) que les nombres d'hospitalisations étaient plus grands et la mortalité plus élevée chez les patients trachéotomisés [Bach, 1997].

1.6 *Évolution cardiaque*

1.6.1 *Atteinte cardiaque*

L'atteinte cardiaque dans la myopathie de Duchenne est bien connue, souvent asymptomatique jusqu'à 15 ans. Ces données sont confirmées dans une revue récente américaine de 128 cas [Connuck, 2008] où le diagnostic de cardiomyopathie a été porté à 14,6 ans en moyenne. Mais dans l'expérience française, des anomalies plus précoces sont identifiées à l'échographie cardiaque sur la cinétique du ventricule gauche et en scintigraphie myocardique avant même l'âge de 10 ans dans 20% des cas [Duboc, 2005].

1.6.2 *Le traitement*

Un traitement préventif par les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) est préconisé dès l'âge de 10 ans chez les patients DMD au vu de deux études réalisées par le groupe de cardiologie français:

- une en double aveugle et contre placebo a montré en 2005 un retard à l'apparition d'une cardiomyopathie chez les patients asymptomatiques traités par IEC entre 9,5 et 13 ans [Duboc, 2005],
- un suivi de cohorte à 10 ans a montré une survie significativement supérieure dans le groupe traité précocement [Duboc, 2007].

Les auteurs anglo saxons sont plus réservés sur cette préconisation même si l'équipe de Muntoni a récemment suggéré cette attitude. Ils proposent une surveillance annuelle cardiologique complète à partir de l'âge de 10 ans [Muntoni, 2005]. Ensuite, le traitement symptomatique de l'insuffisance cardiaque reste classique associant les β -bloquants, les IEC, les diurétiques. Les troubles du rythme cardiaque sont classiquement rapportés mais rarement en cause dans la mortalité précoce de ces patients. Ils sont surtout à type d'arythmie supraventriculaire [Finsterer, 2003].

1.7 État nutritionnel

La nutrition pose deux différents types de questions chez les patients DMD. Il est tout d'abord nécessaire de se référer aux courbes spécifiques établies pour les enfants DMD [Griggs, 1983]. D'une part, 40% des patients DMD développent une obésité en dehors de toute prise de corticoïdes, avant l'âge de 12 ans et de la perte de la marche que cette prise de poids précipite [Willig, 1993], sans explication physiologique ou hormonale à ce jour [Hankard, 1998]. Par ailleurs, après 18 ans, 44% des DMD sont dénutris même en tenant compte de la fonte musculaire dans les calculs des indices de masse corporelle avec des difficultés de mastication et déglutition au premier plan qu'il est nécessaire de prendre en charge [Mok, 2006].

1.8 Prise en charge multidisciplinaire

La prise en charge pluridisciplinaire de ces patients paraît donc indispensable et

reconnue par toutes les équipes (Standart Care for DMD, Treat NMD). Elle a permis, en particulier grâce au suivi orthopédique, cardiaque et respiratoire, d'améliorer la survie des patients mais aussi la qualité de vie [Jepessen, 2003]. Les équipes françaises assurent depuis 15-20 ans ce type de suivi pluridisciplinaire coordonné et de ce fait ont acquis une expérience dans la prise en charge des patients DMD assurant une meilleure survie à long terme dans un état orthopédique, respiratoire cardiaque et nutritionnel plus satisfaisant que les séries anciennes anglo-saxonnes ou les récentes publications qui se centrent sur le bénéfice des corticoïdes à court et moyen termes.

1.9 Essais thérapeutiques hors thérapie génique

Il n'existe pas à ce jour de traitement spécifique de la DMD mais différents essais hormonaux, immunosuppresseurs et pharmacologiques ont été réalisés.

1.9.1 Corticoïdes

L'expérience des pays anglo-saxons a conduit à proposer une corticothérapie systématique au long cours à la dose de 0,75mg /kg/jr pour la prednisone ou 0,9mg/kg/jr pour le Deflazacort assez précocement (~ 6 ans). Le bénéfice principal invoqué est un gain sur l'âge de perte de marche de 2 ans en moyenne selon les équipes [Manzur, 2008; Bushby, 2004]. Le maintien des corticoïdes après la perte de marche dépend de l'expérience des équipes qui soulignent un bénéfice sur la fonction respiratoire [Daftary, 2007], l'installation de la scoliose et même pour certains, beaucoup plus controversé sur la cardiomyopathie [Markham, 2008]. Les effets secondaires sont bien sûr monitorés au plus près mais inévitables: cataracte, ostéopénie, obésité, diabète et hypertension artérielle.

1.9.2 Pharmacologiques autres

La supplémentation orale par glutamine sur un temps court (10 jours) réduit la dégradation protéique [Mok, 2006] mais aucun bénéfice évident sur la force musculaire n'a pu être montré par une supplémentation en glutamine ou créatine sur 6 mois dans un essai en double aveugle contre placebo [Escolar, 2003]. Dans les années 80, une supplémentation en L carnitine a

aussi été proposée sans succès [Cornelio, 1982].

Le gène de la dystrophine

2.1 Le gène et ses transcrits

Le gène de la dystrophine est localisé en Xp21 [Kunkel, 1985]. C'est le plus grand gène connu, identifié en 1987 [Koenig, 1987]. Il correspond à environ à 1% du génome et de 1 à 5% du chromosome X [Kunkel, 1989]. 90% du gène est composé d'introns et la séquence codante de 86 exons comprend 7 séquences promotrices liées aux premiers exons [Mandel, 1989].

Ce gène code pour différentes isoformes de dystrophine dont trois pleine longueur (*full length dystrophin*) et quatre séquences courtes (*short isoform*).

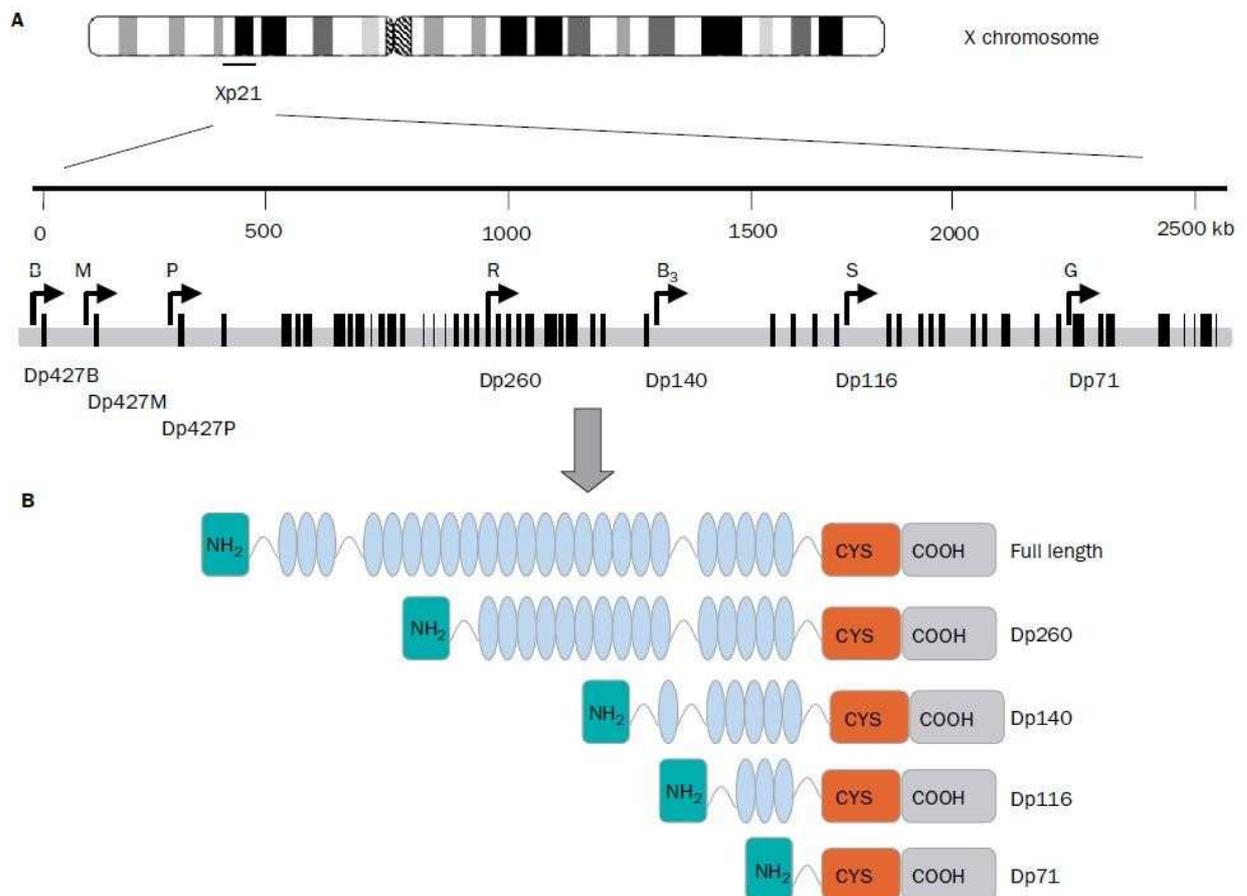


Schéma 2: Organisation génomique du gène de la dystrophine. Les barres verticales représentent les 79 exons. Les flèches indiquent les différents promoteurs en particulier du cerveau (B), muscle (M), des cellules de Purkinje (P), de la rétine (R), des cellules de Schwann (S) et du promoteur général Dp71 (G) [Muntoni, 2003].

Il existe trois isoformes pleine longueur qui ont le même nombre d'exons mais qui

dérivent de trois promoteurs différents dans le cerveau, le muscle et les cellules de Purkinje cérébelleuses [Muntoni, 2003]. La forme pleine longueur est une protéine de poids moléculaire 427 kDa qui comprend 4 domaines. Le domaine amino terminal a des séquences homologues avec l' α actine et contient 232 à 240 acides aminés. Le domaine central est une succession de 25 séquences répétées hélicoïdales identiques à la spectrine d'environ 3000 résidus. Il existe par ailleurs une région riche en cystéine de 280 résidus. La dernière région carboxy terminale comprend 420 résidus. Cette protéine est associée avec la membrane sarcolemmique du muscle cardiaque, squelettique, lisse et interagit avec les autres protéines du complexe glycosarcolemmique (sarcoglycan, dystroglycan, syntrophine, et dystrobrevine).

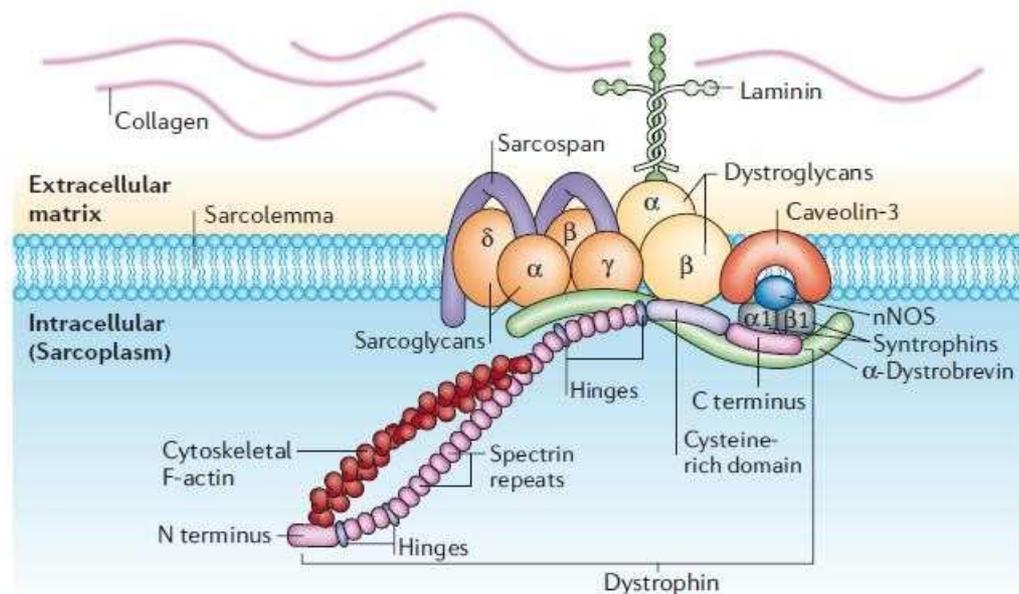


Schéma 3 Le complexe glyco-sarcolemmique: La dystrophine se fixe grâce à sa partie C-terminale au complexe DAPC. Le DAPC comprend les protéines sarcolemmiques (α -dystrobrevin, syntrophins et neuronal nitric oxide synthase (nNOS)), les protéines transmembranaires (β -dystroglycan, les sarcoglycans, caveolin-3 et sarcospan) et les protéines de la matrice extra cellulaire (α -dystroglycan et laminin). La partie N terminale est liée au cytosquelette par les filaments de (F)-actin.

Ce complexe glycosarcolemmique forme un pont entre le sarcolemme et la membrane basale de la matrice extracellulaire. Ensuite la dystrophine interagit avec le réseau sarcomérique par la F actine. La première fonction du complexe glycosarcolemmique est de stabiliser le sarcolemme et de protéger les fibres musculaires des dommages engendrés par les contractions musculaires

répétées. En dehors de ce rôle mécanique, ce complexe transmembranaire joue un rôle dans la communication intercellulaire par des signaux biochimiques [Hoffman, 2001; Davies, 2006]. La dystrophine est phosphorylée *in vivo* et *in vitro* par des kinases soit proline, soit sérine-thréonine, soit calmoduline dépendantes [Rando, 2001]. La phosphorylation de la dystrophine modifie son affinité pour la F actine et la syntrophine, cette phosphorylation pourrait être un signal de transduction [Ilsley, 2001].

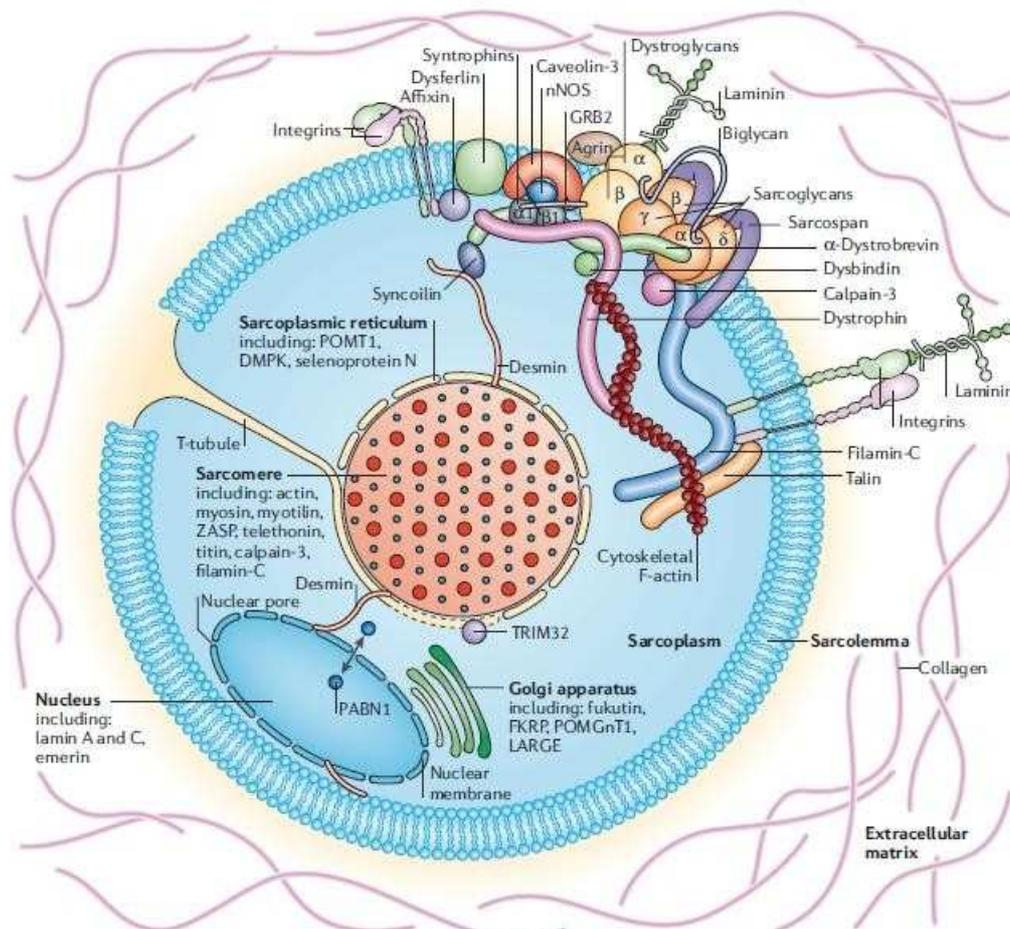


Schéma 4: Section transverse d'une fibre musculaire montrant la position approximative des plus importants composants protéiques du complexe. La dystrophine se lie à la matrice extracellulaire (MEC) aux points de contraction du sarcomère. Ce lien se forme grâce à une cascade de protéines schématiquement représentées.

Les isoformes courtes proviennent de 4 promoteurs internes différents et produisent des protéines qui n'ont pas de domaine terminal «*Actin binding*» mais gardent leur domaine riche en cystéine et le domaine carboxy-terminal qui est le site de liaison avec les autres protéines du

complexe glycosarcolemmique. Le promoteur de l'exon 30 code pour un transcrit de 260 kDa (Dp 260) qui est exprimé dans la rétine ou il coexiste avec les isoformes muscle et cerveau de grande longueur (Dp 427) [D'Souza, 1995]. Le promoteur de l'exon 45 produit une isoforme de 140 kDa (Dp 140) qui s'exprime dans le cerveau, la rétine et le rein [Lidov, 1995]. Le promoteur de l'exon 56 produit une isoforme de 116 kDa (Dp 116) qui ne s'exprime que dans le nerf périphérique [Byers, 1993]. Le promoteur de l'exon 63 produit une isoforme (sur laquelle nous reviendrons dans le chapitre cognition) de 71kDa qui ne s'exprime pas dans le muscle squelettique mais dans le cerveau, la rétine, le foie, le rein, le poumon et le cœur. Il existe fréquemment un épissage alternatif pour cette isoforme (Dp71) avec les 13 derniers acides aminés de la partie carboxy-terminale remplacée par 31 autres [Austin, 1995].

2.2 Mutations dans le gène de la dystrophine

2.2.1 Principaux types de mutation

Les mutations retrouvées dans les dystrophinopathies sont soit des délétions plus ou moins larges, soit des mutations ponctuelles soit plus rarement des duplications. Leur fréquence estimée dépend en partie de la technique utilisée. La PCR multiple, de loin la technique la plus utilisée rend aisée la détection des délétions mais ne permet pas d'identifier les duplications et bon nombre des mutations ponctuelles qui nécessitent une technique de *Southern Blot* pour les premières et une PCR multiplex, voire une analyse des ARN messagers dans le muscle pour les secondes. Les mutations les plus fréquentes dans le gène de la dystrophine sont des délétions intragéniques dans 65 % des cas environ. Les délétions peuvent se situer partout dans le gène mais il existe clairement deux points chauds «hotspot»: un dans la partie centrale du gène entre l'exon 45 et 55 mais avec un point de cassure dans l'intron 44 et l'autre dans la partie proximale en 5' entre l'exon 2 et 19 avec un point de cassure fréquent dans l'intron 2 et 7 [Muntoni, 2003].

2.2.2 Corrélations génotypes – phénotypes

La règle de Monaco permet d'expliquer la sévérité variable des dystrophinopathies en

fonction du siège de la délétion et non de sa taille. Soit la délétion respecte le cadre de lecture est la protéine sera produite de façon incomplète ou en quantité insuffisante soit la délétion décale le cadre de lecture, entraînant dans ce cas l'absence de production de dystrophine. Une grande partie des phénotypes de gravité différente des dystrophinopathies *i.e.* myopathie de Duchenne, myopathie de Becker et variantes s'explique par la règle de Nicholson [Nicholson, 1993].

L'absence complète de la protéine musculaire conduit à un phénotype Duchenne alors que la présence de dystrophine en quantité insuffisante ou tronquée produit les formes intermédiaires ou les variantes de myopathies de Becker.

Groupe	Clinique	Western Blot dystrophine (Muscle)	Immunohistochimie dystrophine (fibres musculaires)	Cadre de lecture Région du gène
1	DMD sévère	0<Q<10% T normale(N)	0 ou fibres révertantes < 1%	Décalé
2	DMD modérée	0<Q<20% T normale(N)	IHC<50% qq f. révertantes (fr)	Décalé
3	Forme intermédiaire	20<Q<30% T N ou diminuée	50<IHC<90% fr groupées	Décalé ou conservé
4	BDM sévère	30<Q<65% T N ou diminuée	60<IHC<90%	Conservé (Nterminale)
5	BDM classique	65<Q<80% T N ou diminuée	IHC 100% irrégulière	Conservée (distale)
6	Forme bénigne	70<Q<100% T diminuée	IHC normale	Conservée (proximale)

Tableau 2: Corrélation entre la quantité résiduelle de dystrophine et le phénotype clinique d'après Nicholson. DMD Duchenne Muscular Dystrophy; BDM Becker Muscular Dystrophy ;Q quantité; T taille ; N normale ; IHC Immunohistochimie.

Les duplications représentent environ 5% des cas et les mutations ponctuelles ont été sous estimées durant plusieurs années par les techniques classiques. Les mutations (environ 30%) sont aujourd'hui mieux caractérisées par la PCR multiplex ou la Reverse Transcription à partir d'échantillon musculaire par l'analyse des ARNs ainsi que quelques mutations introniques récemment décrites [Tuffery, 1995 & 1999]. La plupart des mutations sont soit des mutations non sens soit de petites délétion ou insertion décallant le cadre de lecture soit des mutations affectant des sites d'épissage.

2.2.3 Saut d'exon

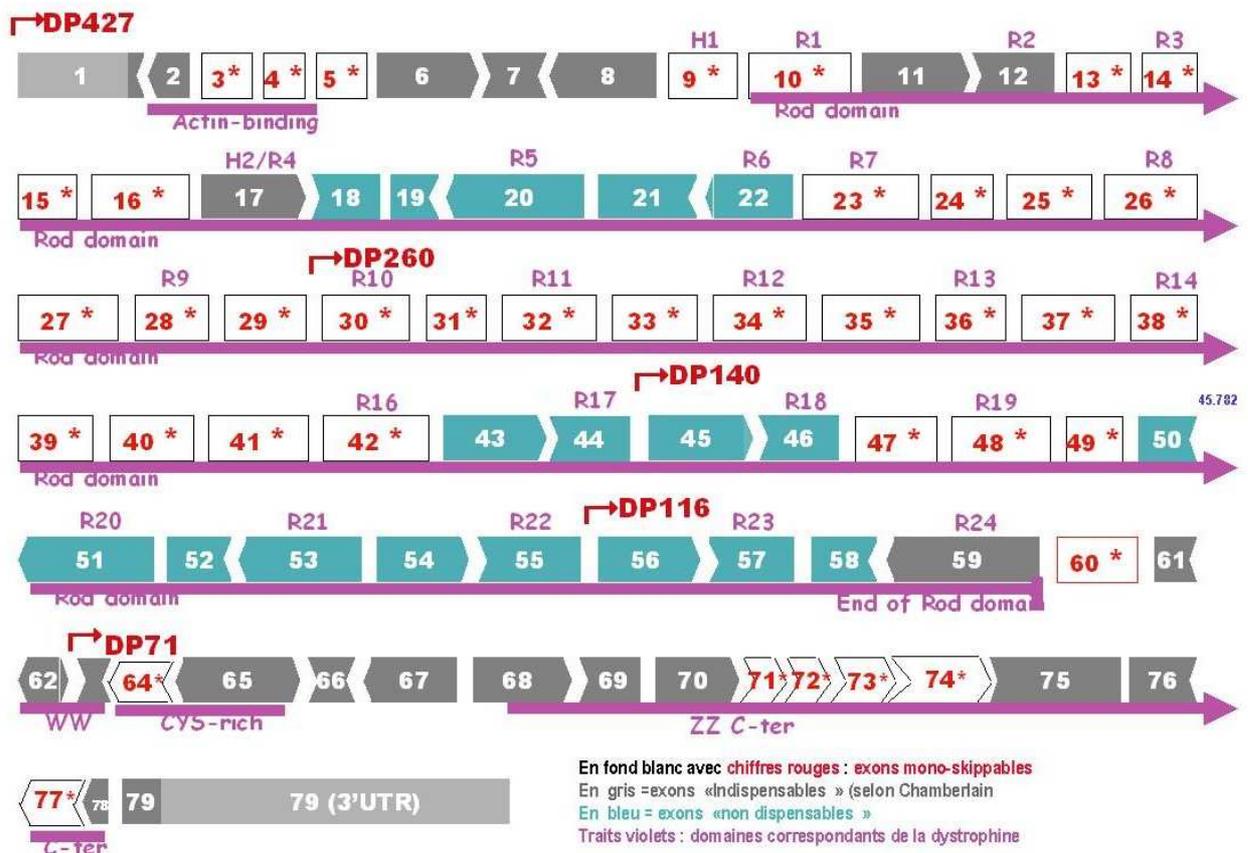


Schéma 5: Représentation des exons du gène de la dystrophine et sites potentiels d'épissage en vue d'une correction génomique par saut d'exon d'après Kaplan JC.

Le phénomène de saut d'exon est rencontré de façon spontanée dans certaines fibres musculaires chez les patients DMD permettant une ré-expression de la dystrophine dans ces rares fibres appelées fibres révertantes. Ce mécanisme existe aussi dans le muscle de la souris mdx. Certaines régions du gène semblent plus propices à la survenue de saut d'exon comme la région centrale mais le facteur qui paraît le plus important est l'environnement intronique de l'épissage ou de la délétion. Ce phénomène spontané dans le gène de la dystrophine a conduit certaines équipes à envisager une correction génique par saut d'exon permettant le rétablissement du cadre de lecture [Aartsma-Rus, 2004].

2.2.4 Formes particulières

Les cardiomyopathies liées à l'X : quelques rares formes de cardiomyopathies liées à

l'X sans atteinte musculaire squelettique sont liées au gène de la dystrophine. Il s'agit de mutations qui touchent la transcription ou l'épissage sans respect du cadre de lecture siégeant uniquement dans des régions où s'exprime le transcrite cardiaque c'est à dire dans la région 5' du gène, soit l'exon 1 soit l'intron 1 [Milasin, 1996; Yoshida, 1998]. Une mutation rare dans l'intron 11 a aussi été rapportée par l'équipe de Muntoni [Ferlini, 1999]. Des mutations avec respect du cadre de lecture ont aussi été rapportées dans les régions 49-51, 48-49, 45-48, 45-55, 48, 48-51, 48-53 avec présence dans le muscle cardiaque d'une expression diminuée de la dystrophine [Muntoni, 2003].

L'élévation asymptotique isolée des CK a été rapportée dans une famille d'adultes mâles de façon exceptionnelle avec une mutation dans l'exon 48 [Morrone, 1997].

L'atteinte rétinienne dans les dystrophinopathies est cliniquement asymptotique mais il existe des altérations de l'électrorétinogramme (ERG). L'isoforme principale rétinienne est la Dp260. Le Dp 71 s'exprime elle au niveau de la paroi des vaisseaux rétiens. L'anomalie à l'ERG est une réduction de l'onde b en scotopie. L'absence de Dp71 modifie la fonction des canaux potassiques 4.1 et de l'aquaporine 4 [Daloz, 2001].

L'expression chez les filles : le gène de la dystrophine est localisé en Xp21 et le taux de néomutations est de 1/3. Les mères estimées transmettrices (2/3 des cas environ) sont le plus souvent asymptotiques. Sur une série de 129 transmettrices, 53% ont des CK augmentées, 17% un déficit de la force musculaire souvent asymétrique prédominant au niveau des ceintures, plus marqué après 33 ans [Hoogewaard, 1999]. Sur le plan cardiaque, la même équipe signale chez les femmes transmettrices asymptotiques, des anomalies en échographie cardiaque dans 36% des cas et des cardiomyopathies dilatées identifiées dans 8% des cas [Hoogewaard, 1999]. Par ailleurs, il existe des filles réellement symptomatiques du fait d'un mosaïcisme tissulaire ou d'une inactivation anormale du chromosome X (lyonisation) avec des symptomatologies douloureuses à l'effort ou de réelles dystrophies musculaires [Sewry, 1993; Tihy, 1994].

2.3 Atteinte cognitive chez les DMD et la génétique

2.3.1 Description des atteintes cognitives

L'absence ou la diminution des transcrits de la dystrophine dans le système nerveux principalement dans les dendrites des cellules pyramidales du cortex et de l'hippocampe, ainsi que dans les cellules de Purkinje du cervelet [Mehler, 2000], conduit à des déficits cognitifs variables. Depuis la description initiale de Duchenne en 1868, un déficit cognitif a été mis en évidence avec un QI moyen de 85 chez les patients avec 30% des patients présentant un QI inférieur à 70. Il existe une dissociation des QI verbal et performance en faveur du QI performance, contrairement à ce qui pourrait être attendu (différentielle de 5 à 8 points) [Cotton, 2001]. Cette diminution du QI n'est pas seulement due à un déficit éducationnel ou au déficit moteur car ce déficit cognitif n'est pas retrouvé dans d'autres dystrophies musculaires comme les sarcoglycanopathies.

Des déficits plus spécifiques des performances verbales, la mémoire, la lecture et les mathématiques ont été mis en évidence. En effet, l'analyse de l'empan verbal par le «*digit span*» et le «*story recall*» a montré un déficit pouvant refléter une anomalie primaire du langage, un trouble de la concentration ou un trouble de la mémoire de travail. Par ailleurs, les difficultés spécifiques des apprentissages comme la dyslexie, dyscalculie et la dysgraphie qui sont rencontrés plus fréquemment chez les patients DMD correspondent à des anomalies dans l'apprentissage de mécanismes d'automatisme où le cervelet pourrait jouer un rôle clé.

Il existe une prévalence plus élevée des troubles envahissants du développement chez les patients DMD avec une prévalence de 4/100 vs 1,6/1000 dans la population générale [Hinton, 2007]. L'implication du cervelet dans les mécanismes autistiques a été évoquée au même titre que le sulcus temporal [Sparks, 2002; Boddaert, 2004]. L'expression prédominante des transcrits de la dystrophine dans le cervelet et les atteintes neurocognitives et psychiatriques décrites chez les patients DMD impliquent en premier lieu le cervelet.

Il n'existe pas de corrélation génotype-phénotype simple entre les délétions / duplications du gène de la dystrophine et l'incidence du retard mental chez les patients atteints de

DMD. Cependant, la présence de délétions dans l'extrémité 3' du gène de la dystrophine avec la perte des isoformes distales de la dystrophine est associée à une incidence plus élevée de déficits cognitifs. Notamment, les isoformes Dp140 et Dp71 de la dystrophine dont les premiers exons se situent respectivement au niveau des introns 45 et 63, sont particulièrement associées au retard mental [Muntoni, 2003].

2.3.2 Mécanismes de l'atteinte cognitive chez l'homme et la souris MDX

Sur le plan morphologique, les études neuropathologiques anciennes ont mis en évidence entre autres une désorganisation de l'architecture corticale, prédominante dans les régions fronto-temporales, des anomalies de migration (hétérotopies) et un développement et une arborisation dendritique anormale au niveau du cortex visuel qui a été considéré comme un mécanisme plus diffus pour les auteurs [Rossman, 1966; Jagadal, 1988]. Ces données précèdent la validation génétique du diagnostic et il est possible que certaines études incluent des dystrophies musculaires congénitales.

Les altérations de la neurotransmission

La recherche fondamentale dirigée vers la compréhension des mécanismes conduisant aux déficits cognitifs chez les patients DMD est très riche et repose essentiellement sur des données accumulées chez le modèle murin (souris mdx). La dystrophine est localisée au niveau des neurones post-synaptiques de ces régions et colocalise avec la sous-unité du récepteur GABA-A. Il a été montré chez la souris mdx une diminution nette des sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 2$ du récepteur GABA dans les régions, ce qui pourrait suggérer que la dystrophine jouerait un rôle important dans le clustering et la stabilisation des récepteurs GABA-A d'un sous groupe de synapses inhibitrices [Graciotti, 2008].

Le dysfonctionnement des récepteurs GABA-A n'est probablement pas le seul mécanisme impliqué dans le déficit cognitif. En effet, la désorganisation du complexe protéique associé à la dystrophine conduit à un processing anormal de la transmission synaptique, notamment

par un dysfonctionnement de l'interaction dystrophine- α/β dystroglycanes, comme cela a été montré dans les pathologies de la jonction neuromusculaire avec une anomalie du clustering des récepteurs à l'acétylcholine ou dans les pathologies liées à des anomalies de l' α -dystroglycane, entraînant une altération de la transmission synaptique, de la transduction des signaux intracellulaires et de la migration neuronale.

De plus, des altérations de l'homéostasie calcique, due en partie aux modifications des canaux calciques membranaires, sont un autre facteur modifiant la transmission du signal. Des modifications de l'homéostasie calcique neuronale pourraient avoir d'importantes implications dans l'élaboration correcte d'un grand nombre de fonctions cellulaires, comme la libération des neurotransmetteurs, la plasticité synaptique, la transcription de gènes [Mehler, 2000].

Les altérations de la barrière hématoencéphalique (BHE)

Il a été montré que la dystrophine jouait un rôle majeur dans le développement de la barrière hématoencéphalique. Des modifications de la perméabilité vasculaire ont été mises en évidence dans le modèle *mdx*. La dystrophine est présente au niveau de la micro circulation cérébrale et dans le pied astrocytaire périvasculaire formant une unité gliovasculaire au niveau de la BHE. Chez la souris *mdx*, la diminution de la dystrophine dans ces régions entraîne un œdème cérébral et des altérations sévères de la BHE résultant de la réduction d'une protéine associée aux jonctions serrées entre les cellules endothéliales (zonula occludens ZO1) et d'une protéine gliale essentielle au cours du développement de la BHE, l'Aquaporine 4 (AQP4) exprimée au niveau des astrocytes et des cellules ependymaires [Nico, 2002]. Ces auteurs ont confirmé le lien entre la diminution de la ZO1, AQP4, GFAP, et la dystrophine (Dp71). La dystrophine gliale périvasculaire joue donc probablement un rôle dans la polarisation fonctionnelle (polarisation d' AQP4 face aux cellules endothéliales) et la différenciation des astrocytes. L'AQP4, ancrée dans la dystrophine, perdrait sa polarité normale au niveau des pieds astrocytaires, ce qui pourrait entraîner une perturbation de l'homéostasie de l'eau et contribuer aux processus œdémateux [Nico, 2002; Nico,

2004, Nico, 2006; Nico, 2004*].

Nico et al ont aussi montré que chez la souris *mdx* il existe une expression cérébrale majorée de facteurs angiogéniques comme la tryptase, le VEGF, associée à une augmentation de son récepteur VEGFR2 sur la cellule endothéliale [Nico, 2002]. La même équipe a aussi mis en évidence une sur-expression de métalloprotéases matricielles (MMP2 et 9, endopeptidase) au niveau des plexus choroïdes, des cellules ependymaires et, à un moindre degré, au niveau des astrocytes périvasculaires et des cellules endothéliales. L'augmentation de la production des MMPs est associée à des lésions de la BHE. L'hypothèse proposée est que la déficience cérébrale en dystrophine et protéines associées (DAP) au niveau des cellules gliales chez les souris *mdx* pourrait induire des altérations du cytosquelette glial qui entraînerait une sur expression des MMPs par ces cellules gliales qui, à leur tour, pourraient être responsables de l'ouverture de jonctions serrées et d'une augmentation de la perméabilité vasculaire [Nico, 2006].

Cependant, chez les patients DMD, il n'existe que très peu de données sur la densité en micro vaisseaux cérébraux. Un article seulement rapporte une plus importante densité capillaire chez les patients DMD que chez les contrôles [Sugino, 1991].

2.3.3 Études neuroradiologiques

Les études neuroradiologiques sont peu nombreuses et souvent réalisées chez des patients très mal caractérisés sur le plan clinique et génétique. En 1994, Bresolin et al ont publié des résultats de densitométrie d'émission de protons (PET) de fluorodeoxyglucose (FDG) montrant un hypométabolisme cérébelleux bilatéral chez les 4 patients étudiés (absence de dystrophine en *Western Blot*) et non caractérisés sur le plan génétique. Un hypométabolisme au niveau des aires associatives a été retrouvé dans 3/4 des cas. L'IRM cérébrale réalisée au décours était normale dans tous les cas [Bresolin, 1994].

Une autre étude de FDG-PET porte sur 10 patients caractérisés sur le plan immunohistochimique et génétique (10 délétions, absence du détail des délétions retrouvées)

comparés à 17 patients adultes normaux,(Lee 2002). Un hypométabolisme impliquant l'aire sensitivomotrice, le néocortex temporal, le lobe temporal interne et le cervelet. Les auteurs relient ces données obtenues en PET au fait que ces structures sont particulièrement riches en dystrophine. L'hypométabolisme observé dans ces régions correspondrait donc à une diminution pathologique du taux de dystrophine attendue dans ces structures [Lee, 2002].

Chiron et al 1999 ont étudié les anomalies de spécialisation hémisphérique chez des sujets atteints de dysphasie développementale avec un groupe contrôle composé des patients atteints de DMD. De manière surprenante, ils ont mis en évidence que les patients DMD droitiers présentaient une asymétrie de fonctionnement entre les deux hémisphères aux dépens de l'hémisphère gauche. Les auteurs ont conclu que les difficultés d'apprentissage observées dans la DMD pourraient être reliées, comme dans les dysphasies développementales, à une spécialisation hémisphérique anormale. Les études neuropsychologiques montrant des difficultés d'apprentissage de la lecture chez les DMD pourraient abonder dans ce sens [Chiron, 1999; Billard, 1992].

D'autres auteurs ont étudié le métabolisme cérébral dans la DMD en spectroscopie de résonance magnétique: Tracey et al ont étudié en spectroscopie de phosphore 31 (P31) (cortex, lobes frontaux et pariétaux) le cerveau de 19 garçons [Tracey, 1996]. Cette population est très mal caractérisée autant sur le plan génétique que sur le plan immunocytochimique (histologie musculaire 11/17 patients, biologie moléculaire, 13/17, 3 patients ayant seulement un diagnostic clinique). Comme cela avait déjà été montré chez la souris *mdx*, les auteurs ont mis en évidence une augmentation des ratios Pi/ATP, Pi/PME, Pi/PCr. Ces résultats correspondent à une augmentation de Pi et une diminution de l'ATP au niveau du système nerveux central. La signification exacte de ce phénomène, qui a aussi été démontré au niveau du muscle des patients atteints demeure inconnue et semble refléter la diminution du pool de dystrophine musculaire et cérébrale [Tracey, 1996; Rae, 1998]. La même équipe a utilisé la spectroscopie de protons (SRM H1) dans le même objectif: 15 patients (dont seulement 5 ont été caractérisés sur la plan génétique) comparés à 15 témoins

normaux.

L'analyse neuropsychologique réalisée a comporté des échelles d'intelligence et deux batteries plus spécifiques (MAT = test de compétences visuospatiales et du raisonnement non verbal et WRAML). Les données ont été acquises à partir de deux voxels situés dans l'hémisphère cérébelleux et le lobe frontal gauche. Les résultats mettent en évidence un rapport Choline/NAA significativement plus élevé au niveau du cervelet gauche chez les patients Duchenne vs enfants normaux, le rapport créatine/NAA demeurant inchangé entre les deux groupes. Par ailleurs, les auteurs ont observé une association significative entre l'élévation du rapport choline/NAA dans le cervelet et de bonnes performances au test MAT. L'interprétation de ces résultats est extrêmement délicate et le lien effectué par les auteurs entre ces deux résultats est peu satisfaisant. En effet, le test MAT n'étudie pas a priori les fonctions cérébelleuses et il est difficile de trouver une explication claire à l'augmentation du pic de choline dans le cervelet des patients DMD [Tracey, 1996; Rae, 1998].

2.3.4 Conclusion

L'atteinte cognitive et psychiatrique des patients DMD semble donc impliquer fortement le cervelet et n'est pas expliquée totalement par l'analyse des différents types de mutations retrouvées impliquant différents transcrits et leur localisation dans le gène de la dystrophine. Les différentes études chez la souris *mdx* montrent une expression prédominante des transcrits de la dystrophine (DP 71) dans le cervelet. Par ailleurs, de nombreuses données ont été accumulées chez la souris *mdx* en faveur de la perturbation de l'homéostasie du milieu extracellulaire et de la perméabilité vasculaire.

Il nous apparaît donc important dans un projet futur de pouvoir étudier, à l'aide de nouvelles méthodes non invasives d'analyses morphologiques fiables, le cerveau de patients DMD parfaitement caractérisés sur le plan génétique et neuropsychologique : analyse du volume des différentes structures cérébrales en particulier le cervelet par le logiciel VBM, analyse des grandes

voies de connection par l' analyse en « *tracking fibres* », analyse en spectroscopie par résonance magnétique de protons de différentes régions (SRM H1).

2.4 Essais de thérapie génique

2.4.1 *Codon stop*

Après l'étude de L Sweeney identifiant une ré-expression de la dystrophine dans le muscle chez la souris *mdx* (qui a un codon stop) après perfusion de gentamycine [Barton-Davis, 1999] des essais ont été réalisés sans succès chez des patients DMD et BDM où aucune ré-expression de la dystrophine n'a pu être authentifiée [Wagner, 2001]. Des différences de conformation entre les gentamycines du commerce (levogyre vs dextrogyre) ont été soulevées. Dans le même objectif, une molécule plus innovante, le PTC 124, a été développé. Elle est en cours d'étude dans la DMD et la mucoviscidose [Wilton, 2007].

2.4.2 *Saut d'exon*

La restauration du cadre de lecture du gène de la dystrophine par « exon skipping » a été tenté chez la souris *mdx* et le chien golden retriever muté avec une ré-expression de la dystrophine dans le muscle de façon satisfaisante. Chez 4 patients DMD sélectionnés, l'injection intramusculaire d'un oligonucléotide antisens a permis in situ un saut de l'exon 51 à 64 dans 97 % des fibres et une ré-expression partielle de la dystrophine dans le muscle de 3 à 12% [Van Deutekom, 2007]. Ces résultats encourageants permettent d'envisager des développements de cette technique une fois résolu le problème de la distribution générale de l'oligosens dans le muscle.

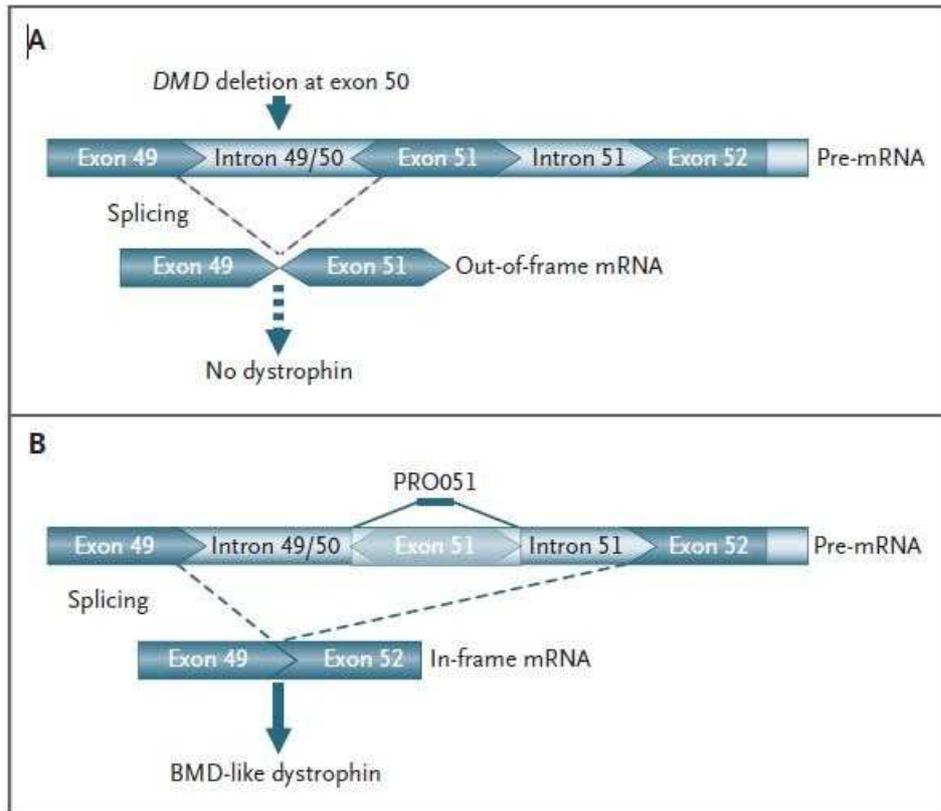


Schéma 1: Représentation du mécanisme du saut d'exon chez un patient DMD ayant une délétion de l'exon 50 permettant la restauration du cadre de lecture et conduisant à une dystrophine incomplète et un phénotype BMD [Van Deutekom, 2007]

Atteinte musculaire des patients DMD sur le plan histologique

3.1 Données de la littérature

3.1.1 Introduction

Duchenne en 1868 et Erb en 1891 décrivent une atteinte musculaire primitive évolutive survenant chez des garçons qui installent une paralysie progressive mais la description histologique de l'atteinte musculaire dans les dystrophinopathies a été réalisée dans les années 1960 par Bell et Cohen puis un peu délaissée au profit des avancées génétiques lors de la découverte du gène de la dystrophine. La formule décrite alors comprend un processus nécrose régénération et un remplacement progressif du tissu musculaire par une fibrose et du tissu adipeux [Bell, 1968]. Ils signalent que le pourcentage de fibres nécrotiques et en régénération est indépendant du degré évolutif de la maladie. Ils insistent sur l'augmentation des fibres de type 1 au cours de la maladie et l'aspect en foyer des lésions qui suggère un mécanisme vasculaire. Cette théorie vasculaire sera débattue avec des arguments contradictoires, en particulier les analyses morphométriques ne montreront ni de perte capillaire ni occlusion de petits vaisseaux [Jerusalem, 1974]. Il n'existe pas de modification de la perméabilité capillaire en microscopie électronique [Bradley, 1975]. Les analyses ultra structurales des fibres nécrotiques mais aussi des fibres non nécrotiques confirment l'existence de défauts de la membrane plasmique avec une perméabilité modifiée pour la peroxydase [Engel, 1975].

L'hypothèse d'une anomalie de la membrane sarcolemmique est alors évoquée [Bradley, 1978]. L'existence de fibres hypercontractées témoins de cette anomalie sarcolemmique est notée mais discutée comme étant soit pathognomonique de la DMD soit simplement le résultat d'un artéfact de fixation [Lotz, 1987].

3.1.2 Les fibres nécrotiques

Les fibres nécrotiques sont facilement reconnues au trichrome avec une couleur bleu vert, avec un réseau myofibrillaire absent ou désorganisé et une réactivité ATPasique ou oxydative

diminuée. Elles fixent de façon non spécifique la fraction C5b du complément ou complexe d'attaque membranaire (MAC) et expriment la prostaglandine D2 [Okinaga, 2002]. Elles sont associées à des cellules inflammatoires (macrophages et des lymphocytes T en plus faible proportion). La fréquence des fibres nécrotiques varie d'un patient à l'autre et d'un muscle à l'autre, de façon indépendante du degré évolutif de la pathologie de 0,5 à 3,5% [Bell, 1968]. La nécrose est segmentaire avec la présence de fibres régénératives avec un cytoplasme basophile, une augmentation des activités oxydatives et une immuno-réactivité pour la myosine fœtale et l'utrophine. L'existence de foyers de nécrose/régénération de myofibres reste mal expliquée et pourrait être liée à une nécrose segmentaire de la fibre avec une fusion incomplète des myotubes [Schmalbruch, 1984]. La nécrose myocytaire en foyer a aussi été récemment rattachée à une toxicité de cellules mastocytaires [Wehling, 2008].

3.1.3 La prédominance de fibre de type 1

La prédominance de fibres de type 1, classiquement rapportée, varie selon les muscles biopsés et l'âge des enfants (quadriceps 41 à 75%). Les fibres de type 2b diminuent après l'âge de 2 ans et disparaissent après 5 ans en rapport probablement à une fragilité de la membrane sarcolemmique plus importante. Les fibres de type 2c augmentent avec l'âge [Whitaker, 1983]. Entre l'âge de 1 et 5 ans, la taille moyenne des fibres est plus élevée que chez les patients contrôles puis se normalise en alternant des fibres de grande taille et des groupements de petites fibres [Bell, 1967]. Les centralisations nucléaires sont présentes dans 2 à 4% des myocytes mais ne semblent pas liées à la sévérité de la pathologie.

3.1.4 Les fibres hypercontractées

Les fibres hypercontractées sont arrondies, foncées, hyperréactive au trichrome et souvent de grande taille. Elles témoignent d'anomalies sarcolemmiques permettant l'entrée massive du calcium dans la cellule, induite par un stress ou un détergent en général. Dans la DMD, elles sont plus fréquentes (4 à 8,3%) que chez le sujet normal (0,4%) avec la même technique de biopsie et de

fixation et ne peuvent donc pas être imputables à un artefact. Elles sont beaucoup plus rares dans les dystrophies musculaires congénitales, les myosites, les lésions de dénervation (incidence < 1%). Elles sont déplétées en desmine et actine, témoignant d'une activation des protéases cytoplasmiques calcium dépendantes [Uchino, 1988]. La surcharge calcique des fibres musculaires non nécrotiques avec des dépôts sub-sarcolemmiques du calcium est un fort argument pour l'hypothèse de défaut sarcolemmique primitif permettant l'entrée du calcium dans les cellules. Cette anomalie est déjà présente dans le muscle de sujets DMD à l'âge fœtal [Engel 2003].

3.1.5 Les cellules de l'inflammation

Les cellules inflammatoires sont péri-vasculaires (1 à 4 cellules de type macrophages autour des vaisseaux), dans le périmysium et l'endomysium où elles sont proches des foyers de régénération : ce sont des macrophages ou plus rarement des lymphocytes T, CD8+ dans un tiers des cas. Le nombre de cellules inflammatoires dans les infiltrats endomysiaux est plus faible que dans les polymyosites que ce soient les macrophages ou les lymphocytes T dans une proportion de 1 à 10 [Arahata, 1984]. L'inflammation dans la DMD apparaît donc comme un phénomène secondaire et modéré. Par contre la présence de cellules mastocytaires, myocytotoxiques, est plus importante dans les dystrophinopathies que dans les autres dystrophies musculaires expliquant l'aspect en foyer de la nécrose [Wehling, 2008]. Les fibres déficientes en dystrophine seraient plus sensibles à la protéolyse induites par les mastocytes [Cai, 2000].

3.1.6 Les cellules satellites

Le pourcentage de fibres nucléées accompagnées de cellules satellites est 3 à 7 fois plus élevé dans le muscle DMD que dans le muscle normal. Cette augmentation des cellules satellites est aussi rapportée dans la myotonie et les polymyosites. Il semblerait donc que la capacité à maintenir une population de cellules myogéniques est augmentée même si la capacité de division et de fusion de ces cellules est peut être altérée [Wakayama, 1979].

3.1.7 Les vaisseaux

La théorie vasculaire dans la DMD a été débattue dans les années 1970 avec des arguments contradictoires [Mendell, 1971]. Pour certains, l'aspect de grouping des foyers de nécrose dans la DMD suggérait un mécanisme ischémique mais les analyses morphométriques ne montrent pas de perte capillaire ni occlusion de petits vaisseaux [Jerusalem, 1987]. Pour certains, aucune modification importante de la paroi capillaire en microscopie électronique que ce soit en terme d'épaisseur de la paroi ou de solution de continuité n'a pu être mise en évidence [Bradley, 1975; Koehler, 1977]. Pour ces auteurs, il n'y a donc pas d'argument morphologique en faveur d'une pathologie vasculaire primitive de type ischémique. Pour d'autres, l'hypothèse d'une souffrance peut être secondaire, de type ischémique reste valable avec une augmentation de l'épaisseur de la paroi des vaisseaux artériolaires et un infiltrât cellulaire [Musch, 1975].

En 1987, Miike et al retrouve, sur l'analyse de quatre biopsies musculaires réalisées chez des patients jeunes présymptomatiques, une tortuosité des microvaisseaux avec une augmentation de l'épaisseur de la membrane basale dans 30% des capillaires et un aspect d'agrégats plaquettaires sur la paroi des artérioles et veinules en microscopie électronique. L'analyse morphométrique montre que la surface occupée par les capillaires est plus importante dans la DMD que dans d'autres maladies neuromusculaires. Ces observations sont en faveur d'un mécanisme compensatoire de prolifération vasculaire [Miike, 1987]. Ces anomalies semblent liées au processus de dystrophie musculaire chez l'enfant car Sugino en 1991 retrouve le même aspect de tortuosité vasculaire et d'augmentation de la surface des cellules endothéliales et péricytaire dans le muscle de patients ayant une dystrophie musculaire congénitale de Fukuyama [Sugino, 1991]. En 2005, N'Guyen rapporte dans le modèle canin de DMD (chien GRMD) une augmentation de la surface occupée par le lit capillaire et une augmentation d'épaisseur de la paroi des vaisseaux. Par contre, elle note un appauvrissement du lit vasculaire chez le chien âgé corrélé à la fibrose musculaire [N'Guyen, 2005].

En 2004, Straino montre chez la souris mdx une augmentation de l'artériogénèse

après lésion ischémique de la patte par rapport à la souris sauvage avec une production augmentée du VEGF sérique et une prolifération plus importante des vaisseaux capillaires de *mdx* sur matrigel après stimulation par un facteur de croissance fibroblastique [Straino, 2004]. D'autres équipes ont montré chez la souris *mdx* mais surtout chez les patients DMD des anomalies de la régulation de la micro circulation et de la réponse au stress oxydatif médié par NOS [Brenmann, 1995; Sander, 2000]. En 2006, Ito a montré la restauration d'une vaso-régulation normale chez la souris *mdx* après ré-expression conditionnelle d'un transgène de mini dystrophine uniquement dans les muscles lisses de la paroi des vaisseaux. Ceci semble confirmer que l'absence de dystrophine elle même est la cause d'un défaut vasogénique chez la souris *mdx* [Ito, 2006]. Le rôle du vaisseau et de sa proximité semble central dans le processus de la dystrophie dans la DMD en terme de participation à la souffrance myocytaire mais aussi à sa correction. L'équipe de Cossu a mis en évidence l'existence d'une population particulière de cellules «souches» périvasculaires différentes des cellules satellites, proches des péricytes, appelées mésangioblastes, qui après greffe chez le chien GRMD améliorent la fonction et la morphologie musculaire en restaurant in situ une expression de la dystrophine [Sampaolesi, 2006; Dellavalle, 2007].

3.2 La fibrose musculaire

3.2.1 La fibrose endomysiale et périmysiale

La fibrose endomysiale et périmysiale progresse avec la maladie dans la DMD. En période néonatale, le tissu conjonctif est normal alors que la fibrose est bien présente à 4 ans [Stephens, 1982]. La cinétique et les différents partenaires intervenant dans la fibrose musculaire en général ou dans les processus dystrophiques type DMD sont incomplètement identifiés. Les composants de la matrice extracellulaire sont produits et accumulés en réponse à une activation de la cascade de cytokines profibrosantes, elle même secrétées par les fibroblastes, les cellules satellites et les macrophages [Tidball, 2007].

3.2.2 Les protéines de la matrice extracellulaire (ECM)

Dans les différents tissus, l'ECM a un rôle de support et d'accrochage pour les cellules, de cloisonnement et de régulation des communications intercellulaires. L'ECM régule la dynamique cellulaire, nécessite l'intervention de certains facteurs de croissance et favorise le dépôts de certaines protéines. Des modifications pathologiques activent des protéases qui favorisent ces dépôts. La formation de la matrice extracellulaire est essentielle dans les procédés de croissance, de soutien et de fibrose. Par exemple, dans les tumeurs, l'action de protéases ou de métalloprotéinases, permet la diffusion de métastases cancéreuses en limitant la synthèse de la matrice extracellulaire mais permet aussi le contrôle de l'extension de la fibrose qui est en elle même délétère pour le tissu. Les composants de la matrice extracellulaire sont produits par les cellules résidentes et secrétés par exocytose.

Les glycoaminoglycans (GAG)

Les GAG sont des polymères de glucides de la matrice extracellulaire qui ont une charge négative permettant son hydratation (gel) ainsi que la séquestration et le stockage des facteurs de croissance. L'héparane sulfate en particulier sert de ligand à bon nombre de protéines (perlecan, agrine, collagène X, VIII) et régule des processus aussi divers que l'angiogenèse, la cascade de la coagulation et la réparation tissulaire.

L'acide hyaluronique est un polysaccharide qui confère aux tissus, une résistance à la compression. Il est localisé de façon préférentielle au niveau de régions articulaires et du tissu interstitiel. Il interagit avec le récepteur transmembranaire CD44.

Les autres composants matriciels

Le collagène est la famille de glycoprotéines la plus abondante et représente 90% des protéines de la matrice extracellulaire. Le collagène est présent dans l'ECM sous forme fibrillaire et donne un support structurel aux cellules résidentes. Le collagène est secrété sous forme précurseur

procollagène puis il est ensuite clivé par des protéases qui permettent l'assemblage. Le collagène est divisé en différentes familles: fibrillaire (I, II, III, V, XI), facit (IX,XII,XIV), petite chaîne (VIII et X), de la membrane basale (IV) et autres (VI, VII, XIII).

Les fibronectines permettent la connection des fibres de collagène avec les cellules dans l'ECM et leur mouvement. Les fibronectines sont secrétées par les cellules sous forme inactives puis sont associées en dimères par le biais des intégrines. Ces dimères ont des fonctions propres comme celle d'agir sur le site d'une lésion tissulaire en s'associant aux plaquettes et de faciliter le mouvement des cellules vers le le lieu lésé. L'élastine confère une élasticité aux tissus en opposition au collagène. Elle est présente dans les parois des vaisseaux et les fascias. L'élastine est synthétisée par les fibroblastes et les cellules α SMA positives. Les laminines sont situées au niveau de la membrane basale et organisées en structure fibrillaire formant un réseau qui permet la résistance aux forces de tension s'exerçant sur la membrane. Elles ont aussi un rôle important dans l'adhérence et le guidage cellulaire en s'associant aux collagènes.

La liaison des cellules à la matrice extracellulaire se fait par le biais de molécules d'adhésion cellulaires (CAM) nommées intégrines, qui ont une position transmembranaire et permettent une signalisation intracellulaire en association avec les protéines du cytosquelette. De nombreuses cellules sont impliquées dans la constitution de la matrice extracellulaire en particulier les fibroblastes. Elles sont bien caractérisées dans des tissus comme le foie, le rein, le poumon en situation physiologique ou pathologique mais moins bien identifiées dans le muscle.

3.2.3 Les mécanismes de la fibrose en général [Lupher , 2006]

L'inflammation et la fibrose sont deux évènements très intriqués dans les différents tissus. Les différents partenaires sont les myofibroblastes dont certains pourraient être d'origine médullaire et de cellules recrutées sur le site lésionnel tels que les macrophages et les lymphocytes T. La fibrose est la clé de nombreuses affections pathologiques humaines qui vont de la rétinopathie

et la néphropathie diabétique à la cirrhose du foie, la fibrose pulmonaire idiopathique, la sclérodermie ou l'insuffisance cardiaque congestive. La constitution de la fibrose est une réponse mal régulée à une agression tissulaire et la succession d'évènements est la même quelque soit le tissu même si tous les partenaires ne sont pas aussi bien identifiés dans le cas particulier du muscle.

Le processus se déroule en trois étapes:

- Lors de la première phase, la rupture de la barrière vasculaire au moment du traumatisme expose les plaquettes à la matrice extracellulaire et provoque une agrégation plaquettaire avec dégranulation qui libère différents facteurs dont la thrombine qui va cliver le fibrinogène et former avec la fibronectine une matrice provisoire. Les cellules inflammatoires et plus tard les fibroblastes vont arriver sur le site. A la phase précoce, les macrophages sont recrutés sur le site de la lésion. Dans un premier temps les macrophages et les neutrophiles vont avoir une action détersive en phagocytant les débris nécrotiques. Ils produisent dans le même temps des cytokines et des facteurs chimotactiques qui vont attirer les cellules endothéliales pour former de néovaisseaux, et des cellules T elles même activées et sécrétrices de cytokines profibrosantes. Dans le même temps, les fibroblastes migrent vers le site, guidés par la néomatrice de fibrine et s'activent en myofibroblastes. Ce complexe mixte peuplé de macrophages, cellules T, myofibroblastes et néovaisseaux mêlés à une matrice de collagène, fibronectine et acide hyaluronique est appelé tissu granulaire.
- La seconde phase est la constitution du tissu cicatriciel. Les myofibroblastes activés produisent de grande quantité de collagène I et III dans la matrice extracellulaire. Cette phase de remodelage a un turn-over important de synthèse et dégradation des protéines de matrice extracellulaire avec un excès de collagène qui conduit à la formation du tissu cicatriciel. Au début, le collagène III prédomine puis est remplacé progressivement par le collagène I. Les fibres de collagène s'organisent en un réseau stable et compact.
- La troisième phase est la résorption du tissu cicatriciel. Ce procédé associe une réduction de la production de collagène par les myofibroblastes et une augmentation de la dégradation résultant d'une variation du ratio entre les métalloprotéinases (MMPs) et leurs inhibiteurs (*Tissue Inhibitors of MetalloProteinases*, TIMPs) produits par les macrophages, les granulocytes et les myofibroblastes. Il existe donc in fine un équilibre global entre une activité de synthèse de la matrice extracellulaire (surtout initiale) et une activité

protéolytique (surtout terminale) pour permettre la résolution du tissu cicatriciel. Le moindre déséquilibre entre les éléments (synthèse excessive ou protéolyse insuffisante) favorise la constitution de la fibrose chronique dans le tissu.

Les trois partenaires cellulaires intervenant dans la fibrose tissulaire en général ont des caractéristiques que nous retrouverons dans le muscle.

Le fibroblaste

Le myofibroblaste est considéré comme la cellule principale responsable de la fibrose. Son phénotype a été décrit par Gabbiani comme une cellule fibroblastique avec un cytoplasme riche en microfilaments contenant de l' α Smooth Actine (α SMA) et de la myosine [Gabbiani, 2003]. Le statut activé ou non des myofibroblastes dépend de trois facteurs:

- tension mécanique de la matrice collagénique [Tomasek, 2002],
- environnement riche en cytokines profibrosantes, TGF- β , interleukine 14 (IL-14) et IL-4 [Wynn, 2004],
- EIII-A fibronectine.

Trois sources différentes de myofibroblastes sont connues:

- activation de fibrocytes dérivés de la moelle osseuse quelque soit le tissu [Abe, 2001],
- des cellules résidentes mésenchymateuses (EMT) identifiés par exemple pour le foie [Iwano, 2002] ou d'autres tissus en dehors du muscle [Kalluri 2003],
- activation des péricytes résidents comme les cellules étoilées pour le foie et le pancréas [Bachem, 1998; Reeves, 1996] et les cellules mésangiales pour le rein.

Les myofibroblastes activés produisent:

- du collagène, de la fibronectine, de la laminine et des protéoglycanes,
- des métalloprotéases MMPs (MMP-2 et 3), des TIMP-1 et 2 [Arthur, 2000],
- des cytokines, le TGF- β en premier lieu.

La liaison au CD40 augmente l'expression de molécules d'adhésion cellulaire telles que ICAM-1 ou

vasculaire telles que VCAM-1 et celle des interleukines IL-1, IL-6, IL-8 et les prostaglandines et l'acide hyaluronique qui ont un rôle important dans le remodelage de la matrice extracellulaire [Schwabe, 2001].

Le macrophage

Le macrophage a un rôle central dans le processus fibrotique par sa production de TGF- β qui active en myofibroblastes les péricytes, les fibrocytes et les cellules mésenchymateuses résidentes (EMT). L'isoforme TGF- β 1 est une cytokine profibrosante parfaitement identifiée dans les processus de fibrose par exemple du poumon [Selman, 2001] et du foie [Sandersson, 1995]. La régulation de la production du TGF- β dans ces différents tissus permet de modifier la production de fibrose après lésion ou spontanément, confirmant le rôle clé pro-fibrosant de cette cytokine [Fukasawa, 2004; Sato, 2003]. Dans la cellule, les homodimères de TGF- β sont compactés en un complexe inactif avec des protéines LAP (*Latency Associated Protein*). La dissociation du TGF- β des LAPs est indispensable pour permettre une liaison à son récepteur. Cette dissociation est catalysée par de nombreux facteurs dont les MMPs, l' α β 6 intégrine-kinase, la plasmine, les cathepsines, la calpaïne et la thrombospondine [Gorelik, 2002]. Le signal du TGF- β est transduit par une kinase transmembranaire et des médiateurs intracellulaires connus comme les *Smads* [Massagué, 2000]. Les Smad3/3 heterodimères associés au Smad4 se transfèrent vers le noyau pour réguler la transcription des gènes codant pour le collagène I, III et l'intégrine ILK [Li et al, 2000].

Le PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*), produit par les macrophages est particulièrement actif sur les myofibroblastes [Bonner, 2004]. Il a un effet mitogène, chimioattractant et augmente la production de collagène et des molécules d'adhésion par le myofibroblaste. Le PDGF- α et PDGF- β et leurs récepteurs sont fortement impliqués dans les mécanismes de fibrose de du foie, du rein, du poumon, de la peau et des vaisseaux. Ainsi la Pirfenidone est un agent antifibrosant efficace dans le foie en bloquant les récepteurs du PDGF [Di

Sario, 2002].

Les macrophages M1 et M2 se différencient par leurs molécules de surface mais surtout leurs fonctions [Gordon, 2003]. Les macrophages M1 sont induits par les cytokines TH1 d'origine fongique ou bactérienne (Interféron γ) et par les produits de dégradation de la matrice [Duffield, 2003]. Ils n'expriment pas le CD163 au niveau membranaire. Les macrophages M1 et M2 ont des fonctions complémentaires. Les macrophages M1 ont:

- un rôle d'initiation dans la constitution de la fibrose en induisant l'apoptose [Canbay, 2003],
- un rôle dans la dégradation de la matrice extracellulaire par le biais des MMPs [Song, 2000],
- un rôle dans la résolution de la fibrose par la production des collagénases MMP 1 et 13. [Iredale, 1998].

Les macrophages M2 sont inductibles par les cytokines TH2 (IL4, IL-13, IL-10 et TGF- β), la phagocytose des cellules apoptotiques et les corticostéroïdes [Duffield, 2003]. Ils expriment fortement le CD163 et le récepteur mannose CD206 [Gordon 2005]. Les macrophages M2 sont hautement profibrosants et participent activement à la phase de remodelage dans la fibrose:

- ils produisent du TGF- β et activent la production de molécules de la MEC par les myofibroblastes,
- par le biais du PDGF et de l'IGF (*Insulin Growth Factor*), ils activent les myofibroblastes [Song, 2000],
- ils produisent un taux élevés de transglutaminase qui permet le maillage et la stabilisation de la matrice extracellulaire [Issa, 2004].

Par ailleurs, la synthèse du collagène dépend du pool de L-Proline (libre). Les cellules M1 agissent sur le système iNOS inductible, qui oxyde le substrat L-arginine pour former du NO et de la L-citrulline. Les cellules M2 expriment l'arginase 1 (ARG1) qui transforme la L-arginine en en L-ornithine. La L-ornithine est le substrat de deux enzymes, ODC nécessaire à la croissance cellulaire et OAT génératrice de L-Proline. La présence sur le même site de macrophages M1 et M2 régule

donc le taux de L-proline et donc la production de collagène. Les fibroblastes, eux aussi inductibles par les cytokines TH1 et TH2, ont le même profil d'expression iNOS et ARG1, respectivement [Witte, 2002].

Les lymphocytes

Les cellules T CD4⁺ sont régulatrices de la fibrose par les THelper1 (TH1) et THelper2 (TH2).

Les cytokines

Le système des cytokines produites par les TH2 CD4⁺ a un rôle important dans la genèse et l'amplification de la fibrose alors que celui des TH1CD4⁺ est plutôt suppresseur. L'interleukine 4 (IL4) produite par les cellules TH2 stimule la production de collagène I et III dans le foie, le poumon et les fibroblastes extraits de lésions de sclérodémie [Doucet, 1998]. Mais la majorité de l'effet profibrosant de TH2 est lié à la production de l'interleukine13 (IL13) qui stimule le phénotype M2 des macrophages mais aussi la prolifération des myofibroblastes et la synthèse de collagène [Wynn, 2004]. A l'opposé, l'interferon γ (INF- γ) et l'interleukine-12 (IL-12) produit par les cellules TH1 ont un effet antifibrosant en particulier l'INF- γ qui diminue la transcription des gènes codant pour le collagène et le TGF- β [Narayanan, 1992].

Les chimiokines

Les chimiokines qui régulent la fibrose sont des peptides chimio-attractants qui recrutent les leucocytes et les myofibroblastes sur le site de la lésion. Les différentes chimiokines CC associées à TH2 sont produites par les myofibroblastes activés et sont partenaires de la fibrose dans les différents tissus par exemple CCL2 dans le rein, CCL3 dans l'alvéole pulmonaire, CCL3 dans le poumon etc. Les chimiokines CXC ont un rôle dans l'angiogénèse associée à la fibrose et sont régulées par l'INF- γ produit par les cellules TH1 [Strieter, 2002].

Les intégrines

Les intégrines sont des protéines hétérodimériques transmembranaires impliquées dans les relations cellules-cellules et cellules-MEC. Elles peuvent modifier le comportement cellulaire par des tensions mécaniques comme par exemple l'activation des myofibroblastes par des kinases. L' $\alpha1\beta1$ intégrine qui relie la matrice extracellulaire au collagène et à la lamine est exprimée à la surface des myofibroblastes, des cellules endothéliales microvasculaires, des macrophages et des cellules T. Elle joue un rôle important dans l'organisation de la MEC et la régulation des MMPs. L'intégrine $\alpha\upsilon\beta6$, dont l'expression est limitée aux cellules épithéliales, induit l'expression de MMP-6 et intervient dans la liaison des LAPs et TGF- β . L'intégrine $\alpha\upsilon\beta3$ intervient dans la prolifération et la survie des myofibroblastes dans le foie et son blocage induit l'apoptose de ceux ci [Zhou, 2004]. L'intégrine-kinase ILK (Integrin Linked kinase) est régulée par la production de TGF- β dans le rein et intervient à différents niveau de la constitution de la MEC [Li, 2003].

D'autres intervenants dans le mécanisme de la fibrose sont connus comme le *Connective Tissue Growth Factor* (CTGF), profibrosant et exprimé par les fibroblastes qui augmente la synthèse de collagène de type I et la fibronectine [Riser, 2000].

Au total, la fibrose est souvent une réponse en partie inappropriée par perte des mécanismes de régulation suite à un traumatisme tissulaire. La plupart des revues générales insistent sur les mécanismes communs de la fibrose dans les tissus mais le muscle est très rarement cité alors que les mêmes partenaires cellulaires sont en jeu (les macrophages, les myofibroblastes et les cellules T) et les mêmes cascades de cytokines.

3.2.4 La fibrose dans le muscle normal et dystrophique

Au sein des différentes dystrophies, on oppose assez volontiers les DMC, où le tissu interstitiel fibrotique est au premier plan, sans processus majeur de nécrose-régénération et

d'inflammation et la DMD, où le processus de nécrose-régénération est au premier plan avec une régénération très active [Taniguchi, 2006]. L'étude des composants de la matrice extracellulaire par une analyse statistique multidimensionnelle des transcrits dans les DMC et la DMD montrent des régulation différentes. Les gènes des protéines de la MEC (Collagène I) sont exprimés de façon beaucoup plus franche dans la DMC alors que les gènes de régénération musculaire sont régulés négativement dès le début de la maladie. Cette équipe suggère que la DMC est une maladie primitivement fibrosante alors que la DMD serait plutôt primitivement inflammatoire. L'hybridation in situ des différents transcrits codant pour des gènes de la MEC montre une expression localisée au niveau de l'interstitium mais aussi des cellules musculaires elles mêmes.

3.2.5 Le collagène dans le muscle

D'après les analyses en immunofluorescence, la répartition du collagène I à IIIp-N collagène et de la fibronectine se fait dans l'endomysium et le périomyosium dans le muscle normal. Le collagène de type IV est limité à la membrane basale. Dans la DMD, la dermatomyosite (DM) et la polymyosite (PM), l'augmentation de la fibrose endo et périomyosiale est constituée de collagène I et III et de type I et III pN collagène et de fibronectine. Dans la DM et PM, l'augmentation de l'épaisseur de la paroi des vaisseaux est associée à l'accumulation de collagène de type I et III, de type I et III pN, de fibronectine et de collagène IV [Foidard, 1981]. Une équipe a étudié la corrélation entre l'intensité de la fibrose et le taux sérique de procollagène type I, le propeptide amino terminal du collagène de type III et la laminine chez 20 patients (16 DMD, 2 DM, 2 BDM). Il n'y a aucune modification significative chez les patients DMD par rapport au sujet normal.

3.2.6 Les cytokines profibrosantes dans le muscle

Le TGF- β 1 est la cytokine de référence la plus étudiée dans les processus de dystrophie musculaire et elle est très fortement exprimée dans le muscle des patients DMD [Yamasaki, 1994]. Bernasconi a clairement montré une augmentation de son expression dans le muscle par RTqPCR dans la DMD, plus élevée que dans le Becker rapportée au muscle sain. Alors

que la fibrose augmente progressivement avec l'âge, le pic maximum de cytokine TGF- β 1 se situe entre 2 et 6 ans et se stabilise à des valeurs moins élevées ensuite [Bernasconi, 1995].

Tomasek et al ont montré que la contraction mécanique de myofibroblastes (cultivés avec du triton X 100) favorise l'activation du TGF- β 1 via la signalisation Smad 2/3 et son action sur la matrice extracellulaire. La contraction mécanique des myofibres issues de DMD est génératrice de fibrose [Tomasek, 2002]. De la même façon, l'activation du TGF β 1 par la traction des α ν β 6 intégrines a un rôle dans la genèse de la fibrose pulmonaire et hépatique [Jenkins, 2006; Kim, 2006]. Le stress mécanique produit un signal moléculaire qui permet la différenciation des myofibroblastes et leur expression α -SMA.

La voie du TGF- β 1 CTGF est reconnue comme la voie profibrosante dans différentes situations pathologiques. Le niveau de mRNA de CTGF est fortement corrélé avec l'intensité de la fibrose dans la sclérodermie par exemple. Le VEGF, l'angiotensine II et les stéroïdes favorisent l'induction du CTGF. Le TGF- β 1 augmente l'expression de CTGF dans les cultures de myoblastes et de myotubes. Le niveau de mRNA de CTGF est augmenté à un stade précoce de la dystrophie chez le chien GRMD et dans la DMD [Sun, 2008] ce qui est à rapprocher du taux plus élevé de TGF- β 1 chez les jeunes patients DMD. Il est particulièrement exprimé dans le cytoplasme des cellules en régénération plutôt qu'au niveau de la lame basale des fibres quiescentes en immunohistochimie. La colocalisation de CTGF et TGF- β au niveau des fibroblastes et l'augmentation de CTGF dans le muscle DMD suggère que l'expression de CTGF est augmentée par le TGF- β et joue un rôle dans la genèse de la fibrose [Sun, 2008].

Trois modalités peuvent rendre compte de l'implication de CTGF dans les mécanismes fibrosants. A un taux élevé le CTGF a un effet bloquant sur la voie de signalisation Wnt, qui est connue comme un facteur clé de la régénération musculaire, en se liant au récepteur du complexe Wnt et peut expliquer ainsi la progression de la fibrose. Deuxièmement, le CTGF a un rôle dans la survie et la

différentiation des fibres en régénération, montré dans le rhabdomyosarcome humain. Troisièmement, le CTGF produit par les fibres musculaires en régénération pourrait stimuler la production de collagène et des protéines de la MEC par les fibroblastes adjacents et les myoblastes eux même [Brack, 2007].

Plusieurs équipes se sont attachées à définir le patron d'expression des protéines de l'inflammation, de la myogénèse, de la matrice extracellulaire dans le muscle de DMD. Sur une série de 19 muscles de patients DMD âgés de moins de 2 ans, Pescatori met en évidence à une phase présymptomatique, un patron d'expression des gènes déjà très différent du muscle normal à 2 ans. Cette signature “dystrophique” est caractérisée par l'induction de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire, le remodelage de la matrice extracellulaire et la régénération musculaire. A l'inverse, l'expression de certains gènes impliqués dans la production énergétique est diminuée (*PYGM*, Glycogène phosphorylase et *CAPRI* calcium dépendent RAS *GTPase activating proteine*). Des gènes de signalisation morphogéniques Wnt, Notch et (BMP) sont aussi mis en jeu de façon plus importante que dans le muscle sain [Pescatori, 2007].

3.2.7 Les glycanes dans la fibrose musculaire

La synthèse des mRNAs de décorine et biglycan est diminuée alors même que l'expression de TGF- β est augmentée dans le muscle squelettique de DMD [Zanotti, 2005]. En revanche, la synthèse de décorine et de biglycan est augmentée dans une culture de fibroblastes extraits du muscle DMD in vitro. Ces données suggèrent que les fibroblastes pourraient être une source propre de protéoglycans qui joueraient un rôle dans les lésions cellulaires musculaires [Fadic, 2006]. Les myotubes en culture de muscles de DMD ont un niveau d'expression de mRNA de la décorine significativement plus bas et du TGF β 1, de la myostatine et du collagène I et VI plus élevé. Les transcrits des métalloprotéases MMP2, TIMP-1, TIMP-2 sont augmentés dans les myoblastes DMD en culture. Ainsi, les auteurs considèrent que les cellules musculaires de DMD contribuent par elle même au processus fibrotique [Zanotti, 2007]

3.2.8 *Les métalloprotéases dans le muscle*

Les métalloprotéases ont un rôle clé dans la formation, le remodelage et la régulation de la MEC dans les situations physiologiques mais aussi pathologiques [Bani, 2008]. Le rôle des MMP-2 et MMP-9 a été analysé chez le chien CXMDJ déficient en dystrophine. L'activité gélatinolytique observée dans les foyers de nécrose endomysiale est liée à MMP-2 et localisée à la membrane basale. L'activité MMP-9 est co-localisée avec les cellules inflammatoires. Ces activités ainsi que les mRNA codant pour MMP-2 et MMP-9 sont augmentés dans le quadriceps du chien CXMDJ par rapport au chien contrôle. MMP-2 a donc un rôle direct dans le remodelage de la MEC et la régénération musculaire alors que MMP-9 est directement lié à l'inflammation.

3.2.9 *Les partenaires cellulaires de la fibrose*

3.2.9.1 Les cellules satellites et le cercle vicieux de la fibrose-

Il a été montré que la production de collagène I dans le milieu de culture de myoblastes dérivés de cellules satellites musculaires affectent leur croissance et leur prolifération [Nadan, 1990; Saitoh, 1992]. L'équipe de Partridge en 2007 a réalisé différentes études in vitro à partir de cultures de fibres musculaires isolées de souris C57 et *mdx*. Les cellules satellites émanant des fibres musculaires de jeunes souris *mdx* (2 mois) expriment fortement les transcrits du collagène I et III et les protéines correspondantes ainsi que les facteurs de myogénèse (myogénine, etc). Chez la souris *mdx* plus âgée (>18 mois), deux populations cellulaires exclusives l'une de l'autre, apparaissent en culture, une à forte expression de facteurs myogéniques et qui ne synthétise pas de collagène et une qui n'exprime plus les gènes de la myogénèse mais produit du collagène I (potentiellement des myofibroblastes). L'expression du collagène I se réduit donc aux cellules non myogéniques. Cette séquence suggère fortement que la progression de la fibrose, en particulier du collagène, dans le muscle déficient en dystrophine modifie les mécanismes qui génèrent la matrice extracellulaire avec une reprogrammation d'une partie des myoblastes en myofibroblastes, agents profibrosants [Alexakis, 2007].

3.2.9.2 Les macrophages

Les macrophages ont un rôle important dans toutes les lésions musculaires, de déterision mais aussi de support pour la régénération musculaire à partir des cellules satellites [Chazaud, 2003; Tidball, 2007]. La majorité des macrophages recrutés après lésion musculaire, induite par exemple par la notexine est d'origine monocytaire avec un changement de phénotype de ces macrophages phagocytaires à la phase de déterision en macrophages antiinflammatoires qui stimulent la myogénèse et la croissance des fibres musculaires [Arnold, 2007].

3.2.9.3 Les cellules T

Les cellules T sont un des partenaires de la fibrose musculaire étudiés chez la souris *mdx* mais peu étudiés chez les patients DMD en dehors de données histologiques anciennes où leur présence est signalée [Engel, 1986]. Chez la souris *mdx*, les lymphocytes T jouent un rôle clé dans l'installation de la fibrose musculaire et des dépôts de collagène comme le prouve la diminution de la fibrose chez les souris déplétées en lymphocytes T(*mdx nu/nu*) et sa restauration après greffe thymique. L'expression du TGF- β décroît de façon concomitante à la déplétion en cellules T.

3.2.9.4 Les mastocytes

Récemment, Wehling a montré que les mastocytes, identifiés dans les régions de nécrose régénération chez les patients DMD, interviennent dans le mécanisme de la fibrose musculaire par la libération de MBP 1 (*Major Basic Protein*) chez la souris *mdx*. La protéine MBP1 induit une lyse des cellules musculaires in vitro et in vivo et favorise de ce fait le processus dystrophique. La déplétion des cellules éosinophiles par l'anticorps au récepteur chimiokine 3 réduit la lyse musculaire. La mutation nulle de MBP1 chez la souris *mdx* réduit la fibrose musculaire et cardiaque mais augmente le nombre des lymphocytes T cytotoxiques sans augmentation du taux d'interféron γ , de TNF α ou de NOS. Les éosinophiles pourraient donc jouer un rôle immuno modulateur encore mal élucidé dans le mécanisme de la fibrose [Wehling, 2008].

3.3 Conclusion

Les lésions musculaires dans la DMD ont été largement décrites dans les années 80 mais les mécanismes intimes conduisant à la constitution progressive d'une fibrose endomysiale ne sont pas encore bien caractérisés. L'interface entre la dystrophine et la matrice extracellulaire, la cascade des cytokines et le rôle clé du TGF- β sont bien identifiés mais le partenariat entre les différentes cellules (péricytes, macrophages, cellules T, myofibroblastes, cellules satellites) intervenant dans la constitution de la fibrose musculaire reste incomplètement élucidé.

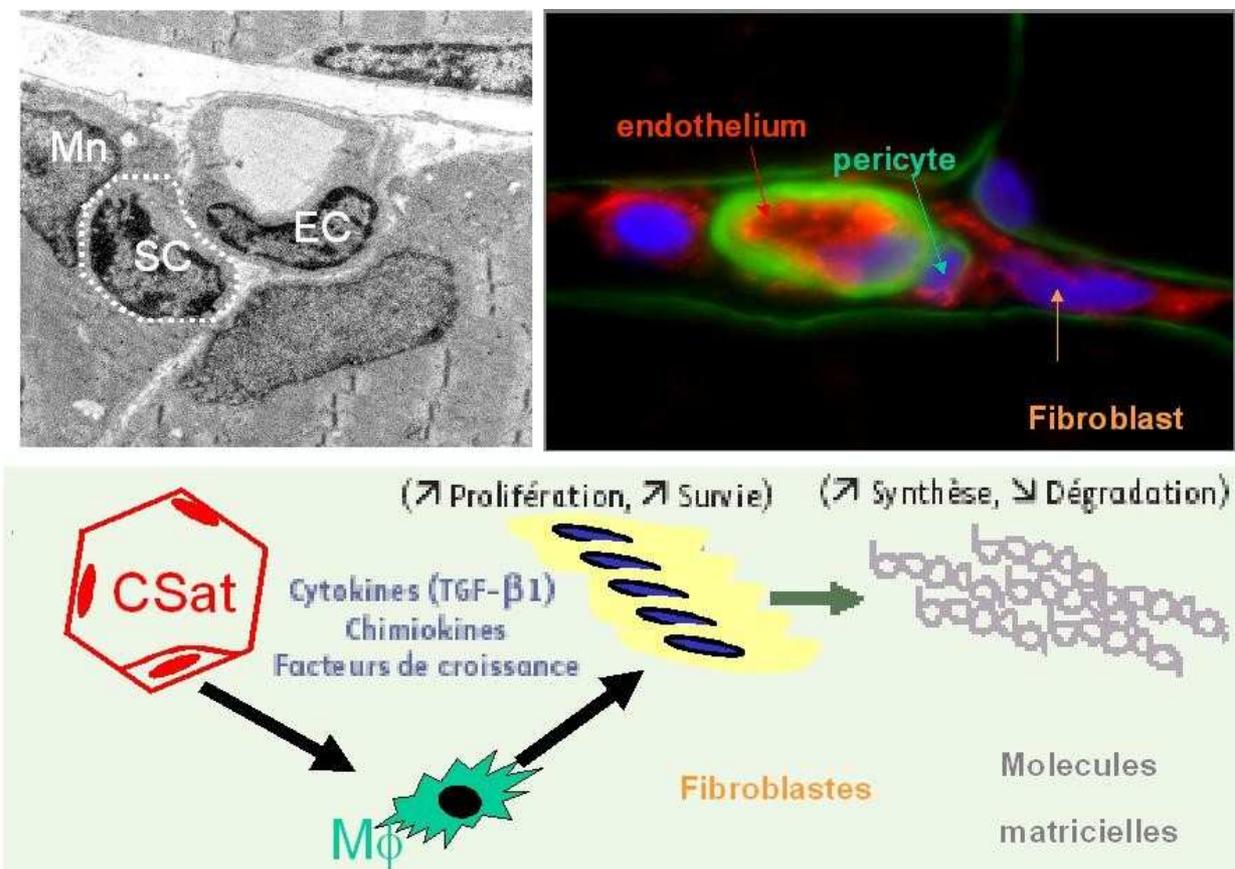


Schéma 6: Représentation de la niche vasculaire musculaire avec ces constituants cellulaires (péricyte, fibroblaste, cellule satellite, vaisseaux) et proposition d'un schéma d'activation du macrophage par les cytokines, les chimiokines et les facteurs de croissance produits par les cellules satellites et les cellules T régulant la synthèse de la MEC avec évolution de certaines cellules satellites vers un profil profibrosant type myofibroblaste.

Les modèles expérimentaux de dystrophie musculaire de type DMD

4.1 La souris *mdx*, un bon modèle de DMD ?

Que nous apporte le modèle murin pour répondre aux différents mécanismes intervenant dans la dystrophie musculaire, inflammation et fibrose musculaire? L'analyse histologique simple des différents partenaires cellulaires et l'évolution naturelle des lésions musculaires chez la *mdx* puis la réponse à différents types de stress lésionnels permet de définir les grandes lignes du mécanisme de nécrose-régénération musculaire et les processus de remodelage de la MEC.

4.1.1 L'analyse histologique et fonctionnelle musculaire de la mdx

La souris *mdx* a été identifiée en 1984 [Bulfield, 1984] au sein d'une colonie de souris C57BL/10ScSn. L'absence de dystrophine a été confirmée en 1987 par Hoffmann et la mutation ponctuelle dans le gène de la dystrophine en 1989 [Sicinski, 1989]. Ce modèle murin paraît cliniquement peu atteint avec une survie un peu réduite (20-24 mois) par rapport à une souris sauvage (30 mois) [Tanabe, 1986; Torres, 1987]. Son évolution est aussi particulière sur le plan histologique avec une crise inflammatoire à J28 de vie [Cooper, 1989; Coulton, 1988] alors que ne se développent ensuite que très tardivement après 18 mois, des lésions de dystrophie musculaire dans le muscle squelettique des membres [Lefaucheur, 1994]. De 13 à 52 semaines le nombre de fibres est identique au témoin alors que le poids du tibialis antérieur (TA) augmente à partir de 10 semaines jusqu'à 50% par rapport au témoin C57. De façon parallèle la surface de section (*Cross Sectional Area* ou CSA) du TA augmente régulièrement (+50% à 6 mois). Il n'y a donc pas d'hyperplasie musculaire mais une régénération importante comme l'atteste la variabilité de la taille des fibres plus importante chez la *mdx*. La CSA des fibres dans le TA est augmentée de 50% à 6 mois à 25% à 52 mois avec une hypertrophie des fibres régénératives qui présentent par ailleurs de nombreuses segmentations (*splitting*). Le diamètre des fibres varie de 10 à 100 μm à 40 semaines pour un contrôle entre 20 et 70 μm . Après 12 mois, l'aspect est différent avec apparition progressive des fibres nécrotiques, des fibres hypercontractées et une diminution des fibres en régénération. Les

fibres centronucléées atteignent un plateau à 26 semaines avec 80 à 90% de fibres centronucléées témoignant d'un fort potentiel régénératif qui persiste jusqu'à 104 semaines de vie [Pastoret, 1995]. Le phénomène de nécrose-régénération dans les muscles des pattes varie d'un maximum de 7,5% dans le soleus à 3 semaines de vie lors de la crise inflammatoire de 28 jours à 3% dans le TA à 18 mois lors de phase de vieillissement. Le pourcentage de fibres nécrotiques se stabilise à 2 % dans le TA [Pastoret, 1995]. Le phénomène de nécrose régénération persiste de façon durable avec une augmentation des CK permanente et une forte variation du calibre des fibres et une hypertrophie de celles-ci comme dans la DMD. La réduction de la capacité de régénération du muscle chez la vieille souris *mdx* (>18 mois) est attribué à la diminution du nombre de cellules satellites et de leur moindre capacité à proliférer et à fusionner [Carlsoln, 1992]. La fibrose endomysiale n'est bien visible qu'après 18 mois et en particulier dans le soleus [Pastoret, 1993].

En 1991, Stedman démontre que l'évolution des lésions de dystrophie musculaire dans le diaphragme de la souris *mdx* reproduit les lésions histologiques de la DMD humaine dès 6 mois avec une évolutivité beaucoup plus rapide que les muscles des pattes [Stedman, 1991]. L'installation d'une fibrose quantifiée par le dosage de l'hydroxyproline est validée à 12 mois ainsi que la diminution de la force isométrique du diaphragme de façon contemporaine. En 1993 Louboutin précise l'analyse histologique du diaphragme. Les anomalies apparaissent après 25 jours de vie. Les premières plages de nécrose sont visibles à 30 jours avec des groupement (clusters) de régénération. A 60 jours, 35% des fibres sont centralisées dans le diaphragme alors que 80% le sont dans le TA. Le processus de régénération est donc beaucoup moins important avec installation d'une fibrose endomysiale à partir de 60 jours. La proportion de la surface du tissu interstitiel par rapport au tissu total dans le diaphragme de la souris *mdx* est de 5% à 30 jours comme le modèle sauvage mais augmente à 10% à 120 jours et 30% à 270 jours [Louboutin, 1993]. Au total, l'atteinte histologique des muscles des pattes considérée comme très différente du modèle humain [Torres, 1986; Tanabe, 1986] est en fait simplement tardive et peu visible sur les souris étudiées de 20 à 60

jours. L'atteinte diaphragmatique est plus précoce histologiquement et fonctionnellement.

Sur le plan fonctionnel, l'atteinte respiratoire en particulier du diaphragme est en fait assez précoce en terme de fatigabilité et l'insuffisance respiratoire est la cause du décès plus précoce. Chez la souris *mdx* de 6 semaines, l'analyse histologique montre une surface de collagène de 3,6% versus 1,1% pour la *C57* avec 25% de fibres centronucléées versus 0,3%.

Au même âge, l'analyse de la force isométrique du diaphragme est diminuée de 37% et le nombre total de cross bridge (CB) rapporté à la surface en mm² ainsi que la CB de force élémentaire est significativement diminuée [Coirault, 2003]. Les auteurs pointent le fait que la dysfonction du diaphragme est précoce avant même la diminution du nombre de fibres musculaires et l'installation massive de la fibrose.

L'apparition d'une cyphose tardive chez la souris *mdx* confirme l'atteinte des muscles paraspinaux et diaphragmatiques. Laws a réalisé un indice de mesure de la cyphose chez la souris et a montré que celui-ci était anormal dès l'âge de 9 mois et s'aggravait entre 10 et 17 mois associé à une réduction de la cage thoracique et donc du volume respiratoire. Cette cyphose sévère est associée à la présence d'une fibrose, dans le diaphragme, les muscles intercostaux et paraspinaux mesurée par l'analyse de la surface de fibrose en rouge picrosirius et la quantité d'hydroxyproline chez des souris *mdx* à 17 mois par rapport à des souris contrôles. La capacité de travail des muscles est aussi diminuée alors que le pourcentage de fibres centronucléées est de 35% dans le diaphragme et de 50% environ dans les autres muscles impliqués [Laws, 2004].

La cardiomyopathie dilatée qui n'avait pas été rapportée chez la souris *mdx* jeune [Sicinski, 1990] existe en fait clairement, dépistée par le suivi échographique et le cathétérisme cardiaque après 9 mois. L'analyse histologique du myocarde de vieilles souris *mdx* met en évidence une fibrose ventriculaire gauche [Quinlan, 2004].

Des tests de fatigue musculaire chez la souris *mdx* ont été réalisés par les mesures répétées d'agrippage et d'impulsion et le décrétement entre les mesures [Connolly, 2001]. Ces mesures

faites à 3, 10 et 24 semaines et rapportées au poids de l'animal montre un décrétement d'emblée de 40% avec une fatigabilité musculaire qui s'accroît dans le temps par rapport aux souris témoins avec une prise de poids supérieure.

4.1.2 Les capacités de régénération après lésions musculaires

En 1991 Zacharias, après lésion musculaire (injection buvipacaine dans le TA) retrouve une capacité de régénération musculaire identique à la souris sauvage en trois semaines en terme de nombres de fibres et de noyaux centronucléés. Le nombre de cellules satellites chez la souris *mdx* jeune paraît plus important [Zacharias, 2000].

L'analyse de l'expression des marqueurs Pax7 et m-Cadherin (cellules satellites) et de l'utrophine comme marqueur de régénération musculaire chez la souris *mdx* comparée à la *C57BL/10J* a été réalisée dans 3 muscles différents (masseter, gastronectius et diaphragme). Elle montre une expression plus élevée de mRNA de Pax7 et d'utrophine et un nombre de cellules satellites par fibre plus important chez la *mdx* que la *C57*. Par contre, chez la souris *mdx*, il n'y a pas de corrélation entre l'intensité des phénomènes de nécrose-régénération et le taux de mRNA de Pax7 et d'utrophine, ni le nombre de cellules satellites [Yamane, 2005]. Après lésion par dépôt de notexine sur le diaphragme abasé de *mdx* par voie chirurgicale, Matecki teste la capacité de régénération du muscle diaphragmatique de la souris *mdx* par comparaison à la souris *C57*. Quatre heures après exposition à la notexine, 90% des myofibres sont lésées. A J5 la myosine est fortement ré-exprimée chez la souris *mdx* et *C57* et éteinte à J20. A J60, la souris *C57* montre une diminution de force musculaire isométrique de 25% associé à une augmentation du tissu conjonctif. La *mdx* présente un diaphragme qui retrouve une force identique malgré la persistance de lésions de dystrophie musculaire importante à la coloration classique HE [Matecki, 2004].

4.1.3 Expressions des différentes cytokines, collagène et metalloprotéases

4.1.3.1 Expressions de différents gènes dans le muscle MDX

Il a été réalisé l'étude de l'expression de 2751 gènes par *microarray* corrélée à

une méthode d'analyse statistique par cluster hiérarchique dans le muscle quadriceps à 8 semaines des modèles murins de dystrophinopathies (*mdx*), de sarcoglycanopathies (*Sgca null*, *Sgcb null*, *Sgcg null*, *Sgcd null*), de dysferlinopathies (*Dysf null*, *SJF dys*) et type sauvage (*C57Bl/6*, *C57Bl/10*) (Turk, 2005).

Clairement, les muscles dystrophiques (dystrophine et sarcoglycans) montrent un profil différent avec une forte diminution de l'expression des gènes impliquant le complexe glycosarcolemmique, une forte augmentation d'expression de gènes régulant les composants de la matrice extracellulaire. L'expression des gènes impliqués dans la réaction inflammatoire est augmentée en particulier dans les macrophages, les cellules T et les cellules NK. Les chimiokines et la voie du complément sont aussi activées. L'expression des gènes de la chaîne respiratoire mitochondriale est diminuée. Une différence entre les sarcoglycanopathies et dystrophinopathies murines se retrouvent pour un groupe de 46 gènes impliqués en particulier dans la myogenèse et semble liée à l'évolution de la dystrophie musculaire qui est plus sévère dans les sarcoglycanopathies alors que la souris *mdx* revient dans le temps à une expression proche de la souris sauvage.

4.1.3.2 Expression du collagène

Les techniques classiques de coloration par le rouge picrosirius montrent une accumulation du collagène avec l'âge chez la vieille souris *mdx* (52 mois) dont la quantité est triplée. L'analyse par hybridation in situ du procollagène I et III dans les différents muscles de la souris *mdx* (diaphragme et tibialis antérieur) confirme une augmentation de l'expression de mRNA de collagène I et III dans les régions de nécrose régénération et les régions riches en fibrose endomysiale et autour des vaisseaux dans le diaphragme. Toutefois le taux de procollagène III décroît avec l'âge de la souris chez la *mdx* et la *C57*.

Il y a donc deux mécanismes différents selon l'âge des souris:

- une augmentation des transcrits chez la souris jeune en particulier dans les régions de

nécrose régénération et de fibrose avec une production de cytokines profibrosantes par les cellules inflammatoires et les fibroblastes,

- une diminution des mécanismes de dégradation du collagène et de la matrice extracellulaire avec l'âge expliquant l'abondance de collagène chez la vieille souris *mdx* alors que l'expression des mRNA a diminué.

4.1.3.3 TGF- β

Le TGF- β est la cytokine la plus impliquée dans les mécanismes d'inflammation et de fibrose musculaire qui participe à la constitution de la dystrophie musculaire [Yamazaki, 1994]. L'expression du TGF- β 1 dans le diaphragme de la souris est élevée à 6 et 9 semaines de façon corrélée au collagène 1 mais se normalise à 12 semaines. L'adjonction de décorine fait diminuer la fibrose de 40% confirmant le rôle du TGF- β dans la constitution de la fibrose et l'effet antifibrosant de la décorine [Gosselin, 2004]. L'analyse spatiale et temporelle de l'expression du TGF- β 1, 2, 3 et des récepteurs T β RI, II, III dans le muscle de la souris *mdx* par RTqPCR et hybridation in situ montre une forte corrélation entre l'inflammation endomysiale et l'expression du TGF- β 1 [Zhou, 2006]. En effet, l'expression du TGF β 1,2,3 et de ses récepteurs est:

- plus importante dans le quadriceps (x5) que le diaphragme à 8 semaines
- a un pic d'expression à 8 semaines dans les deux tissus et décroît ensuite de façon plus marquée dans le quadriceps.
- Particulièrement importante dans les clusters de cellules en régénération et les cellules inflammatoires au niveau du QD et du diaphragme.

4.1.3.4 Les métalloprotéases

Le rôle des métalloprotéases chez la souris *mdx* a été récemment étudié. L'augmentation de MMP-9 est directement corrélée à l'activité TNF- α et à l'inflammation alors que l'activité MMP-2 est liée au phénomène de régénération mis en évidence par l'activité N-CAM. Les fibres N-CAM + sont présentes dans le soleus à 2 semaines, le gastronectmuis à 12 semaines, et à 24 semaines dans le diaphragme. A l'inverse, dans le diaphragme, l'activité MMP-2 est élevée

précocement et persiste confirmant le rôle du micro environnement musculaire dans la cinétique des différentes cytokines favorisant soit l'inflammation soit le remodelage et la régénération. [Bani, 2008].

4.1.4 Les régulations proposées chez la souris mdx

4.1.4.1 Surexpression d'IGF1

L'IGF1 est connu pour favoriser la régénération musculaire et la synthèse des protéines impliquées dans les phénomènes de régénération [Engert, 1996] et pourrait prévenir une partie des phénomènes de vieillissement musculaire. La surexpression d'un transgène d'IGF1 dans le muscle de la souris *mdx* [Musaro, 2001] permet:

- une amélioration globale de la force musculaire testée au niveau de l'EDL à 4 et 14 mois mais identique lorsqu'elle est rapportée à la surface de myofibres.
- une diminution de la myonécrose : la myonécrose évaluée au bleu Evans est diminuée et le taux de CK diminué de 40%. Dans le muscle EDL, à 4 mois le nombre de fibres centronuclées chez la *mdx* et *mdx / IGF1⁺* est identique; à 14 mois, les fibres sont plus larges et plus nombreuses. Dans le diaphragme, à 4 mois, l'hypertrophie musculaire macroscopique de 40% est réellement due à l'hypertrophie des myofibres et non à l'augmentation de leur nombre et se confirme à 14 mois où l'épaisseur du diaphragme est multipliée par trois. Le pool de cellules satellites du muscle dystrophique n'est donc pas réduit mais les signaux favorisant le régénération, normalement down régulés sont réactivés par l'IGF1.
- une réduction de la fibrose en particulier dans le diaphragme : la fibrose endomysiale, mesurée par un trichrome de Gomori et le dosage de l'hydroxyproline est réduite de façon significative à 14 mois. En théorie, l'IGF1 secrétée par les fibres musculaires peut stimuler les cellules satellites mais aussi d'autres types cellulaires comme les fibroblastes et augmenter le dépôt de collagène. Dans le cas de la souris *mdx / IGF1⁺*, l'effet bénéfique de l'IGF1 sur la régénération musculaire chez la jeune souris doit s'accompagner de la mise en place d'un environnement peu propice à l'afflux des fibroblastes à un âge plus avancé et empêchant le développement de la fibrose[Barton, 2002].

4.1.4.2 Les cellules T et leur déplétion

L'analyse détaillée des organes de la souris *mdx* âgée a montré qu'il existait

une quantité augmentée de collagène dans le muscle mais aussi dans le cœur, le poumon et le rein. Ces dépôts de collagène quantifiés par le dosage de l'hydroxyproline sont nettement diminués chez la souris transgénique *mdx /nu/nu* déplétée en cellules T. La restauration des cellules T par greffe thymique fait réapparaître des dépôts de collagène dans les différents tissus confirmant que les lymphocytes T sont un des partenaires de l'installation de la fibrose chez la souris *mdx* [Morrison, 2000]. La déplétion en lymphocytes T à 4 semaines de vie par thymectomie ou anticorps antiCD4 et CD8 ne modifie pas l'évolution de la souris *mdx* en terme de dépôts de collagène dans le diaphragme même si le taux sérique de TGFβ1 diminue. Si la déplétion a lieu entre J6 et J30, la fibrose diaphragmatique diminue, confirmant la nécessité d'une déplétion très précoce en lymphocytes pour obtenir un effet antifibrosant. Par ailleurs la déplétion doit être complète et des lymphocytes T résidents résiduels (lymphocytes T mémoire?) sont identifiés après thymectomie à J30 chez la souris *mdx* qui paraît avoir un taux plus élevé que les souris sauvages *C57* de lymphocytes T activés dans le muscle [Morrison, 2005].

4.2 Les modèles expérimentaux de lésion musculaire

4.2.1 Introduction

Différents modèles lésionnels musculaires existent qui visent à étudier la régénération musculaire et sa régulation cellulaire. La lésion est rarement analysée sous l'angle du potentiel effet fibrosant de cette lésion musculaire quelqu'en soit son mécanisme mais plutôt sous l'angle inflammatoire. Les modèles animaux utilisés sont soit le rat pour analyser le mode de réparation du muscle sain en particulier en médecine du sport, soit la souris, dans l'objectif d'analyser les mécanismes cellulaires et moléculaires de réparation musculaire dans des modèles murins de pathologie musculaire génétique.

Du point de vue mécanique, la lésion musculaire perturbe le réseau et les connections entre les myofibres (l'appareil contractile) et le tissu conjonctif en particulier la jonction myotendineuse et l'endomysium. Le cytosquelette contractile (myofibrilles) est en relation étroite

avec la matrice extracellulaire par les protéines subsarcolemmiques par le biais de l'actine, du complexe glycosarcolemmique dont fait partie la dystrophine, des intégrines et des laminines. En médecine du sport, la rupture de la jonction myotendineuse représente un modèle de lésion musculaire largement étudiée par l'équipe de Kalimo [Kääriäinen, 2000]. La nécrose rompt l'unité de l'appareil myotendineux dans les lésions expérimentales de type lacération, contusion, compression avec non seulement lésion myocytaire mais aussi de la lame basale sarcolemmique et de l'environnement endomysial. A l'inverse, les lésions de type toxique (bupivacaine et cardiotoxine) reproduisent davantage les phénomènes métaboliques de rhabdomyolyse où seule la nécrose des myofibrilles est au premier plan avec respect de l'appareil musculotendineux et du sarcolemme. Dans les lésions de type mécanique, les fibres lésées du fait de la destruction de l'appareil musculotendineux présentent aussi des lésions de type dénervation avec interruption des jonctions neuromusculaires.

4.2.2 Les lésions cytotoxiques

Elle permettent d'étudier la réaction inflammatoire musculaire après lésion de myonécrose. En effet, les agents utilisés sont des venins de serpents (notexine ou cardiotoxine) qui provoquent une lyse myocytaire sans détruire le pool de cellules satellites, ni les vaisseaux, ni les nerfs, ni interrompre les relations entre les myofibrilles et l'appareil musculo-tendineux.

Injection unique

Cette méthode permet de créer une lésion musculaire aiguë très différente des processus dystrophiques pathologiques mais permet de reproduire et d'évaluer les interactions cellulaires dans le processus de nécrose régénération. Pour Plat, la notexine produit une lyse myocytaire plus importante que la cardiotoxine (bupivacaine) avec une récupération plus lente [Plat, 2006]. La méthode la plus classique est l'injection soit sous anesthésie après incision de la peau dans le tibialis antérieur (TA) d'une dose unique de notexine de 40µl (la concentration de 10µg par ml), soit en transcutané à la dose de 10µl. D'autres équipes utilisent la cardiotoxine à forte dose soit

100µl (équivalent de 10 mmoles de Naja Nigricollis de chez Calbiochem) [Cohn, 2007; Goetsch, 2003].

La cinétique de la lésion

Le rôle des différents types cellulaires, en particulier des macrophages dans la détersion et la régénération de la lésion musculaire a été étudié après lésion toxique. Chez la souris *C57BL/6J*, la déplétion des monocytes et macrophages par clodronate diminue la capacité de régénération musculaire après lésion par injection de cardiotoxine. ainsi que l'expression de TGFβ1 dans le muscle évalué par *Western Blot*. L'implication de la voie COX2B a été mise en évidence par l'étude du niveau d'expression de COX2B des cultures de cellules myogéniques MPCs en présence de TGF-β1. Après lésion musculaire par cardiotoxine et adjonction de TGFβ1, le nombre de macrophages infiltrés augmente au niveau de la lésion. Par ailleurs chez la souris *COX2-/-*, cette augmentation n'a pas lieu confirmant la médiation de l'action du TGF-β1 par la voie COX2. En régulant l'expression du TGF-β1, PGE2 pourrait avoir un effet antifibrosant [Shen, 2007]. Le rôle des macrophages dans le support de la régénération musculaire en culture cellulaire a été démontré [Chazaud, 2003]. In vivo, les monocytes recrutés après une lésion musculaire par notexine se transforment en macrophages antiinflammatoires pour favoriser la myogenèse [Arnold, 2007].

Application locale sur le diaphragme de notexine

Après laparotomie sous anesthésie générale(AG), un héli-diaphragme est abrasé légèrement puis badigeonné avec un coton imprégné de notexine (10µg/ml). En maintenant l'animal incliné à 30 degrés, la contamination des autres tissus serait évitée et l'animal suturé au décours sans détresse respiratoire. A H4, 90% des cellules myocytaires sont lésées. Les capacités de régénération du diaphragme chez la souris *mdx* et *C57* ont ainsi été évaluées à J20 et J60 et montreraient en fait des capacités de récupération fonctionnelles meilleures chez la souris *mdx*. [Matecki, 2004].

Injections répétées

L'injection répétée de bupivacaine ou de sérum physiologique chez la souris *mdx* pendant une période de 12 mois montre une augmentation du collagène endomysial de 4,6 fois à 9 mois et 7,2 fois à 12 mois [Itagaki, 1995].

En vue d'évaluer le potentiel de régénération musculaire, une injection répétée hebdomadaire de bupivacaine (30mg/kg) durant 20 et 50 semaines dans le TA a été réalisée chez la souris *mdx* et *C57* versus une solution saline versus rien. Après un cycle de 20 injections, la fibrose endomysiale dans le TA est plus importante chez les souris traitées par bupivacaine que par soluté salé ou non traitée. La diminution de capacité de régénération n'est visible qu'après 50 semaines d'injection alors même que la fibrose endomysiale n'augmente pas par rapport au cycle de 20 semaines. Les auteurs concluent donc un peu rapidement que ce n'est pas la fibrose qui limiterait les possibilités de régénération mais les capacités propres des cellules satellites de la souris *mdx* [Luz, 2002].

4.2.3 Les lésions mécaniques

Les lésions mécaniques de type lésions musculaires par rupture de l'appareil musculotendineux ont une séquence assez stéréotypée et perturbent toute la voie de signalisation entre la MEC et l'appareil contractile [Kääriäinen, 2000].

- 0-24H: rupture myofibrillaire et hématome qui dissocie les fibres. Infiltration du pérmysium par les macrophages. Activation des cellules satellites à 12H.
- J2-J3: différenciation des cellules satellites en myoblastes et fusion des myotubes, phagocytose par les macrophages des myofibres nécrosées.
- J5: les myofibres régénérées commencent à adhérer au tissu interstitiel conjonctif. Les myotubes emplissent l'espace sarcolemmique évidé.
- J7: les myofibres régénérées s'étendent hors de l'espace de la lame basale
- J14: formation de mini jonctions neuromusculaires à la fin des fibres régénérées
- J21-56: organisation des myofibres dans le sarcolemme, migration des noyaux centronucléés à la périphérie des myocytes.

La technique par lacération chirurgicale

Elle a été mise au point par l'équipe de Huard en 1999 [Li, 2002]. Elle se fait sous anesthésie générale avec incision de l'aponévrose et une lacération par lame de bistouri chirurgical de 60% de la longueur, 50% de la largeur et 100% de l'épaisseur du muscle gastronectmuis. La peau et l'aponévrose sont suturées. L'analyse du muscle est ensuite réalisée de façon séquentielle et a permis à cette équipe de tester les différentes modalités de régénération du muscle et de remodelage de la matrice extracellulaire.

Après transplantation musculaire de cellules MC13 (*Muscle Derived Stem Cells*) dans le gastronectmuis chez la souris SCID (immunodéficiente), les cellules se différencient en myofibres (exprimant des marqueurs myoD, myogénine et desmine) alors qu'elles dérivent en myofibroblastes (exprimant l' α -SMA et la vimentine) après application de la technique de lacération [Li, 2002]. Li met donc en évidence la capacité des cellules MC13 à se différencier en myofibroblastes générateurs de fibrose dans un environnement propice (muscle lésé). Il confirme le rôle du TGF- β 1 en 2004 dans la transformation des cellules myogéniques en cellules profibrosantes par deux expériences [Li, 2004]:

- culture de cellules murines myogéniques C2C12 en milieu enrichi en TGF- β 1 favorise la synthèse autocrine par les myoblastes de TGF- β 1 et conséquemment de α -SMA et vimentine alors que la synthèse de MyoD et Myogénine décroît,
- après lacération l'expression de TGF- β 1 par les cellules myogéniques augmente dans le gastronectmuis lésé et des cellules myogéniques transfectées pour le TGF- β 1, transplantées dans le gastronectmuis, se différencient en myofibroblastes.

Cette cascade profibrosante est diminuée par l'administration de décorine de façon contemporaine à la lésion musculaire [Li, 2004]. Le transfert du gène de la décorine dans les myoblastes augmente leur différenciation en myotubes en culture et la régénération musculaire après lacération de muscle greffé par les cellules transfectées. La myostatine stimule la prolifération des fibroblastes en culture et leur différenciation en myofibroblastes.

La myostatine augmente l'expression du TGF- β 1 par les myoblastes C2C12 et

réciroquement le TGF- β 1 augmente l'expression de la Myostatine. La décorine stimule l'expression de la follistatine, antagoniste de la myostatine, et intervient comme agent antifibrosant. Le modèle KO murin pour la myostatine après lacération musculaire montre des lésions fibrosantes musculaires beaucoup moins importantes que la souris sauvage. Le TGF- β 1 et la myostatine co-localisent dans les myofibroblastes à la phase aiguë de la lésion musculaire [Zhu, 2007]. Outre la décorine inhibant la voie du TGF- β 1, la suramine, par inhibition compétitive avec le TGF- β 1, a aussi été évaluée à visée antifibrosante en culture cellulaire et sur la C57 après lacération [Chan, 2003].

Par ailleurs, sur le même type de lésion musculaire, l'administration d'IGF1 permet une meilleure régénération musculaire [Sato, 2003]. L'antiinflammatoire NS-398, inhibiteur de la cyclooxygenase2 (COX2), contrairement à l'effet espéré anti TGF- β 1, après lésion musculaire par lacération ralentit la régénération in vivo, augmente l'expression du TGF- β 1 et donc la fibrose musculaire. A la phase aiguë de la lacération, le nombre de macrophages dans le muscle lésé est réduit par rapport aux souris non traitées confirmant indirectement le rôle important des macrophages dans le phénomène de régénération [Shen, 2005].

La technique de lacération est utilisée par une seule équipe et constitue un modèle plus intéressant que les toxines pour analyser en particulier la constitution de la fibrose. Il paraît difficile à reproduire et n'est pas utilisé en particulier sur les modèles murins myopathiques en particulier la souris *mdx*.

La technique de dénervation au niveau de la patte [Murray, 1982]

La technique de dénervation par lésion du nerf sciatique par voie chirurgicale demande une AG et une microchirurgie précise puisqu'il faut inciser le nerf sciatique sur une longueur de 10 mm dans son épaisseur. Des lésions musculaires se constituent avec à J4 une atrophie des fibres musculaires, un afflux des cellules mononucléées dans la région pérисynaptique. Ces cellules mononucléées constituant un infiltrât interstitiel ne seraient pas d'origine sanguine

d'après immunomarquage au BrdU [Murray, 1982] mais d'origine fibroblastique avec un immunomarquage positif pour le collagène I et présence de filaments d'actine dans le cytoplasme [Connor, 1987]. L'accumulation de cellules interstitielles dans les régions périssynaptiques est associée à l'augmentation d'expression des protéines de la matrice extracellulaire telles que la tenascine C, la N-CAM et la fibronectine [Sanes, 1986; Gatchalian, 1989]. A J14, une fibrose interstitielle est installée, confirmée par immunomarquage en collagène I. La présence d'adipocytes à 4 mois dépend du fond génétique (absents chez la C57, présents dans la BALB/c). L'installation de la fibrose interstitielle empêcherait le processus de régénération après ré-innervation secondaire [Mochizuki, 2005]. Toutefois, la ré-innervation d'un muscle lacéré améliore la régénération musculaire au long cours (7 mois) [Lim, 2006].

Ce modèle lésionnel a été utilisé pour évaluer la participation des cellules dérivées de la moelle osseuse dans le processus fibrotique musculaire [Mochizuki, 2005]. De J4 à J14 post dénerivation, un afflux de cellules dérivées de la moelle osseuse s'accumule dans l'espace périssynaptique. Il s'agit de cellules dérivées du lignage de monocytes et macrophages (CD45+ et CD11b+). Elles expriment le TGF- β 1 mais pas le collagène 1 et la tenascine. Elles participent donc à la régulation du phénomène de fibrose sans en être les effecteurs directs. Les cellules interstitielles locales dérivées du muscle sont les réels effecteurs de la fibrose musculaire et expriment le collagène I et la tenascine. Il n'y a donc pas de cellules satellites dérivées de la moelle de donneur intervenant directement dans le fibrose dans ce modèle lésionnel [Mochizuki, 2005].

4.2.4 Conclusion: nécessité d'un modèle plus proche de la fibrose musculaire de la DMD

La nécessité de mettre au point un modèle lésionnel simple de réalisation et plus proche des lésions musculaires et de la fibrose installée dans la dystrophie musculaire des dystrophinopathies paraît indiscutable et fait partie du projet que j'ai développé.

4.3 Propositions thérapeutiques et essais chez la MDX

4.3.1 Action sur l'entrée du Ca^{2+} dans la cellule et effet antioxydant

Inhibiteur de la cyclophiline D

La *Mitochondrial Permeability Transition* (MPT) régule l'entrée du calcium dans la mitochondrie. La Cyclophiline D est une isomérase transmembranaire qui régule la MPT codée par le gène *Ppif*. Son inhibition protège des mécanismes de mort cellulaire médiés par l'entrée de calcium dans la cellule comme le montre le modèle expérimental de souris *Ppif*^{-/-}. La souris dystrophique *Scgd*^{-/-} délétée pour *Ppif* ne développe pas de lésion musculaire. Par analogie, les souris mdx ont été traitées par *Debio 025* un inhibiteur de la cyclophiline D de 4 à 10 semaines de vie. L'analyse du diaphragme, du gastronectius et du quadriceps montre une diminution significative de la fibrose et des centralisations nucléaires par rapport aux souris *mdx* non traitées [Millay, 2008].

N AcetylCysteine (NAC), antioxydant [Whitehead, 2008]

L'existence de canaux mécano-sensitifs activés par l'étirement musculaire (SACs) joue un rôle dans les lésions musculaires de la souris mdx. Les bloqueurs de SAC limitent l'entrée du calcium intracellulaire et limitent les lésions musculaires induites par l'étirement chez la souris mdx [Yeung, 2005; Whitehead, 2006]. L'entrée du calcium dans la cellule augmente la production de radicaux libres ou *Reactive Oxygen Species* (ROS) par la mitochondrie qui eux même augmentent la perméabilité membranaire au calcium. Ces mécanismes sont mis en jeu dans les lésions de dystrophie musculaire [Rando, 2002; Whitehead, 2006; Tidball, 2007]. La prise de NAC par voie orale durant six semaines chez la souris mdx montre in vitro une meilleure réponse du muscle quadriceps au stress mécanique induit par étirement avec une diminution des ROS, des centralisations nucléaires et de la production des protéines impliquées dans la voie NF kappa B. L'arginine, le thé vert [Buetler, 2002] et d'autres piègeurs (scavengers) de radicaux libres [Hnia, 2007] ont été testés comme agent anti-oxydant chez la souris *mdx*, inhibant secondairement les mécanismes fibrosants.

Pentoxifylline:

In vitro, la pentoxifylline en agissant sur l'entrée du calcium dans la cellule a un effet antifibrosant car elle réduit la prolifération de fibroblastes, stimule l'activité des collagénases, diminue le TGF- β dans les cultures de fibroblastes d'origine hépatique [Preaux, 1997]. In vivo, chez la souris mdx, l'administration de pentoxifylline durant 4 semaines ne permet ni une amélioration fonctionnelle du diaphragme au test mécanique in vitro ni une diminution du collagène diaphragmatique.

4.3.2 Action sur les cellules satellites des inhibiteurs de la déacétylase

L'administration [Minetti, 2006] quotidienne d'inhibiteur de la déacétylase soit de la trichostatine (TsA), du valproate de sodium (VPA) ou du phénylbutyrate (PhB) à des souris *mdx* à 12 semaines durant 3 mois a montré:

- une diminution des CK,
- une amélioration de la force de travail in vitro de l'EDL après traitement
- une augmentation de la taille des fibres, une diminution de la fibrose
- une augmentation de la production de follistatine

4.3.3 Action antiinflammatoire et antifibrosante

4.3.3.1 Halofuginone

L'halofuginone inhibe la production de collagène I dans des conditions pathologiques comme la fibrose pulmonaire [Selman 2001]. Il réduit la fibrose in vitro, en limitant la synthèse des métalloprotéinases MMP2 et du TGF- β 1 sur les fibroblastes de malades atteints de sclérodémie avec un effet anti TNF- α . Le traitement par halofuginone de la souris mdx âgée (8-9 mois) durant 12 semaines permet:

- une amélioration fonctionnelle de la récupération musculaire au grip test
- une amélioration de la fonction cardiaque à l'échographie cardiaque et respiratoire
- une diminution de la fibrose diaphragmatique et quadricipitale, du collagène I et III et de l'expression d' α -SMA, indicateurs de l'activité fibroblastique [Huebner, 2008].

4.3.3.2 Anti TNF- α

L'injection d'anti TNF- α (Remicade), qui bloque l'action du TNF- α , cytokine produite par les lymphocytes T, a été testée chez la souris *mdx* jeune à partir de J7 de vie avant la crise inflammatoire de J21. L'analyse à J18 et J28 de vie montre une diminution de la crise inflammatoire et des dommages myocytaires évalués par l'injection de Bleu Evans [Grounds, 2004]. L'évaluation à long terme à 12 semaines ne montre pas de résultat significatif au niveau du TA mais le diaphragme n'a pas été évalué.

4.3.3.3 Cyclosporine

La cyclosporine évaluée de 4 à 8 semaines de vie sur la souris *mdx* montre :

- une diminution des CK,
- une diminution des fibres centronucléées et des zones de nécrose régénération dans l'EDL,
- une amélioration des performances électrophysiologiques du diaphragme [De Luca, 2005].

4.3.3.4 Interleukine 15

L'interleukine15 (IL15) est une cytokine qui a un effet anabolisant. L'administration d'IL15 à la souris *mdx* durant 4 semaines améliore la fonction diaphragmatique et diminue l'infiltration collagénique du diaphragme sans modifier la population de cellules T in situ. Elle permet aussi une régénération musculaire après lésion toxique (buvipacaine) chez la souris C57 et *mdx* [Harcourt, 2005].

4.3.3.5 Les corticoïdes

L'utilisation de drogues antiinflammatoires en premier lieu les corticoïdes d'ailleurs beaucoup moins spécifiques a déjà été évalué chez la souris *mdx* avec un effet sur la crise inflammatoire. Rien n'est signalé sur un effet antifibrosant [Fischer, 2005].

4.3.4 Le losartan

Le losartan est un anticorps bloquant du récepteur de type I de l'angiotensine

II qui a une action antagoniste indirect sur le TGF- β et favorise in vivo la régénération et le remodelage musculaire [Cohn, 2007]. L'équipe de Cohn a montré chez la souris *fibrilline* $-/-$ mais surtout chez la *mdx* un bénéfice du losartan après lésion musculaire aigüe par cardiotoxine. Plus intéressant, un traitement chronique et précoce dès 4 semaines de vie, permet un bénéfice à long terme chez la souris *mdx* plus âgée (9mois):

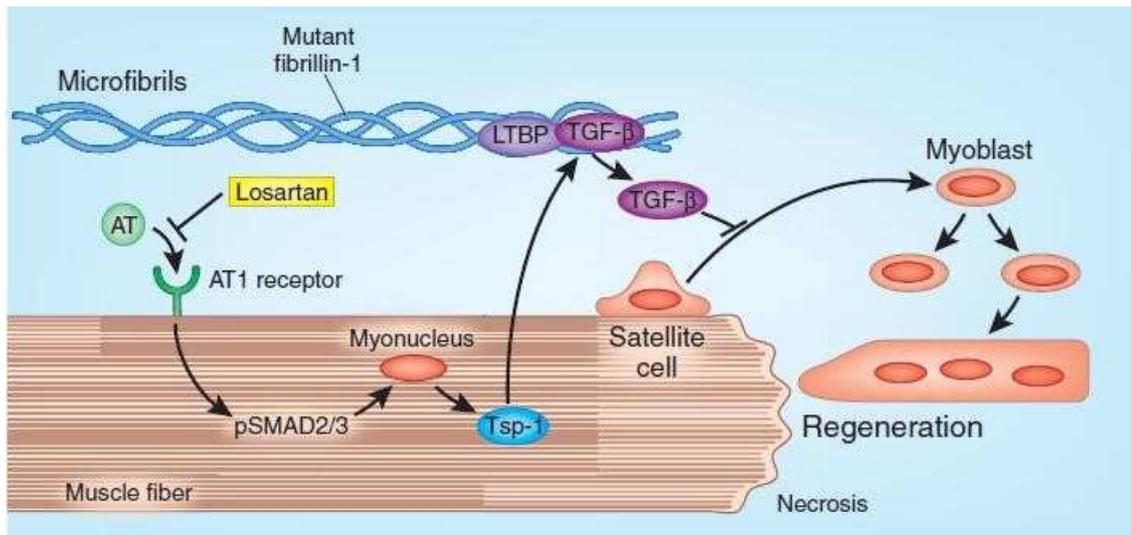


Schéma 7: le TGF- β inhibe la régénération musculaire par les cellules satellites et a un rôle profibrosant. Le losartan en bloquant le récepteur antithrombine 1 (AT1) agit sur la production de thrombospondine qui est un puissant activateur du TGF- β . Les ACE en inhibant l'enzyme de conversion diminue la production d'AT1 et de ce fait pourrait avoir un rôle antifibrosant. (Chamberlain 2007)

- le diaphragme de la *mdx* montre une expression importante de thrombospondine1(TSP-1) et une accumulation intranucléaire des pSmad2 témoignant d'une activité profibrosante médiée par le TGF- β . Cette activité est significativement diminuée chez la *mdx* traitée identique à la C57 non traitée.
- la quantité de fibrose diaphragmatique est significativement diminuée chez la souris *mdx* traitée
- la force musculaire isométrique de l'EDL chez la souris *mdx* traitée est améliorée de façon significative, comparable à la souris sauvage C57.

Dans l'éditorial qui précède l'article, Chamberlain souligne le potentiel antifibrosant de cette molécule mais aussi des inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) qui

interviennent sur la même voie. Les IEC sont déjà utilisés à visée protecteur myocardique chez les patients DMD et pourraient améliorer la fonction musculaire chez ces mêmes patients [Chamberlain, 2007].

Les méthodes d'analyses stéréologiques et statistiques utilisées

Le choix d'une méthode d'analyse stéréologique pour analyser les différents partenaires cellulaires impliqués dans la dystrophie musculaire de Duchenne et de pouvoir réaliser des analyses de corrélation avec les données cliniques par une analyse statistique multiparamétrique nous a semblé judicieux et innovant.

5.1 Les méthodes stéréologiques

Les méthodes stéréologiques permettent d'analyser des coupes de tissus en ultrastructure et de réaliser des mesures de surface, longueur, de proximité de certains partenaires cellulaires de façon statistique à partir d'un nombre suffisant de coupes, et d'un échantillonnage adapté.

Les microstructures biologiques n'ont pas une distribution uniforme et les mesures quantitatives de ces données nécessitent des spécifications topographiques et un choix représentatif des échantillons.

5.1.1 Définition

La stéréologie est donc un ensemble de méthodes essentiellement probabilistes qui permettent d'estimer des informations dans l'espace en deux ou trois dimensions (espaces R²R³) à partir de mesures réalisées dans un espace de dimension inférieur (espace R¹R²). Elle se fonde sur l'interprétation d'images planes (section ou projection) par des critères de probabilité géométrique. Seul un nombre restreint de paramètres ramenés à l'unité d'espace, peut être analysé. Les paramètres stéréologiques sont définis par rapport à un espace de référence. Dans la notion de paramètre, sont décrits le type de mesure effectuée, le type de mesure de référence, le compartiment d'intérêt et l'espace de référence.

5.1.2 Les règles internationales de l'International Stereology Society (ISS)

- Le paramètre s'écrit en lettre majuscule: V(Volume), A (Surface ou Area), L (Longueur ou Length), P (Point ou nombre de points), S (Surface d'enveloppe), N (Nombre de connexités)
- Cette lettre majuscule est suivie d'une lettre en indice, caractérisant le paramètre de l'espace

de référence: v, a, l, p (volume, surface, longueur, point)

- Ces deux lettres sont suivies d'une parenthèse dans laquelle sont nommés les compartiments d'intérêt et de référence.

5.1.3 Les principes de la stéréologie

Le principe de la stéréologie se fonde sur le fait que le plan image est issu d'un passage aléatoire d'une surface coupante à travers un volume, dans lequel différents éléments qui le composent sont répartis de façon aléatoire. Les profils des éléments solides apparaissent comme des surfaces, les surfaces comme des lignes et les lignes comme des points. La règle générale est donc qu'un solide à n dimension est vu comme une structure à (n-1) dimension (*Practical Stereology* Russ 2004)

Espace	Paramètres	Paramètres	Paramètres	Paramètres
R3	Vv(X) proportion volumique	Sv(X) surface spécifique	Mv(X) intégrale de courbure spécifique	Nv(X) Nb de connexité spécifique/unité de volume
R2	Aa(X) proportion surfacique	La(X) périmètre spécifique	Na(X) Nb de connexité spécifique/unité de surface	
R1	LI(X) proportion linéique	NI(X) Nb de connexité spécifique/unité de longueur		
R0	Pp(X) proportion de point			

Tableau 3: d'après Russ 2004.

L'échantillonnage

La meilleure stratégie qui garantisse une sélection de territoires représentatifs consiste à effectuer un échantillonnage systématique au hasard sur les coupes étudiées. En pratique, la position de départ pour déterminer le premier territoire est choisie en se référant à une table de nombres aléatoires. Puis les territoires sont sélectionnés en se plaçant avec un pas d'écartement régulier [Howard et Reed, 1998].

L'autre alternative est l'acquisition de l'intégralité de la section histologique qui

permet d'estimer la valeur moyenne et la valeur maximum d'un marquage et de rendre compte de la distribution focale ou uniforme des éléments mesurés sur la coupe. L'acquisition se fait à partir d'un microscope avec une platine motorisée et l'acquisition de clichés numériques jointifs. Certaines de nos données ont été acquises avec un *Coolscope* (Souris mdx et fibrose) et d'autre sur un *Olympus*.

Trois variables doivent être prises en compte

Le gradient: les variations spatiales sont fréquentes dans les structures biologiques et les propriétés globales du tissu doivent être prises en compte dans la taille de l'échantillon pour optimiser la distribution spatiale.

L'anisotropie: variation avec l'orientation du tissu. Les fibres musculaires d'un faisceau sont alignées selon l'axe macroscopique du muscle. Elles sont toutes orientées dans le même sens au sein d'un faisceau et ainsi distribuées uniformément dans le même plan, ce qui limite les erreurs liées à l'anisotropie plus fréquente dans des tissus moins organisés. Le choix de coupes toutes orientées dans le même plan avec des coupes transversales du muscle permet d'éviter les erreurs liées à l'anisotropie.

Les associations: La mesure quantitative d'associations positives ou négatives de différents éléments d'une structure est basée sur la comparaison de valeurs mesurées de propriétés qui confirment l'interaction des éléments et des valeurs conçues pour un modèle qui assure que la distribution est en fait indépendante.

La proportion de surface

La méthode la plus simple pour apprécier la proportion de surface est celle du comptage de point ou « *point counting* ». On peut estimer une surface en cherchant à la partitionner en petites unités de surface élémentaires dont la taille est connue et en comptant les éléments. Ces unités de surface sont matérialisées par un point. L'ensemble des points constitue une trame régulière dont chaque élément contrôle une fraction de surface. Cette mesure est entachée d'une part d'erreur par excès et d'une part d'erreur par défaut qui se compensent. Le choix du nombre de points

doit être réalisé en fonction de la précision désirée.

La proportion de surface peut être estimée par le nombre de points présents dans les régions à mesurer et du nombre de points couvrant l'espace de référence.

$$\begin{aligned} Aa \text{ (régions, espace de référence)} &= \text{Aire des régions d'intérêt} / \text{Aire de l'espace de référence} \\ &= P \text{ régions} \times S / P \text{ référence} \times S \end{aligned}$$

Aa est la proportion surfacique; S est la surface d'une unité; P *régions* est le nombre de points tombant sur l'objet; P *référence* est le nombre total de points couvrant l'espace de référence.

Le comptage de point peut être réalisé de deux manières différentes: interactive ou automatique. La méthode interactive utilise une grille générée par ordinateur et placée sur une image numérique. La seconde méthode utilise l'analyse automatique d'images numérisées. Chaque pixel est associé à une surface élémentaire, calculée à partir de la résolution xy du système d'acquisition. Le dénombrement de pixels réalisés en analyse d'images pour estimer une surface n'est qu'un cas particulier de la méthode du *point counting*.

La méthode d'analyse de points dans notre cas, est réalisée à l'aide d'une grille construite avec 56 intersections dans le logiciel *Simple PCI* qui se projette sur des images numérisées de biopsies musculaires. Chaque élément α est considéré lorsqu'il apparaît sur une des 54 intersections de la grille Na et sa surface relative rapportée à la grille est évaluée à $Na / 56$.

5.1.4 Les applications à l'étude des tissus

Ces méthodes ont été utilisées pour l'analyse des lésions neuronales dans la maladie de Parkinson [Koprach 2008], du tissu cardiaque et de l'ischémie du muscle cardiaque [Mühlfeld, 2004] mais aussi dans l'analyse des différents partenaires cellulaires musculaires dans des modèles expérimentaux d'exercices musculaires [Baker 2006].

5.2 Les méthodes d'analyse statistiques multiparamétriques

Pour analyser la population de 75 patients Duchenne de notre première étude et les corrélations entre les données cliniques et l'analyse morphométrique du muscle de ces patients dans

la seconde partie du travail, nous avons choisi des méthodes statistiques utilisées dans les analyses de population permettant de mélanger des variables nominales et ordinales sur des grands nombres de données avec des petites cohortes [Wilcox et al, 2003]. Ces méthodes par une approche exploratoire permettent de dégager des associations ou des sous groupes homogènes de données (dans notre cas patients ou données morphométriques) sans à priori avec une forte puissance d'analyse.

5.2.1 Les principes

L'analyse exploratoire de données (EDA) est utilisée pour identifier des relations entre des variables qui à priori ne sont pas attendues pour être liées. Différentes méthodes EDA peuvent être testées: [Van der Kooij, 2003]

- l'analyse en composante principale linéaire (LPCA),ou non linéaire (NLPCA),
- l'analyse de correspondance simple (SCA) ou multiple (MCA),
- l'analyse de clusters hiérarchique (HCA).

L'analyse en composantes principales (PCA) est une méthode de réduction du nombre de caractères permettant des représentations géométriques des individus et des caractères . Cette réduction ne sera possible que si les caractères initiaux ne sont pas indépendants et ont des coefficients de corrélation non nuls. La PCA est une méthode factorielle car la réduction du nombre de caractères ne se fait pas par une simple sélection de certains d'entre eux mais par la construction de nouveaux caractères synthétiques obtenus en combinant les caractères initiaux au moyen de facteurs. C'est une méthode linéaire car il s'agit de combinaisons linéaires où les variables sont des vecteurs dans un espace défini par les composantes principales. Les coordonnées des vecteurs (variables) sur les axes et les angles entre ces différents vecteurs déterminent les corrélations entre les variables. La spécificité de l'analyse en composantes principales est le fait qu'elle traite exclusivement des caractères numériques (âge du patient, mesure de la force musculaire, mesure morphométriques sur la biopsie musculaire etc), jouant tous le même rôle. La corrélation entre

différentes variables est évaluée par la variance.

L'analyse non linéaire de composantes (NLPCA) peut traiter des caractères qualitatifs (premier symptôme de la maladie, type de scolarité, etc), des variables ordinales (où l'ordre de classement est important témoignant par exemple d'un degré de gravité de la maladie), de variables continues ou discontinues. La mesure α de Cronbach est un paramètre utile qui permet de valider la qualité de la solution proposée et les relations entre les différentes variables. Cette valeur doit être supérieure à 0.7 pour estimer que la corrélation entre les variables est valide.

L'analyse de correspondance simple (SCA) ou multiple (MCA) est la méthode privilégiée de description des variables qualitatives.

L'analyse de correspondance simple est une méthode exploratrice de description statistique qui une fois les points représentés de façon satisfaisante dans un nombre suffisant de plans, consiste à étudier les distances entre les points ayant des coordonnées nouvellement calculées. Elle utilise des tableaux de contingence simple correspondant à la ventilation des individus selon deux caractères qualitatifs. En tant que méthode d'exploration, l'analyse de correspondances simples ne cherche pas à tester des hypothèses mais à faciliter la compréhension des données. Une représentation graphique dans un plan principal qui représente plus de 80% de l'inertie sera la solution où le premier axe sera celui où la variabilité est la plus forte et un second axe où la variabilité est plus faible mais où l'étude des contributions (équivalent de la notion de corrélation pour les variables quantitatives) validera ce second axe. La proximité entre deux modalités d'un même caractère définit une similitude de profil (proximité des points du graphique en un nuage de point).

L'analyse de correspondances multiples permet d'étudier p caractères qualitatifs sur n individus en tableau sous forme disjonctive. Elle permet de mêler des variables numériques et qualitatives. Le logiciel utilisé pour notre étude est le logiciel SPAD5.0 avec un codage des données soit en codage binaire soit en codage avec un rangement ordinal de 1 à 5 (cf annexe chap 6).

L'analyse de clusters hiérarchiques (HCA) vise à regrouper en différents clusters les individus présentant des similitudes. Le problème principal des méthodes de classification hiérarchique consiste à définir le critère de regroupement de deux classes ce qui revient à définir une distance entre classes. Tous les algorithmes de classification hiérarchique se déroulent de la même manière: on cherche à chaque étape les deux classes les plus proches, on les fusionne, et on continue jusqu'à ce qu'il n'y ait plus qu'une classe. Les résultats d'une classification hiérarchique doit être confirmée par l'examen des plans factoriels par une analyse de composante principale ou une analyse des correspondances. Dans notre recherche, le logiciel utilisé est Statgraphics Plus 5.

5.2.2 Les applications en médecine et biologie

Ces méthodes sont utilisées en médecine et biologie pour identifier à partir de variables phénotypiques et quantitatives biologiques des sous groupes homogènes de patients dans des pathologies très diverses:

- 4 sous groupes pronostiques de 91 patients lupiques avec 75 caractéristiques immunitaires [Tapanes 2000],
- 4 sous groupes phénotypiques de patients dyslipidémiques en vue d'analyse de liaison génétique [Wilcox, 2003],
- 2 phénotypes de spondylarthrites ankylosantes à partir de 190 familles multiplex [Porcher, 2005],
- des facteurs de risques de récurrence de néoplasie du col de l'utérus sur un suivi de 268 patients avec une infection initiale à papilloma virus [Frega, 2003].

Ces méthodes sont aussi utilisées pour identifier des groupes homogènes de patients à partir de données qualitatives en pédiatrie et déterminer ensuite des choix thérapeutiques ou de prévention:

- en épileptologie, pour identifier trois sous groupes pronostics à partir de 75 patients dans le syndrome de Lennox Gastaud déterminant une stratégie thérapeutique ultérieure différentes pour ces sous groupes [Kaminska, 1999],

- en psychiatrie, pour déterminer des groupes à risque psychiatrique à partir d'une grille d'évaluation de comportement chez les enfants d'âge préscolaire [Guralnik, 1990],
- pour définir des sous groupes phénotypiques de 105 enfants autistes sur la base de l'analyse de leur comportement en rapport avec la classification du DSM-3R [Van der Gaag, 1995],
- pour identifier les manifestations en rapport avec la douleur chez 101 enfants non verbaux déficients intellectuellement [Breau 2003],
- pour identifier cinq situations à risque d'abus sexuels chez l'adolescent et mettre en place sur les facteurs de risques identifiés des mesures de prévention [Bouvier, 1999].

En conclusion, dans tous les exemples cités, on notera que les effectifs se situent entre 60 et 100 patients, soit de relatifs petits effectifs avec des variables nominales pour beaucoup, confirmant la force de ce type d'analyse statistique par rapport aux analyses de liaisons classiques.

Mise en évidence de 4 profils évolutifs de Duchenne par HCA sur une série de 75 patients

6.1 Résumé

Hétérogénéité clinique de la Dystrophie Musculaire de Duchenne: définition de sous types et de critères prédictifs par une étude de suivi de cohorte à long terme.

Clinical heterogeneity of Duchenne muscular dystrophy: definition of subtypes and predictive criteria by a long term follow up study

L'hétérogénéité de la myopathie de Duchenne a été soulignée par Brooke dès les années 1980 mais un peu trop vite uniquement rattachée à la notion de quantité de dystrophine résiduelle dans le muscle dans les années suivant la découverte du gène (Nicholson, 1993). Notre expérience clinique confirmait cette impression de variations en terme de fonction musculaire, respiratoire, cardiaque et cognitive.

J'ai donc recueilli les données cliniques de suivi sur 10,6 ans d'une cohorte de 75 patients Duchenne parfaitement caractérisés au niveau de l'analyse musculaire (Biopsie musculaire avec immuno-histochimie pour les trois anticorps commercialisés de la dystrophine et analyse en Western Blot des protéines glycosarcolemmiques) et génotypage. Ces patients ont été suivis à l'Hôpital Saint Vincent de Paul par le Dr Michelle Mayer et moi même sur une période de 10,6 ans en moyenne (5-15,2 ans). Les données ont été collectées sur des tableaux Excel contenant des éléments anamnestiques (16), des éléments moteurs fonctionnels et orthopédiques (20), des éléments respiratoires (19), des éléments cardiaques (10), des éléments cognitifs, scolaires et génétiques (16).

Les caractéristiques générales de ces patients correspondent aux données de la littérature (tableau1). 56 % des patients ont un retard à la marche (>18 mois), 56% n'ont jamais couru, 31% n'ont jamais monté les marches d'escaliers sans support. Si on reprend 2 éléments principaux du score de Brooke, on notera que la capacité à se relever du sol est perdue à 8,3 ans et

celle à lever le coude du plan de table à 13,7 ans. En terme de prise en charge orthopédique, des rétractions des membres inférieurs sont fréquentes, débutant à 7,7 ans (6,3 à 10,3 ans). Des ténotomies des membres inférieurs ont été réalisées chez 42 enfants à un âge moyen de 9,6 ans au moment de la perte de la marche. Tous les patients sauf deux ont développé une scoliose apparue entre l'âge de 8 et 16 ans. L'arthrodèse du rachis a été réalisée chez 53 patients à un âge moyen de 13,2 ans. La fonction respiratoire était normale jusqu'à 10 ans que ce soit pour la CRF, le VR ou la CV. Une rééducation respiratoire par relaxateur de pression a été instituée dans 50 cas dans les mois précédant l'arthrodèse du rachis. Une ventilation nasale nocturne a été nécessaire chez les patients les plus âgés de notre série dans 14 cas, toujours après l'âge de 16 ans. Une cardiomyopathie a été détectée en échographie cardiaque chez 30% des enfants à 12 ans. 52 patients ont eu un traitement par IEC après l'âge de 10 ans pour les plus jeunes. 7 patients sont décédés, tous d'insuffisance cardiaque, 2 avant 15 ans et 5 après 20 ans.

Les données ont ensuite été codées en variables ordinales ou nominales (annexe 1) pour permettre une analyse multiparamétrique. Par rapport à deux axes moteur et cognitif, 4 sous groupes de patients se sont dégagés et ainsi caractérisés (figure 1).

- Le groupe A (20%) que l'on pourrait qualifier de **forme congénitale** présente une atteinte intellectuelle importante avec un retard psychomoteur d'emblée qui est le symptôme diagnostic, une marche tardive (>18 mois), une atteinte musculaire (perte de marche à 8,9 ans), cardiaque (72% ont une cardiomyopathie avant 12 ans) et respiratoire (arrêt de la croissance pulmonaire avant 10 ans et CV à 60% à 10 ans) sévère. Les CK initiales sont aussi plus élevées ($p < 0.01$).
- Le groupe B (28%) est une **forme classique** de DMD avec des fonctions cognitives limites (border line ou atteinte modérée) et évolution motrice médiane (perte de marche à 9,8 ans).
- Le groupe C (22%) n'a pas d'atteinte intellectuelle et surtout un **bon pronostic moteur** avec un âge de perte de marche supérieur à 11 ans, une atteinte respiratoire plus tardive ainsi que la scoliose (cf figure 3, $p < 0.01$).
- Le groupe D (30%) a les performances intellectuelles et scolaires les meilleures mais un **mauvais pronostic moteur** inférieur au groupe B et très différent du groupe C (cf figure 3).

L'analyse de la variation du testing musculaire dans les 4 sous groupes montre clairement un profil évolutif parallèle mais avec dès l'âge de 6 ans des valeurs de MMT plus basses pour le groupe A et D (figure annexe 2).

L'analyse du génotype de ces patients a montré une répartition, en terme de mutation ponctuelles de délétions et duplications du gène de la dystrophine, assez identique aux données de la littérature [Muntoni, 2006]. L'analyse de ces mutations, en tenant compte de leur siège dans le gène de la dystrophine, a permis un codage spécifique en prévoyant les différents transcrits de la dystrophine probablement impliqués par les mutations de chaque patient (cf annexe 1). Pour l'atteinte cognitive, une corrélation génotype phénotype a été identifiée avec un gradient croissant du sous groupe A à D pour les mutations avant l'exon 30 (figure 5). Les patients ayant une atteinte cognitive plus sévère présentent des mutations dans la partie C terminale du gène, après l'exon 44, et les trois patients avec une délétion emportant la Dp71 ont une atteinte intellectuelle sévère comme attendue. De plus, les altérations de l'électro-rétinogramme corrélées aux résultats génétiques montrent que les patients avec une mutation en amont de l'exon 30 ont un ERG normal ($p < 0.003$) et un QI > 70 ($p < 0.007$). (Rappel: les transcrits cérébraux et rétiens (Dp140 et Dp71) se situent après l'exon 30). En revanche, aucune corrélation génotype / phénotype n'a été trouvée pour l'atteinte musculaire.

Il nous a paru essentiel après caractérisation de ces sous groupes A, B, C, D de déterminer des critères pronostics précoces permettant de prévoir l'appartenance d'un patient à un sous groupe défini. Ces indicateurs pronostics ont pu être identifiés et confirmés comme valides sur une série indépendante de 34 patients suivi à l'hôpital Necker sur plus de 5ans et tous âgés d'au moins 12 ans à la fin du suivi (tables 4 et 5 de l'article).

- La variable «retard psychomoteur comme premier symptôme » permet d'identifier les patients du groupe A (Sensibilité 0.93, Spécificité 0.95). Deux autres indicateurs combinés renforcent la qualification pour du groupe A: l'âge de survenue avant 2 ans et le retard

mental sévère ou modéré (Sensibilité 0.93, Spécificité 0.98).

- La variable «âge de perte de marche après 11 ans» qualifie les patients du groupe C (sensibilité 0.78, Spécificité 0.96). Une variable de «score de testing musculaire des membres inférieur > 6 à 8 ans» associé à un niveau intellectuel normal ou border line permet de caractériser le groupe C (Sensibilité 1, Spécificité 0.94).
- Les groupes B et D se distinguent par l'atteinte cognitive toujours présente dans le groupe B et absente dans le groupe D (table 4).

Ces critères ont permis de classer de façon satisfaisante les 34 patients de la série 2: 8 en groupe A, 9 en groupe C et de répartir les 17 restants en groupe B « classique DMD » et groupe D «atteinte purement motrice» (table 5).

Au total, cette étude permet de confirmer l'hétérogénéité des patients DMD, de proposer des critères pronostics indicateurs des différents sous groupes pour de futurs essais thérapeutiques. L'absence de corrélation de la gravité motrice avec le génotype suggère l'existence de facteurs épigénétiques. Ces données ont conduit à réaliser une analyse précise morphométrique des biopsies musculaires initiales de ces patients qui font l'objet de la deuxième partie des résultats.

6.2 Données supplémentaires

Le codage utilisé et la définition des valeurs utilisées pour la MCA est rapporté dans les tableaux suivants. Pour simplifier la lecture, les définitions du codage et des valeurs utilisées ont été regroupé par thèmes en six tableaux: Génétique, Symptôme, Age de la perte des fonctions motrices, Prise en charge orthopédique, Intellect et scolarité et Variables cardiaques et respiratoires.

Définition des valeurs utilisées pour la MCA					
Codage	Symptômes				
	Initiaux	Age premiers symptômes	Délag de diagnostic	Phénotype	Acquisition de la marche
1	Marche sur la pointe des pieds	Néonatal	0,5 an	Normal	> 24 mois
2	chutes fréquentes	< 2 ans	1 an	Maigre	18 < à > 24 mois
3	2+4	2 - 4 ans	2 ans	Obèse	< 18 mois
4	Retard psychomoteur	4 - 6 ans	3 ans		
5	Hyper Ckémie	> 6 ans	4 ans		

Définition des valeurs utilisées pour la MCA								
Codage	Age de la perte des fonctions motrices							
	Montée des escaliers	Se relever du sol	Capacité à courir	Marche	S'asseoir seul	Elever le bras	Premier fauteuil	Rétractation des membres inf
0	incapacité	incapacité	incapacité		incapacité	incapacité	6 - 8 ans	4 - 6 ans
1	4 - 6 ans	4 - 6 ans	4 - 6 ans	6 ans	4 - 6 ans	6 - 8 ans	8 - 10 ans	6 - 8 ans
2	6 - 8 ans	6 - 8 ans	6 - 8 ans	7 ans	6 - 8 ans	8 - 10 ans	10 - 12 ans	8 - 10 ans
3	8 - 10 ans	8 - 10 ans	8 - 10 ans	8 ans	8 - 10 ans	10 - 12 ans		10 - 12 ans
4				9 ans	10 - 12 ans	12 - 14 ans		Jamais
5				10 ans				
6				11 ans				
7				12 ou > 12 ans				

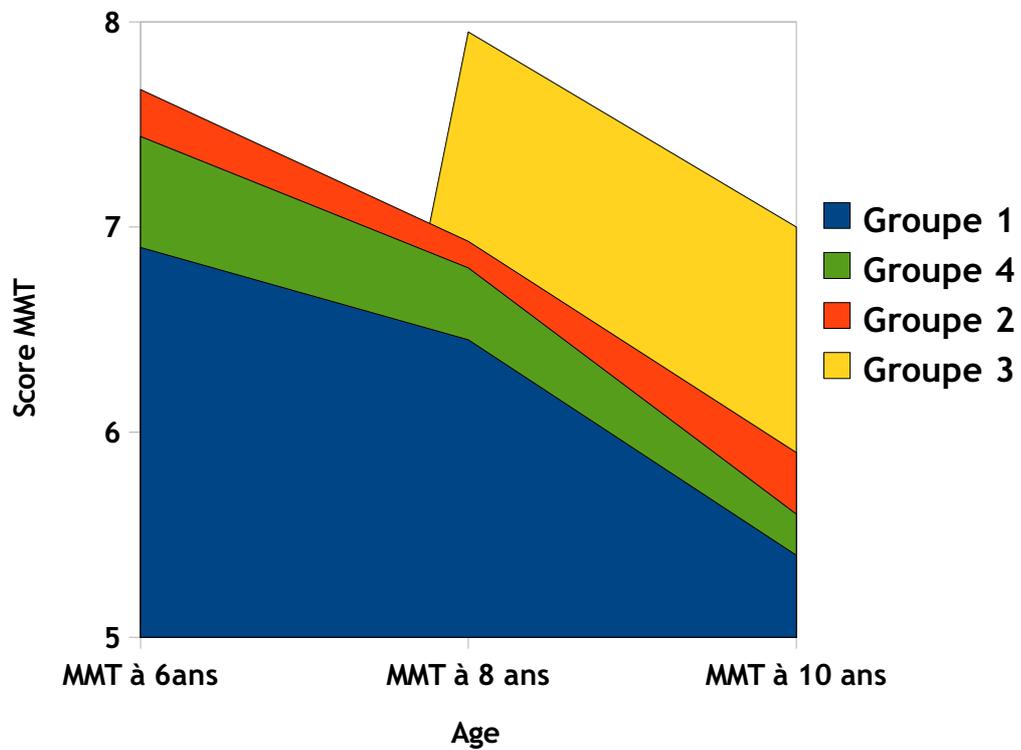
Définition des valeurs utilisées pour la MCA					
Codage	Intellect et scolarité				
	Type d'établissement	Niveau scolaire maximum	Redoublement	Quotient Intellectuel	Electro rétinogramme
0		illettré			
1	Domicile	primaire en retard	> 3 ou égal	Retard Mental Severe	anormal
2	pour retard mentaux	primaire	2	Retard Mental Modéré	normal
3	pour handicap moteur	collège	1 ou 0	Border line	non fait
4	adaptée CLIS ou SEGPA	Lycée		Normal	
5	Normal	Université			

Définition des valeurs utilisées pour la MCA		
Codage	Génétique	
	Génétique	Créatine Kinase au moment du diagnostic(UI)
1	délétion non connue	< 1000
2	délétion 1-29 = DP427	1000-5000
3	délétion 30-44 = DP260	5000-10000
4	délétion 45-55 = DP140	> 10000
5	délétion 52-62 = DP116	> 20000
6	délétion délétion >62 = DP71	

Définition des valeurs utilisées pour la MCA						
Codage	Prise en charge Orthopédique					
	Ténotomie des membres inf	Capacité a déambuler après chirurgie	Indice de rétraction	Fin de la verticalisation	Age de la scoliose	Chirurgie de la scoliose
0		0 mois		8 - 10 ans	Précoce < 12 ans	Précoce S+
1	Oui	< 6 mois	Orthèse et rétraction	10 - 12 ans	Normal > 12 ans	Classique
2	Non	6 - 12 mois	Pas d'orthèse et rétraction	12 - 14 ans	Absence	Préventive
3		12 - 18 mois	Orthèse et pas de retraction	14 - 16 ans		Pas de scoliose
4		> 18 mois	Ni orthèse ni rétraction	> 16 ans		Trop jeune

Définition des valeurs utilisées pour la MCA					
Codage	Variables cardiaques et respiratoires				
	LEVF < 55%	Arrêt de croissance pulmonaire	Augmentation du volume résiduel	Capacité vitale à 10 ans (%)	Différence de CV 14 -10 est v
1	atteinte cœur avant 10 ans	< ou égal à 10 ans	6 - 7 ans	< 50%	v < -40 ou égal
2	atteinte entre 10 - 12 ans	11 ans	8 - 9 ans	entre 50 - 80%	-40 < v < -30 ou égal
3	atteinte entre 13 - 15 ans	12 ans	10 - 11 ans	> ou égale à 80%	-30 < v < -20 ou égal
4	atteinte après 15 ans	13 ans	> ou égale à 12 ans		-20 < v < -10 ou égal
5	Pas d'atteinte après 15 ans	14 ans			v > -10

Evolution de la force musculaire globale (MMT)
dans les 4 groupes identifiés



6.3 Article soumis

Clinical heterogeneity of Duchenne muscular dystrophy (DMD): definition of sub-phenotypes and predictive criteria by long-term follow-up study

**Isabelle Desguerre,^{1,2} Christo Christov,^{2,3} Michele Mayer,⁴ Reinhard Zeller,⁵ Henri-Marc Becane,⁶
Sylvie Bastuji-Garin,⁷ France Leturcq,^{5,6} Catherine Chiron,⁸ Jamel Chelly,^{5,6}
and Romain K Gherardi,^{1,2}**

¹AP-HP, Centre de Référence des Maladies Neuromusculaires "Garches-Necker-Mondor-Hendaye", France; AP-HP, Groupe hospitalier Necker - Enfants Malades, "Neuropédiatrie", Paris; ²INSERM U841 "Mondor Biomedical Research Institute", Paris XII University, Faculty of Medicine, Department of Neurosciences, Team 10", 8, rue de Général Sarrail, 94010 Créteil, France, Isabelle Desguerre, paediatrician

²INSERM U841 "Mondor Biomedical Research Institute", Paris XII University, Faculty of Medicine, Department of Neurosciences, Team 10", ³IFR10, Plateforme d'Imagerie Cellulaire et Tissulaire, Créteil, France; 8, rue de Général Sarrail, 94010 Créteil, France, Christo Christov, assistant professor in neuropathology

⁴AP-HP, Groupe hospitalier Trousseau; Service de Neuropédiatrie, 26, av du docteur Arnold Netter, 75571 Paris, France, Michele Mayer, paediatrician

⁵AP-HP, Groupe hospitalier Cochin-Saint Vincent-de-Paul, Service de Biochimie Génétique, Hôpital Cochin, 27 rue du Faubourg Saint Jacques, 75679 Paris, France, Reinhard Zeller, research fellow

⁶Institut Cochin, Université Paris Descartes, CNRS (UMR 8104), 27 rue du Faubourg Saint Jacques, 75679 Paris, France, Henri-Marc Becane, paediatrician

⁷AP-HP, Groupe hospitalier Henri Mondor, "Epidémiologie et Santé Publique", Créteil, Professor Sylvie Bastuji-Garin, professor in epidemiology and statistics

⁸INSERM U663, René Descartes Paris V University, Paris, France, Catherine Chiron, neurologist

⁵AP-HP, Groupe hospitalier Cochin-Saint Vincent-de-Paul, Service de Biochimie Génétique, Hôpital Cochin, ⁶Institut Cochin, CNRS (UMR 8104), 27 rue du Faubourg Saint Jacques, 75679 Paris, France Paris, France, France Leturcq, biochemist

⁵AP-HP, Groupe hospitalier Cochin-Saint Vincent-de-Paul, Service de Biochimie Génétique, Hôpital Cochin, ⁶Institut Cochin, CNRS (UMR 8104), 27 rue du Faubourg Saint Jacques, 75679 Paris, France Paris, France, Jamel Chelly, professor in genetics and biochemistry

¹AP-HP, Centre de Référence des Maladies Neuromusculaires "Garches-Necker-Mondor-Hendaye", France; AP-HP, Groupe hospitalier Henri Mondor, "Pathologie", Créteil, ²INSERM U841 "Mondor Biomedical Research Institute", Paris XII University, Faculty of Medicine, Department of Neurosciences, Team 10", 8, rue de Général Sarrail, 94010 Créteil, France, Romain K Gherardi, professor, head of the department of Neurosciences

Correspondence to: Romain K Gherardi, Phone: 33.1.49812732; Fax: 33.1.49812733; e-mail: romain.gherardi@hmn.aphp.fr

Running title: DMD sub-phenotypes

Key words: Duchenne muscular dystrophy, sensitivity, specificity, natural history, therapeutic trial

Abstract

Background. To explore clinical heterogeneity of Duchenne muscular dystrophy (DMD), viewed as a major obstacle to the interpretation of therapeutic trials

Methodology/Principal findings. A retrospective single institution long-term follow-up study was carried out in DMD patients with both complete lack of muscle dystrophin and genotyping. An exploratory series (series 1) was used to assess phenotypic heterogeneity and to identify early criteria predicting future outcome; it included 75 consecutive steroid-free patients, longitudinally evaluated for motor, respiratory, cardiac and cognitive functions (median follow-up: 10.5 yrs). A validation series (series 2) was used to test robustness of the selected predictive criteria; it included 34 more routinely evaluated patients (age >12yrs).

Multivariate analysis of series 1 classified 70/75 patients into 4 clusters with distinctive intellectual and motor outcomes: A (congenital DMD, 20%): severe intellectual and motor outcomes; B (classical DMD, 28%): intermediate intellectual and poor motor outcome; C (moderate pure motor DMD, 22%): normal intelligence and delayed motor impairment; and D (severe pure motor DMD, 30%): normal intelligence and poor motor outcome. Group A patients had the most severe respiratory and cardiac involvement. Frequency of mutations upstream to exon 30 increased from group A to D, but genotype/phenotype correlations were restricted to cognition (IQ>71: OR 7.7, 95%CI 1.6-20.4, p<0.003). Diagnostic accuracy tests showed that combination of "clinical onset <2yrs" with "mental retardation" reliably assigned patients to group A (sensitivity 0.93, specificity 0.98). Combination of "lower limb MMT score>6 at 8yrs" with "normal or borderline mental status" reliably assigned patients to group C (sensitivity: 1, specificity: 0.94). These criteria were also predictive of "congenital DMD" and "moderate pure motor DMD" in series 2.

Conclusions/Significance. DMD can be divided into 4 sub-phenotypes differing by severity of muscle and brain dysfunction. Simple early criteria can be used to include patients with similar

outcomes in future therapeutic trials.

Introduction

Affecting approximately one in 3500 males, Duchenne muscular dystrophy (DMD) is the most common inherited myopathy whose poor prognosis is well known [1]. DMD has been classically considered stereotyped in its clinical presentation, evolution and severity [2,3]. However, inter-individual differences in terms of motor, respiratory and cardiac involvement had been reported before the identification of dystrophin [1]. Subsequently, rare studies documented that identical mutations can produce DMD phenotypes of different severity [4]. Adding to this clinical heterogeneity, brain dysfunction is observed in some DMD patients [5]. As recent preclinical studies have opened avenues for promising pharmacologic, gene and cell therapies of the disease [6], in-depth knowledge of DMD natural history is now mandatory. In fact, phenotypic variations were already shown to compromise results of clinical trials [7].

In the literature, large DMD series investigated on a follow-up basis are scant, out-dated or fragmentary. The largest study, analyzing the history of 473 Dutch DMD patients diagnosed from 1961 to 1982 [8], provides limited information, since neither muscle biopsy nor genetic analysis was available for most cases, data was collected by a questionnaire sent to physicians, and clinical practices were not described. Studies searching for genotype-phenotype correlations considered the whole spectrum of dystrophinopathies and not homogenous DMD cohorts [9,10]. Expectedly, inverse correlation was found between severity of disease and residual amount of dystrophin assessed by immunoblotting [10]. Studies comparing muscle testing scores in DMD patients [11-13] are mostly cross-sectional. Longitudinal evaluation has been limited to respiratory and cardiac functions studies which demonstrated the beneficial effects of ventilation support [14,15] and early angiotensin-converting enzyme inhibitor (ACEI) administration [16].

We report a comprehensive clinical analysis of 75 DMD patients, evaluated longitudinally by the

same team over a mean follow-up of >10yrs. This analysis substantiates DMD's clinical heterogeneity and identifies 4 phenotypes with different outcomes that can be predicted by simple clinical indicators. The applicability of these indicators was then tested in a second series of 34 patients.

Patients and methods

1- Patients

DMD diagnosis was performed from 1990 to 2000 at Saint-Vincent-de-Paul hospital, Paris; inclusion criteria were: (i) absence of muscle dystrophin assessed by both immunohistochemistry (Dys1, 2, 3 moAbs, Novocastra, UK) and Western blot (dystrophin bands absent); (ii) genotyping performed (laboratory of molecular genetics, Cochin hospital, Paris); (iii) follow-up >4 yrs by the same team.

2-Follow-up

Children from series 1 (n=75) were systematically evaluated every six months by a multidisciplinary team for motor, respiratory, cardiac, and nutritional status and remained steroid-free. Physiotherapy was performed 2-3 times per week. Lower-limb contractures were prevented by nocturnal leg orthosis from age 6, and ultimately treated by tenotomy. Spinal arthrodesis was systematically performed from age 12. Respiratory care started when forced vital capacity (FVC) reached 11 or 30% of the theoretical value and included nocturnal monitoring of capillary PO₂ and PCO₂, intermittent positive pressure ventilatory (IPPV) daily support, and nasal non invasive nocturnal ventilatory (NINV) support in case of abnormal blood gas levels. Cardiac echogram was performed yearly and myocardial scintigram immediately before surgery; ACEIs were administered when left ventricular ejection fraction (LVEF) reached 55%. Children from series 2 (n=34) were aged more than 12yrs at data collection and had been evaluated and taken in charge at Necker hospital using standard procedures.

3- Clinical parameters

Initial exploration yielded 33 (out of 82) relevant items describing history of disease, muscle, cardiac, respiratory and cognitive functions, and genetics (Table1).

Manual muscle testing (MMT) using the MRC scale [14] was yearly performed, yielding upper limb (average value of 2x5 muscles), lower limb (2x4 muscles) and global (2x9 muscles) scores reported at ages 8 and 10. Respiratory function was yearly evaluated and 3 indices were derived from FVC, residual functional capacity (RFC), and residual volume (RV) expressed relative to theoretical values: (i) FVC decrease from 10 to 14yrs (Δ FVCV); (ii) RFC plateauing (age of pulmonary growth arrest); (iii) onset of RV increase (age of involvement of expiratory muscles). Cardiac function was yearly assessed and the age at decrease of LVEF below 55% was considered. Body mass index determined at age 8 was classified as low, normal, or high according to reference curves [17]. Electroretinogram was scored as normal or abnormal.

Cognitive status was evaluated by both general intelligence assessment (IQ) and educational level. Wechsler Intelligence Scale [18] was used to measure, from age 6 to 10, verbal performance and full scale IQ. Patients were conventionally classified [18] as severely mentally retarded when IQ was <50 or impossible to assess because of pronounced behavioural disturbances; mildly mentally retarded ($50 < IQ < 70$); borderline ($71 < IQ < 84$); and normal ($IQ > 85$ or strictly normal academic level). Were also considered school delay; the maximal education level reached by patients, and the type of establishment attended according to the French educational model (Table 1).

4-Molecular and protein analyses

Muscle proteins were screened by immunohistochemistry and two multiplex Western blot analyses: (A) combination of Dys8/6C5 (NLC-DYS2/dystrophin C-ter), Cal3c/2A2 (NLC-CALP-12A2/calpain 3 exon 8), 35DAG/21B5 (NLC- γ -SARC/ γ -sarcoglycan), and Ham1/7B6 (NLC-Hamlet/dysferlin) monoclonal antibodies; (B) combination of Dys4/6D3 (NCL-DYS1/dystrophin

rod domain), Calp3d/2C4 (NLC-CALP-2C4/calpain 3 exon 1), and ad1/20A6 (NLC- γ -SARC/ γ -sarcoglycan) monoclonal antibodies (all from Novocastra) .

Mutations were conventionally identified [19]. Deletions and duplications were detected by quantitative fluorescent-PCR using genomic DNA, and all other types of mutations were detected either by sequencing of all DMD gene exons and exon-intron junctions, or by systematic analysis of muscle dystrophin mRNA, using RT-PCR and sequencing of 14 amplified overlapping fragments. Abnormalities were substantiated by segregation analysis [19]. Altered transcripts were inferred from each mutation [20]. The four internal promoters of the dystrophin gene give rise to several transcripts. Splicing between promoter-specific first exons and exons 30, 45, 56, 63 generate respectively the dystrophin isoforms Dp260, Dp140, DP116, and Dp71. Mutations before exon 30 only affect full length dystrophin. In addition to it, the other isoforms are successively affected, as the mutation progresses after exon 29 towards the C terminus.

5-Statistical Analyses

To detect correlations between clinical variables and homogenous sub-groups of patients, we used non-linear Categorical Principal Component Analysis (CatPCA) [21], followed by Hierarchical Cluster Analysis (HCA) [22]. CatPCA benefits from optimal scaling, handles together nominal (*e.g.* initial symptoms), ordinal (*e.g.* cognitive status), and interval (*e.g.* age at ambulation loss) variables, and is suitable for data recorded with uncertain units (*e.g.* MMT scores) [21]. Analysis was performed with SPSS 11.0 software. Original variables were reduced to 2 principal components with Cronbach's $\alpha \geq 0.70$ for each, allowing plotting of cases in a two dimensional space. Clusters were determined using Statgraphics Plus 5.0. Their stability was tested by 20 randomisations, each one providing a sample containing half of patients, and by repeating HCA on each sample; cases that did not remain in the same cluster on two HCA were considered unclassifiable [21]. To identify early predictive indicators of different outcome patterns, we used a comprehensive set of diagnostic

accuracy tests (sensitivity, specificity, kappa, accuracy, positive and negative predictive likelihood values), as previously recommended [23]. These tests were calculated using the Diagnostic Effectiveness module of SISA [24]. Comparisons in figures 2-4 indicate differences between clusters established by multiple range post-test with ($p < 0.05$), following a significant Kruskal-Wallis test (Statgraphics 5.0 Plus). Two-sided p-values are reported, 95% confidence intervals of means or proportions, or box-and-whisker plots (10th, 25th, 50th, 75th, 90th percentiles) represent data scatter.

Results

1-Global population characteristics (Table 1)

Follow-up of the 75 patients from series 1 ranged from 4.0 to 18yrs (mean 10.2). Most patients (n=41) were older than 16 at end-point. Clinical characteristics are listed in table 1. Briefly, 56% of patients had delayed walking (>18mo), 56% had never been able to run, and 31% to climb stairs without support. Ability to rise from floor was lost at 8.3yrs, and to elevate arms at 13.7yrs. All patients had scoliosis, diagnosed from age 9 to 16. Lower limb tenotomies were performed at 9.6yrs (n=42), and spinal arthrodesis at 13.2yrs (n=53). Patients usually had normal respiratory function until 10yrs. Cardiac failure was diagnosed in 30% of patients at age 12, 7 died from heart failure (2 before 15yrs, 5 after 20yrs).

2-Identification and characterisation of clusters

CatPCA identified cognitive and motor parameters as the main contributors to the structure of DMD symptoms, which could be adequately described by two independent principal components (figure 1). Six variables contributed to a "cognition" axis, including items describing intelligence and education and also age and symptoms at disease onset, and 4 to a "motricity" axis, including 3 items describing lower limb function plus "delay of diagnosis" which was longer in less severely myopathic patients (table 2).

HCA yielded an optimal 4-cluster solution. Cluster stability testing detected no more than 5/75 unclassifiable cases to be excluded (7%). The final solution consisted of 4 clusters (A: n=14, B: n=19, C: n=16, D: n=21). No statistically significant differences between clusters could be demonstrated for duration of follow-up: A 10.1 (95% CI: 8.0 to 12.2yrs), B 9.3 (95% CI: 7.3 to 11.4yrs), C 9.9 (95% CI: 7.8 to 12.0 yrs), D 11.1 (95% CI: 9.6 to 12.6 yrs), $p=0.47$, Kruskal-Wallis test. Clusters were characterised by highly distinctive phenotype and outcome on both cognition and motricity axis (figure 2, left and right columns, respectively). Importantly, clinical variables not used to constitute the model also showed significant differences between clusters (figures 3,4), thus providing basis for the recognition of 4 distinctive DMD subsets: group A (congenital DMD, 20%) very poor intellectual and motor outcomes; group B (classical DMD, 28%) intermediate intellectual and poor motor outcomes; group C (moderate pure motor DMD, 22%) normal intelligence and delayed motor impairment; and D (severe pure motor DMD, 30%) normal intelligence and poor motor outcome.

Group A was characterised by both precocity and severity of symptoms. Initial symptoms appeared at 1.3yrs (vs. ≥ 3.3 yrs in other groups) (figure 2) and always consisted of psychomotor delay. Patients had the poorest mental status (29% IQ<50; 57% IQ 50-70) and global outcome, as assessed by generally lower cognitive (figure 2), motor (figure 2,3), cardiac and respiratory (figure 4) indices than other groups; 13/14 (93%, 95% CI: 72 to 99%) of these patients were never able to run versus 48% (95% CI: 48 to 62%) in other groups ($p<0.005$). They had the highest CK levels at diagnosis (figure 4); 10/14 (72%^o had cardiomyopathy before 12 yrs, and 13/14 (90%) at 15 yrs.

Group B patients had clinical features and severity similar to the mean values of the overall DMD population (table 1), thus corresponding to what is considered the common clinical DMD profile in the literature. They had poor motor outcome (ambulation loss at 9.6yrs) and mildly impaired mental status; only 3/19 (16%) of patients with cardiac and respiratory dysfunctions before 12yrs. Group B

showed significantly better global outcome than group A, worse mental status than groups C and D, and worse motor status than group C (figure 2-3).

Group C patients had the best motor outcome (figures 2,3) and almost normal cognition (figure 2). Ambulation loss occurred at 12.5yrs, and MMT at 8 and 10yrs was the best measured among DMD patients in both the lower and the upper limbs; contractures and scoliosis onsets were delayed (figure 4); Since DMD diagnosis was delayed in these patients (age 7.2yrs), physiotherapy was applied later thus excluding better outcome linked to rehabilitation. BMI was intriguingly different, 11/16 (69%) (95% CI: 41 to 89%) of patients being thin vs. 18/54 (33%) (95% CI: 21 to 48%) in other groups ($p<0.02$).

Group D patients had a poor motor outcome similar to group B (figures 2,3), but strictly normal cognition (figure 2). Ambulation loss occurred at 10yrs. Patients had strictly normal cognitive status and an educational level similar to this of group C. However, 86% of D patients attended an ordinary educational establishment vs. 38% of C, 26% of B and 21% of A patients (all $p<0.007$ by Fischer exact test).

3-Genotype-phenotype analysis

Mutation was identified in 67 patients, including 77% deletions, 19% punctual mutations, and 4% duplications. Mutations are predicted to mainly affect expression of transcripts corresponding to DP427 isoform (mutation in the region of exons 1-29, $n=24$), DP427+DP260 (exons 30-44, $n=18$), and DP427+DP260+DP140 (exons 45-55, $n=20$). Additional involvement of DP116 (exons 56-62), and of DP116+DP71 (after exon 63) occurred in 2 and 3 patients, respectively.

Clinical classification of patients partially correlated with the gene affected region (figure 5), as mutations before exon 30 were found in increasing numbers from group A to D: 18% (A); 29% (B); 40% (C), and 55% (D). Further, we separately explored genotype impact on cognition and motor function. We found that frequency of mutations before exon 30 correlated well with IQ ($IQ>71$: OR

7.7, 95%CI: 1.6 to 20.4, $p < 0.003$) and retinogram (normal retinogram: OR 9.7, $p < 0.007$), whereas no correlation with any motor parameter could be demonstrated (e.g. age of ambulation loss > 10 yrs: OR 1.2, 95%CI: 0.4 to 3.4, $p = 0.44$). As expected, the 3 patients with mutation after exon 63 affecting the brain specific DP71 transcript had severe mental retardation [20] and were classified in group A (figure 6).

4- Selective indicators for patient classification

Then, we examined if a reduced set of criteria could be sufficient to classify patients. Using diagnostic accuracy tests, we searched for simple and widely available indicators allowing discrimination of patients from group A vs. B+C+D, group C vs. A+B+D, and group B vs. D. Results are listed in tables 3 and 4. Consistent with the precocity of their psychomotor symptoms, patients classified in group A were reliably identified by "psychomotor delay as first symptom" (sensitivity: 0.93, specificity: 0.95). In the same way, group C patients, whose motor handicap less severe had and occurred later in life, could be identified by "loss of ambulation > 11 yrs" (sensitivity 0.78, specificity 0.96). These two indicators appeared as suitable and simple surrogate criteria for recognition of group A and group C patients, respectively. Combinations of criteria also gave good results. Combination of "clinical onset < 2 yrs" with "mental retardation" (severe or mild) assigned patients to group A (sensitivity 0.93, specificity 0.98) with even higher positive predictive value than the criterion "psychomotor delay as first manifestation" (PPV: 0.93 vs. 0.81). Combination of "lower limb MMT score > 6 at 8 yrs" with "normal or borderline cognitive status" most reliably assigned patients to group C (sensitivity: 1, specificity: 0.94). Compared to the criterion "loss of ambulation > 11 yrs", combined criteria showed higher accuracy and offered the advantage of being usable at a much younger age. Combined criteria allowed exclusion of group A and C patients from the series. In the remaining population, IQ categorically segregated group D from group B patients. Notably, predictive combinations reliably identified patients classified by surrogate indicators as

congenital DMD (table 3) and moderate pure motor DMD (table 4).

To test the robustness of these predictive criteria, we examined an additional set of 34 unselected DMD patients aged more than 12 (series 2). Files contained data required to retest group A and C patients (age of onset with type of initial symptoms, n=32; and MMT at 8 yrs with mental status evaluation, n=34), but were not complete enough to classify patients by the multivariate model. Surrogate criteria, however, allowed satisfactory recognition of patients with clinically evident congenital DMD ("psychomotor delay as first manifestation", n=8) and with moderate pure motor DMD (identified *a posteriori* by "loss of ambulation >11yrs", n=9). Data for major motor parameters such as MMT of lower limbs, ages at losing ambulation or at onset of scoliosis, and of becoming wheel-chair-ridden were very similar for moderate pure motor DMD patients identified by multivariate analysis (series 1) or by surrogate criteria (series 2) (not shown). As shown in table 5, early predictive criteria in combination assigned patients in these two subgroups, with similarly good efficiency in series 1 and 2.

Discussion

In this study, we substantiated DMD's clinical heterogeneity and identified 4 subsets of patients with different cognitive and motor outcomes. Despite rough correlation of cognitive impairment with the mutated region in the dystrophin gene, and of low BMI with better motor outcome, neither genotyping nor nutritional status served to identify DMD subsets, whereas age and type of symptoms at onset, muscle strength at 8yrs, and IQ, did.

Unlike previous studies conducted on the whole spectrum of dystrophinopathies [9,10], we stringently included patients without any residual dystrophin at Western blot. Mutation could be identified in 89% of patients, a satisfactory prevalence for DMD series. Global characteristics of our DMD population were similar to those previously reported in terms of ages at diagnosis (5.2 vs. 5.3yrs), first walking (16 vs. 20mo), first symptoms (3 vs. 2.4yrs), and chair-ridden (10.2 vs. 9.5yrs)

[8].

Admittedly, our study has the drawbacks of any retrospective clinical investigation, such as variable follow-up duration which occasionally resulted in missing data for delayed events in the youngest patients (*e.g.* spinal arthrodesis or cardiomyopathy). A long-term follow-up (>10yrs) prospective study on the global clinical variables of DMD, however, is unlikely to be undertaken.

A strong point of the study is that patients were followed by the same medical team, collecting data on a systematic basis twice a year and maintaining homogeneous practices along the entire follow-up. For example, none of the patients had received steroids.

Multivariate classification approaches can be applied to small cohorts [25,26], and were used for example to subclassify spinal muscular atrophy patients (n=102) into 3 severity types [27] or to delineate specific epilepsy syndromes (n=72) for therapeutic purposes [22]. The power of such approaches reside in their ability to uncover, without *a priori* hypotheses, variables that participate to data structure [28]. These variables may seem poorly relevant when considered individually, *e.g.* “type of educational establishment” and “delay of diagnosis” strongly contributed to the stable 4-cluster solution.

The 4 DMD subsets mainly differed by cognitive and motor involvement.

Group A included 20% of patients with a condition similar to that previously described as congenital form of DMD [29]. These patients came early to medical attention (1.2yrs) because of psychomotor delay affecting speaking more than walking. Severe (1/3) to moderate (2/3) mental retardation was constant. Despite early onset, diagnosis was delayed considerably and was performed usually when motor deficit had become obvious. They had the poorest motor, respiratory and cardiac outcomes, *i.e.* the most severe striated muscle involvement. For example, 2/3 of them had cardiac dysfunction before age 12. Accordingly, the highest CK levels were found in this group. Finally, patients with psychomotor delay as the initial manifestation, with marked hyperCKaemia, and who have never

been able run, form an easily recognizable subset of severe DMD.

Group B designated as classical form of DMD, included 28% of patients with clinical features and functional parameters similar to the overall DMD population. Despite poor motor outcome and constant learning difficulties, these patients could not be easily recognised due to lack of specific or salient clinical characteristics.

Group C (moderate pure motor DMD) included 22% of patients, sharply contrasting with the others because of a better muscular status. As a corollary, both DMD diagnosis (7.2yrs) and rehabilitation onset were delayed in these patients. Intriguingly, most of them attended motor handicapped schools, and were thin according to BMI (69% vs. 31% in other groups, $p < 0.03$). Why nutritional status in DMD is highly variable remains unclear, but low BMI in group C patients supports the view that limited burden of the weakened muscles may be an advantage in DMD [30].

Group D patients (severe pure motor DMD) included 30% of patients with sharp contrast between severe motor involvements and perfectly spared cognitive functions. Complementary Western blot analyses were systematically conducted to explain discrepancy of muscle involvement in groups C and D patients. They failed to detect different levels of relevant muscle proteins including dystroglycans, sarcoglycans, dysferlin, and calpain (data not shown).

There were inter-group genotypic variations as mutations before exon 30 increased in numbers from group A to D. Location of the mutation selectively influenced cognitive but not motor outcome. When cognition was evaluated separately, correlations remained incomplete, except for rare mutations occurring after exon 63 that were exclusively found in group A and associated with severe mental retardation [20]. Lack of correlation with motor outcome suggests impact of other factors than the mutation itself on severity of the myopathy [31]. Whether these factors implicate genetic components remains to be established [4]. As genotyping appeared nearly useless to predict motor outcome, we searched for robust clinical indicators allowing early classification of almost any DMD

patient. Group A patients could be easily recognised from infancy by psychomotor delay occurring as initial symptom before 2 yrs. Moreover, group C patients, which clinical status worsens more slowly than usual in DMD, could be reliably recognised from 8yrs of age by combination of "lower limb MMT score >6" with "normal or borderline mental status". We were unable to use earlier indicators for this group, *e.g.* MMT at 6yrs, because many group C patients were not diagnosed at this age, due to less severe myopathy and longer diagnosis delay (usually >4yrs). Once A and C patients were excluded, group D patients could be easily distinguished from group B patients on the grounds of their constantly normal IQ.

With regard to therapeutics, it would be interesting to examine if “good responders” to steroids belong to a given sub-phenotype of DMD. More generally, trials which are in danger of being inconclusive due to lack of precise knowledge on DMD’s natural history [7], would strongly benefit from accurate selection of clinically homogeneous patient subsets. The simple combinations of robust predictive criteria identified in this study seem appropriate for this purpose.

Contributors: Isabelle Desguerre, Christo Christov, and Romain Gherardi were responsible for the design of the study. Isabelle Desguerre and Michele Mayer collected and interpreted clinical data; Reinhard Zeller, France Leturcq, Henri-Marc Becane, and Jamel Chelly executed and interpreted molecular and protein analyses, Christo Christov planned and carried out statistical analyses which were controlled by Catherine Chiron and Sylvie Bastuji-Garin. Isabelle Desguerre, Christo Christov and Romain Gherardi drafted the manuscript. All authors revised it critically for important intellectual content and approved the final version. Romain Gherardi is the guarantor.

Funding: this work was supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM); the funding source had no involvement in the authors’ work.

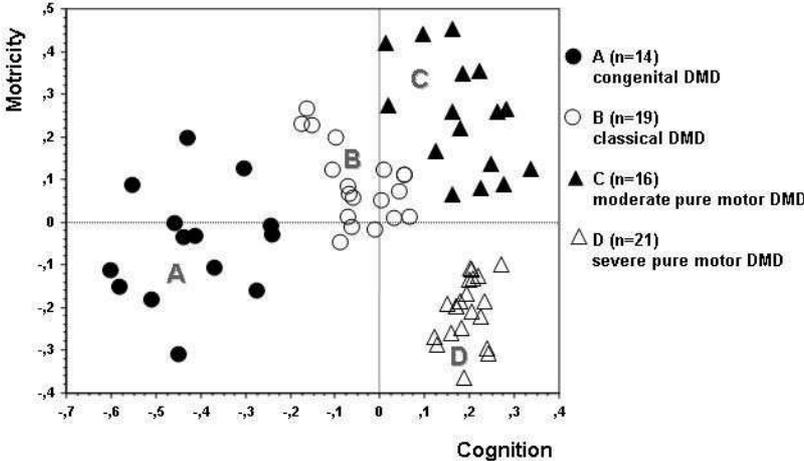
Conflicts of interest: none to declare

No ethical approval was required for this study.

Figures and Tables

Figure 1. The 4-cluster solution.

DMD patients were assigned to 4 clusters in the final hierarchical cluster analysis (linkage: Ward's method, metric: squared Euclidean distance) using CatPCA-derived XY coordinates in a plane defined by the cognition and motricity principal components (axes) (Cronbach's α : 0.859 and 0.721, respectively).



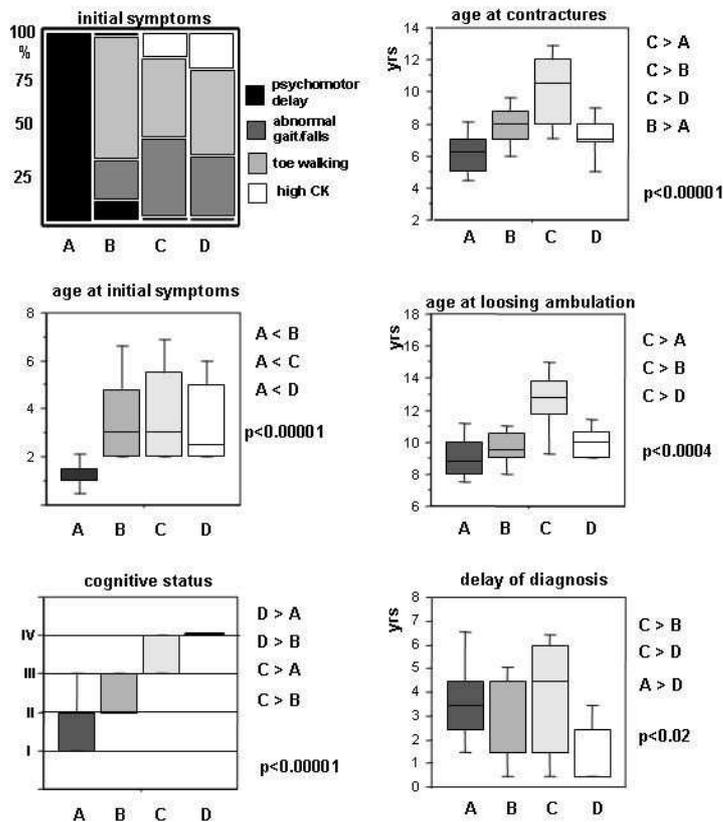


Figure 2. Variables constituting the “cognition” (left) and the “motricity” (right) principal components. Group A patients manifested early in life by psychomotor delay. “Cognitive status” measures increase from cluster A to D, also supported by an identical increase of “maximal education level” and an inversely symmetrical decrease of “school delay” ($p < 0.00001$ for both, data not shown). Accordingly, 86% of D patients attended an ordinary educational establishment vs. 38% of C, 26% of B and 21% of A patients (all $p < 0.007$ by Fischer exact test). A and C patients had values at each extremity of the motricity spectrum, also comprising the age of becoming “wheelchair-ridden” ($p < 0.00001$, not shown). “Delay of diagnosis” contributed to the integrity of the second principal component and, notably, to the delineation of cluster D (indicated p values are obtained by Kruskal-Wallis test; clusters were compared by a multiple range post-test with $p < 0.05$).

Figure 3. Muscle strength variables not used to constitute the model.

C patients had better muscle strength than A, B, or D patients and a retarded onset of scoliosis. These motor parameters, not used in the multivariate analysis, support the validity of the model. "Age at onset of physical therapy" trailed behind the evolution of muscle strength and motricity: no clear benefit from therapy could be demonstrated in this series (indicated p values are obtained by Kruskal-Wallis test; clusters were compared by a multiple range post-test with $p < 0.05$).

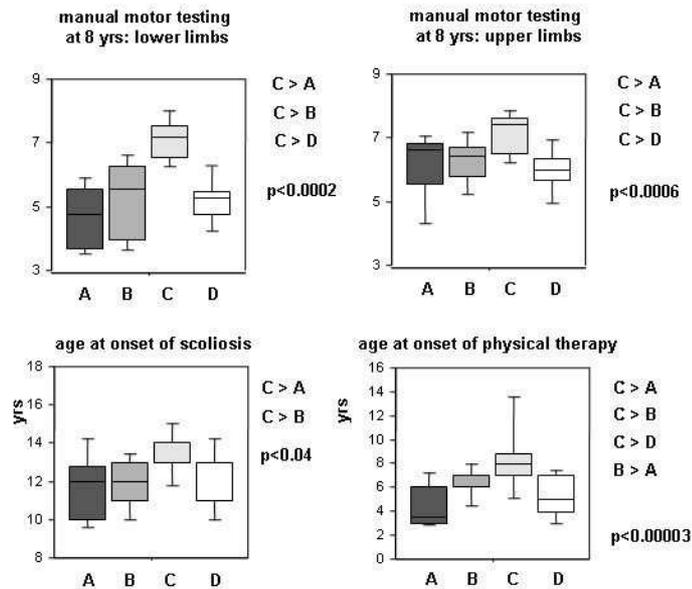


Figure 4. Pulmonary and cardiac function variables not used to constitute the model.

Group A patients had poorest respiratory and myocardial functions and highest serum CK levels at diagnosis. These variables, not used in the multivariate model, also corroborate its predictive relevance (indicated p values are obtained by Kruskal-Wallis test; clusters were compared by a multiple range post-test with $p < 0.05$).

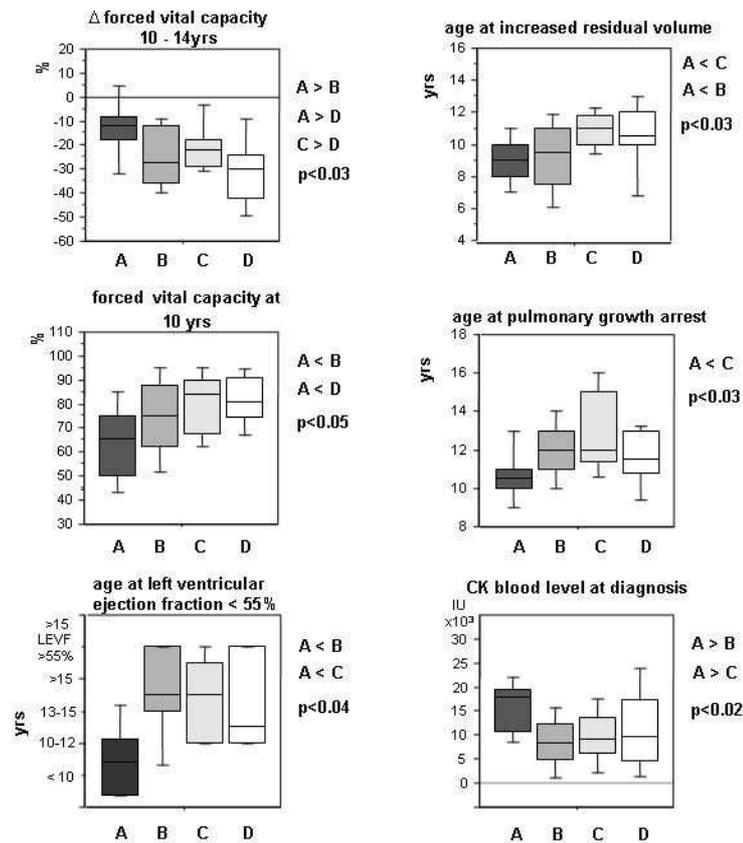


Figure 5. Genotype/phenotype correlations.

Proportion of patients with a mutation upstream to exon 30 steadily increased from group A to D. This ascent correlated with spared cognition (mental status: $p < 0.0003$) but not with motricity (age at ambulation loss: NS) (Fisher’s exact test).

Expectedly, the 3 patients with mutation after exon 63 affecting the brain specific DP71 transcript were classified in group A.

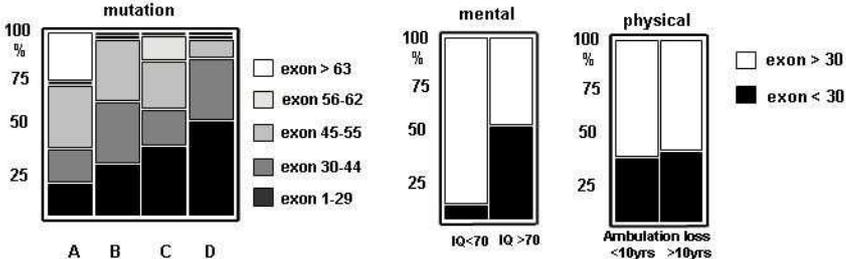


Table 1. Data describing patient's history of disease, muscle and cognitive functions (quantitative variable are mean +/- SD)

Table 1. Data describing patients' history of disease, muscle and cognitive functions (quantitative variables are mean ± SD)

History	Age at initial symptoms (yrs)	Initial symptom: psychomotor delay (%)	Initial symptom: abnormal gait (%)	Initial symptom: high CK (%)	Age at diagnosis (yrs)	Age at follow-up end-point (yrs)	Age at first walking (months)	Age at loss of ambulation (yrs)	Age at becoming chair-ridden (yrs)	Age at beginning of physiotherapy (yrs)	CK level (IU)	Phenotype fat/thin/normal (%)
Cluster A N=14	1.3±0.6	100	0	0	4.1±2.1	13.5±3.7	20.0±7.9	9.0±1.6	8.4±1.5	4.5±2.0	17765	50/29/21
Cluster B N=19	3.6±1.7	11	68	0	5.6±1.7	15.3±3.8	16.0±4.8	9.6±1.3	9.5±1.3	6.3±1.4	8166	32/42/26
Cluster C N=16	3.8±2.0	0	44	13	7.2±1.9	16.8±1.6	15.0±3.8	12.6±2.0	11.5±1.5	8.1±2.8	9000	12/69/19
Cluster D N=21	3.3±1.72	0	33	19	4.5±1.9	15.7±3.4	16.0±3.4	10.0±1.4	9.0±1.0	5.4±1.7	9566	29/38/33
Overall N=75	3.0±1.86	24	65	10	5.3±2.1	15.4±3.4	16.8±5.1	10.3±1.9	9.5±1.7	6.0±2.3	9680	32/40/28

Muscle function	MMT 9 muscles at 8 yrs	MMT lower limbs at 8 yrs	MMT upper limbs at 8 yrs	MMT from 9 muscles at 10 yrs	MMT lower limbs at 10 yrs	MMT upper limbs at 10 yrs	Testing of quadriceps at 10 yrs	Age lower limbs contractures (yrs)	Age scoliosis (yrs)	LEFVC <55% before 10 yrs (%)	Vital capacity at 10 years (%)	Age abnormal residual volume (yrs)
Cluster A N=14	6.5±0.7	6.7±1.5	6.3±0.9	5.5±1.0	4.8±1.0	6.1±1.1	2.1±0.4	6.3±1.4	11.6±2.0	37	65±16	8.9±1.5
Cluster B N=19	6.1±2.4	6.2±2.5	6.0±2.5	5.8±0.8	5.3±1.2	6.3±0.6	2.4±0.5	7.7±1.5	11.9±1.3	11	75±16	9.4±2.2
Cluster C N=16	8.0±0.7	8.0±0.7	8.0±0.8	7.0±0.6	6.8±0.6	7.2±0.7	3.1±0.7	10.2±2.1	13.2±1.4	0	80±14	10.9±1.3
Cluster D N=21	6.8±0.7	7.1±0.7	6.6±1.0	5.6±0.6	5.1±0.6	6.0±0.7	2.5±0.4	7.1±0.3	12.4±1.5	6	81±12	10.4±2.3
Overall N=75	6.7±1.5	7.0±0.5	6.6±1.6	5.9±0.9	5.5±1.1	6.4±0.9	2.5±0.6	7.8±2.1	12.2±1.6	27	75±15	9.9±2.0

Cognition	Severe mental retardation (%)	Moderate mental retardation (%)	Neuropsychological dysfunction (%)	Normal mental status (%)	Ordinary school (%)	Motor handicapped school (%)	Mental handicapped school (%)	School delay >3yrs (%)	Genetics deletion/ mutation/ duplication (%)
Cluster A N=15	29	57	14	0	21	43	36	86	66/33/0
Cluster B N=23	6	42	52	0	26	63	11	26	90/5/5
Cluster C N=16	0	0	31	69	38	62	0	6	73/26/0
Cluster D N=21	0	0	0	100	86	14	0	0	71/19/10
Overall N=75	6	24	27	43	48	43	9	24	77/19/4

Table 2. Variables' contributions to the two principal components (Cronbach's, a measure by default for the internal consistency of categorical principal components in the SPSS software, is 0.891 and 0.721), absolute values above 0.500 were retained to define the principal components.

Variable	Principal component	
	Cognition	Motricity
Cognitive status	0.891	-0.095
Maximal education level	0.884	-0.109
Education delay	0.840	-0.376
Education type of establishment	-0.814	-0.020
Age at initial symptoms	0.725	0.132
Initial symptoms	0.710	-0.353
Age at becoming chair-ridden	0.226	0.857
Age at first contractures in lower limbs	0.298	0.759
Age at loss of ambulation	-0.131	0.707
Delay of diagnosis	0.442	0.69

Table 3 Simplified indicators of congenital DMD (cluster A) derived from series 1.

Indicators	Sensitivity	Specificity	Accuracy	Kappa	PPV**	NPV**
Psychomotor delay as 1 st symptom congenital DMD defined by cluster analysis*	0.93 0.64-1.00	0.95 0.84-0.99	0.94 0.85-0.98	0.83 0.60-1.00	0.81 0.57-0.93	0.98 0.91-1.00
Age initial symptom < 2yrs + cognitive status I, II*** congenital DMD defined by cluster analysis*	0.93 0.64-1.00	0.98 0.89-1.00	0.96 0.84-0.99	0.91 0.68-1.00	0.93 0.68-0.98	0.98 0.91-1.00
Age initial symptom < 2yrs + cognitive status I, II congenital DMD defined by surrogate criterion (psychomotor delay as 1 st symptom)*	0.88 0.64-0.98	1.00 0.92-1.00	0.97 0.89-1.00	0.92 0.68-1.00	1.00 0.78-1.00	0.94 0.81-0.99

* Yate's Chi square: all p=0.00001, exact 95% confidence limits

** PPV and NPV, positive or negative predictive value

*** I: severe mental retardation, II: mild mental retardation (see methods)

Table 4 Simplified indicators of moderate pure motor DMD (cluster C) derived from series 1.

Indicators	Sensitivity	Specificity	Accuracy	Kappa	PPV	NPV
De ambulation loss > 11 yrs moderate pure motor DMD defined by cluster analysis*	0.78 0.59-0.97	0.96 0.91-1.00	0.91 0.85-0.98	0.77 0.53-1.00	0.88 0.71-1.00	0.93 0.80-1.00
MMT > 6 at 8yrs plus + cognitive status III, IV moderate pure motor DMD defined by cluster analysis*	1 0.72-0.99	0.94 0.80-0.99	0.96 0.84-0.99	0.88 0.59-1.00	0.83 0.55-0.95	1 0.80-0.99
MMT > 6 at 8yrs plus + cognitive status III, IV moderate pure motor DMD defined by surrogate criterion (ambulation loss > 11 yrs)*	0.83 0.51-0.97	0.94 0.79-0.99	0.91 0.78-0.97	0.78 0.49-1.00	0.83 0.55-0.95	0.94 0.81-0.99

* Yate's Chi square: all p=0.00001, exact 95% confidence limits

** PPV and NPV, positive or negative predictive value

*** III borderline normal, IV normal (see methods)

Table 5 Simplified indicators applied to congenital and to moderate pure motor DMD in series 2.

	Sensitivity	Specificity	Accuracy	Kappa	PPV**	NPV**
Age initial symptom <2yrs + cognitive status I, II*** psychomotor delay as 1 st symptom*	0.86 0.47-0.97	0.96 0.80-0.99	0.94 0.77-0.99	0.86 0.47-1.00	0.86 0.47-0.97	0.96 0.80-0.99
MMT > 6 at 8yrs plus + cognitive status III, IV*** ambulation loss > 11 yrs*	1.00 0.63-0.99	0.92 0.73-0.99	0.94 0.79-0.99	0.86 0.53-1.00	0.82 0.52-0.95	0.94 0.86-1.00

* Yate's Chi square: all p=0.00001, exact 95% confidence limits

** PPV and NPV, positive or negative predictive value

*** I severe mental retardation, II mild mental retardation, III borderline normal, IV normal (see methods)

REFERENCES

- 1 Brooke MH, Fenichel GM, Griggs RC, Mendell JR, Moxley R, et al. (1989) Duchenne muscular dystrophy: patterns of clinical progression and effects of supportive therapy. *Neurology* 39: 475–481.
- 2 Brooke MH, Fenichel GM, Griggs RC, Schumate JB, Pellegrino RJ (1983) Clinical investigation in Duchenne Dystrophy: Determination of the power of therapeutic trials based on natural history. *Muscle Nerve* 6: 91–103.
- 3 Mendell JR, Province MA, Griggs RC, Brooke MH, Fenichel GM, et al. (1987) Clinical investigation of Duchenne muscular dystrophy. A methodology for therapeutic trials based on natural history controls. *Arch Neurol* 44: 808–811.
- 4 Sifringer M, Uhlenberg B, Lammel S, Hanke R, Neumann B, et al. (2004) Identification of transcripts from a subtraction library which might be responsible for the mild phenotype in an intrafamilially variable course of Duchenne muscular dystrophy. *Hum Genet* 114: 149–156.
- 5 Bushby KM, Apleton R, Anderson LV, Welsch JL, Kelly P, et al. (1995) Deletion status and intellectual impairment in Duchenne muscular dystrophy. *Dev Med Child Neurol* 37: 260–269.
- 6 Kapsa R, Kornberg AJ, Byrne E (2003) Novel therapies for Duchenne muscular dystrophy. *Lancet Neurol* 2: 299–310.
- 7 Escolar DM, Buyse G, Henricson E, Leshner R, Florence J, et al. (2005) CINRG randomised controlled trial of creatine and glutamine in Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* 58: 151–155.
- 8 Van Essen AJ, Verheij JBGM, Reefhuis J, Fidler C, Begeer JH, et al. (2004) The natural history of Duchenne muscular dystrophy: analysis of data from a Dutch survey and review of age-related events. *Online Leyden Muscular Dystrophy pages*.
- 9 Bushby K (1992) Genetic and clinical correlation of Xp21 muscular dystrophy. *J Inher Metab Dis* 15: 551–564.
- 10 Nicholson LV, Johnson MA, Bushby KM, Gardner-Medwin D, Curtis A, et al. (1993) Integrated study of 100 patients with Xp21 linked muscular dystrophy using clinical, genetic, immunochemical and histopathological data. Trends across the clinical groups. *J Med Genet* 30: 728–736.
- 11 Allsop KG, Ziter FA (1981) Loss of strength and functional decline in Duchenne's dystrophy. *Arch Neurol* 38: 406–411.
- 12 Kilmer DD, Abresch RT, Fowler WM Jr (1993) Serial manual muscle testing in Duchenne muscular dystrophy. *Arch Phys Med Rehabil* 74: 1168–1171.
- 13 Mayhew JE, Florence JM, Mayhew TP, Henricson EK, Leshner RT, et al. (2006) Reliable surrogate outcome measures in multicenter clinical trials of Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 35: 36–42.
- 14 Jeppesen J, Green A, Steffensen BF, Rahbek J (2003) The Duchenne muscular dystrophy population in Denmark, 1977–2001: prevalence, incidence and survival in relation to the introduction of ventilator use. *Neuromuscul Disord* 13: 804–812.
- 15 Eagle M, Bourke J, Bullock R, Gibson M, Struab V, et al. (2007) Managing Duchenne muscular dystrophy. The additive effect of spinal surgery and home nocturnal ventilation in improving

survival. *Neuromuscul Disord* 17: 470–475.

16 Duboc D, Meune C, Lerebours G, Devaux JY, Vaksman G, et al. (2005) Effect of Perindopril on the onset and progression of Left Ventricular Dysfunction in Duchenne Muscular Dystrophy. *J Am Coll Cardiol* 45: 855–867.

17 Cole TJ, Bellizini MC, Flegal KM, Dietz WH (2000) Establishing a standard definition for child overweight and obesity world:international survey. *BMJ* 320: 1240–1243.

18 Wicksell RK, Khilgren M, Melin L, Orvar EO (2004) Specific cognitive deficits are common in children with Duchenne Muscular Dystrophy. *Dev Med and Child Neurol* 46:154–156.

19 Deburgrave N, Daoud F, Llense S, Barbot JC, Recan D, et al. (2007) Protein– and mRNA–based phenotype–genotype correlations in DMD/BMD with point mutations and molecular basis for BMD with nonsense and frameshift mutations in the DMD gene. *Hum Mutat* 28: 183–195.

20 Muntoni F, Torelli S, Ferlini A (2003) Dystrophin and mutations:one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol* 2: 731–740.

21 Meulman J, Van der Kooij AJ, Heiser WJ (2004) Principal components analysis with non linear optimal scaling transformations for ordinal and nominal data. In: Kaplan D, editor, *Handbook of quantitative methodology for the social sciences*. Thousand Oaks: Sage Publications, Inc. pp 49–70.

22 Kaminska A, Ickowicz A, Plouin P, Bru MF, Dellatollas G, et al. (1999) Delineation of cryptogenic Lennox Gastaud syndrome and myoclonic astatic epilepsy using multiple correspondence analysis. *Epilepsy Res* 36: 15–29.

23 Knottnerus JA, van Weel C, Muris JWM (2002) Evidence base of clinical diagnosis: evaluation of diagnostic procedures. *BMJ* 324: 477–480.

24 Uitenbroek DG (1997) SISA Diagnostic accuracy. www.quantitativeskills.com

25 Wilcox MA, Wyszynski DF, Panhuysen CI, Ma Q, Yip A, et al. (2003) Empirically derived phenotypic subgroups – qualitative and quantitative trait analyses. *BMC Genetics* 4 (Suppl 1): S15.

26 Wilcox MA, Wyszynski DF, Panhuysen CI, Ma Q, Yip A, et al. (2005) Two major spondylarthropathy phenotypes are distinguished by pattern analysis in multiplex families. *Arthritis Rheum* 53: 263–271.

27 Chung B, Wong V, Ip P (2004) Spinal muscular amyotrophy: Survival pattern and functional status. *Pediatrics* 114: 548–553.

28 Bouvier P, Halperin D, Rey H, Jaffe PD, Laederach J, et al. (1999) Typology and correlates of sexual abuse in children and youth: multivariate analyses in a prevalence study in Geneva. *Child Abuse Negl* 23: 779–790.

29 Prella A, Medori R, Moggio M, Chan HW, Gallanti A, et al. (1992) Dystrophin deficiency in a case of congenital myopathy. *J Neurol* 239: 76–78.

30 Mok E, Beghin L, Gauchon P (2006) Estimation body composition in children with Duchenne muscular dystrophy:comparison of bioelectrical impedance analysis and skinfold–thickness measurement. *Am J Clin Nutr* 83: 63–69.

31 Suthers GK, Davies KE (1992) Phenotypic heterogeneity and the single gene. *Am J Hum Genet* 50: 887–891.

La fibrose endomysiale précoce est un facteur de mauvais pronostic moteur

7.1 Résumé

La fibrose endomysiale dans la dystrophie musculaire de Duchenne: un marqueur de mauvais pronostic moteur associée à une activation des macrophages alternes.

Endomysial fibrosis in Duchenne muscular dystrophy (DMD): a marker of poor outcome associated with macrophage alternative activation

L'analyse statistique clinico-génétique des 75 patients DMD du premier travail a clairement individualisé quatre profils évolutifs de patients avec en particulier deux groupes sans atteinte cognitive mais avec un pronostic moteur très différent, bon pour le groupe C et mauvais pour le groupe D sans corrélation génotypique. Pour essayer d'affiner les facteurs épigénétiques intervenant dans la gravité motrice, une analyse morphométrique des biopsies musculaires de 35 de ces patients a été réalisée. L'analyse des biopsies musculaires de ces 35 patients à des âges différents a permis de retracer dans un premier temps les grandes lignes évolutives de la maladie musculaire comme décrites par Bell et Engel avec une cinétique en trois temps pour les différents éléments constituant le processus dystrophique: les phénomènes de nécrose régénération, les fibres hypercontractées, les adipocytes et l'œdème interstitiel, la fibrose endomysiale et pérимysiale (cf annexe 1). Elle confirme l'existence d'un processus précoce impliquant des fibres hypercontractées et de l'œdème interstitiel chez les patients très jeunes (2-4ans). Le phénomène de nécrose est au maximum vers 7 ans de façon contemporaine à l'augmentation de la fibrine impliquée récemment dans le processus dystrophique via le TGF- β et l'activation des macrophages [Vidal, 2008]. La fibrose endomysiale croît avec l'âge ainsi que l'adipose après l'âge de 7 ans.

Pour un complément d'études, 25 biopsies quadricipitales précoces, cf table 1 & 2, de ces patients DMD, entre 3,5 et 7 ans pour 23/25 cas et 2 à 10 ans ont été sélectionnées. L'analyse multiparamétrique, cf table 3, couplant des données cliniques motrices simples (âge de la marche, âge de perte de la marche, âge de la scoliose, testing musculaire global (score MMT) et du

quadriceps à 10 ans) à une étude stéréologique de 6 paramètres morphométriques (nécrose régénération, fibres hypercontractées, adipocytes et œdème interstitiel, fibrose endomysiale et pérимыsiale) a permis d'identifier clairement la fibrose endomysiale comme marqueur précoce de mauvais avenir moteur (perte de marche précoce, $p < 0.002$) cf figure 1 & 2A. Cette fibrose endomysiale est indépendante de l'âge du patient au moment de la biopsie pour notre série, de la fibrose pérимыsiale et des autres paramètres de nécrose régénération et du nombre de fibres musculaires cf figure 2B & 2C. Elle est donc par elle même clairement associée à la perte de fonction musculaire prévisible à distance puisque les biopsies ont été réalisées en moyenne 4 ans avant toutes les mesures motrices utilisées. Les autres paramètres morphologiques ne sont pas corrélés entre eux, ni à l'âge, ni à la gravité motrice. Seules les fibres hypercontractées qui sont le témoin d'une souffrance myocytaire particulière à la DMD sont liées au jeune âge de l'enfant. L'analyse du muscle en Western Blot des différentes protéines du complexe glycosarcolemmique et de la dystrophine ainsi que la calpaïne n'a pas permis de mettre en évidence des différences entre les patients avec un âge de perte de marche précoce (< 8 ans) et tardif (> 11 ans). De même, les mutations dans le gène de la dystrophine n'impliquaient pas de transcrit spécifique en fonction de la gravité de l'atteinte musculaire des patients.

L'analyse de la fibrose endomysiale musculaire dans les muscles DMD a été envisagé sous deux angles: les modifications du lit capillaire myocytaire en lien avec la fibrose endomysiale et le rôle des différents partenaires cellulaires impliqués dans la constitution de la fibrose et la régulation de la matrice extracellulaire.

Les données contradictoires sur le lit capillaire myocytaire dans le processus dystrophique ont fait évoquer un processus ischémique [Mendell, 1971], récusé par d'autres équipes [Jerusalem, 1974] sans anomalie de la paroi capillaire avec un processus de néoangiogénèse probable. Chez nos patients, le lit capillaire est plus riche que chez les enfants du même âge mais la distance entre le

capillaire et le myocyte est augmentée de 2,5 fois ($p < 0.0001$) perturbant éventuellement les échanges gazeux et aggravant possiblement la souffrance myocytaire cf figure 4A. 85 % des capillaires dans le muscle normal sont à moins d'un micron de distance du myocyte au lieu de 18% dans le muscle DMD. L'éloignement du lit capillaire perturbe la niche vasculaire, unité constituée de la cellule endothéliale, de la cellule satellite et du myocyte [Christov, 2007]. La présence d'un stress oxydatif, déjà impliqué dans la physiopathologie des dystrophies musculaires [Tidball, 2007] a été confirmé par la présence d'anticorps anti HNE dans le cytoplasme des myocytes dans les régions de nécrose régénération riches en macrophages CD68+ dans les biopsies quadricipitales de ces patients cf figure 3E.

Nous trouvons une augmentation significative des macrophages alternes CD206+ dans les régions riches en fibrose endomysiale par rapport aux régions pauvre en fibrose endomysiale ($p < 0.0001$) ce qui est un argument fort en faveur du rôle profibrosant des macrophages CD206+ cf figure 4 B. Le rôle des macrophages alternes a déjà été mis, par notre équipe, en évidence expérimentalement après lésion musculaire chez la souris *mdx* [Arnold 2007]. Dans le même temps, la diminution significative des cellules satellites CD56+, cf figure 4C, dans les régions de forte fibrose comparées aux régions faiblement fibrotiques pose la question de la transformation potentielle des cellules satellites, dans un environnement riche en collagène I, en myofibroblastes comme suggéré par Alexakis in vitro [Alexakis, 2007]. Il est toutefois notable que le nombre de cellules satellites même dans les régions fibrotiques reste supérieur à celui présent dans un muscle normal du même âge comme signalé dans la littérature [Wakayama, 1979].

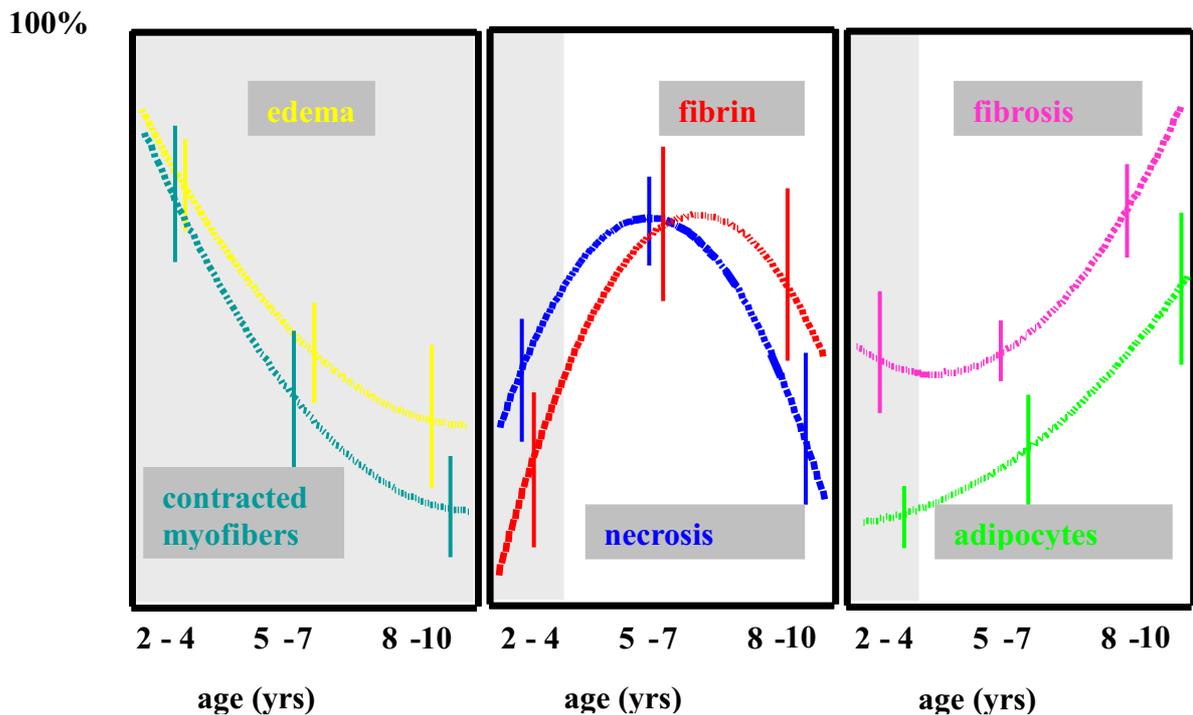
Au total, notre analyse des biopsies musculaires des jeunes patients DMD a permis d'identifier la fibrose endomysiale comme cible thérapeutique et d'envisager des thérapeutiques antifibrosantes telles que les IEC [Cohn 2007]. Conséquence du processus dystrophique, la fibrose:

1. est corrélée à la gravité évolutive de la maladie musculaire;

2. est induite par la présence de macrophages alternes CD206+;
3. entretient un cercle vicieux profibrosant en favorisant la transformation des cellules satellites en cellules profibrosantes;
4. favorise la souffrance myocytaire en perturbant les échanges gazeux au sein de la niche vasculaire par éloignement du lit capillaire.

La recherche de facteurs génétiques ou épigénétiques contribuant à la constitution de la fibrose endomysiale paraît indispensable tel que les polymorphismes du TGF- β ou de l'angiotensine I impliqués par exemple dans la fibrose pulmonaire [Xaubet 2003, Molina 2008].

Annexe 1



Annexe 1: Évolution des différents constituants musculaires dans la DMD à partir de la biopsie quadricipitale de 35 patients DMD entre 2 et 10 ans. Confirmation d'un processus précoce impliquant des fibres hypercontractées et de l'œdème interstitiel chez les patients très jeunes. Le phénomène de nécrose est au maximum vers 7 ans de façon contemporaine à l'augmentation de la fibrine. La fibrose endomysiale croît avec l'âge ainsi que l'adipose après l'âge de 7 ans.

7.2 Article soumis:

Endomysial fibrosis in Duchenne muscular dystrophy (DMD):

a marker of poor outcome associated with macrophage alternative activation

running title : DMD fibrosis

Isabelle Desguerre,^{a,b,c} Michelle Mayer,^d France Leturcq,^e Jacques-Patrick Barbet,^f Romain K Gherardi,^{b,c,g,h} Christo Christov.^{c,g,h}

^a AP-HP, Necker - Enfants Malades Hospital, Neuropediatrics Unit, Paris, France

^b AP-HP, Centre de Référence des Maladies Neuromusculaires "Garches-Necker-Mondor-Hendaye", France;

^c INSERM U841-Team 10, Department of Neurosciences, "Mondor Biomedical Research Institute", Paris XII University, Faculty of Medicine, Créteil, France,

^d AP-HP, Trousseau Hospital; Neuropediatrics Unit, Paris, France

^e AP-HP, Cochin-Saint Vincent-de-Paul Hospital, Department of Genetic, Paris, France,

^f AP-HP, Cochin-Saint Vincent-de-Paul Hospital, Pathology Department, Paris, France

^g AP-HP, Albert Chennevier- Henri Mondor Hospital, Service d'Histologie, Département of Pathology, Créteil, France

^h INSERM U841, Plateforme d'Imagerie Cellulaire et Tissulaire, Créteil, France

Correspondence to: Pr Romain K Gherardi, Groupe hospitalier Albert Chennevier- Henri Mondor, Service d'Histologie, Département de Pathologie, F-94010 Créteil, France, Phone: 33.1.49812746; Fax: 33.1.49812733; e-mail: romain.gherardi@hmn.aphp.fr

Abstract

Myopathological alterations in DMD have not been correlated systematically with motricity, even though conspicuous interindividual motor outcome variability exists, and their mechanisms remain incompletely understood. We included 25 steroid-free DMD patients in a multiparametric analysis plotting initial histological alterations in quadriceps muscle with 13 relevant clinical data collected by the same team over a long-term follow-up (mean>10yrs). There was no residual muscle dystrophin at immunohistochemistry and Western blot. Elementary histological parameters (fiber size, hypercontracted fibers, necrotic/basophilic fibers, edema, endomysial and perimysial fibrosis, and fatty degeneration) were assessed by morphometry. Endomysial fibrosis was the sole myopathological parameter significantly correlated with poor motor outcome, assessed by

quadriceps muscle strength, manual muscle testing of upper and lower limbs at 10yrs, and age at ambulation loss (all $p < 0.002$). Motor outcome and fibrosis were not correlated with genotype. Myofibers exhibited oxidative stress-induced protein alterations and became separated from capillaries by fibrosis, which was associated with both increase of CD206+ alternatively activated macrophages and relative decrease of CD56+ satellite cells (both $p < 0.0001$). This study provides firm basis for antifibrotic therapeutic strategies in DMD, and supports the view that alternatively activated macrophages, known to inhibit myogenesis while promoting collagen-producing cell formation, play a key role in myofibrosis.

Introduction

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD), the most frequent neuromuscular disorder in school-age children [1], is a progressive X-linked disease with severe motor outcome characterized by complete loss of muscle dystrophin. DMD has long been described as homogeneous in its clinical presentation, evolution and severity [2], but this is not the experience of clinicians in charge of patients. Interindividual variability of the extent of central nervous system involvement is one factor contributing to clinical heterogeneity [3,4]. The residual quantity of dystrophin has been correlated with the severity of motor outcome in patients with dystrophinopathies, a setting encompassing both DMD and Becker muscular dystrophy cases [5]. Moreover, DMD patients with complete lack of dystrophin at Western blot may also show marked differences in motor severity, even if they have the same mutation [6]. For example the mean age at which DMD patients lost their ambulation ranged from 6 to 15 years in a recent series [1]. Such variations could introduce a non-negligible bias in therapeutic trials which are in danger of being inconclusive due to lack of precise knowledge on DMD's natural history [7]. In a preliminary clinical study, we observed partial genotype/phenotype correlations for cognitive impairment but not for motor outcome, suggesting influence of as yet

unknown factors on muscle involvement in DMD [Desguerre et al., unpublished data]. This prompted us to reevaluate muscle biopsies.

Surprisingly little has been previously done to correlate systematically pathological alterations and clinical outcome. DMD myopathological alterations are well characterized, but exact mechanisms underlying myofiber alterations and muscle fibrosis remain to be fully established [8]. DMD lesions are generally believed to reflect repeated cycles of acute myofiber necrosis and regeneration, progressively leading to severe terminal myofiber degeneration and extensive fibrosis. Myofibers respond by regeneration, a highly integrated biological process that involves both activation of quiescent myogenic progenitor cells residing beneath the myofiber basal lamina, called satellite cells [9], and the collaboration of non-muscle cells, including endothelial cells [10] and macrophages [11]. We previously showed that, at steady state, CD56/NCAM+ satellite cells are closely associated with, and vary in proportion to, of CD31/PECAM-1+ capillaries [10]. During muscle repair, the two cell types functionally interact, forming a myovascular unit likely involved in spatio-temporal coordination of angiogenesis and myogenesis, as demonstrated in DMD [10]. It was also observed in our laboratory that macrophages, according to their state of activation, play different roles in muscle repair [12]. Two distinct macrophage populations exist. Classically activated (or M1) macrophages are induced by interferon gamma, produce reactive oxygen species, exhibit pro-inflammatory functions, and may enhance both damage of dystrophin-deficient myofibers [13] and myogenic cell proliferation [12]. Alternatively activated (or M2) macrophages are induced by IL-4, IL-10 and corticosteroids, exhibit anti-inflammatory functions by producing TGF- β , and are crucially involved in wound healing [14]. M2 macrophages identified by the specific cell surface markers CD206 (also known as mannose receptor) [14] were recently found in increased numbers in fibrotic areas in diaphragm of the mdx mouse model of DMD [15]. This was consistent with the effects of TGF- β , a major microenvironmental cue controlling satellite cell behavior [16]. This

potent inhibitor of myogenic cell proliferation [16] and differentiation [17] has been shown to induce satellite cell transformation into fibroblast-like collagen-producing cells [18], a phenomenon recently documented in the mdx mouse [19]

In the present paper, we first present a multiparametric analysis plotting initial histological alterations in quadriceps muscle with clinical data collected in 25 corticosteroid-free DMD patients with long-term follow up. This allowed us to identify endomysial fibrosis as the sole myopathological alteration predicting poor motor outcome. Then we explored selected factors potentially relevant to DMD muscle damage and fibrosis, including genotyping, quantitative assessment of other myopathy-associated proteins, and immunohistologic markers of oxidative stress, M1 and M2 macrophages, and satellite cells. Myofibers showed striking oxidative stress-induced protein alterations at their surface, and became progressively dissociated from adjacent capillaries by fibrosis. Moreover, endomysial fibrosis was significantly associated with both relative satellite cell decrease and selective infiltration by M2 alternatively activated macrophages, thus supporting in DMD pathophysiological mechanisms of myofibrosis recently delineated in animal models [15].

Patients and methods

1-Patients

We included 25 consecutive genotyped DMD patients whose definite diagnosis of DMD was established at Saint-Vincent-de-Paul hospital, Paris, from 1990 to 2000, on the basis of a total absence of dystrophin (negative Dys1, Dys2 and Dys3 by immunohistochemistry, confirmed by Western blot). Every six months following diagnosis children were systematically evaluated by a multidisciplinary team for motor, respiratory, cardiac, cognitive and nutritional status according to the recommendations of the DMD French consortium.

All remained steroid-free and benefited from homogeneous clinical practices. For instance, physiotherapy was performed 2-3 times per week, lower-limb contractures were prevented by nocturnal leg orthosis from age 6, and, when necessary, cured by tenotomy. Spinal arthrodesis was systematically performed from age 12. Respiratory care started when forced vital capacity (FVC) reached 11 or 30% of the theoretical value and included nocturnal monitoring of capillary PO₂ and PCO₂, intermittent positive pressure ventilatory (IPPV) daily support, and nasal non-invasive nocturnal ventilatory (NINV) support, in case of abnormal blood gas levels. Cardiac echogram was performed yearly and myocardial scintigram immediately before surgery; ACEIs were administered when left ventricular ejection fraction (LVEF) reached 55%, i.e. always after age 10 in this series.

2-Quantitative data on muscle strength

Motor function was assessed by (i) classical criteria such as the age of loosing the ability to walk, of becoming wheel-chair-ridden, and of becoming scoliotic; (ii) manual muscle testing (MMT), performed yearly, and according to the MRC scale, to determine upper limb (average value of 2x5 muscles), lower limb (2x4 muscles), and global (2x9 muscles) scores at ages 6, 8 and 10 (7); (iii) quadriceps muscle strength (QMS), important because this muscle was chosen for biopsy, generally measured over 6 consecutive years (range 3-10); the value at 10 yrs, available for all patients, proved useful in the final statistical analysis.

3-Histological and immuno-histochemical staining

The 25 snap-frozen quadriceps muscle specimens, collected at initial biopsy, were cross-sectioned (5µm) and processed for both routine staining such as hematoxylin-eosin, Masson's and modified Gomori's trichrome, and the immuno-histological screen currently used to assess muscular dystrophy (see below). In addition, 10 samples were processed for automated immuno

histochemistry (Ventana NEXES) with primary monoclonal antibodies recognizing CD31/PECAM-1 expressed by endothelial cells (1:20, DAKO, ref. No M0823), CD68/KP1 (macrosialin), a lysosomal membrane antigen expressed by M1 phagocytic macrophages (1:300, DAKO, ref. No M0814), CD206 (mannose receptor), a canonic marker of M2 alternatively activated macrophages (1:50, Antibody Online GMBH, ref. No ABIN159212), or CD56/NCAM, a reliable marker of both quiescent and activated human satellite cells (1:100, Novocastra, ref. No NCL-CD56-1B6), and peroxidase-coupled secondary antibodies, and DAB as chromogen (both from Ventana). Local production of reactive oxygen species was inferred from immuno-histochemical detection of HNE (4-hydroxy-2-nonenal)-modified proteins [20] (1:200, Calbiochem, ref. No 393207). HNE is the most reactive lipid peroxidation product and detection of the protein adducts it forms in tissues attests local lipid peroxidation [21].

4-Morphometric analyses of muscle samples

All morphometric analyses were carried out on digitized non-overlapping consecutive images (x20, 1280x960 pixels, 0.33 μm per pixel), covering > 90% of the tissue section surface, acquired with an Olympus microscope equipped with a CCD camera (Sony) and a motorized stage.

Stereology was used to quantify muscle fascicles (myofibers plus endomysium), perimysial fibrosis and muscle necrosis/regeneration, edema, and fatty degeneration. The area fraction of a structure was estimated by point counts [22]. A rectangular grid containing 54 equidistant points was introduced in the graphics plane of each image (Simple PCI image analysis software) and the relative proportion of points overlaying any of the structures of interest was semi-automatically counted on the computer screen. Results for hyper-contracted myofibers were expressed as number of fibers per microscopic field.

Color image segmentation of sections stained by modified Masson's trichrome and automatic

measurement were used to assess endomysial fibrosis and muscle fiber area (AxioVision 4.3 image analysis software). Examples of image segmentation results (overlaid in pseudocolors) are shown on figure 1. Endomysial fibrosis, defined as areas where endomysial thickness exceeded at least 4 times that of normal endomysium in non-DMD muscle ($2.4 \pm 0.3 \mu\text{m}$, measured in 2 specimens from boys aged 6 and 7), and muscle fiber area fraction were measured in 13-25 fascicles per biopsy. To determine muscle fiber size, 100-300 individual myofibers per biopsy were measured.

Results for CD206+ macrophages, and CD56+ mononucleated satellite cells, were expressed as cell counts per muscle fiber. All images acquired per specimen were used to build whole specimen 2D reconstructions (Analysis software), from which regions of interest (e.g. low or high endomysial fibrosis regions, each measuring $3.84 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ were subsequently extracted for counting of CD206+ macrophages [27 high fibrosis and 20 low fibrosis] or CD56+ satellite cells [27 high fibrosis and 33 low fibrosis areas]. Necrotic areas were stringently avoided.

Distances from capillaries (n=825) to the sarcolemma of neighboring muscle fibers in DMD and control samples, immunostained for CD31, were measured manually. Proximity of satellite cells to capillaries was assessed using the quadrat method as previously described [10].

5-Complementary investigation of myopathy-related muscle proteins

In parallel, screening of muscle proteins that could impact on disease severity was carried out using standard immuno-histochemistry and two multiplex Western blot analyses: (i) a combination of Dys8/6C5 (NLC-DYS2/dystrophin C-ter), Cal3c/2A2 (NLC-CALP-12A2/calpain 3 exon 8), 35DAG/21B5 (NLC- γ -SARC/ γ -sarcoglycan), and Ham1/7B6 (NLC-Hamlet/dysferlin) monoclonal antibodies; (ii) a combination of Dys4/6D3 (NCL-DYS1/dystrophin rod domain), Calp3d/2C4 (NLC-CALP-2C4/calpain 3 exon 1), and ad1/20A6 (NCL- α -SARC/ α -sarcoglycan) monoclonal antibodies (all from Novocastra).

6-Genotyping

Deletions and duplications were detected by quantitative fluorescent-PCR using genomic DNA, and all other types of mutations were detected either by sequencing of all DMD gene exons and exon-intron junctions, or by systematic analysis of muscle dystrophin mRNA, using RT-PCR and sequencing of 14 amplified overlapping fragments. Abnormalities were substantiated by segregation analysis. Altered transcripts were inferred from each mutation [4]. The four internal promoters of the dystrophin gene give rise to several transcripts. Splicing between promoter-specific first exons and exons 30, 45, 56, 63 generate respectively the dystrophin isoforms Dp260, Dp140, DP116, and Dp71. Mutations before exon 30 only affect full length dystrophin. In addition to it, the other isoforms are successively affected, as the mutation progresses after exon 29 towards the C terminus.

7-Statistical Analyses

Correlations between clinical and myopathological variables were detected by non-linear Categorical Principal Component Analysis (CatPCA), carried out in SPSS 16.0. CatPCA benefits from optimal data scaling and is suitable for data recorded with uncertain units (e.g. MMT scores) [23,24]. Original variables were reduced to 2 principal components, sufficiently robust as indicated by Cronbach's $\alpha > 0.70$ for each. Data reported in the body of text and tables represent mean \pm standard deviation (SD); Mann & Whitney test was used for comparison of means, Fisher's exact test for comparison of proportions, and Spearman's test for bivariate correlations. Whether a correlation between two variables was genuine or due to their respective correlations with a third (hidden) variable was assessed by Pearson's product moment partial correlation test executed after linearity was confirmed by a significant ANOVA test.

Results

1-Clinical characteristics of patients

Main clinical characteristics are listed in table 1. Follow-up of the 25 patients ranged from 5 to 13 years (mean 10.3). All patients were older than 12 at end-point, and 11/25 were older than 16. 28% of patients had delayed walking, as defined by age at first walking >18mo. Loss of ambulation, the milestone classically used to assess motor outcome, occurred at a mean age 10.1 but there were marked variations (range 7.5-16 yrs): 6 boys (patients 3, 9, 10, 12, 20, 24) had lost ambulation at age <9 yrs and 6 at age ≥11 yrs (patients 2, 7, 8, 19, 23, 25). Cardiomyopathy (left ventricular ejection fraction LVEF<55%) was detected before 12 yrs in 7 patients. According to conventional criteria for cognitive status evaluation, 12 patients were classified as normal, 6 as borderline, 5 as moderately, and 2 as severely mentally retarded.

2-Muscle biopsy characteristics

As assessed by stereology (table 2), area fractions were 28-70%, for muscle fibers, 1-16%, for necrosis/regeneration foci, 14-35%, for perimysial fibrosis, 2-34%, for endomysial fibrosis, 0-22%, for edema, and 0-19%, for intrafascicular fat cells. Hypercontracted fibers ranged from 0.4 to 9.0 per microscopic field, and their mean area from 841 to 3565 μm^2 .

Compared to normal muscle, mean DMD values indicated a decrease by 50% of muscle fiber area fraction (necrosis and intrafascicular fat cells excluded) and increments of both endomysial and perimysial fibrosis area fractions by 5500 % and 400%, respectively (all significant at $p<0.0001$).

Age of biopsy within the studied 4-10yrs range did not correlate with most morphometric measures including fiber size, necrosis, edema, fatty replacement, perimysial and, notably, endomysial fibrosis (figure 3B).

3-Clinicopathological correlations

Computation of clinical and morphometric data using CatPCA identified a single satisfactory solution with two well defined axes (figure 2A), as indicated by variable loadings and Cronbach's α levels (table 3).

The 1st one, "motor outcome is inversely correlated with endomysial fibrosis", reflected the inverse correlation between endomysial fibrosis and muscle strength estimates such as QMS and global MMT, but also with a major indicator of overall DMD prognosis, the age of losing ambulation.

Two representative cases are illustrated in figure 1: patients 7 and 9 had endomysial fibrosis accounting for 2% and 19% of muscle specimen area at ages 4.0 or 6.0 and QMS at age 10 of 3.5 and 1.5, respectively.

The 2nd one, "hypercontracted fibers are more common in younger patients", reflected the inverse correlation between age of biopsy and number of hypercontracted fibers per microscopic field ($r = -0.551, p < 0.01$).

Of note, CatPCA underscored the independence between endomysial fibrosis evolution and patient age at biopsy since each variable contributed singularly to one of the two independent CatPCA axes. Age of biopsy preceded by a mean of 4.0 yrs age of muscle strength measurement or that of losing ambulation. None of the other histological variables could be introduced adequately into the opposition with motricity.

The established inverse correlation between endomysial fibrosis and muscle strength and motricity prompted us to verify (fig. 2C) whether the effect of endomysial fibrosis may not simply reflect muscle fiber diminution through fibrotic substitution. However, even if diminished in comparison with healthy muscle, muscle fiber area fraction did not correlate with either MMT or age of losing ambulation. The weak positive correlation ($r=0.464, p < 0.05$) with QMS proved spurious when controlled for endomysial fibrosis, since a partial correlation test reduced the correlation coefficient

to almost zero ($r=0.046$, NS) (figure 2C). Similarly, perimysial fibrosis, whose contribution to the reduction of the muscle fiber fraction was twice as important as that of endomysial fibrosis, did not correlate at all with motricity (figure 2C).

As endomysial fibrosis proved to be uniquely associated with the downfall of DMD patient motricity, we next checked whether it could be related to biological data.

4- Correlations between biologic variables and endomysial fibrosis

4.1 Other myopathy-related muscle proteins

Immunohistochemistry and Western blotting failed to detect interindividual differences in the expression of the different proteins of the dystrophin complex, including dystroglycans, sarcoglycans, and other relevant muscle proteins including dysferlin and calpain (data not shown).

In the same way, no correlation could be established between endomysial fibrosis or motor outcome and the number of revertant fibers (always < 5 per section).

4.2 Genotype

Genotyping found 5 patients with point mutations, 18 with deletions, and 1 with a duplication affecting the dystrophin gene; in 1 patient no definite genetic lesion could be demonstrated. Mutations were predicted to mainly affect expression of transcripts corresponding to DP427 isoform (mutation in the region of exons 1-29, $n=8$), DP427+DP260 (exons 30-44, $n=4$), DP427+DP260+DP140 (exons 45-55, $n=11$). There was no mutation involving DP116 (exons 56-62, $n=0$) and 1 involving DP71 (after exon 63, $n=1$). No genotype-muscular phenotype correlation could be established. Most severely affected patients (3, 9, 10, 12, 20, 24), who also exhibited marked initial endomysial fibrosis ($14.0 \pm 3.4\%$), had mutations located haphazardly in exons 1-29, 30-44, or 45-55 regions (table 1), similarly to the less severely affected patients (2, 7, 8, 19, 23, 25)

who had less fibrosis (5.6 ± 2.9 %, $p < 0.007$).

4.3 Muscle capillaries

Endomysial fibrosis tended to encircle individual myofibers (figure 3C), and to separate capillaries from muscle cells (figure 3G-J). Compared to normal muscle, the average distance from capillary edge to myofiber sarcolemma was increased 2.5 fold ($p < 0.0001$) (figure 4A). In controls, 85% of capillaries were situated at a distance of less than $1\mu\text{m}$ and only 3% at a distance greater than $5\mu\text{m}$. Inversely, in DMD patients, only 18% were situated at a distance of less than $1\mu\text{m}$ and 18% at a distance greater than $5\mu\text{m}$ ($p < 0.0001$).

4.4 Oxidative stress, macrophages subsets and satellite cells

Anti-HNE antibodies labeled sarcolemma of most myofibers, and to a lesser extent their sarcoplasm, a finding not observed in normal controls (figure 3 E, F). In addition, cytoplasmic HNE positivities were detected in phagocytic cells infiltrating necrotic fibers (figure 3 L) where CD68+ macrophages represented the most abundant mononuclear cell subset (Fig 3I). Distribution of CD68+ M1 macrophages and of CD206+ M2 alternatively activated macrophages was strikingly different. As shown in figure 3 K-N, CD68+ cells were less numerous in the endomysium remote from necrotic areas than CD206+ cells which tended to be diffusely distributed. The later subset was significantly colocalized with endomysial fibrosis since CD206+ cell counts in regions featuring extensive or minimal endomysial fibrosis indicated a median two-fold increase of CD206+ cells in highly fibrotic areas ($p < 0.0001$). CD56+ satellite cells were more numerous in DMD patients than in normal age-matched muscle controls, but their distribution in the former also depended on the extent of endomysial fibrosis: a median two-fold decrease of satellite cell numbers were found in fibrotic compared to less fibrotic areas ($p < 0.0001$). Whatever their number in a given area, 93% of

satellite cells were at less than 15 μm from the closest interstitial capillary.

Discussion

In the present study we show that (i) the quantity of endomysial fibrosis in quadriceps muscle of DMD patients is inversely correlated with QMS, with MMT, a more general upper and lower limb muscle strength score, and with age of losing ambulation, an important prognostic indicator in DMD patients; (ii) necrosis and other myopathological elementary lesions do not correlate with motor outcome; (iii) genotyping, revertant fiber counts, and assessment of dystrophin-related muscle proteins appear useless to predict motor severity and myofibrosis; (iv) endomysial fibrosis separates capillaries from muscle cells and is spatially associated with both infiltration of alternatively activated macrophages and dampening of satellite cell activity.

Our series is homogenous since it included patients without any dystrophin at Western blot, followed for over 10 yrs by the same medical team maintaining standardized practices along the entire follow-up, and collecting clinical data twice a year on a systematic basis.

Biopsy invariably carried out in the quadriceps muscle avoided bias due to unequal involvement of different muscles and permitted accurate correlations with subsequent quadriceps muscle testing.

Histo-pathological findings were those typically reported in DMD. They were assessed by a combination of morphometric procedures, including a stereological approach, well adapted to the uniformly oriented skeletal muscle tissue, and an automated evaluation of segmented digital images, well adapted to measure sharply contrasted structures such as fibrotic tissue and myofibers by trichrome staining. Hypercontracted fibers, that are associated with plasma membrane defects and calcium influx in non-necrotic fibers [25], were uniquely correlated with young age, a quite unexpected finding of unknown significance. In contrast, necrosis correlated neither with age nor with other myopathological alterations. Necrosis was previously reported to be independent of the

stage of disease [26], suggesting that myofiber injury may long occur at a somewhat constant rate during the evolution of DMD.

More importantly, patients had dramatically different amounts of connective tissue deposition in their muscle. Although endomysial fibrosis is known to increase inexorably with DMD progression in a given individual, transversal analysis showed no correlation between endomysial fibrosis and age of biopsy, within the studied 4-10yrs range, pointing out marked interindividual differences for this variable.

Clinico-pathological correlations were established using a multivariate analysis approach allowing one to uncover variables that participate to data structure in the absence of a priori hypotheses. These variables may seem poorly relevant when considered individually, as, for example, "hypercontracted fibers" in the best solution model. The multivariate analysis approach provided the first formal confirmation of an inverse correlation between endomysial fibrosis and poor future motor outcome in DMD. Notably, the unique prognostic significance of endomysial fibrosis was established at a stage when muscle function is still relatively well preserved. Our results are in line with those reported in mice deficient in both dystrophin and utrophin showing that that decline of muscle strength is largely proportional to the amount of endomysial fibrosis [27]. However, whether the established correlation between endomysial fibrosis and motor weakness indicates causal relationship may still deserve discussion. On the one hand, most and less severe DMD cases, defined by reference to the classic age range of 9-11 yrs at ambulation loss, had markedly different levels of endomysial fibrosis. It cannot be excluded, however, that their poor outcome was due to a more active disease also affecting myofiber integrity, causing earlier appearance of endomysial fibrosis, in severe cases. The lack of correlation between necrosis and motor outcome does not support this hypothesis. On the other hand, fibrosis may be deleterious per se, as already reported in liver cirrhosis [28], glomerulosclerosis [29], myocardial fibrosis [30,31], or idiopathic pulmonary

fibrosis [32]. In line with these observations, in vitro studies have shown that collagen affects the growth and differentiation of myoblasts [19,33,34]. Thus, the deleterious effect of endomysial fibrosis may not be due to mere muscle fiber substitution. The more voluminous perimysial fibrosis did not correlate with motricity. The opposition between the two types of fibrosis strongly suggests that only fibrosis in immediate contact with muscle fibers is associated with compromised motor function. Interestingly, lesions in immediate contact with muscle fibers other than fibrosis such as edema, which also occupied a similar area fraction (10%), could not be correlated with motricity. Accumulation of matrix components in the endomysium progressively encloses myofibers in a rigid coat and was shown to increase by 2.5 fold capillary-to-fiber distances. Endomysial fibrosis thereby likely impairs both muscle fiber mechanic function and gas exchanges [35]. In addition, pushing aside capillaries from myofibers could potentially impede their reciprocal stimulation by soluble factors during muscle repair [10].

The mechanisms by which myofibers degenerate and myofibrosis develops in DMD remain largely unknown. Many experimental and clinical findings support the hypothesis that free radicals can promote and perhaps initiate much of the pathology of DMD and mdx dystrophy [see 36 for review]. The development of specific antibodies against protein-bound HNE has made it possible to obtain evidence for the occurrence of oxidative stress in vivo [20, 21]. Immuno histochemical detection of strong HNE expression at the surface of myofibers in our patients was consistent with previous biophysical detection of increased concentrations of antioxidant compounds (vitamin E and coenzyme Q) at the sarcolemma surface [37], thus supporting that muscle cell membranes are chronically subjected to oxidative stress in DMD. Sources of increased ROS production in DMD have not been completely elucidated but it is believed that much of the muscle fiber damage in mdx mice results from macrophage-derived free radicals [13,38]. This was supported by detection of HNE immuno-reactivities within macrophages invading necrotic myofibers.

Distribution of the different MP subsets in DMD were in accordance with the classical ED1/ED2 paradigm in rats, in which different MP phenotypes are associated with different stages of muscle repair [39,40]. In these studies, macrophages expressing the ED1 marker (the CD68 rat homologue) were deemed to play a role in toxicity and phagocytosis early after injury whereas macrophages expressing ED2 appeared with a delay in the vicinity of fibers and were thought to participate to healing [39,40]. In our patients CD68+ and ROS-producing macrophages (M1 type) were prominently concentrated into necrotic foci, whereas CD206+ macrophages (M2 type), although also found at site of regeneration, tended to be more diffusely distributed in the endomysium and were significantly associated with endomysial fibrosis.

Marked increase of the overall satellite cell number compared to control was noted, as previously reported by ultrastructural studies [41], likely assessing extensive activation of muscle satellite cells for myofiber regeneration. Interestingly, however, satellite cells were significantly less numerous in fibrotic compared to non fibrotic zones. The significance of this finding remains to be elucidated. On the one hand, continuous satellite cell proliferation is known to result in progressive telomere erosion and loss of regenerative capacity in DMD [42] and in old mdx mice [43]. On the other hand, it is increasingly acknowledged that the micro-environment controls satellite cell senescence, a crucial role being played by TGF- β [44], a major fibrogenic cytokine [45], which peaks in DMD muscle between 2 and 6yrs of age [46]. In vitro, dystrophic myotubes from DMD affected muscle express higher levels of TGF- β 1, collagen I and collagen VI, and are thereby fibrogenic [47,48]. It is also likely that inflammatory cells such as T lymphocytes [49] and macrophages activated in the alternative pathway [14] contribute to muscle fibrosis in the mdx mouse. The finding of greater numbers of CD206+ expressing macrophages in DMD fibrotic areas supports these data. Circulating monocytes recruited at site of muscle injury have been shown to first exhibit a pro-inflammatory profile and to switch their phenotype upon phagocytosis of necrotic muscle cells into

anti-inflammatory cells producing TGF- β [12]. It was also shown in a model of fibrosis by denervation that such blood-borne macrophages do not produce extracellular matrix by themselves but, through TGF- β release, stimulate muscle tissue-derived cells to express collagen type I and tenascin-C [50]. In the same way, it seems possible that satellite cells, that must make the choice to either undergo myogenic differentiation or produce collagen type I, but cannot do both [19], may finally transform into fibroblast-like cells in a TGF- β enriched environment [18] and directly participate to muscle fibrosis [19].

The basis of the observed inter-individual variations in myofibrosis among DMD patients remains elusive. Our patients were stringently selected on the basis of complete absence of residual dystrophin at Western blot, and had similarly low numbers of revertant fibers at biopsy, precluding a role for residual dystrophin in motor disease severity. In contrast to CNS dysfunction [3, 7], the identified mutations were not predictive of a severe motor phenotype. Possible implication of a large set of other myopathy-associated protein deficiencies was also dismissed by Western blot. In fact, there are considerable inter-individual variations in normal tissue reactions to pathogenic insults, the determinants of which are currently under scrutiny [51]. For example, preliminary data, that remain to be replicated in large studies, suggest genetic predispositions responsible for aggressive fibrotic diseases in liver, lung and skin. Such genetic factors include single nucleotide polymorphisms in TGF- β 1 [52,53], angiotensinogen [54], and other fibrosis-associated candidate genes [55]. Therefore, it seems plausible that some background genes could be involved in the variance of fibrotic reaction to dystrophin deficiency and influence outcome of DMD patients.

In conclusion, this study shows that early endomysial fibrosis is well correlated to the severity of motor outcome in DMD, independently of genotype, providing support to emerging pharmacologic strategies targeting myofibrosis to treat DMD [56].

Figures and legends

Figure 1. Examples of color segmentation of sections stained with Masson's trichrome highlighting in pseudocolors muscle fibers in grey and endomysial fibrosis in red. Two cases with minimal (A, 2%) and advanced (B,19%) endomysial fibrosis at initial biopsy (at 4 and 6 years) whose quadriceps muscle strength score measured at age 10 was 3.5 and 1.5, respectively.

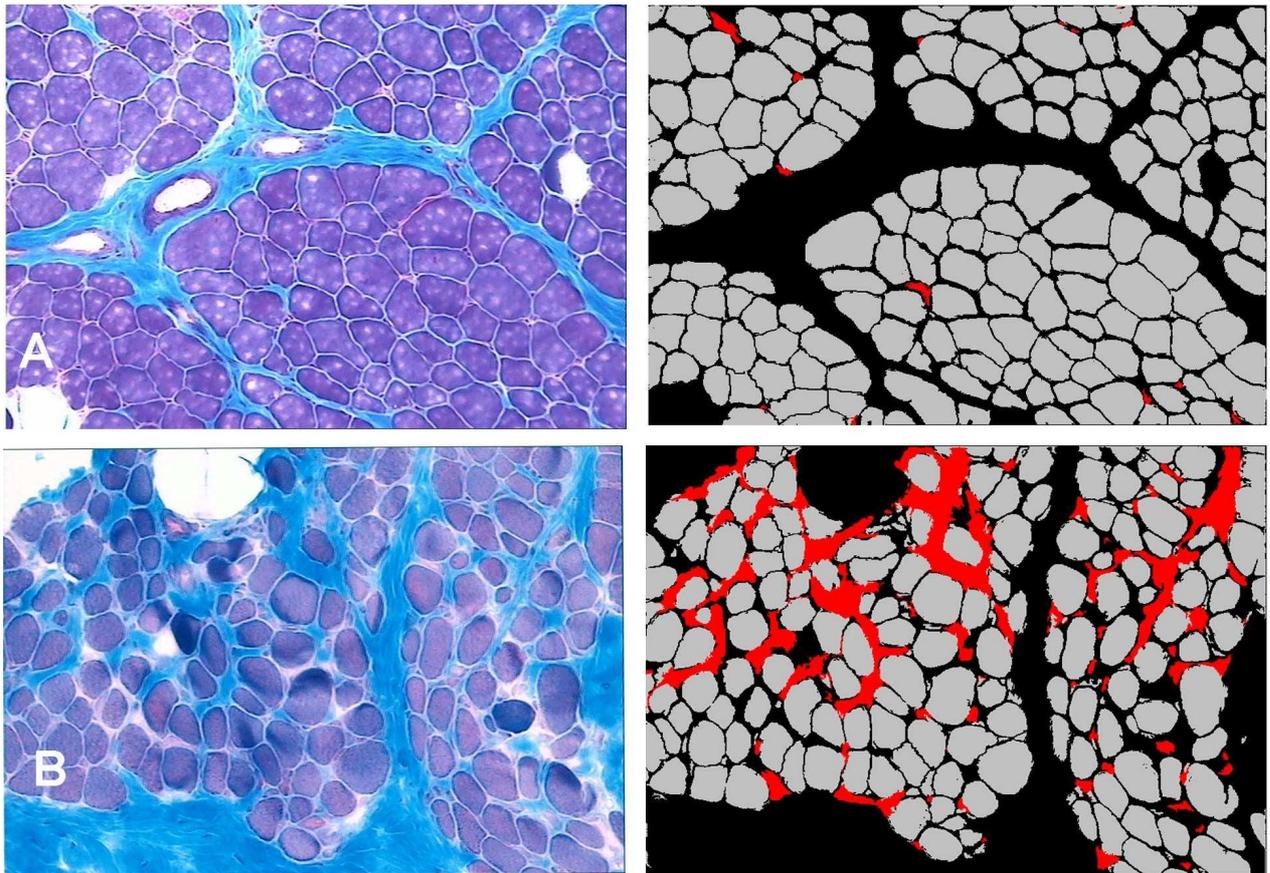


Figure 2. Overview of results from the Categorical Principal Component (CatPCA) and bivariate correlations analyses (QMS: quadriceps muscle strength at 10 yrs; MMT: global manual muscle testing at 10 yrs measuring 2x9 upper and lower limb muscles; ALA: age of losing ambulation; HMF: hypercontracted muscle fibers; EF: endomysial fibrosis; AB age of biopsy).

A: CatPCA defined 2 principal components defining a 2-dimensional space onto which interacting variables are projected. The first one (x) indicates that motor outcome is inversely correlated with endomysial fibrosis and the second one (y) that hypercontracted fibers were more frequent in younger patients.

B: endomysial fibrosis in quadriceps muscle is independent of age at biopsy within the 4-10 year time interval.

C: QMS was not correlated with necrosis, muscle fiber area or perimysial fibrosis, but was strongly inversely correlated with endomysial fibrosis.

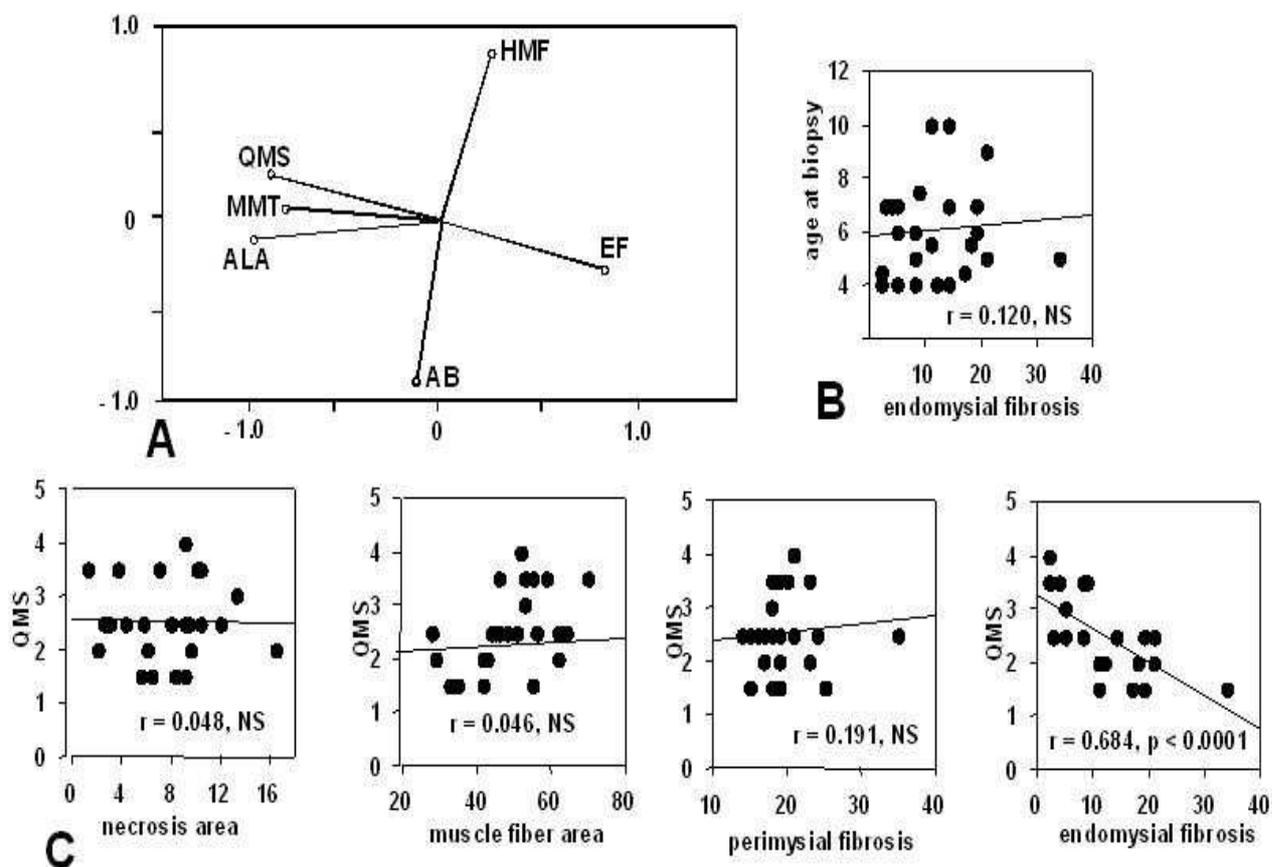


Figure 3. An overview of morphological findings in DMD, initial magnification x400 (HE: hematoxylin eosin; MT: Masson's trichrome; HNE: 4-hydroxy-2-nonenal)

Two hypercontracted fibers (arrows) (A), necrotic foci typically enclosing 2-4 grouped muscle fibers (B) (HE), advanced endomysial fibrosis separating and encasing muscle fibers (C), total absence of muscle dystrophin with the exception of one revertant fiber (D). HNE expression assessing oxidative stress-induced protein alterations is typically seen as a sarcolemmal rim (E), a finding not observed in healthy control (F). CD31 staining shows that capillary-to-muscle fiber distance in control is minimal (G), but increases in DMD muscle areas showing endomysial fibrosis (H) assessed by collagen I staining on a consecutive section (I). CD68 expressing macrophages are mostly seen in necrotic zones showing phagocytosis (J), but were scant in areas with pronounced fibrosis (arrows) (K). Macrophages clearing muscle fiber debris express HNE (arrows) (L). CD206 expressing alternatively activated macrophages are not scant in zones with little endomysial fibrosis (M) and abundant in areas showing pronounced endomysial fibrosis (N) assessed by collagen I staining on a consecutive section (O). CD56 expressing satellite cells are more numerous in less fibrotic zones (P) compared to those showing marked endomysial fibrosis (Q) assessed by collagen I staining on a consecutive section (R). In these examples, satellite cells per muscle fiber indices are 0.72 (P) and 0.28 (Q).

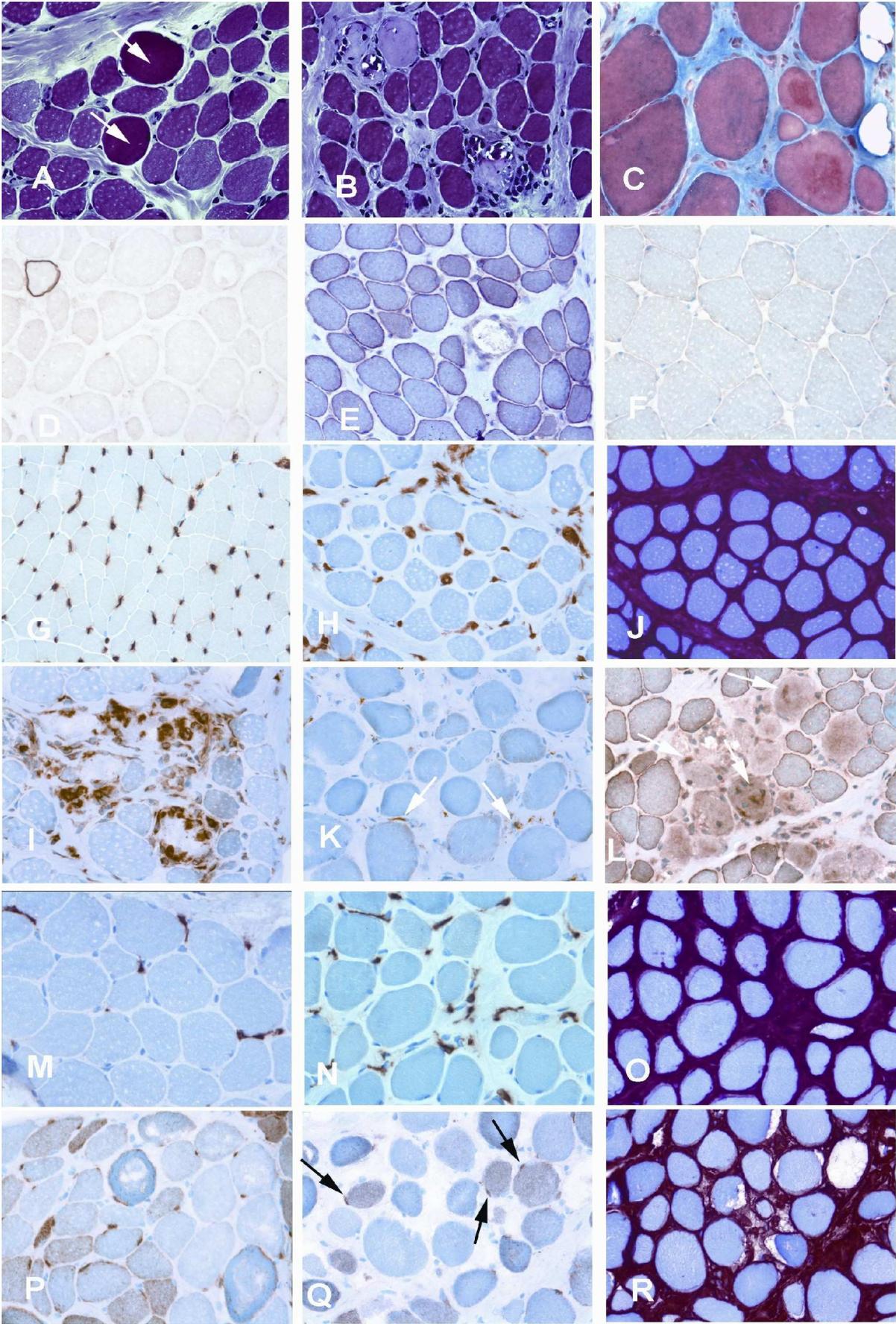


Figure 4. There was a highly significant increase of the capillary-to-muscle fiber distance in DMD compared to normal controls (A). Comparison of areas with high and low endomysal fibrosis in DMD patients and age-matched normal controls indicates an increase of CD206+ alternatively activated macrophages in DMD, peaking in fibrotic areas (B) and a relative decline of CD56+ satellite cells in the same areas (C).

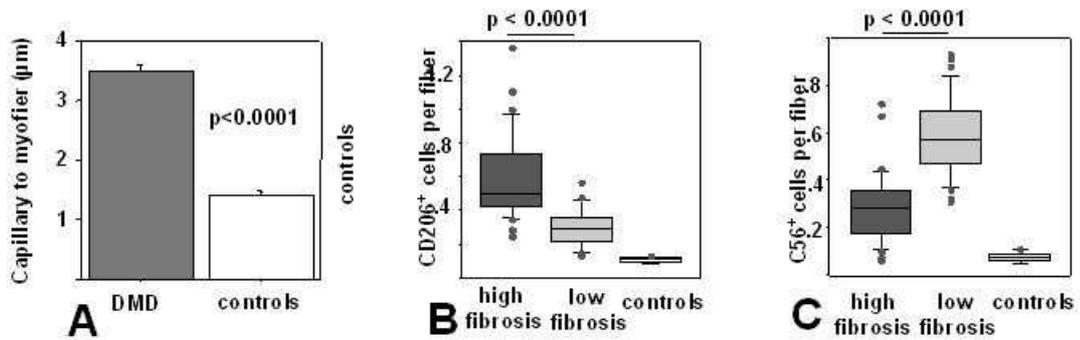


Table 1

Table 1: Clinical characteristics (Del: deletion. Mut: point mutation. Dup: duplication. ex: exon, N: normal. BL: borderline. MR: mentally retarded; SMR: severely mentally retarded).

Patient	Mutation in dystrophin gene	Cognition	Age at diag (yrs)	Age of follow-up end-point (yrs)	Age of first walking (months)	Age of ambulation loss (yrs)	Age of 1 st use of wheel-chair (yrs)	Age of lower limb contractures (yrs)	Age of onset of scoliosis (yrs)	CK at diagnosis (IU)	Age at initiation of physiotherapy (yrs)	MMT 9x2 muscles (10 yrs)	Testing of Quadriceps strength (10 yrs)	Vital capacity (%) (10 yrs)
1	Del ex 48-52	N	4.0	17	16	9.0	9.0	6.0	11.0	16721	4.5	5.6	4.0	77
2	Del ex 44-52	MR	9.0	14	24	11.0	11.0	9.0	11.0	9331	9.0	5.7	2.5	50
3	unknown	MR	3.5	15	21	7.5	7.0	7	12.0	19258	3.0	4.7	2.0	80
4	Mut ex 63	SMR	2.0	15	17	10.5	9.0	5.0	13.0	34948	3.0	6.6	3.5	70
5	Del ex 8-11	BL	6.0	18	24	10.5	10.0	9.0	14.0	9140	6.0	6.7	2.5	92
6	Del ex8-11	BL	6.0	18	24	10.5	10.0	9.0	13.0	8610	6.0	6.8	2.5	96
7	Del ex48-52	BL	4.0	15	18	11.0	8.0	5.0	11.0	28000	4.0	7.1	3.5	60
8	Del ex 51	N	7.5	18	21	11.5	13.0	11.0	13.0	461	7.0	6.0	3.5	68
9	Mut ex 44	MR	6.0	13	12	8.0	9.0	6.0	12.0	20000	7.0	4.7	1.5	90
10	Del ex18-44	MR	7.0	15	12	8.0	9.0	7.0	12.5	unknown	7.0	5.2	2.0	84
11	Mut ex 54	BL	7.0	11	15	10.5	10.0	7.0	12.0	4900	4.5	6.2	2.5	73
12	Del ex 46-53	SRM	5.0	15	25	7.5	6.0	7.0	10.0	5732	6.0	3.8	1.5	38
13	Del ex 44-47	MR	7.0	18	18	9.0	9.0	10.0	13.5	13260	7.5	6.7	2.5	83
14	Dup ex2-9	BL	4.0	18	12	9.5	9.0	6.0	12.0	15000	3.0	4.4	1.5	74
15	Del ex 2-5	N	2.0	12	17	10.5	8.0	6.5	10.0	15000	3.5	5.5	2.5	97
16	Del ex 48-52	N	4.0	12	18	10.0	9.0	8.0	11.0	2000	4.0	5.8	2.5	80
17	Del ex 21-25	N	5.0	12	18	9.0	8.0	7.0	12.0	18000	5.0	5.7	2.5	90
18	Mut ex7	N	6.0	11	18	10.3	9.0	9.0	11	10726	5.0	4.0	2.0	77
19	Del ex 55	N	5.0	18	14	10.0	10.0	9.0	14	999	7.0	5.9	3.5	81
20	Del ex48-50	BL	3.0	21	14	9.0	9.0	8.0	11	unknown	5.0	5.4	2.5	63
21	Del ex 10-43	N	6.0	16	18	9.0	8.0	7.0	10.0	5000	7.0	5.2	2.0	85
22	Del ex 46-47	N	4.0	15	12	10.5	9.0	7.0	13.0	8722	5.0	6.5	2.5	95
23	Del ex 44	N	6.0	17	13	16.0	10.0	13.0	never	2720	6.0	6.8	3.0	67
24	Mut ex 11	N	5.0	17	20	8.5	9.0	8.0	10.0	27982	5.0	4.5	1.5	76
25	Del ex3-11	N	6.5	15	12	15.0	11.0	12.0	never	15000	7.0	7.3	3.5	89
Mean			5.3	15.4	17.3	10.1	9.2	8.0	11.9	12674	5.7	5.8	2.5	77
SD			1.6	2.6	4.2	2.0	1.4	2.1	1.2	9168	1.5	1.0	0.6	14

Table 2: Quantitatively measured myopathological parameters (MF: microscopic field x 200; percentages indicate area fractions; see text for details)

Patient	Age at biopsy (yrs)	Muscle fibers area fraction (%)	Necrotic foci (%)	Perimysial fibrosis (%)	Endomysial fibrosis (%)	Oedema (%)	Fibre replacement by fat cells (%)	Hyper contracted fibers (nbr / MF)	Muscle fibers area (µm ²)
1	4.5	52	9.0	21	2	15	6.0	2.0	2053
2	6.0	44	8.0	18	8	21	1.0	3.2	2321
3	3.5	62	6.0	19	12	0	1.0	3.0	1435
4	5.0	46	3.7	20	8	22	0.0	9.0	841
5	7.0	64	5.8	17	3	10	0.1	1.2	1695
6	7.0	56	9.0	19	5	11	0.0	3.2	1344
7	4.0	55	7.0	23	2	13	4.0	6.2	1271
8	7.5	53	10.0	19	9	8	3.0	0.8	1884
9	6.0	35	9.0	15	19	13	1.0	2.7	1060
10	10.0	43	9.6	17	11	9	9.0	0.6	1315
11	7.0	45	5.8	15	14	14	6.1	0.8	3565
12	5.5	55	6.3	25	11	2	5.6	1.0	1423
13	7.0	28	12.0	35	19	5	0.6	0.9	1128
14	5.0	33	5.6	18	34	6	0.2	6.7	937
15	4.0	45	10.4	19	14	10	4.0	2.5	1001
16	4.0	51	3.1	21	8	14	3.1	1.1	1745
17	5.0	48	4.3	14	21	5	8.0	2.1	1484
18	5.5	42	2.1	17	18	2	18.6	1.3	1983
19	6.0	70	1.3	18	8	2	0.3	0.6	1414
20	10.0	62	2.5	16	14	6	0.2	2.0	1997
21	9.0	29	16.4	23	21	7	3.9	0.6	1623
22	4.0	46	9.4	24	5	15	3.9	3.0	1307
23	6.0	53	13.3	18	5	9	2.0	0.4	1969
24	4.5	42	8.3	19	17	10	0.0	2.0	1945
25	7.0	59	10.3	20	4	6	4.0	0.8	2180
Mean	6.0	48	7	20	12	9.4	3.4	2.3	1638
SD	1.8	11.1	3.7	6.0	7.6	5.6	4.1	2.1	574

Table 3: Variables loadings on the two independent principal components: “endomysial fibrosis is inversely correlated with motor function” (X axis) and “age of biopsy is inversely correlated with the number of hypercontracted fibers”. Respective estimates of Cronbach’s α, internal consistency measure of categorical principal components in the SPSS software, are 0.884 and 0.767; a value > 0.700 ensures sufficient robustness of the axis). Loadings with absolute values above 0.500 were retained to define the final principal components.

Variable	Principal component	
	Motor outcome is inversely correlated with endomysial fibrosis	Age at biopsy is inversely correlated with number of hypercontracted fibres
Endomysial fibrosis	+ 0.922	- 0.272
MMT overall	- 0.890	- 0.065
Quadriceps strength at 10yrs	- 0.838	+ 0.101
Age at ambulation loss	- 0.789	- 0.010
Age at biopsy	- 0.182	- 0.879
Hypercontracted fibres	+ 0.264	+ 0.852

REFERENCES

1. Kohler M, Clarenbach CF, Bahler C, Brack T, Russi EW, Bloch KE. Disability and survival in Duchenne Muscular Dystrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2008 Aug 19 [Epub ahead of print]
2. Van Essen AJ, Verheij JBG, Reefhuis J, et al. The natural history of Duchenne muscular dystrophy: analysis of data from a Dutch survey and review of age-related events. 2004 Online Leyden Muscular Dystrophy pages[□], <http://www.dmd.nl/>
3. Bushby KM. Genetic and clinical correlation of Xp21 muscular dystrophy. *J Inher Metab Dis* 1992;15:551–64
4. Muntoni F, Torelli S, Ferlini A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol* 2003;2:731–40
5. Nicholson LV, Johnson MA, Bushby KM, et al. Integrated study of 100 patients with Xp21 linked muscular dystrophy using clinical, genetic, immunochemical and histopathological data. Trends across the clinical groups. *J Med Genet* 1993;30:728-36
6. Sifringer M, Uhlenberg B, Lammel S, et al. Identification of transcripts from a subtraction library which might be responsible for the mild phenotype in an intrafamilially variable course of Duchenne muscular dystrophy. *Hum Genet* 2004;114:149–56
7. Escolar DM, Buyse G, Henricson E, et al. CINRG randomized controlled trial of creatine and glutamine in Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* 2005;58:151–55
8. Engel AG, Osawa C. Dystrophinopathies. in Engel AG, Franzini-Armstrong C, eds. *Myology*, McGraw Hill, New-York 2004: 961-1020
9. Hawke TJ, Garry DJ. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* 2001;91: 534-551
10. Christov, C, Chretien, F, Abou Khalil R, et al. Muscle satellite cells and endothelial cells: close neighbors and privileged partners. *Mol Biol Cell*. 2007;18:1397-409
11. Chazaud, B, Sonnet C, P. Lafuste, et al. Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth. *J. Cell Biol*. 2003;163:1133-43
12. Arnold, L, Henry, A, Poron , et al. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med*. 2007;204:1057-69
13. Wehling M, Spencer MJ, Tidball JG, et al. A nitric oxide synthase transgene ameliorates muscular dystrophy in mdx mice. *J. Cell Biol*.2001;155: 123–131
14. Stein, M, Keshav, S, Harris N, et al. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: A marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med* 1992;176: 287–92
15. Vidal B, Serrano AL, Tjwa M, et al. Fibrinogen drives dystrophic muscle fibrosis via a TGFb/alternative macrophage activation pathway. *Genes Dev*2008;22:1747-52
16. Carlson ME, Hsu M, Conboy IM. Imbalance between pSmad3 and Notch induces CDK inhibitors in old muscle stem cells. *Nature* 2008;454:528-32
17. Massague J, Cheifetz S, Endo T, Nadal-Ginard B .Type β transforming growth factor is an inhibitor of myogenic differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:8206-10
18. Li Y, Foster W, Deasy BM, Chan Y, et al. Transforming growth factor- β 1 induces the differentiation of myogenic cells into fibrotic cells in injured skeletal muscle: a key event in muscle fibrogenesis. *Am J Pathol* 2004;164:1007-19
19. Alexakis C, Partridge T ,Bou Gharios G. Implication of the satellite cell in dystrophic muscle fibrosis: a self perpetuating mechanism of collagen overproduction. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;293: 661-9
20. Hussain SN, Matar G, Barreiro E, Florian M, Divangahi M, Vassilakopoulos T. Modifications of proteins by 4-hydroxy-2-nonenal in the ventilatory muscles of rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol*

Physiol. 2006;290: 996-1003

21. Uchida K. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Prog Lipid Res.* 2003;42: 318-43
22. Gundersen JH, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microscopy* 1987;147: 227-69
23. De Leeuw J. Non-linear principal component analysis and related techniques <http://www.preprints.stat.ucla.edu>
24. Meulman J, Van der Kooij AJ, Heiser WJ. Principal Components Analysis with non linear Optimal Scaling Transformations for Ordinal and Nominal data. In: D Kaplan, ed, *Handbook of quantitative Methodolgy for the Social Sciences*, Thousand Oaks, CA:Sage Publications, Inc., 2004:49-70
25. Barend PL, Engel AG. Are hypercontracted muscle fibers artifacts and do they cause rupture of the plasma membrane. *Neurology* 1987;37:1466-75
26. Bell CB, Conen PE. Histopathological changes in Duchenne Muscular Dystrophy. *J Neurol Sci* 1968;7: 529-40
27. Connolly AM, Keeling RM, Mehta S, Pestronk A, Sanes JR. Three mouse models of muscular dystrophy: the natural history of strength and fatigue in dystrophin-, dystrophin/utrophin-, and laminin $\alpha 2$ -deficient mice. *Neuromuscul Disord* 2001;118:703-12
28. Kossakowska AE, Edwards DR, Lee SS, et al. Altered balance between matrix metalloproteinases and their inhibitors in experimental biliary fibrosis. *Am J Pathol* 1998;153:1895-902
29. Schnaper HW, Kopp JB, Poncelet AC, et al. Increased expression of extracellular matrix proteins and decreased expression of matrix proteases after serial passage of glomerular mesangial cells. *J Cell Sci* 1996;109: 2521-8
30. LiY.Y., Feng YQ, Kadokami T, et al. Myocardial extracellular matrix remodeling in transgenic mice overexpressing tumor necrosis factor α can be modulated by anti-tumor necrosis factor α therapy. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 2000;97: 12746-51
31. Herpel E, Pritsch M, Koch A, et al. Interstitial fibrosis in the heart: differences in extracellular matrix proteins and matrix metalloproteinases in end-stage dilated, ischaemic and valvular cardiomyopathy. *Histopathology* 2006;48:736-7
32. Selman M, King TE, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann. Intern. Med.* 2001;134 ,136-51
33. Nandan D, Clarke EP, Ball EH, Sanwal BD. Ethyl-3,4 dihydroxybenzoate inhibits myoblast differentiation: evidence for an essential rôle of collagen. *J Cell Biol*;1990;110:1673-9
34. Saitoh O, Periasamy M, Kan M, Matsuda R. cis-4-Hydroxy-L-proline and ethyl-3,4-dihydroxybenzoate prevent myogenesis of C2C12 muscle cells and block MyoD1 and myogenin expression. *Exp Cell Res.*1992;200:70-6.
35. Chilibeck A, Paterson DH, Cunningham DA, Taylor AW, Noble EG. Muscle capillarization O₂ diffusion distance, and VO₂ kinetics in old and young individuals. *J Appl Physiol.* 1997;82:63-91
36. Tidball JG, Wehling-Henricks M. The role of free radicals in the pathophysiology of muscular dystrophy. *J Appl Physiol* 2007;102: 1677-86
37. Touboul D, Brunelle A, Halgand F, De La Porte S, Laprevote O. Lipid imaging by gold cluster time-of-flight secondary ion mass spectrometry: application to Duchenne muscular dystrophy. *J Lipid Res* 2005;46:1388-95
38. Grady RM, Zhou H, Cunningham JM, et al. Interactions between neutrophils and macrophages promote macrophage killing of rat muscle cells in vitro. *J Physiol* 2003;547: 125-32
39. McLennan IS. Degenerating and regenerating skeletal muscles contain several subpopulations of

- macrophages with distinct spatial and temporal distributions. *J. Anat* 1996;188:17-28
40. St Pierre BA, Tidball JG. Differential response of macrophage subpopulations to soleus muscle reloading after rat hindlimb suspension. *J Appl Physiol* 1994;77:290-7
41. Wakayama Y, Schotland DL, Bonilla E, Orecchio E. Quantitative ultrastructural study of muscle satellite cells in Duchenne dystrophy. *Neurology* 1979;29: 401-7
42. Decary S, Ben Hamida C, Mouly V, Barbet JP, Hentati F, Butler-Browne GS. Shorter telomeres in dystrophic muscle consistent with extensive regeneration in young children. *Neuromuscular Disord* 2000;10:113-20
43. Lund TC, Grange RW, Lowe DA. Telomere shortening in diaphragm and tibialis anterior muscles of aged mdx mice. *Muscle Nerve* 2007;3:387-90
44. Mauviel A. Transforming growth factor- β : a key mediator of fibrosis. *Methods Mol Med* 2007, 117:69-80
45. Bernasconi P, Torchiana E, Confalonieri P, et al. Expression of transforming growth factor β 1 in dystrophic patient muscles correlates with fibrosis. *J Clin Invest* 1995;96:1137-44
46. Sun G, Haginoya K, Wu Y, et al. Connective tissue growth factor is overexpressed in muscles of human molecular dystrophy. *J Neurol Sci* 2008;267: 48-56
47. Fadic R, Mezzano V, Alvarez K, et al. Increase in decorin and biglycan in Duchenne Muscular Dystrophy: role of fibroblasts as cell source of these proteoglycans in the disease. *J Cell Mol Med* 2006;10:758-69
48. Zanotti S, Saredi S, Ruggieri A, et al. Altered extracellular transcript expression and protein modulation in primary Duchenne muscular dystrophy myotubes. *Matrix Biol* 2007;26: 615-24
49. Morrison J, Palmer DB, Cobbold S, et al. Effect of T-lymphocyte depletion on muscle fibrosis in the mdx mouse. *Am J Pathol* 2005;166:1701-10
50. Mochizuki Y, Ojima K, Uezumi A, et al. Participation of bone marrow-derived cells in fibrotic changes in denervated skeletal muscle. *Am J Pathol.* 2005;166:1721-32
51. Fernet M, Hall J. Predictive markers for normal tissue reactions: Fantasy or reality? *Cancer Radiother.* 2008 Aug 25 [Epub ahead of print]
52. Wang H, Mengsteab S, Tag CG, et al. Transforming growth factor- β 1 gene polymorphisms are associated with progression of liver fibrosis in Caucasians with chronic hepatitis C infection. *World J Gastroenterol.* 2005;11:1929-36
53. Xaubet A, Marin-Arguedas A, Lario S, et al. TGF- β 1 gene polymorphisms are associated to disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:431-5
54. Molina M, Xaubet A, Li X, et al. Angiotensinogen gene G-6A polymorphism influences Idiopathic Pulmonary Fibrosis disease progression. *Eur Respir J* 2008 May 28.
55. Bayat A, Watson JS, Stanley JK, Ferguson MW, Ollier WE. Genetic susceptibility to Dupuytren disease: association of Zfp9 transcription factor gene. *Plast Reconstr Surg.* 2003;111:2133-9.
56. Cohn RD, van Erp C, Habashi JP, et al. Angiotensin II type 1 receptor blockade attenuate TGF- β -induced failure of muscle regeneration in multiple myopathic states. *Nat Med* 2007;13:204-210.

Mise au point d'un modèle expérimental de fibrose musculaire

8.1 Résumé

Un nouveau modèle de fibrose expérimentale musculaire chez la souris mdx reproduisant une dystrophie musculaire (article en cours)

A new model of experimental fibrosis in hindlimb skeletal muscle of mdx mouse mimicking muscular dystrophy

Le rôle central de la fibrose endomysiale dans le processus dystrophique a rendu nécessaire la mise au point d'un modèle expérimental de myofibrose dystrophique. La souris *mdx*, modèle murin de la DMD présente une fibrose musculaire endomysiale tardive après 18 mois en dehors du diaphragme et un déficit moteur lui aussi modéré et tardif. Les méthodes de lésions musculaires, utilisées pour étudier les mécanismes de réparation de la fibre musculaire, cytotoxiques (cardiotoxine) ou mécaniques par lacération ou dénervation, restent avant tout des lésions aiguës conduisant pour les premières à un processus inflammatoire et pour les secondes à une désorganisation du réseau cytosquelettique et de la jonction musculo-tendineuse.

J'ai mis au point une nouvelle méthode de lésion musculaire focale profibrosante du tibialis antérieur chez la souris *mdx* jeune âgée de 2 mois après la crise inflammatoire: série de 15 micropiqures quotidiennes avec une aiguille de très faible diamètre (épingle entomologique *minuties diamètre 0,15mm kabourek 05415*) pendant 15 jours validée pour chaque étape par 3 séries de 5 souris âgées de 2 mois au moment de la lésion.

L'évolution à J8 de la dernière série de piqûres montre l'installation d'une fibrose endomysiale au trichrome de Masson et nous a conduit à analyser l'évolution à court terme J8 et moyen terme (1, 2, 3 mois):

- (i) de la lésion musculaire, des centralisations nucléaires et de la taille des fibres en HE,
- (ii) de la fibrose endomysiale par quantification de la surface de collagène I,
- (iii) de la force musculaire isométrique du tibialis lésé comparé au tibialis contrôle controlatéral.

A J8, la diminution de la force isométrique est significative ($p < 0,01$) sans augmentation des fibres centronucléées et associée à une forte augmentation de l'immuno-marquage pour le collagène I dans l'endomysium ($p < 0,001$) cf figure 1. La présence de fibres hypercontractées évoque un mécanisme identique au processus dystrophique de la DMD et la lésion est peu inflammatoire.

A 1 mois, la fibrose endomysiale mesurée par la surface en collagène I reste significativement plus élevée dans le TA lésé alors que la force musculaire n'est pas très différente du TA non lésé cf figure 1. Des phénomènes de compensation avec des fibres plus hypertrophiques est probable, connaissant les fortes capacités de régénération de la souris *mdx*.

A 2 et 3 mois, la fibrose endomysiale reste stable et significativement plus élevée que dans le TA contrôle, 15% versus 7%, et la diminution significative de la force musculaire développée par le TA lésé se confirme, cf figure 3. Par ailleurs, la force développée par le TA contrôle diminue avec le vieillissement de la souris *mdx* âgée de 5 mois en fin d'étude. Le nombre de fibres centronucléées du TA lésé est identique au TA contrôle à 2 mois et stable. Il est plus faible à 3 mois du côté lésé témoignant d'une capacité de régénération moindre à ce stade, cf figure 2, sachant que la régénération est théoriquement très importante chez la *mdx* jusqu'à un âge avancé (>18 mois) [Louboutin, 1993]. La quantification du collagène I confirme la persistance d'une fibrose endomysiale stable à 2 et 3 mois. Le rôle du collagène sur la diminution de capacité de régénération des myoblastes déjà démontré par Nadan peut expliquer cette évolution à long terme sur une fibrose stabilisée [Nadan, 1990].

Au total, l'aspect du muscle TA lésé associe de rares foyers de nécrose régénération avec une forte irrégularité de calibre des fibres musculaires, quelques fibres hypercontractées et une fibrose endomysiale. Ces lésions sont comparables à celles du diaphragme de la souris *mdx* connues pour être proche de la dystrophie musculaire de la DMD. Ce mécanisme de lésion musculaire expérimental chez la souris sauvage C57 induit aussi des lésions myocytaires aiguës mais il ne

constitue pas de fibrose endomysiale à long terme.

L'analyse quantitative de ARN messenger en RtgPCR à J8 n'a pas permis de mettre en évidence une augmentation du TGF- β , de l' α -SMA ou du collagène I en comparant le TA lésé, le TA contrôle et le diaphragme de la même souris. Il est probable que cette mesure est trop tardive par rapport à la cinétique lésionnelle impliquant le TGF- β qui augmente uniquement dans les 24 à 48 heures suivant une lésion ainsi que l' α -SMA impliquant les myofibroblastes.

L'absence d'augmentation de ces ARN messagers, même dans le diaphragme pourtant très dystrophique et fibrotique est connu dès que la souris *mdx* est sortie de la crise inflammatoire de 28 jours et nos souris sont âgées de 2 mois [Gosselin, 2004]. Cette mesure n'est donc pas contributive.

L'analyse de la lox en immuno-histochimie à J8 montre une expression dans l'endomysium qui doit être précisée mais qui pourrait participer à la constitution d'une fibrose stable et définitive dans le muscle comme cela a été décrit dans les régions fibrotiques cardiaques de la souris *mdx* [Spurney, 2008]. Une analyse en Western Blot des différentes protéines et de la Lox est en cours ainsi que la caractérisation des facteurs cellulaires intervenant dans la fibrose musculaire.

Au total, ce modèle de lésion musculaire liée à un stress mécanique répété est simple à réaliser, reproductible et stable dans le temps avec constitution d'une fibrose endomysiale qui permet d'envisager des évaluations de thérapeutiques antifibrosantes chez la souris *mdx* de façon plus satisfaisante.

8.2 Article en cours

A new model of experimental fibrosis in hindlimb skeletal muscle of mdx mouse mimicking muscular dystrophy

Isabelle DESGUERRE^{1,2}, Ludovic ARNOLD, Shahragim TAJBASHKSH, Romain K GHERARDI^{1,2}, Fabrice CHRETIEN, Arnaud FERRY, Bénédicte CHAZAUD

¹AP-HP, Centre de Référence des Maladies Neuromusculaires "Garches-Necker-Mondor-Hendaye", France; AP-HP, Groupe hospitalier Necker - Enfants Malades, "Neuropédiatrie", Paris; ²INSERM U841 "Mondor Biomedical Research Institute", Paris XII University, Faculty of Medicine, Department of Neurosciences, Team 10", 8, rue de Général Sarrail, 94010 Créteil, France, Isabelle Desguerre, paediatrician

¹AP-HP, Centre de Référence des Maladies Neuromusculaires "Garches-Necker-Mondor-Hendaye", France; AP-HP, Groupe hospitalier Henri Mondor, "Pathologie", Créteil, ²INSERM U841 "Mondor Biomedical Research Institute", Paris XII University, Faculty of Medicine, Department of Neurosciences, Team 10", 8, rue de Général Sarrail, 94010 Créteil, France, Romain K Gherardi, professor, head of the department of Neurosciences

Introduction

Duchenne muscular dystrophy (DMD), the most common neuromuscular disorder in school age is a progressive X linked myopathy characterized by complete lack of dystrophin in skeletal muscle [Muntoni, 2003]. DMD myopathologic alterations in the muscle are related to repeated cycles of acute myofibre necrosis and regeneration leading to severe terminal myofibre degeneration and extensive fibrosis [Engel, 2004]. Classically, the clinical evolution of this muscular dystrophy is severe, characterized by loss of ambulation around 10 years and cardiac and respiratory distress around 15 years leading to death [Van Essen, 2004]. This disease is in fact more heterogeneous, particularly the motor outcome, in part independently of the genotype, suggesting influence of epigenetic factors [Desguerre, 2007].

We demonstrated recently that early endomysial fibrosis is well correlated with later bad motor outcome in DMD patients [Desguerre 2008 submitted]. Endomysial fibrosis seems to be one of the key of muscle injury in DMD and the target of future therapy. The mechanisms by which myofibrosis develops in DMD remain largely unknown, but they are likely dependent of the release

of fibrogenic cytokines such TGF- β [Bernasconi, 1996; Zanotti, 2005] which peaks in DMD muscle between 2 and 6 years [Sun, 2008]. Moreover, dystrophic myotubes obtained from DMD affected muscle express high levels of TGF- β , collagens I et VI and metalloproteases [Pescatori, 2007].

Muscular dystrophy is characterized by the balance between muscle regeneration and myofibrosis [Engel, 2004]. Muscle tissue regeneration is a highly integrated process that involves both activation of quiescent progenitor cells residing beneath the myofiber basal lamina, the satellite cells [Davies, 2006], and the collaboration of non muscle cells including endothelial cells [Christov, 2007] and macrophages [Chazaud, 2003; Arnold, 2007]. Conversely, the mechanisms of myofibrosis remain incompletely resolved although general steps of fibrosis in different tissues such as kidney, liver or lung are better known [Sanderson, 1995; Kalluri, 2003; Selman, 2001]. The matrix components such as collagens are always involved in muscle fibrosis and the implication of profibrotic cytokines such as TGF- β are confirmed in the muscle [Yamasaki, 1994; Bernasconi, 1995]. The cell partners implicated in myofibrosis are macrophages, activated by cytokines and metalloproteases, T cells which activate and recruit macrophages derived from monocytes [Arnold 2007] and myogenic cell themselves which may switch into fibrotic cells, as it has been suggested in dystrophic mdx mice [Alexakis, 2007].

A better understanding of these mechanisms requires animal models to study the pathogenesis of fibrosis and to evaluate antifibrotic strategies. However, the murine model of DMD, the mdx strain, due to a point mutation in the dystrophin gene [Sicinski, 1989], is not satisfactory. Indeed, mdx mice show dystrophic lesions with endomysial fibrosis in limb skeletal muscles only at very old age, i.e. after 18 months [Iefacheur, 1995; Pastoret, 1993; Louboutin, 1993]. At 21 days of life, inflammatory lesions appears in muscles, associated with numerous central nucleated fibres followed by repeated cycles of myofibre regeneration without fibrosis [Torres, 1987; Tanabe, 1986; Coulton, 1988]. No evidence of muscular strength decrease is observed in normal condition

[Anderson, 1988]. However, hind limb mdx muscle exhibits deficits in maximal tetanic force and fatigue resistance after cytotoxic injury, even at long term (56 days) [Vignaud, 2007]. However, muscle regeneration after imposed injury is better in young than older mdx mice [Zacharias, 2001]

Diaphragm muscle is the sole muscle with real early dystrophic lesions, such as observed in DMD patients [Stedman, 1991] that is associated with decrease of muscle strength [Coirault, 2003]. Consequently, it is necessary to induce supplementary muscle injury to study the mechanisms of muscle regeneration and myofibrosis. In several studies, muscle injury were obtained by mechanical stress or cytotoxic lesion. Acute mechanical stress was obtained by laceration [Li, 2002; 2004] or denervation [Murray, 1982]. Cytotoxic injury mediated by cardiotoxin or notexin creates acute lesion with myonecrosis and accumulation of inflammatory cells [Shen, 2007; Arnold, 2007]. In mdx mice, the acute lesion resolves in 15 days without any persistence of endomysial fibrosis; centrally nucleated myocytes are observed as previously seen before the injury with high regenerative capacity [Itaki, 1995; Pastoret, 1995]. Nevertheless, many studies have used these models of acute injury which are unsatisfactory to explore mechanisms of chronic muscular dystrophy [Kääriäinen, 2000].

In the present work, we propose a new model of mechanical muscle injury by daily repeated micro-multipunctures, that triggers a micromechanical muscle lesion mimicking muscular dystrophy with endomysial fibrosis and lost of muscular strength.

Material and Methods

- **Muscle injury.** Mdx-4cv mice were bred and used according to French legislation. Experiments were conducted at 6-8 weeks of age. Fifteen micropunctures were made daily in the right tibialis anterior (TA) muscle with micropins used for entomology (150 µm diameter) during 2 weeks. Animals were rested for 1 week, 1 or 2 or 3 months after injury before analysis.

- **Strength measurement.** Neuromuscular function was evaluated by the measurement of in situ muscle contraction in response to nerve stimulation, as previously described [Vignaud, 2007]. Animals were anesthetised (i.p., pentobarbital sodium, 50 mg.kg⁻¹). The knee and foot were fixed with clamps. The distal tendon of the TA muscle was attached to an isometric transducer (Harvard Bioscience) using a silk ligature. All data provided by the isometric transducer were recorded and analysed on a microcomputer, using the PowerLab system (4SP, AD Instruments) and software (Chart 4, AD Instruments). The sciatic nerves were proximally crushed and distally stimulated by a bipolar silver electrode using supramaximal square wave pulses of 0.1 ms duration. All isometric measurements were then made after a 5 min rest period and at an initial muscle length of L₀ (length at which maximal tension was obtained during the twitch), as described. Single twitches or responses to tetanic stimulation (pulse frequency from 6.25, 12.5, 25, 50, 100 and 143 Hz) were successively recorded. At least 1 min was allowed between contractions. The P₀ (maximal tetanic force) parameter was studied. Muscle masses (m) were determined to calculate specific tensions (P₀/m).
- **Histology.** After contractile measurements, the animals were killed with an overdose of pentobarbital. Muscles were then weighed, frozen in liquid nitrogen, respectively, precooled in isopentane and stored at -80°C until histological analysis. 7 µm thick cryosections were treated for histological stainings: hematoxylin-eosin, Masson trichrome, and for immunolabellings.

Immunolabellings. Muscle sections were incubated with anti-collagen I antibody (1/40 over night 4 °C, Chemicon) overnight at 4°C, revealed with peroxidase-conjugated secondary antibody. Controls included incubation with whole rabbit IgGs.

- **Morphometric measures.** For each muscle, sections were made at 3 different levels within the TA muscle (upper third, median third, lower third). For each muscle, about 6-7 pictures were taken at x20 (HE) or x40 (collagen I staining) and were analyzed with Image J software

(For each time point 5 mice are analyzed, and the experiments have been repeated 3 times). The number of fibres containing centrally located nuclei was estimated on HE stained sections and given as a percentage of the total number of fibres. The area covered by collagen I/oxidase staining was evaluated in percentage of the total picture area.

- **Statistics.** Each experiment has been repeated independently 3 times. For each series, 5 mice for each time point were used. Student t test was used and $p < 0.05$ was considered as significant.

Results

Three series of 5 mice were analysed at each time point in order to describe and confirm the muscle injury, the kinetics of the muscle damage and that of the muscle strength.

At one week after injury, endomysial fibrosis was present and associated with muscle strength decrease. After one week resting, analysis of muscles after HE and trichrome stainings showed that treated TA presented important variability in fibre size, some necrotic and regenerative fibres, some hypercontracted fibres, few inflammatory cells and endomysial thickening between fibres, indicative of fibrosis deposit compared to contralateral TA (Fig. 1). Collagen I immunostaining confirmed the presence of matrix deposit between myofibres in the interstitial space (Fig. 1). The area covered by collagen was strongly increased (+66%) in treated vs. untreated muscles (19.3% vs. 6.6%, $p < 0.0001$) (Fig. 3A). Measurement of maximal force showed that the strength of the treated muscle was decreased by 15% compared to that of contralateral muscle ($p < 0.01$) (Fig. 3B). The number of centrally nucleated myofibres was not different in the injured (80%) than in the control group (79%) (Fig. 3C). To analyze whether this endomysial fibrosis was reversible, longer time points were analyzed.

At one month resting, muscle lesion were confirmed with stable endomysial fibrosis.

At one month resting, dystrophic process persisted associating irregular myofibers size, necrotic

fibres and endomysial fibrosis (Fig. 1). Hypercontracted fibres persisted (Fig. 1). Centrally nucleated fibres were constant both in injured TA, 56% and control TA, 58% (Fig 3C). The cross sectional area covered by collagen was still higher (+48%) in treated muscles compared to contralateral, 13.9% vs. 7.2%, $p < 0.0001$, (Fig. 3A). However, measurement of maximal force showed that the strength of the treated muscle was not significantly different from control even if the mean force was lower than in contralateral muscle, half of the mice showed a decrease in treated TA while half presented similar force in both muscles. This data suggested a compensatory mechanism.

At two and three months resting, the endomysial fibrosis associated with muscle strength decrease was confirmed. At two and three months resting, the dystrophic pattern of the injured muscle was persistent including a lot of large hypertrophic fibres presenting several nuclei in transversal sections, irregular size of the fibres, few necrotic areas and regenerative fibres, as usually observed in mdx mice (Fig. 2). The number of centrally nucleated myofibres remained at the same levels at one and two months without any differences between injured TA and control TA, around 58% of the fibres (Fig. 3C). At three months, injured muscle showed a significantly lower number of centrally nucleated fibres, 50% versus 63%, ($p < 0.000$) (Fig. 3C). Those data were confirmed in all the series of treated mdx mice. The cross sectional area covered by collagen I was still higher, +55% vs. +48% in treated muscles compared to contralateral, ($p < 0.05$) (Fig. 3A). Measurement of maximal force showed that the strength of the treated muscle was significantly decreased compared to contralateral muscle, -14% ($p < 0.01$) and -12% ($p < 0.05$) for 2 and 3 months resting, respectively, (Fig. 3B).

When considering the evolution of the untreated mdx TA muscle, the strength remained stable at 2, 3, 4 months of age, since the experiment begun at 2 months of age, and Collagen I area remained also stable, around 7%. At 5 months of age (i.e. 3 month after the

beginning of the experiment), the number of centrally nucleated fibres and collagen I area were unchanged, while the TA muscle strength decreased, by 15% ($p < 0.05$).

Discussion

In clinical studies of DMD patients, we have showed that early endomysial fibrosis is correlated with bad motor outcome and muscle strength decrease [Desguerre, 2007]. In the present work, we have set up a model of repeated mechanical micro-injuries in mdx muscle to induce a fibrotic process mimicking muscular dystrophy.

The kinetics of the fibrosis process appeared to occur in two steps. One week resting after the end of injury, a significant endomysial fibrosis was observed in association with a significant functional weakness of the treated muscle. Three weeks later, the fibrotic area decreased partly, although remaining high compared to control and then remained constant until 3 months resting.

As shown by immunolabelling, endomysial fibrosis was composed of collagen I, the most important component of the extracellular matrix [Tomasek, 2002]. Preliminary results indicate a positive labelling for Lysyl Oxidase (Lox) in the endomysial space. Lox is responsible of the formation of pyridoline cross-links in the matrix to assess the irreversibility of fibrosis [Van der Slot, 2004]. This is in accordance with the persistence of collagen I deposit at 3 months after the end of injury. Recently, high expression of Lox is shown to be correlated with fibrosis and cardiac dysfunction in mdx mice [Spurney, 2008].

The nature of the cells that synthesize collagens in skeletal muscle is still unknown. Myofibroblasts, that have been involved in fibrogenesis in various tissues, such as the liver, have never been identified in skeletal muscle [Sanderson, 1995; Kalluri, 2003; Selman, 2001]. Therefore, in muscle, fibrogenesis may be induced by several cell types, including interstitial fibroblasts, periendothelial

cells and myogenic cells themselves [Alexakis, 2007]. TGF- β is thought to play a crucial role in general fibrotic process [Mauviel, 2007]. Li confirmed the local expression of TGF- β by myogenic cells in injured muscle of C57BL by laceration and that TGF- β plays a significant rôle in both initiation of fibrotic cascades in skeletal muscle and the induction of myogenic cells to differentiate into myofibroblastic cells [Li, 2004]. TGF- β and collagen 1 is particularly increased in diaphragma muscle of mdx mice from 6 to 9 weeks of age and early treatment with decorin permits the decrease of fibrosis [Gosselin, 2004]. Also, molecular mechanisms involved in this fibrotic process, such as TGF- β , are currently under investigation [Tidball, 2007; Turk, 2005].

In the same time, collagen I content in the contralateral control muscle remained low in a constant range. These data confirm that muscular dystrophy damage in the mdx mouse hindlimb muscle is later than 5 months of age [Lefaucheur, 1994], which is the end point of our study. Endomysial fibrosis is usually observed only after 18 months in hindlimb muscles [Pastoret, 1993]. Mdx mouse is a model of important regeneration and, accordingly, centrally nucleated fibres are present in 80% of the fibres at 26 weeks in the EDL [Louboutin, 1993]. In the present series, the number of centrally nucleated fibres in TA were constant at the different stages after the lesions, i.e. between 2 and 4 months of age in both the control and injured TA. The decrease of the number of centrally nucleated myofibres in the injured muscle observed at 5 months of age (3 months after injury) suggests that endomysial fibrosis could affect per se the capacity of regeneration of the mdx muscle as proposed by Alexakis et al. [Alexakis, 2007]. As Collagen content is known to decrease the growth and the differentiation of cultured myoblasts [Nadan, 1990; Saitoh, 1992], the presence of collagen 1 in the interstitial space of the injured TA could affect the regeneration of the muscle.

The variability of the size of the fibres is very important in the injured muscle. This phenomenon is observed, at a lower level in control muscle; moreover, size variability increased with age. The variability coefficient of the diameter of the fibres is classically twice higher in mdx

mice and the number of hypertrophic fibres increases from 10 weeks of age, with a greater cross section area (+50%) at 6 months of age [Pastoret, 1993]. In the present model, muscle damage seemed to increase the number of hypertrophic fibres with some splitting. In the same time, as in the muscle of DMD patients, we observed hypercontracted fibres in the injured muscle at the different time points.

No severe inflammation was observed at any time point in the injured muscle. Some focal area of necrosis was present in the control and injured TA as classically reported around 2% of total area [Pastoret, 1995]. Anyway, the first time point studied is one week after the end of injury and the inflammatory process, which is the first part of the extracellular matrix remodeling process after injury, is likely to be resolved [Zacharias, 2001].

When comparing time point to time point, the histological pattern of injured TA was similar, and particularly concerning endomysial fibrosis, to that of the diaphragm muscle, reported as a good model of DMD [Stedman, 1991].

Strength of the muscle strongly decreased after 1 week resting, i.e. when collagen area was the highest. However, at 1 month resting, force had returned to the contralateral values in half of the treated animals. This phenomenon may be explained by a compensatory mechanism particularly involved in mdx mice with high potential of regeneration and muscle hypertrophy. Then at 2 and 3 months, the decrease in maximal force seemed to be stabilized. Indeed, although the force of the untreated muscle decreased with age, and notably at 3 months post-injury (from 117 to 93 g/100 ml of muscle, $p < 0.05$), the difference between treated and untreated muscle remained constant (see Fig. 3B). This decrease was associated both with the decrease of regenerative process in the injured muscle and with the persistence of the endomysial fibrosis. Interestingly, although mdx muscle exhibits important capacities of regeneration, Vignaud et al. demonstrated that muscle force decreases after cytotoxic lesion even one month later after histological recovery [Vignaud, 2007].

This model of muscle injury chosen in the present study is interesting because it mimics chronic injury. Acute muscle injury, such as cytotoxicity induced by notexin or cardiotoxin injection, creates inflammatory injury with complete recovery [Zacharias, 2001]. Mechanical injury, such as laceration or denervation, induces a complete disruption between myofibres and the connective tissue framework [Kääriäinen, 2000]. For these reasons, these two models appear to be far from the muscular dystrophy process observed in human dystrophies [Engel 2004]. The histological features of the present model are identical of those known in DMD including high variability of the fibre size, hypercontracted fibres, endomysial fibrosis and cycles of necrosis/regeneration. In this model, the inflammatory process is moderate and the micropunctures could be compared with repeated mechanical stress with respect of the connective tissue framework and the myotendinous junction as observed in human muscular dystrophy with genetic defect of the DAG complex [Engel, 2004; Davies, 2006].

These data suggest that repeated microinjuries of dystrophin-deficient muscle trigger a endomysial fibrotic process that stabilizes with time. This process is associated with a decrease of muscle strength. Endomysial fibrosis seems to be one of the target of therapy in DMD. This model will be useful to study the mechanisms of fibrosis process in dystrophin deficient muscle and to evaluate antifibrotic treatment.

Figure legends

Figure 1. Histological analysis of injured TA muscle at 1 week and 1 month resting most-injury. TA muscles of 2 month-old mice were micropunctured during 2 weeks and rested for either 1 week or 1 month. Muscle sections were stained as indicated for HE or trichrome staining, and collagen I was revealed by immunolabelling. Diaphragm of the same animals were also analysed at each time point. Bars=20 µm.

Figure 2. Histological analysis of injured TA muscle at 2 and 3 months resting most-injury. TA

muscles of 2 month-old mice were micropunctured during 2 weeks and rested for either 2 or 3 months. Muscle sections were stained as indicated for HE or trichrome staining, and collagen I was revealed by immunolabelling. Diaphragm of the same animals were also analysed at each time point. Bars=20 μ m.

Figure 3. Quantitative analysis of muscle damage in injured and untreated contralateral TA muscles. TA muscles of 2 month-old mice were micropunctured during 2 weeks and rested for either 1 week or 1, 2 or 3 months. (A) Collagen 1 area was quantified after immunolabelling and peroxidase staining as shown in Figures 1 and 2. (B) Muscle maximal force was evaluated for each muscle. (C) The number of centrally nucleated myofibres was estimated after HE staining. Results are means \pm sem of at least 3 separate experiments (4-5 mice in each experiments).

Figure 1. Histological analysis of injured TA muscle at 1 week and 1 month resting most-injury.

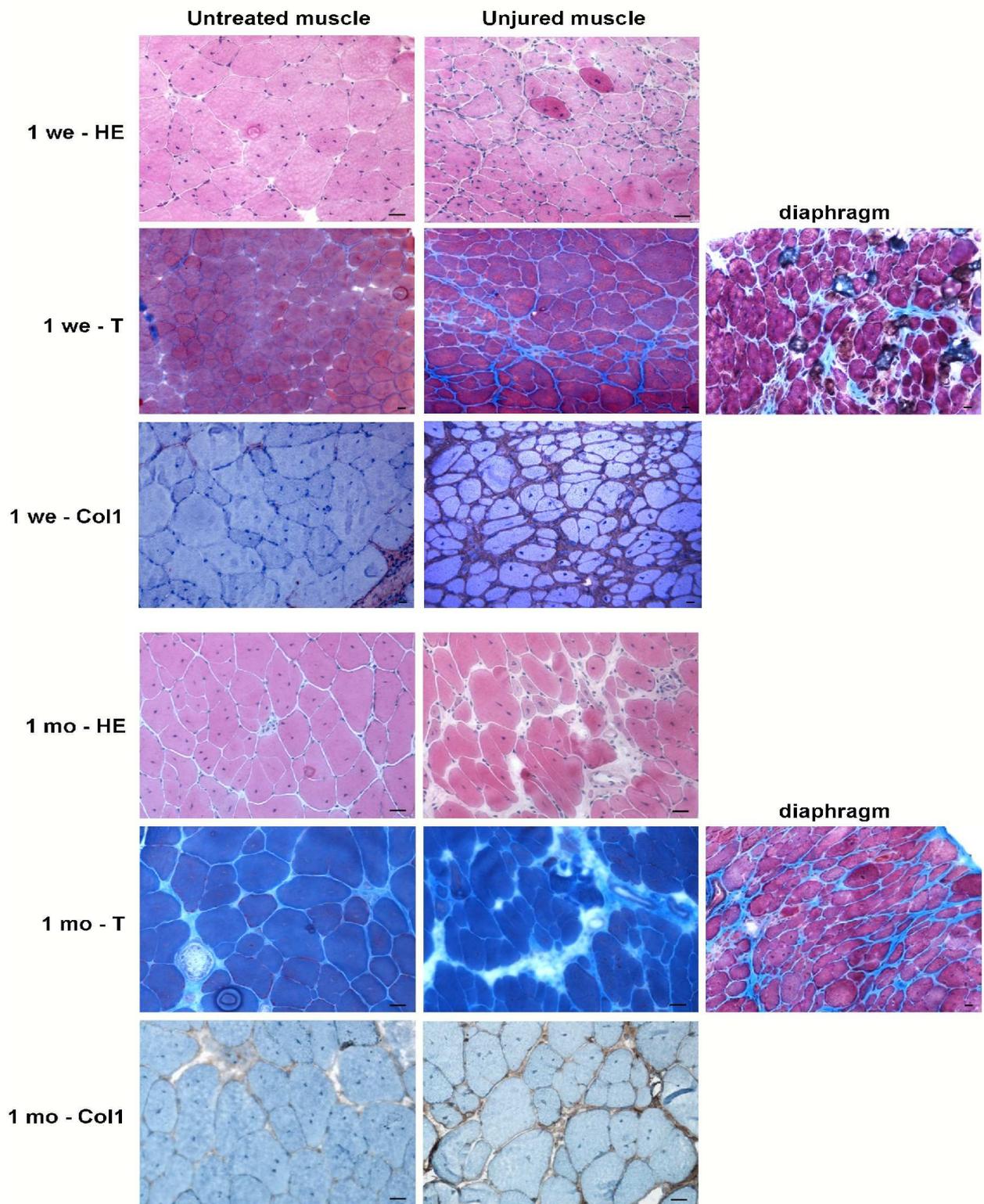


Figure 2. Histological analysis of injured TA muscle at 2 and 3 months resting most-injury.

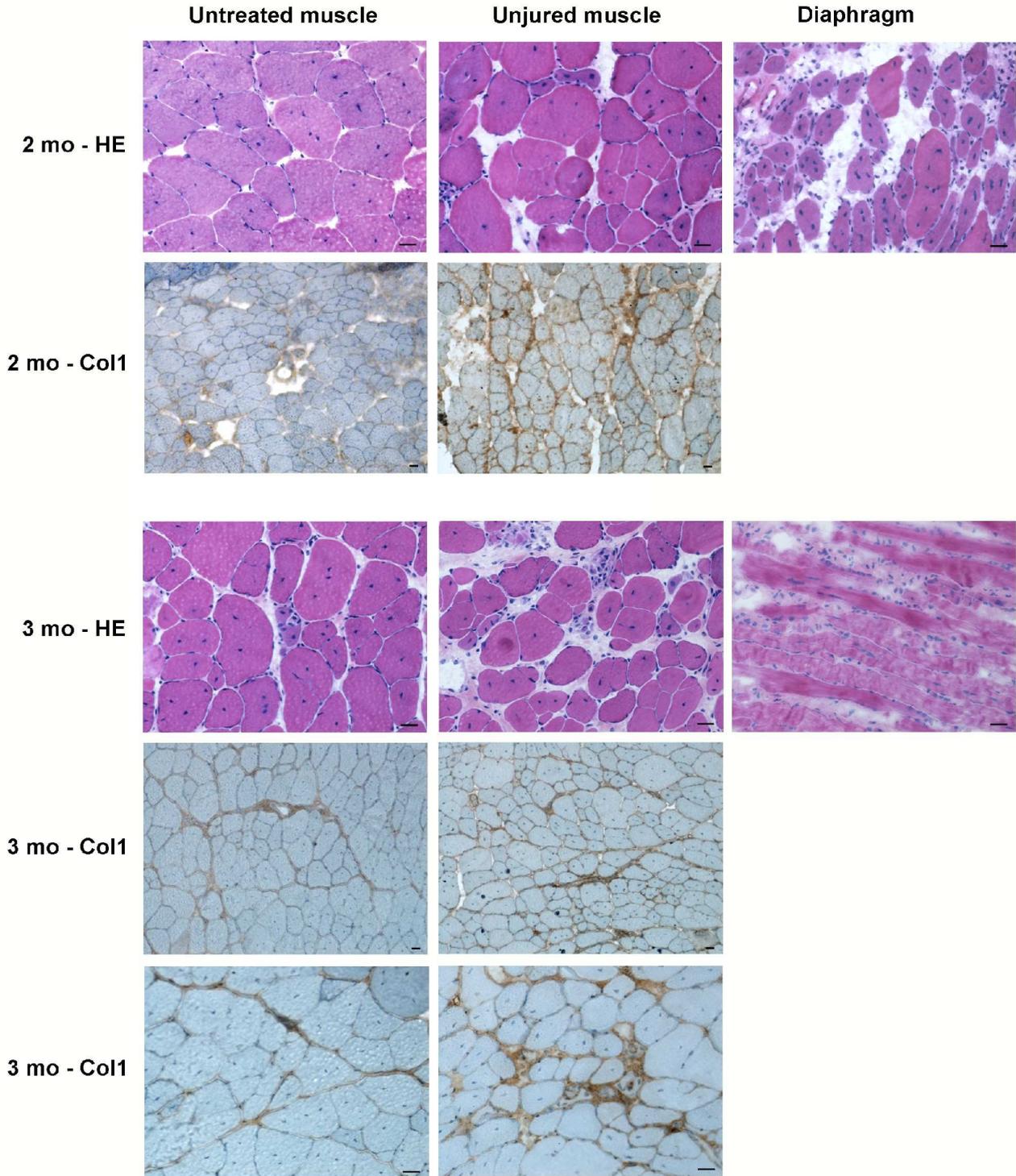
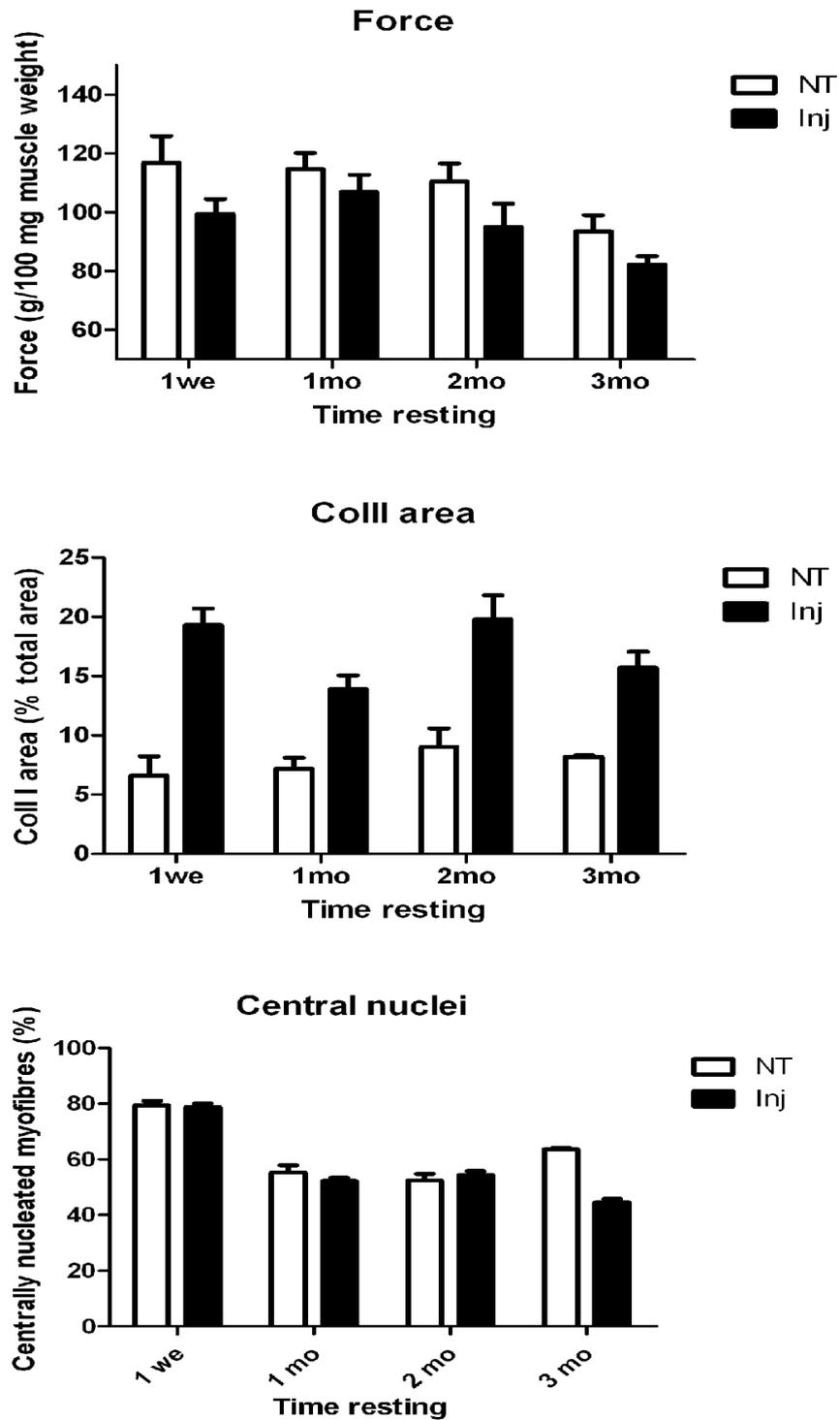


Figure 3. Quantitative analysis of muscle damage in injured and untreated contralateral TA muscles.



Bibliography

- ✓Alexakis C, Partridge T, Bou Gharios G. Implication of the satellite cell in dystrophic muscle fibrosis: a self perpetuating mechanism of collagen overproduction. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 293: 661-9.
- ✓Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, Plonquet A, Gherardi RK, Chazaud B. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med*. 2007; 204(5): 1057-69
- ✓Bernasconi P, Torchiana E, Confalonieri P, Brugnani R, Barresi R, Mora M, Cornelio F, Morandi L, Mantegazza R. Expression of transforming growth factor- β 1 in dystrophic patient muscles correlates with fibrosis. Pathogenetic role of a fibrogenic cytokine. *J Clin Invest*. 1995; 96(2): 1137-44.
- ✓Chazaud B, Sonnet C, Lafuste P, Bassez G, Rimaniol AC, Poron F, Authier FJ, Dreyfus PA, Gherardi RK. Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth. *J Cell Biol*. 2003; 163(5): 1133-43.
- ✓Christov C, Chretien F, Abou-Khalil R et al. Muscle Satellite Cells and Endothelial Cells: Close Neighbors and Privileged Partners. *Molecular Biology of the Cell* 2007; 18, 1397–09.
- ✓Coirault C, Pignol B, Cooper RN, Butler-Browne G, Chabrier PE, Lecarpentier Y. Severe muscle dysfunction precedes collagen tissue proliferation in mdx mouse diaphragm. *J Appl Physiol*. 2003; 94(5): 1744-50.
- ✓Coulton GR, Morgan JE, Partridge TA, Sloper JC. The mdx mouse skeletal muscle myopathy: I. A histological, morphometric and biochemical investigation. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1988; 14(1): 53-70.
- ✓Coulton GR, Curtin NA, Morgan JE, Partridge TA. The mdx mouse skeletal muscle myopathy: II. Contractile properties. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1988; 14(4):299-314.
- ✓Davies KE and Nowak KJ. Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players. *Nature reviews* 2006; 7: 762-773.
- ✓Desguerre I, Christov C, Mayer M, Becane HM, Zeller R, Chelly J, Gherardi R. Phenotypic heterogeneity of Duchenne muscle dystrophy assessed by long term follow-up and rôle of endomysial fibrosis in the muscle. [abstract]. *Eur J Paediatric Neurol* 2007; 11 (suppl 1): 37
- ✓Engel AG, Osawa C. Dystrophinopathies. in Engel AG, Franzini-Armstrong C. *Myology*, 2003; 961-1020 McGraw Hill, New-York.

- ✓Gosselin LE, Williams JE, Deering M, Brazeau D, Koury S, Martinez DA. Localization and early time course of TGF- β 1 mRNA expression in dystrophic muscle. *Muscle Nerve*. 2004; 30(5): 645-53.
- ✓Itagaki Y, Saida K, Iwamura K. Regenerative capacity of mdx mouse muscles after repeated applications of myo-necrotic bupivacaine. *Acta Neuropathol*. 1995; 89(4): 380-4
- ✓Kääriäinen M, Järvinen T, Järvinen M, Rantanen J, Kalimo H. Relation between myofibers and connective tissue during muscle injury repair. *Scand J Med Sci Sports*. 2000; 10(6): 332-7.
- ✓Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest*. 2003; 112(12): 1776-84.
- ✓Lefaucheur JP, Pastoret C, Sebille A. Phenotype of dystrophinopathy in old mdx mice. *Anat Rec*. 1995; 242(1): 70-6.
- ✓Li Y, Foster W, Deasy BM, Chan Y, Prisk V, Tang Y, Cummins J, Huard J. Transforming growth factor- β 1 induces the differentiation of myogenic cells into fibrotic cells in injured skeletal muscle: a key event in muscle fibrogenesis. *Am J Pathol*. 2004; 164(3): 1007-19.
- ✓Li Y, Huard J. Differentiation of muscle-derived cells into myofibroblasts in injured skeletal muscle. *Am J Pathol*. 2002; 161(3): 895-907
- ✓Louboutin JP, Fichter-Gagnepain V, Thaon E, Fardeau M. Morphometric analysis of mdx diaphragm muscle fibres. Comparison with hind limb muscles. *Neuromuscul Disord*. 1993; 3(5-6): 463-9.
- ✓Mauviel A. Transforming growth factor- β : a key mediator of fibrosis. *Methods Mol. Med*. 2007; 117: 69–80.
- ✓Murray MA, Robbins N. Cell proliferation in denervated muscle: identity and origin of dividing cells. *Neuroscience*. 1982; 7(7): 1823-33.
- ✓Muntoni F, Torelli S, Ferlini A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol* 2003; 2 :731–40.
- ✓Nandan D, Clarke EP, Ball EH, Sanwal BD. Ethyl-3,4 dihydroxybenzoate inhibits myoblast differentiation: evidence for an essential role of collagen. *J Cell Biol* 1990; 110: 1673-79.
- ✓Pastoret C, Sebille A. Age-related differences in regeneration of dystrophic (mdx) and normal muscle in the mouse. *Muscle Nerve*. 1995; 18(10): 1147-54.
- ✓Pastoret C, Sebille A. Further aspects of muscular dystrophy in mdx mice. *Neuromuscul Disord*. 1993; 3(5-6): 471-5.

- ✓Pastoret C, Sebille A. mdx mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. *J Neurol Sci.* 1995; 129(2): 97-105.
- ✓Pescatori M, Broccolini A, Minetti C, Bertini E, Bruno C, D'amico A, Bernardini C, Mirabella M, Silvestri G, Giglio V, Modoni A, Pedemonte M, Tasca G, Galluzzi G, Mercuri E, Tonali PA, Ricci E. Gene expression profiling in the early phases of DMD: a constant molecular signature characterizes DMD muscle from early postnatal life throughout disease progression. *FASEB J.* 2007; 21(4): 1210-26
- ✓Saitoh O, Periasamy M, Kan M, Matsuda R. cis-4-Hydroxy-L-proline and ethyl-3,4-dihydroxybenzoate prevent myogenesis of C2C12 muscle cells and block MyoD1 and myogenin expression. *Exp Cell Res.* 1992; 200(1): 70-6
- ✓Sanderson N, Factor V, Nagy P, Kopp J, Kondaiah P, Wakefield L, Roberts AB, SpornMB, Thorgeirsson SS. Hepatic expression of mature transforming growth factor b1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92(7): 2572-6.
- ✓Selman M, King TE, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann. Intern. Med.* 2001; 134: 136–151
- ✓Shen W, Li Y, Tang Y, Cummins J, Huard J. NS-398, a cyclooxygenase-2-specific inhibitor, delays skeletal muscle healing by decreasing regeneration and promoting fibrosis. *Am J Pathol.* 2005; 167(4): 1105-17
- ✓Sicinski P, Geng Y, Ryder-Cook AS, Barnard EA, Darlison MG, Barnard PJ. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science.* 1989; 244(4912): 1578-80
- ✓Spurney CF, Knobloch S, Pistilli EE, Nagaraju K, Martin GR, Hoffman EP. Dystrophin-deficient cardiomyopathy in mouse: expression of Nox4 and Lox associated with fibrosis and altered functional parameters in the heart. *Neuromuscul Disord.* 2008 May; 18(5): 371-81
- ✓Stedman HH, Sweeney HL, Shrager JB, Maguire HC, Panettieri RA, Petrof B, Narusawa M, Lefterovich JM, Sladky JT, Kelly AM. The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature.* 1991; 352(6335): 536-9.
- ✓Sun G, Haginoya K, Wu Y, Chiba Y, Nakanishi T, Onuma A, Sato Y, Takigawa M, Iinuma K, Tsuchiya S. Connective tissue growth factor is overexpressed in muscles of human muscular dystrophy. *J Neurol Sci.* 2008; 267(1-2): 48-56
- ✓Tanabe Y, Esaki K, Nomura T. Skeletal muscle pathology in X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) mouse. *Acta Neuropathol.* 1986; 69(1-2): 91-5.

- ✓Tidball JG, Wehling-Henricks M. Macrophages promote muscle membrane repair and muscle fibre growth and regeneration during modified muscle loading in mice in vivo. *J Physiol.* 2007; 578(Pt 1): 327-36.
- ✓Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002; 3(5): 349-63.
- ✓Torres LF, Duchen LW. The mutant mdx: inherited myopathy in the mouse. Morphological studies of nerves, muscles and end-plates. *Brain.* 1987; 110 (Pt 2): 269-99.
- ✓Turk R, Sterrenburg E, de Meijer EJ, van Ommen GJ, den Dunnen JT, 't Hoen PA. Muscle regeneration in dystrophin-deficient mdx mice studied by gene expression profiling. *BMC Genomics.* 2005; 6: 98
- ✓Van Essen AJ, Verheij JBG, Reefhuis J et al. The natural history of Duchenne muscular dystrophy: analysis of data from a Dutch survey and review of age-related events. *Leyden Muscular Dystrophy* 2004.
- ✓Van der Slot AJ, Zuurmond AM, van den Bogaerdt AJ, Ulrich MM, Middelkoop E, Boers W, Karel R, DeGroot J, Huizinga TW, Bank RA. Increased formation of pyridinoline cross-links due to higher telopeptide lysyl hydroxylase levels is a general fibrotic phenomenon. *Matrix Biol.* 2004 Jul;23(4):251-7.
- ✓Vignaud A, Ramond F, Ferry a. Differential recovery of neuromuscular function after nerve/muscle injury induced by crude venom from *Notechis scutatus*, cardiotoxin from *najaatra* and treatments in mice. *Neuroscience research* 2007; 58: 317-23.
- ✓Yamazaki M, Minota S, Sakurai H, Miyazono K, Yamada A, Kanazawa I, Kawai M. Expression of transforming growth factor- β 1 and its relation to endomysial fibrosis in progressive muscular dystrophy. *Am J Pathol.* 1994; 144(2): 221-6.
- ✓Zacharias JM, Anderson JE. Muscle regeneration after imposed injury is better in younger than older mdx dystrophic mice. *Neuromuscul Disord.* 2001; 11(8): 703-12.
- ✓Zanotti S, Saredi S, Ruggieri A et al. Altered extracellular transcript expression and protein modulation in primary Duchenne muscular dystrophy myotubes. *Matrix Biol* 2007; 26(8): 615-24.

Conclusion et projets de développement

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est la maladie neuromusculaire la plus fréquente de l'enfant. Son évolution progressive inexorable conduit habituellement au décès dans la troisième décennie. La DMD constitue cependant une affection hétérogène pour la sévérité de l'atteinte musculaire, cognitive et cardiaque, et cette hétérogénéité n'est pas totalement expliquée par la localisation des mutations dans le gène de la dystrophine. Ce travail s'est divisé en trois volets:

- (1) une analyse clinique multivariée** d'une cohorte de DMD suivie à long terme qui nous a permis de définir 4 phénotypes distincts de DMD;
- (2) une étude de corrélation clinico-pathologique** qui a identifié la fibrose endomysiale précoce comme seul facteur histologique prédictif de sévérité motrice;
- (3) la mise au point d'un modèle murin original** de myofibrose dystrophique chez la souris *mdx* déficiente en dystrophine.

(1) Étude multiparamétrique clinique.

La saisie par la même équipe des données fonctionnelles musculaires, cardiaques, respiratoires et cognitives de 75 patients atteints de DMD (tous génotypés et présentant une absence complète de dystrophine musculaire), suivis pendant >10 ans, a permis d'établir un modèle multiparamétrique satisfaisant à deux dimensions principales, cognitive et motrice, et de définir 4 clusters phénotypiques:

- (i)** DMD cognitive et motrice congénitale (20%),
- (ii)** DMD classique (28%),
- (iii)** DMD motrice pure modérée (22%),
- (iv)** DMD motrice pure sévère (30%).

La corrélation génotype-phénotype était restreinte à la seule atteinte cognitive. Des indicateurs pronostics précoces ont été identifiés et validés sur une 2ème série de 34 patients suivis à Necker. Ils permettront d'envisager séparément la réponse des patients lors d'essais thérapeutiques futurs.

(2) Etude histopathologique.

Les variations de sévérité de l'atteinte musculaire n'étant pas expliquées par la génétique moléculaire, nous avons cherché à corrélérer les paramètres moteurs et la biopsie musculaire prélevée dans le quadriceps à un stade précoce (3-7 ans) chez 25 patients (analyse stéréologique des images numérisées pour les paramètres élémentaires: nécrose/régénération, fibres hypercontractées, adipocytes, fibrose endomysiale et périnysiale). Seule la fibrose endomysiale est associée à un pronostic moteur défavorable ($p < 0.002$) attesté par l'âge de perte de marche, la force du quadriceps et le testing musculaire global à 10 ans. Cette fibrose endomysiale dissocie les capillaires des myofibres (écartement $\times 2.5$), et s'accompagne d'une augmentation sélective des macrophages CD206+ activés dans la voie alterne (M2) et d'une diminution relative des cellules satellites musculaires ($p < 0.0001$). Ces données suggèrent un rôle clé de la fibrose endomysiale (et des macrophages M2 profibrosant) dans la sévérité clinique de la DMD.

(3) Étude expérimentale.

Le rôle central de la fibrose précoce dans le pronostic des patients DMD rend nécessaire la mise au point d'un modèle expérimental de myofibrose dystrophique, la souris *mdx* présentant une fibrose musculaire et un déficit moteur des membres modérés et tardifs. La mise au point d'une nouvelle méthode de lésion musculaire focale profibrosante du tibialis antérieur chez la souris *mdx* (piqûres multiples quotidiennes pendant 15 jours) nous paraît prometteuse. L'installation d'une fibrose endomysiale attestée par un fort immunomarquage du collagène I (à 8, 30, 60 et 90 jours) a été quantifiée et corrélée à la perte de la force musculaire dans la patte lésée (comparée au muscle contralatéral). Ce modèle nécessite une analyse des différents partenaires cellulaires et moléculaires intervenant dans le remodelage de la matrice extracellulaire.

Mes perspectives de travaux sont dans la continuité de ces résultats:

L'analyse phénotypique des patients sera élargie à une plus large cohorte en concertation avec les cliniciens du centre référence Garches Necker Mondor et l'équipe de biologie moléculaire de Jamel Chelly.

Une étude multicentrique est en cours portant sur les corrélations entre la génétique et l'atteinte cognitive des patients DMD. Nos premiers résultats sur 75 patients mettent en évidence une prédominance des mutations affectant la partie N terminale du gène avec un gradient progressif. Une analyse en IRM avec spectroscopie de protons centrée sur le cervelet ainsi qu'une mesure en VBM des structures encéphaliques en particulier du cervelet sera réalisée sur 15 patients DMD suivis à Necker.

Le rôle central de la fibrose confirmé dans ma thèse, les données cliniques de Denis Duboc sur la survie au long cours des patients DMD améliorés par la prise précoce dès 10 ans d'inhibiteur de l'enzyme de conversion ainsi que les données expérimentales de Cohn nous ont conduit à proposer un essai thérapeutique multicentrique chez 40 patients DMD jeunes de 3 à 6 ans par inhibiteur de l'enzyme de conversion. Cet essai vise à évaluer le bénéfice moteur et cardiaque de ce traitement par des mesures cliniques simples telles que le test de marche de 6 min mais aussi une quantification de la fibrose musculaire et cardiaque par IRM. Une quantification de la fibrose endomysiale sur la biopsie musculaire initiale disponible au moment du diagnostic sera réalisée par les techniques que j'ai utilisée pour dégager des facteurs de réponse thérapeutique.

Le modèle expérimental de fibrose lésionnelle réalisée sur la souris *mdx* doit être analysé sur le plan moléculaire et des partenaires cellulaires. Une approche en Western Blot et aussi par tri cellulaire pour analyser au mieux le rôle des macrophages comme partenaires de la fibrose sera développée par l'équipe de Bénédicte Chazaud. L'effet antifibrosant de différentes molécules en particulier des IEC pourra être envisagé sur ce modèle lésionnel qui paraît plus proche de la fibrose dystrophique connue dans la DMD.

- Aartsma-Rus A, Janson AA, Kaman WE, Bremmer-Bout M, van Ommen GJ, den Dunnen JT, van Deutekom JC. Antisense-induced multiexon skipping for Duchenne muscular dystrophy makes more sense. *Am J Hum Genet.* 2004; 74(1): 83-92.
- ☞ Abe T, Takeuchi T. Rheumatoid arthritis and tumor necrosis factor α . *Autoimmunity.* 2001; 34(4): 291-303.
- ☞ Acharyya S, Villalta SA, Bakkar N, Bupha-Intr T, Janssen PM, Carathers M, Li ZW, Beg AA, Ghosh S, Sahenk Z, Weinstein M, Gardner KL, Rafael-Fortney JA, Karin, M, Tidball JG, Baldwin AS, Guttridge DC. Interplay of IKK/NF- κ B signaling in macrophages and myofibers promotes muscle degeneration in Duchenne muscular dystrophy. *J Clin Invest.* 2007; 117 (4): 889-901.
- ☞ Alexakis C, Partridge T, Bou Gharios G. Implication of the satellite cell in dystrophic muscle fibrosis: a self-perpetuating mechanism of collagen overproduction. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 293: 661-9.
- ☞ Allsop KG, Ziter FA. Loss of strength and functional decline in Duchenne's dystrophy. *Arch Neurol* 1981; 38: 406-411.
- ☞ Arabie, P., Hubert, L. J. & De Soete, G. 1996. *Clustering and Classification.* Singapore: World Scientific.
- ☞ Arahata K, Engel AG. Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies. I: Quantitation of subsets according to diagnosis and sites of accumulation and demonstration and counts of muscle fibers invaded by T cells. *Ann Neurol.* 1984; 16(2): 193-208.
- ☞ Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, Plonquet A, Gherardi RK, Chazaud B. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into anti-inflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med.* 2007; 204(5): 1057-69
- ☞ Arthur MJ. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000; 279(2): 245-9.
- ☞ Austin RC, Howard PL, D'Souza VN, Klamut HJ, Ray PN. Cloning and characterisation of alternatively spliced isoforms of Dp71. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 1475-1483.
- ☞ Bach JR, Ishikawa Y, Kim H. Prevention of pulmonary morbidity for patients with Duchenne muscular dystrophy. *Chest.* 1997; 112(4): 1024-8.
- ☞ Bachem MG, Schneider E, Gross H, Weidenbach H, Schmid RM, Menke A, Siech M, Beger H, Grünert A, Adler G. Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology.* 1998; 115(2): 421-32.
- ☞ Baker BA, Mercer RR, Geronilla KB et al. Stereological analysis of muscle morphology following exposure to repetitive stretch shortening cycles in rat model. *Appl Physiol Nutr Metab* 2006, 31:167-79.
- ☞ Bakker JP, de Groot IJ, Beckerman H, de Jong BA, Lankhorst GJ. The effects of knee-ankle-foot orthoses in the treatment of Duchenne muscular dystrophy: review of the literature. *Clin Rehabil.* 2000, 14(4):343-59.
- ☞ Bani C, Lagrota-Candido J, Pinheiro DF, Leite PE, Salimena MC, Henriques-Pons A, Quirico-Santos T. Pattern of metalloprotease activity and myofiber regeneration in skeletal muscles of mdx mice. *Muscle Nerve.* 2008; 37(5): 583-92.
- ☞ Barend PL, Engel AG. Are hypercontracted muscle fibers artifacts and do they cause rupture of the plasma membrane. *Neurology* 1987; 37: 1466-75.
- ☞ Barnett MH, Yang F, Iland H, Pollard JD. Unusual muscle pathology in McLeod syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2000; 69(5): 655-7.
- ☞ Barton ER, Morris L, Musaro A, Rosenthal N, Sweeney HL. Muscle-specific expression of insulin-like growth factor I counters muscle decline in mdx mice. *J Cell Biol.* 2002; 157(1): 137-48.
- ☞ Barton-Davis ER, Cordier L, Shoturma DI, Leland SE, Sweeney HL. Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. *J Clin Invest.* 1999; 104(4): 375-81.
- ☞ Bell CB, Conen PE. Histopathological changes in Duchenne Muscular Dystrophy. *J Neurol Sci* 1968; 7: 529.
- ☞ Bell CD, Conen PE. Change in fiber size in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology.* 1967; 17(9): 902-13.
- ☞ Bernasconi P, Torchiana E, Confalonieri P, Brugnoli R, Barresi R, Mora M, Cornelio F, Morandi L,

Mantegazza R. Expression of transforming growth factor- β 1 in dystrophic patient muscles correlates with fibrosis. Pathogenetic role of a fibrogenic cytokine. *J Clin Invest.* 1995; 96(2): 1137-44.

☞ Billard, C., et al., Cognitive functions in Duchenne muscular dystrophy: a reappraisal and comparison with spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord*, 1992. 2(5-6): p. 371-8.

☞ Boddaert, N., et al., Superior temporal sulcus anatomical abnormalities in childhood autism: a voxel-based morphometry MRI study. *Neuroimage*, 2004; 23(1): p. 364-9.

☞ Bonner JC. Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004; 15(4): 255-73.

☞ Bouvier P, Halpérin D, Rey H, Jaffé PD, Laederach J, Mounoud RL, Pawlak C. Typology and correlates of sexual abuse in children and youth: multivariate analyses in a prevalence study in Geneva. *Child Abuse Negl.* 1999; 23(8): 779-90.

☞ Brack AS, comboy MG, Roy S, Lee M, Kuo CJ, Keller C, Rando TA. Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis. *Science* 2007; 317: 807-810.

☞ Bradley WG, Fulthorpe JJ. Studies of sarcolemmal integrity in myopathic muscle. *Neurology.* 1978; 28(7): 670-7.

☞ Bradley WG, O'Brien MD, Walder DN, et al: Failure to confirm a vascular cause of muscular dystrophy. *Arch Neurol* 1975; 32: 466-473.

☞ Breau LM, Camfield CS, Symons FJ, Bodfish JW, Mackay A, Finley GA, McGrath PJ. Relation between pain and self-injurious behavior in nonverbal children with severe cognitive impairments. *J Pediatr.* 2003; 142(5): 498-503.

☞ Brenman JE, Chao DS, Xia H, Aldape K, Brecht DS. Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell.* 1995; 82(5): 743-52.

☞ Bresolin, N., et al., Cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*, 1994; 4(4): 359-69.

☞ Bridwell KH, Baldus C, Iffrig TM, Lenke LG, Blanke K. Process measures and patient/parent evaluation of surgical management of spinal deformities in patients with progressive flaccid neuromuscular scoliosis (Duchenne's muscular dystrophy and spinal muscular atrophy). *Spine.* 1999; 24(13): 1300-9.

☞ Brooke MH, Fenichel GM, Griggs RC, Mendell JR, Moxley R, Florence J, et al. Duchenne muscular dystrophy: patterns of clinical progression and effects of supportive therapy. *Neurology* 1989; 39: 475-481.

☞ Brooke MH, Fenichel GM, Griggs RC, Schumate JB, Pellegrino RJ. Clinical investigation in Duchenne Dystrophy: Determination of the power of therapeutic trials based on natural history. *Muscle Nerve* 1983; 6: 91-103.

☞ Buetler TM, Renard M, Offord EA, Schneider H, Ruegg UT. Green tea extract decreases muscle necrosis in mdx mice and protects against reactive oxygen species. *Am J Clin Nutr.* 2002; 75(4): 749-53.

☞ Bulfield G, Siller WG, Wight PA, Moore KJ. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984; 81(4): 1189-92.

☞ Bushby K, Muntoni F, Urtizberea A, Hughes R, Griggs R. Report on the 124th ENMC International Workshop. Treatment of Duchenne muscular dystrophy; defining the gold standards of management in the use of corticosteroids. *Neuromuscul Disord.* 2004; 14(8-9): 526-34.

☞ Bushby KM, Apleton R, Anderson LV, Welsch JL, Kelly P, et al. Deletion status and intellectual impairment in Duchenne muscular dystrophy. *Dev Med Child Neurol* 1995; 37: 260-269.

☞ Bushby KM. Genetic and clinical correlation of Xp21 muscular dystrophy. *J Inher Metab Dis* 1992; 15: 551-64.

☞ Byers TJ, Lidov HG, Kunkel LM. An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve. *Nat Genet* 1993; 4: 77-81.

☞ Cai B, Spencer MJ, Nakamura G, Tseng-Ong L, Tidball JG. Eosinophilia of dystrophin-deficient muscle is promoted by perforin-mediated cytotoxicity by T cell effectors. *Am J Pathol.* 2000; 156(5): 1789-96.

☞ Canbay A, Feldstein AE, Higuchi H, Werneburg N, Grambihler A, Bronk SF, Gores GJ. Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine expression. *Hepatology.* 2003; 38(5): 1188-98.

☞ Carlson CG, Makiejus RV. A noninvasive procedure to detect muscle weakness in the mdx mouse.

Muscle Nerve. 1990; 13(6): 480-4.

☞ Carlson CG. Acetylcholine receptor and calcium leakage activity in nondystrophic and dystrophic myotubes (MDX) Muscle Nerve. 1996; 19(10): 1258-67.

☞ Chamberlain JS. Interleukin-15 administration improves diaphragm muscle pathology and function in dystrophic mdx mice. Am J Pathol. 2005; 166(4): 1131-41.

☞ Chamberlain JS. ACE inhibitor bulks up muscle. Nat Med. 2007, 13(2): 125-6.

☞ Chan YS, Li Y, Foster W, Horaguchi T, Somogyi G, Fu FH, Huard J. Antifibrotic effects of suramin in injured skeletal muscle after laceration. J Appl Physiol. 2003; 95(2): 771-80.

☞ Chazaud B, Sonnet C, Lafuste P, Bassez G, Rimaniol AC, Poron F, Authier FJ, Dreyfus PA, Gherardi RK. Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth. J Cell Biol. 2003; 163(5): 1133-43.

☞ Chazaud B. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into anti-inflammatory macrophages to support myogenesis. J Exp Med. 2007; 204(5): 1057-69.

☞ Cheuk et al, Cochrane Database Syst Rev, 2007

☞ Chiron, C., et al., Hemispheric specialization using SPECT and stimulation tasks in children with dysphasia and dystrophia. Dev Med Child Neurol, 1999; 41(8): 512-20.

☞ Christov C, Chretien F, Abou-Khalil R et al. Muscle Satellite Cells and Endothelial Cells: Close Neighbors and Privileged Partners. Molecular Biology of the Cell 2007; 18, 1397-09.

☞ Chung B, Wong V, Ip P. Spinal muscular amyotrophy: Survival pattern and functional status. Pediatrics 2004; 114: 548-553.

☞ Cohn RD, van Erp C, Habashi JP et al. Angiotensin II type 1 receptor blockade attenuate TGF- β -induced failure of muscle regeneration in multiple myopathic states. Nat Med 2007; 13: 204-10.

☞ Coirault C, Pignol B, Cooper RN, Butler-Browne G, Chabrier PE, Lecarpentier Y. Severe muscle dysfunction precedes collagen tissue proliferation in mdx mouse diaphragm. J Appl Physiol. 2003; 94(5): 1744-50.

☞ Cole TJ, Bellizini MC, Flegal KM, Dietz WH Establishing a standard definition for child overweight and obesity world:international survey. BMJ 2000; 320: 1240-1243.

☞ Collins, C.A. et al. Cell 2005; 122: 289-301.

☞ Connolly AM, Keeling RM, Mehta S, Pestronk A, Sanes JR. Three mouse models of muscular dystrophy: the natural history of strength and fatigue in dystrophin-, dystrophin/utrophin-, and laminin α 2-deficient mice. J Neurol Sci. 1991; 104(2): 190-6.

☞ Connor EA, McMahan UJ. Cell accumulation in the junctional region of denervated muscle. J Cell Biol. 1987; 104(1): 109-20.

☞ Connuck DM, Sleeper LA, Colan SD, Cox GF, Towbin JA, Lowe AM, Wilkinson JD, Orav EJ, Cuniberti L, Salbert BA, Lipshultz SE; Study Group.Characteristics and outcomes of cardiomyopathy in children with Duchenne or Becker muscular dystrophy: a comparative study from the Pediatric Cardiomyopathy Registry. Am Heart J. 2008; 155(6): 998-1005.

☞ Cooper BJ. Animal models of Duchenne and Becker muscular dystrophy. Br Med Bull. 1989; 45(3): 703-18.

☞ Cornelio F, Dworzak F, Morandi L, Fedrizzi E, Balestrini MR, Gondoni L. Functional evaluation of Duchenne muscular dystrophy: proposal for a protocol. Ital J Neurol Sci. 1982; 3(4): 323-30.

☞ Cotton, S., N.J. Voudouris, and K.M. Greenwood, Intelligence and Duchenne muscular dystrophy: full-scale, verbal, and performance intelligence quotients. Dev Med Child Neurol, 2001; 43(7): 497-501.

☞ Coulton GR, Curtin NA, Morgan JE, Partridge TA. The mdx mouse skeletal muscle myopathy: II. Contractile properties. Neuropathol Appl Neurobiol. 1988; 14(4):299-314.

☞ Coulton GR, Morgan JE, Partridge TA, Sloper JC. The mdx mouse skeletal muscle myopathy: I. A histological, morphometric and biochemical investigation. Neuropathol Appl Neurobiol. 1988; 14(1): 53-70.

☞ Cullen MJ, Fulthorpe JJ. Stages in fibre breakdown in Duchenne muscular dystrophy. An electron-microscopic study. J Neurol Sci. 1975; 24(2): 179-200.

☞ D'Souza VN, Nguyen TL, Maurice GE, Karges W, Pillers DA, Ray PN. A novel dystrophin isoform is required for normal retinal electrophysiology. Hum. Mol. Genet. 1995; 4: 837-842.

- ☞ Daftary AS, Crisanti M, Kalra M, Wong B, Amin R. Effect of long-term steroids on cough efficiency and respiratory muscle strength in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Pediatrics*. 2007; 119(2): 320-4.
- ☞ Dalloz C, Claudepierre T, Rodius F, Mornet D, Sahel J, Rendon A. Differential distribution of the members of the dystrophin glycoprotein complex in mouse retina: effect of the mdx (3Cv) mutation. *Mol Cell Neurosci*. 2001; 17(5): 908-20.
- ☞ Darin N, Tulinius M. Neuromuscular disorders in childhood: a descriptive epidemiological study from western Sweden. *Neuromuscular Disorders* 2000; 10: 1-9.
- ☞ Davies KE and Nowak KJ. Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players. *Nature reviews* 2006; 7: 762-773.
- ☞ Davies KE, Grounds MD. Treating muscular dystrophy with stem cells? *Cell*. 2006; 127(7): 1304-6.
- ☞ Leeuw J. Non-linear principal component analysis and related techniques <http://www.preprints.stat.ucla.edu>
- ☞ Leeuw J. Non-linear principal component analysis and related techniques <http://www.preprints.stat.ucla.edu>
- ☞ De Luca A, Nico B, Liantonio A, Didonna MP, Fraysse B, Pierno S, Burdi R, Mangieri D, Rolland JF, Camerino C, Zallone A, Confalonieri P, Andretta F, Arnoldi E, Courdier-Fruh I, Magyar JP, Frigeri A, Pisoni M, Svelto M, Conte Camerino D. Anti-TNF α (Remicade) therapy protects dystrophic skeletal muscle from necrosis. *FASEB J*. 2004; 18(6): 676-82.
- ☞ Deburgrave N, Daoud F, Llense S, Barbot JC, Recan D, et al. Protein and mRNA-based phenotype-genotype correlations in DMD/BMD with point mutations and molecular basis for BMD with nonsense and frameshift mutations in the DMD gene. *Hum Mutat* 2007; 28: 183–195.
- ☞ Dellavalle A, Sampaolesi M, Tonlorenzi R, Tagliafico E, Sacchetti B, Perani L, Innocenzi A, Galvez BG, Messina G, Morosetti R, Li S, Belicchi M, Peretti G, Chamberlain JS, Wright WE, Torrente Y, Ferrari S, Bianco P, Cossu G. Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat Cell Biol*. 2007; 9(3): 255-67.
- ☞ Desguerre I, Christov C, Mayer M, Becane HM, Zeller R, Chelly J, Gherardi R. Phenotypic heterogeneity of Duchenne muscle dystrophy assessed by long term follow-up and rôle of endomysial fibrosis in the muscle. [abstract]. *Eur J Paediatr Neurol* 2007; 11 (suppl 1): 37.
- ☞ Di Sario A, Bendia E, Svegliati Baroni G, Ridolfi F, Casini A, Ceni E, Saccomanno S, Marzioni M, Trozzi L, Sterpetti P, Taffetani S, Benedetti A. Effect of pirfenidone on rat hepatic stellate cell proliferation and collagen production. *J Hepatol*. 2002; 37(5): 584-91.
- ☞ Doucet C, Brouty-Boyé D, Pottin-Clemenceau C, Jasmin C, Canonica GW, Azzarone B. IL-4 and IL-13 specifically increase adhesion molecule and inflammatory cytokine expression in human lung fibroblasts. *Int Immunol*. 1998; 10(10): 1421-33
- ☞ Duboc D, Meune C, Lerebours G, Devaux JY, Vaksman G, et al. Effect of Perindopril on the onset and progression of Left Ventricular Dysfunction in Duchenne Muscular Dystrophy. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 855–867.
- ☞ Duboc D, Meune C, Pierre B, Wahbi K, Eymard B, Toutain A, Berard C, Vaksman G, Weber S, Bécane HM. Perindopril preventive treatment on mortality in Duchenne muscular dystrophy: 10 years' follow-up. *Am Heart J*. 2007; 154(3): 596-602.
- ☞ Duffield JS. The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde. *Clin Sci (Lond)*. 2003; 104(1): 27-38.
- ☞ Eagle M, Bourke J, Bullock R, Gibson M, Struab V, et al. Managing Duchenne muscular dystrophy. The additive effect of spinal surgery and home nocturnal ventilation in improving survival. *Neuromuscul Disord* 2007; 17: 470–475.
- ☞ Eiholzer U, Gisin R, Weinmann C, Kriemler S, Steinert H, Torresani T, Zachmann M, Prader A. Treatment with human growth hormone in patients with Prader-Labhart-Willi syndrome reduces body fat and increases muscle mass and physical performance. *Eur J Pediatr*. 1998; 157(5): 368-77.
- ☞ Emery AEH. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases: a world survey. *Neuromuscul Disord*. 1991; 1(1): 19-29.
- ☞ Emery AEH, Schelling JL: Limb blood flow in patients and carriers of Duchenne muscular dystrophy.

Acta Genet, Basel, 1965; 15: 337-344.

☞ Emery, A.E.H. & Muntoni, F. Duchenne Muscular Dystrophy Oxford Univ. Press, 2003 Oxford.

☞ Engel AG, Arahata K. Mononuclear cells in myopathies: quantitation of functionally distinct subsets, recognition of antigen-specific cell-mediated cytotoxicity in some diseases, and implications for the pathogenesis of the different inflammatory myopathies. Hum Pathol. 1986; 17(7): 704-21.

☞ Engel AG, Osawa C. Dystrophinopathies. in Engel AG, Franzini-Armstrong C. Myology, 2003; 961-1020 McGraw Hill, New-York.

☞ Engert JC, Berglund EB, Rosenthal N. Proliferation precedes differentiation in IGF-I-stimulated myogenesis. J Cell Biol. 1996; 135(2): 431-40.

☞ Ervasti JM, Ohlendieck K, Kahl SD, Gaver MG, Campbell KP. Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. Nature. 1990; 345(6273): 315-9.

☞ Escolar DM, Buyse G, Henricson E, Leshner R, Florence J, Mayhew J, Tesi-Rocha C, Gorni K, Pasquali L, Patel KM, McCarter R, Huang J, Mayhew T, Bertorini T, Carlo J, Connolly AM, Clemens PR, Goemans N, Iannaccone ST, Igarashi M, Nevo Y, Pestronk A, Subramony SH, Vedanarayanan VV, Wessel H. CINRG randomized controlled trial of creatine and glutamine in Duchenne muscular dystrophy. Ann Neurol. 2005; 58(1): 151-5.

☞ Escolar DM, Buyse G, Henricson E, mayhew J, Florence J, Leshner R, patel KM, Clemence PR. Clinical evaluator reliability for quantitative and manual muscle testing measures of strength in children. Muscle nerve 2001; 24: 787-793.

☞ Fadic R, Mezzano V, Alvarez K et al. Increase in decorin and biglycan in Duchenne Muscular Dystrophy: role of fibroblasts as cell source of these proteoglycans in the disease. J Cell Mol Med 2006; 10: 758-69.

☞ Farini A, Meregalli M, Belicchi M, Battistelli M, Parolini D, D'Antona G, Gavina M, Ottoboni L, Constantin G, Bottinelli R, Torrente Y. T and B lymphocyte depletion has a marked effect on the fibrosis of dystrophic skeletal muscles in the scid/mdx mouse. J Pathol. 2007; 213(2): 229-38.

☞ Ferlini A, Sewry C, Melis MA, Mateddu A, muntoni F. X-linked dilated cardio myopathy and the dystrophin gene. Neuromuscul Disord 199; 9: 339-346.

☞ Finsterer J, Stöllberger C. The heart in human dystrophinopathies. Cardiology. 2003; 99(1): 1-19.

☞ Firth M, Gardner-Medwin D, Hosking G, Wilkinson E. Interviews with parents of boys suffering from Duchenne muscular dystrophy. Dev Med Child Neurol. 1983; 25(4): 466-71.

☞ Fisher I, Abraham D, Bouri K, Hoffman EP, Muntoni F, Morgan J. Prednisolone-induced changes in dystrophic skeletal muscle. FASEB J. 2005; 19(7): 834-6.

☞ Foidart M, Foidart JM, Engel WK. Collagen localization in normal and fibrotic human skeletal muscle. Arch Neurol. 1981; 38(3): 152-7.

☞ Frega A, Stentella P, De Ioris A, Piazze JJ, Fambrini M, Marchionni M, Cosmi EV. Young women, cervical intraepithelial neoplasia and human papillomavirus: risk factors for persistence and recurrence. Cancer Lett. 2003; 196(2): 127-34.

☞ Fukasawa H, Yamamoto T, Togawa A, Ohashi N, Fujigaki Y, Oda T, Uchida C, Kitagawa K, Hattori T, Suzuki S, Kitagawa M, Hishida A. Down-regulation of Smad7 expression by ubiquitin-dependent degradation contributes to renal fibrosis in obstructive nephropathy in mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004; 101(23): 8687-92

☞ Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. J Pathol. 2003; 200(4): 500-3.

☞ Gatchalian CL, Schachner M, Sanes JR. Fibroblasts that proliferate near denervated synaptic sites in skeletal muscle synthesize the adhesive molecules tenascin(J1), N-CAM, fibronectin, and a heparan sulfate proteoglycan. J Cell Biol. 1989; 108(5): 1873-90.

☞ Gifi, A. Nonlinear multivariate analysis. Chichester, UK 1990. John Wiley. (Original work published 1981).

☞ Gilgenkrantz H, Chelly J, Lambert M, Récan D, Barbot JC, van Ommen GJ, Kaplan JC. Analysis of molecular deletions with cDNA probes in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophies. Genomics. 1989, 5(3): 574-80.

- Goetsch SC, Hawke TJ, Gallardo TD, Richardson JA, Garry DJ. Transcriptional profiling and regulation of the extracellular matrix during muscle regeneration. *Physiol Genomics*. 2003; 14(3): 261-71
- Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5(12): 953-64.
- Gorelik L, Constant S, Flavell RA. Mechanism of transforming growth factor β -induced inhibition of T helper type 1 differentiation. *J Exp Med*. 2002; 195(11): 1499-505.
- Gosselin LE, Williams JE, Deering M, Brazeau D, Koury S, Martinez DA. Localization and early time course of TGF- β 1 mRNA expression in dystrophic muscle. *Muscle Nerve*. 2004; 30(5): 645-53.
- Graciotti L, et al., GABAergic miniature spontaneous activity is increased in the CA1 hippocampal region of dystrophic mdx mice. *Neuromuscul Disord*, 2008; 18(3): 220-6.
- Griggs RC, Forbes G, Moxley RT, Herr BE. The assessment of muscle mass in progressive neuromuscular disease. *Neurology*. 1983; 33(2): 158-65.
- Grounds MD, Torrisi J. Inhibition of glomerular mesangial cell proliferation and extracellular matrix deposition by halofuginone. *Kidney Int*. 1997; 52(6): 1561-9.
- Guérette B, Asselin I, Vilquin JT, Roy R, Tremblay JP. Lymphocyte infiltration following allo- and xenomyoblast transplantation in mdx mice. *Muscle Nerve*. 1995; 18(1): 39-51.
- Gullberg D, Velling T, Sjöberg G, Salmivirta K, Gaggero B, Tiger CF, Edström L, Sejersen T. Tenascin-C expression correlates with macrophage invasion in Duchenne muscular dystrophy and in myositis. *Neuromuscul Disord*. 1997; 7(1): 39-54.
- Gundersen JH, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microscopy* 1987; 147: 227-69.
- Guo Y, Petrof BJ, Hussain SN. Expression and localization of protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve*. 2001; 24 (11): 1468-75.
- Guralnick MJ, Groom JM. The correspondance between temperament and peer interactions for normally developing and mildly delayed preschool children. *Child Care Health Dev*. 1990; 16(3): 165-75
- Hankard RG, Hammond D, Haymond MW, Darmaun D. Oral glutamine slows down whole body protein breakdown in Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr Res*. 1998; 43(2): 222-6.
- Harcourt LJ, Holmes AG, Gregorevic P, Schertzer JD, Stupka N, Plant DR, Lynch GS. Interleukin-15 administration improves diaphragm muscle pathology and function in dystrophic mdx mice. *Am J Pathol*. 2005; 166(4): 1131-41.
- Harcourt LJ, Holmes AG, Gregorevic P, Schertzer JD, Stupka N, Plant DR, Lynch GS. A multidisciplinary evaluation of the effectiveness of cyclosporine a in dystrophic mdx mice. *Am J Pathol*. 2005; 166(2): 477-89.
- Hardy, A. & Andre, P. An investigation of nine procedures for detecting the structure in a data set. 1998; 29–36. *Advances in Data Science and Classification*; Ed. by A. Rizzi, M. Vichi & H. H. Bock, Berlin: Springer-Verlag.
- Hartigan-O'Connor D, Kirk CJ, Crawford R, Mulé JJ, Chamberlain JS. Immune evasion by muscle-specific gene expression in dystrophic muscle. *Mol Ther*. 2001; 4(6): 525-33.
- Herpel E, Pritsch M, Koch A et al. Interstitial fibrosis in the heart: differences in extracellular matrix proteins and matrix metalloproteinases in end-stage dilated, ischaemic and valvular cardiomyopathy, *Histopathology* 2006; 48: 736–7.
- Hinton, V.J., et al., Poor facial affect recognition among boys with duchenne muscular dystrophy. *J Autism Dev Disord*, 2007. 37(10): 1925-33.
- Hnia K, Hugon G, Rivier F, Masmoudi A, Mercier J, Mornet D. Modulation of p38 mitogen-activated protein kinase cascade and metalloproteinase activity in diaphragm muscle in response to free radical scavenger administration in dystrophin-deficient Mdx mice. *Am J Pathol*. 2007; 170(2): 633-43.
- Hoffman EP, Brown RH Jr, Kunkel LM. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*. 1987; 51(6): 919-28.
- Hoffman EP, Dressman D. Molecular pathophysiology and targeted therapeutics for muscular dystrophy. *Trends Pharmacol Sci*. 2001; 22(9): 465-70.
- Hoogerwaard EM, Bakker E, Ippel PF, Oosterwijk JC, Majoor-Krakauer DF, Leschot NJ, Van Essen AJ, Brunner HG, van der Wouw PA, Wilde AA, de Visser M. Signs and symptoms of Duchenne muscular

- dystrophy and Becker muscular dystrophy among carriers in The Netherlands: a cohort study. *Lancet*. 1999; 353(9170): 2116-9.
- ☞ Hoogerwaard EM, van der Wouw PA, Wilde AA, Bakker E, Ippel PF, Oosterwijk JC, Majoor-Krakauer DF, van Essen AJ, Leschot NJ, de Visser M. Cardiac involvement in carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*. 1999; 9(5): 347-51.
- ☞ Huebner KD, Jassal DS, Halevy O, Pines M, Anderson JE. Functional resolution of fibrosis in mdx mouse dystrophic heart and skeletal muscle by halofuginone. *Am J Physiol Heart circ Physiol* 2008; 294(4): 1550-1561.
- ☞ Ilsley JL, Sudol M, Winder SJ. The interaction of dystrophin with β -dystroglycan is regulated by tyrosine phosphorylation. *Cell Signal*. 2001; 13(9): 625-32.
- ☞ Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, Hovell C, Arthur MJ. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest*. 1998; 102(3): 538-49.
- ☞ Issa R, AlQteishat A, Mitsios N, Saka M, Krupinski J, Tarkowski E, Gaffney J, Slevin M, Kumar S, Kumar P. Expression of basic fibroblast growth factor mRNA and protein in the human brain following ischaemic stroke. *Angiogenesis* 2005; 8(1): 53-62.
- ☞ Itagaki Y, Saida K, Iwamura K. Regenerative capacity of mdx mouse muscles after repeated applications of myo-necrotic bupivacaine. *Acta Neuropathol*. 1995; 89(4): 380-4
- ☞ Ito K, Kimura S, Ozasa S, Matsuka M, Ikezawa M, Yoshioka K, Ueno H, Suzuki M, Araki K, Yamamura KI, Miwa T, Dickson G, Thomas GD, Miike T. Smooth muscle-specific dystrophin expression improves aberrant vasoregulation in mdx mice. *Hum Mol Genet* 2006; 15 (14): 2266-2275.
- ☞ Iwano T, Tachibana M, Reth M, Shinkai Y. Importance of TRF1 for functional telomere structure. *J Biol Chem*. 2004; 279(2): 1442-8.
- ☞ Jagadha, V. and L.E. Becker, Brain morphology in Duchenne muscular dystrophy: a Golgi study. *Pediatr Neurol*, 1988; 4(2): 87-92.
- ☞ Jenkins RG, Su X, Su G, Scotton CJ, Camerer E, Laurent GJ, Davis GE, Chambers RC, Matthay MA, Sheppard D. Ligation of protease-activated receptor 1 enhances $\alpha(v)\beta 6$ integrin-dependent TGF- β activation and promotes acute lung injury. *J Clin Invest*. 2006; 116(6): 1606-14.
- ☞ Jeppesen J, Green A, Steffensen BF, Rahbek J. The Duchenne muscular dystrophy population in Denmark, 1977–2001: prevalence, incidence and survival in relation to the introduction of ventilator use. *Neuromuscul Disord* 2003; 13: 804–812.
- ☞ Jerusalem F, Engel AG, Gomez MR: Duchenne dystrophy: I. Morphometric study of the muscle microvasculature. *Brain* 1974; 97: 115-122.
- ☞ Kääriäinen M, Järvinen T, Järvinen M, Rantanen J, Kalimo H. Relation between myofibers and connective tissue during muscle injury repair. *Scand J Med Sci Sports*. 2000; 10(6): 332-7.
- ☞ Kääriäinen M, Järvinen T, Järvinen Ultrastructure of right ventricular myocardium subjected to acute pressure load. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2004; 52(6): 328-33
- ☞ Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest*. 2003; 112(12): 1776-84.
- ☞ Kaminska A, Ickowicz A, Plouin P, Bru MF, Dellatolas G, Dulac O. Delineation of cryptogenic Lennox-Gastaut syndrome and myoclonic astatic epilepsy using multiple correspondence analysis. *Epilepsy Res*. 1999; 36(1): 15-29.
- ☞ Kapsa R, Kornberg AJ, Byrne E. Novel therapies for Duchenne muscular dystrophy. *Lancet Neurol* 2003; 2: 299–310.
- ☞ Khurana TS, Byers TJ, Kunkel LM, Sancho S, Tanji K, Miranda AF. Dystrophin detection in freeze-dried tissue. *Lancet*. 1991; 338 (8764): 448.
- ☞ Kilmer DD, Abresch RT, Fowler WM Jr. Serial manual muscle testing in Duchenne muscular dystrophy. *Arch Phys Med Rehabil* 1993; 74: 1168–1171.
- ☞ Kim KK, Kugler MC, Wolters PJ, Robillard L, Galvez MG, Brumwell AN, Sheppard D, Chapman HA. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(35): 13180-5

- ☞ Kinali M, Main M, Eliahoo J, Messina S, Knight RK, Lehovsky J, Edge G, Mercuri E, Manzur AY, Muntoni F. Predictive factors for the development of scoliosis in Duchenne muscular dystrophy. *Eur J Paediatr Neurol*. 2007; 11(3): 160-6.
- ☞ Kissel JT, Burrow KL, Rammohan KW, Mendell JR. Mononuclear cell analysis of muscle biopsies in prednisone-treated and untreated Duchenne muscular dystrophy. CIDD Study Group. *Neurology*. 1991; 41(5): 667-72.
- ☞ Knottnerus JA, van Weel C, Muris JWM. Evidence base of clinical diagnosis: evaluation of diagnostic procedures. *BMJ* 2002; 324: 477-480.
- ☞ Koehler J. Blood vessel structure in Duchenne muscular dystrophy. I. Light and electron microscopic observations in resting muscle. *Neurology*. 1977; 27(9): 861-8.
- ☞ Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell*. 1988; 53(2): 219-28.
- ☞ Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell*. 1987, 50(3): 509-17.
- ☞ Koprach JB, Reske-Nielsen C, Mithal P, Isacson O. Neuroinflammation mediated by IL-1 β increases susceptibility of dopamine neurons to degeneration in an animal model of Parkinson's disease. *J Neuroinflammation*. 2008; 5: 8.
- ☞ Kossakowska AE, Edwards DR, Lee SS et al. Altered balance between matrix metalloproteinases and their inhibitors in experimental biliary fibrosis. *Am. J. Pathol*. 1998; 153: 1895–902.
- ☞ Kunkel L, Burns G, Aldrige J, Latt S. Genetic analysis of Duchenne dystrophy. *Adv Exp Med Biol*. 1985; 182: 287-94.
- ☞ Kunkel LM, Hoffman EP. Duchenne/Becker muscular dystrophy: a short overview of the gene, the protein, and current diagnostics. *Br Med Bull*. 1989; 45(3): 630-43.
- ☞ Laws N, Hoey A. Progression of kyphosis in mdx mice. *J Appl Physiol*. 2004; 97(5): 1970-7.
- ☞ Lee, J.S., et al., Altered regional brain glucose metabolism in Duchenne muscular dystrophy: a pet study. *Muscle Nerve*, 2002. 26(4): p. 506-12.
- ☞ Lefaucheur JP, Pastoret C, Sebillé A. Phenotype of dystrophinopathy in old mdx mice. *Anat Rec*. 1995; 242(1): 70-6.
- ☞ Li Y, Foster W, Deasy BM, Chan Y, Prisk V, Tang Y, Cummins J, Huard J. Transforming growth factor- β 1 induces the differentiation of myogenic cells into fibrotic cells in injured skeletal muscle: a key event in muscle fibrogenesis. *Am J Pathol*. 2004; 164(3): 1007-19.
- ☞ Li Y, Huard J. Differentiation of muscle-derived cells into myofibroblasts in injured skeletal muscle. *Am J Pathol*. 2002; 161(3): 895-907
- ☞ Li Y, Yang J, Dai C, Wu C, Liu Y. Role for integrin-linked kinase in mediating tubular epithelial to mesenchymal transition and renal interstitial fibrogenesis. *J Clin Invest*. 2003; 112(4): 503-16.
- ☞ Li Y.Y., Feng Y.Q., Kadokami T et al. Myocardial extracellular matrix remodeling in transgenic mice overexpressing tumor necrosis factor α can be modulated by anti-tumor necrosis factor α therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000; 97: 12746–51.
- ☞ Lidov HG, Zelig S, Kunkel LM. Dp140: a novel 140 kDa CNS transcript from the dystrophin locus. *Hum. Mol Genet* 1995; 4: 329-335.
- ☞ Lim AY, Lahiri A, Pereira BP, Tan JA, Sebastin SJ, Tan BL, Zheng L, Prem Kumar V. The role of intramuscular nerve repair in the recovery of lacerated skeletal muscles. *Muscle Nerve*. 2006; 33(3): 377-83.
- ☞ Lochmüller H, Petrof BJ, Pari G, Larochelle N, Dodelet V, Wang Q, Allen C, Prescott S, Massie B, Nalbantoglu J, Karpati G. Transient immunosuppression by FK506 permits a sustained high-level dystrophin expression after adenovirus-mediated dystrophin minigene transfer to skeletal muscles of adult dystrophic (mdx) mice. *Gene Ther*. 1996; 3 (8): 706-16.
- ☞ Lotz BP, Engel AG. Are hypercontracted muscle fibers artifacts and do they cause rupture of the plasma membrane? *Neurology*. 1987; 37(9): 1466-75.
- ☞ Louboutin JP, Fichter-Gagnepain V, Thaon E, Fardeau M. Morphometric analysis of mdx diaphragm muscle fibres. Comparison with hind limb muscles. *Neuromuscul Disord*. 1993; 3(5-6): 463-9.

- ☞ Lundberg I, Brengman JM, Engel AG. Analysis of cytokine expression in muscle in inflammatory myopathies, Duchenne dystrophy, and non-weak controls. *J Neuroimmunol.* 1995; 63 (1): 9-16.
- ☞ Lupher ML, and Gallatin WM. Regulation of fibrosis by the immune system. *Advances in Immunology*, 2006; vol 89: 245-288,
- ☞ Luz MA, Marques MJ, Santo Neto H. Impaired regeneration of dystrophin-deficient muscle fibers is caused by exhaustion of myogenic cells. *Braz J Med Biol Res.* 2002; 35(6): 691-5.
- ☞ Main M, Mercuri E, Haliloglu G, Baker R, Kinali M, Muntoni F. Serial casting of the ankles in Duchenne muscular dystrophy: can it be an alternative to surgery? *Neuromuscul Disord.* 2007; 17(3): 227-30.
- ☞ Majno G, Gilmore V, Leventhal M: On the mechanism of vascular leakage caused by histamine-type mediators, a microscopic study in vivo. *Circ Res* 1967; 21: 833-847.
- ☞ Majno G, Palade GE, Schoefl GI: Studies on inflammation: II. The site of action of histamine and serotonin along the vascular tree: A topographic study. *J Biophys Biochem Cytol* 1961; 11: 607-626.
- ☞ Mandel JL. Dystrophin. The gene and its product. *Nature.* 1989; 339(6226): 584-6.
- ☞ Manzur AY, Kuntzer T, Pike M, Swan A. Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008; (1): CD003725.
- ☞ Markham LW, Kinnett K, Wong BL, Woodrow Benson D, Cripe LH. Corticosteroid treatment retards development of ventricular dysfunction in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord.* 2008; 18(5): 365-70.
- ☞ Massagué J. How cells read TGF- β signals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000; 1(3): 169-78.
- ☞ Matecki S, Guibinga GH, Petrof BJ. Regenerative capacity of the dystrophic (mdx) diaphragm after induced injury. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004, 287(4): R961-8.
- ☞ Mauviel A. Transforming growth factor- β : a key mediator of fibrosis. *Methods Mol. Med.* 2007; 117: 69–80.
- ☞ Mayhew JE, Florence JM, Mayhew TP, Henricson EK, Leshner RT, et al. Reliable surrogate outcome measures in multicenter clinical trials of Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 2006; 35: 36–42.
- ☞ McDouall RM, Dunn MJ, Dubowitz V. Nature of the mononuclear infiltrate and the mechanism of muscle damage in juvenile dermatomyositis and Duchenne muscular dystrophy. *J Neurol Sci.* 1990; 99(2-3): 199-217.
- ☞ Mehler, M.F., Brain dystrophin, neurogenetics and mental retardation. *Brain Res Brain Res Rev*, 2000; 32(1): 277-307.
- ☞ Mendell JR, Engel WK, Derrer EC: Duchenne muscular dystrophy: Functional ischemia reproduces its characteristic lesions. *Science* 1971; 172: 1143-1145.
- ☞ Mendell JR, Province MA, Griggs RC, Brooke MH, Fenichel GM, et al. Clinical investigation of Duchenne muscular dystrophy. A methodology for therapeutic trials based on natural history controls. *Arch Neurol* 1987; 44: 808–811.
- ☞ Meulman J, Van der Kooij AJ, Heiser WJ. Principal components analysis with non linear optimal scaling transformations for ordinal and nominal data. 2004; 49–70, Kaplan D, editor, *Handbook of quantitative methodology for the social sciences*. Thousand Oaks: Sage Publications, Inc.
- ☞ Meulman J.J., van der Kooij A.J., and Babinec A. New Features of Categorical Principal Components Analysis for Complicated Data Sets, Including Data Mining. 2000; 207-217, W. Gaul and G. Ritter (Eds.) *Classification, Automation and New Media* Berlin, Germany Springer.
- ☞ Miike T, Sugino S, Ohtani Y, Taku K, Yoshioka K. Vascular endothelial cell injury and platelet embolism in Duchenne muscular dystrophy at the preclinical stage. *J Neurol Sci.* 1987; 82(1-3): 67-80.
- ☞ Milasin J, Muntoni F, Severini GM, Bartoloni L, Vatta M, Krajinovic M, Mateddu A, Angelini C, Camerini F, Falaschi A, Mestroni L, Giacca M. A point mutation in the 5' splice site of the dystrophin gene first intron responsible for X-linked dilated cardiomyopathy. *Hum Mol Genet.* 1996; 5(1): 73-9.
- ☞ Millay DP, Sargent MA, Osinska H, Baines CP, Barton ER, Vuagniaux G, Sweeney HL, Robbins J, Molkentin JD. Genetic and pharmacologic inhibition of mitochondrial-dependent necrosis attenuates muscular dystrophy. *Nat Med.* 2008; 14(4): 442-7.
- ☞ Milligan, G. W. Clustering validation: results and implications for applied analyses. In: *Clustering and*

Classification 1996; 341–375. Ed. by P. Arabie, L. J. Hubert & G. De Soete, River Edge, New Jersey: World Scientific.

☞ Minetti C, Colussi C, Adami R, Serra C, Moseta C, Parente V, Fortunçi S, Straino S, Sampaolesi M, Di Padova M, Illi B, Galinari P, Steinkuhler C, Capogrossi MC, Sartorelli V, Botinelli R, Gaetano C, Puri PL. Functional and morphological recovery of dystrophic muscles in mice treated with deacetylase inhibitors. *Nature Medecine* 2006; 12: 1147-1150.

☞ Miyatake M, Miike T, Zhao J, Yoshioka K, Uchino M, Usuku G. Possible systemic smooth muscle layer dysfunction due to a deficiency of dystrophin in Duchenne muscular dystrophy. *J Neurol Sci.* 1989; 93(1): 11-7.

☞ Mochizuki Y, Ojima K, Uezumi A, Masuda S, Yoshimura K, Takeda S. Participation of bone marrow-derived cells in fibrotic changes in denervated skeletal muscle. *Am J Pathol.* 2005; 166(6): 1721-32.

☞ Mok E, Beghin L, Gauchon P Estimation body composition in children with Duchenne muscular dystrophy: comparison of bioelectrical impedance analysis and skinfold–thickness measurement. *Am J Clin Nutr* 2006; 83: 63–69.

☞ Mokri B, Engel AG. Duchenne dystrophy: electron microscopic findings pointing to a basic or early abnormality in the plasma membrane of the muscle fiber. *Neurology.* 1975; 25(12): 1111-20.

☞ Monici MC, Aguenouz M, Mazzeo A, Messina C, Vita G. Activation of nuclear factor- κ B in inflammatory myopathies and Duchenne muscular dystrophy. *Neurology.* 2003; 60(6): 993-7.

☞ Morrison J, Lu QL, Pastoret C, Partridge T, Bou-Gharios G. T-cell-dependent fibrosis in the mdx dystrophic mouse. *Lab Invest.* 2000; 80(6): 881-91.

☞ Morrison J, Palmer DB, Cobbold S et al. Effect of T-lymphocyte depletion on muscle fibrosis in the mdx mouse. *Am J Pathol* 2005; 166:1701-10.

☞ Morrone A, Zammarchi E, Scacheri PC, Donati MA, Hoop RC, Servidei S, Galluzzi G, Hoffman EP. Asymptomatic dystrophinopathy. *Am J Med Genet.* 1997; 69(3): 261-7.

☞ Mühlfeld C, Coulibaly M, Dörge H, Sellin C, Liakopoulos O, Ballat C, Richter J, Schoendube F. Stereological analysis of muscle morphology following exposure to repetitive stretch-shortening cycles in a rat model. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2006; 31(2): 167-79.

☞ Muntoni F, Bushby K, van Ommen G. 128th ENMC International Workshop on 'Preclinical optimization and Phase I/II Clinical Trials Using Antisense Oligonucleotides in Duchenne Muscular Dystrophy' 22-24 October 2004, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord.* 2005; 15(6): 450-7.

☞ Muntoni F, Torelli S, Ferlini A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol* 2003; 2 :731–40.

☞ Murphy DL, Mendell JR, Engel WK: Serotonin and platelet function in Duchenne muscular dystrophy. *Arch Neurol* 1973; 28: 239-242.

☞ Murray MA, Robbins N. Cell proliferation in denervated muscle: identity and origin of dividing cells. *Neuroscience.* 1982; 7(7): 1823-33.

☞ Musarò A, McCullagh K, Paul A, Houghton L, Dobrowolny G, Molinaro M, BartonER, Sweeney HL, Rosenthal N. Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nat Genet.* 2001; 27(2): 195-200.

☞ Musch BC, Papapetropoulos TA, McQueen DA, Hudgson P, Weightman D. A comparison of the structure of small blood vessels in normal, denervated and dystrophic human muscle. *J Neurol Sci.* 1975; 26(2): 221-34.

☞ Nakae Y, Stoward PJ, Kashiyama T, Shono M, Akagi A, Matsuzaki T, Nonaka I. Early onset of lipofuscin accumulation in dystrophin-deficient skeletal muscles of DMD patients and mdx mice. *J Mol Histol.* 2004; 35(5): 489-99.

☞ Nandan D, Clarke EP, Ball EH, Sanwal BD. Ethyl-3,4 dihydroxybenzoate inhibits myoblast differentiation: evidence for an essential role of collagen. *J Cell Biol* 1990; 110: 1673-79.

☞ Narayanan AS, Whitney J, Souza A, Raghu G. Effect of γ -interferon on collagen synthesis by normal and fibrotic human lung fibroblasts. *Chest.* 1992; 101(5): 1326-31.

☞ Nguyen F, Guigand L, Goubault-Lleroux I, Wyers M, Cherel Y. Microvessel density in muscles of dogs with golden retriever muscular dystrop. *Neuromusc Disor* 2005; 15: 154-163.

- ☞ Nicholson LV, Johnson MA, Bushby KM et al. Integrated study of 100 patients with Xp21 linked muscular dystrophy using clinical, genetic, immunochemical and histopathological data. Trends across the clinical groups. *J Med Genet* 1993; 30: 728-36.
- ☞ Nico, B., et al., A possible role of tryptase in angiogenesis in the brain of mdx mouse, a model of Duchenne muscular dystrophy. *Neuroscience*, 2004; 123(3): 585-8.
- ☞ Nico, B., et al., Altered blood-brain barrier development in dystrophic MDX mice. *Neuroscience*, 2004; 125(4): 921-35.
- ☞ Nico, B., et al., Aquaporin-4 expression during development of the cerebellum. *Cerebellum*, 2002; 1(3): 207-12.
- ☞ Nico, B., et al., Increased matrix-metalloproteinase-2 and matrix-metalloproteinase-9 expression in the brain of dystrophic mdx mouse. *Neuroscience*, 2006; 140(3): 835-48.
- ☞ Nico, B., et al., Vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 expression in mdx mouse brain. *Brain Res*, 2002; 953(1-2): 12-6.
- ☞ Norman AM, Rogers C, Sibert JR, Harper PS. Duchenne muscular dystrophy in Wales: a 15 year study, 1971 to 1986. *J Med Genet*. 1989; 26(9): 560-4.
- ☞ Okinaga T, Mohri I, Fujimura H, Imai K, Ono J, Urade Y, Taniike M. Induction of hematopoietic prostaglandin D synthase in hyalinated necrotic muscle fibers: its implication in grouped necrosis. *Acta Neuropathol*. 2002; 104(4): 377-84.
- ☞ Pastoret C, Sebillé A. Age-related differences in regeneration of dystrophic (mdx) and normal muscle in the mouse. *Muscle Nerve*. 1995; 18(10): 1147-54.
- ☞ Pastoret C, Sebillé A. Further aspects of muscular dystrophy in mdx mice. *Neuromuscul Disord*. 1993; 3(5-6): 471-5.
- ☞ Pastoret C, Sebillé A. mdx mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. *J Neurol Sci*. 1995; 129(2): 97-105.
- ☞ Paulson 08, Engel AG, Gomez MR: Muscle blood flow in Duchenne type muscular dystrophy, limb-girdle dystrophy, polymyositis, and in normal controls. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1974; 37: 685-690.
- ☞ Pescatori M, Broccolini A, Minetti C, Bertini E, Bruno C, D'amico A, Bernardini C, Mirabella M, Silvestri G, Giglio V, Modoni A, Pedemonte M, Tasca G, Galluzzi G, Mercuri E, Tonali PA, Ricci E. Gene expression profiling in the early phases of DMD: a constant molecular signature characterizes DMD muscle from early postnatal life throughout disease progression. *FASEB J*. 2007; 21(4): 1210-26
- ☞ Pierce GB, Nakane PK: Basement membranes: Synthesis and deposition in response to cellular injury. *Lab Invest* 1969; 21: 27-41.
- ☞ Porcher R, Said-Nahal R, D'Agostino MA, Miceli-Richard C, Dougados M, Breban M. Two major spondylarthropathy phenotypes are distinguished by pattern analysis in multiplex families. *Arthritis Rheum*. 2005; 53(2): 263-71
- ☞ Préaux AM, Mallat A, Rosenbaum J, Zafrani ES, Mavier P, Nagler A, Katz A, Aingorn H, Miao HQ, Condiotti R, Genina O, Pines M, Vlodaysky I. Pentoxifylline inhibits growth and collagen synthesis of cultured human hepatic myofibroblast-like cells. *Hepatology*. 1997; 26(2): 315-22.
- ☞ Prella A, Medoni R, Moggio M, Chan HW, Gallanti A. et al. Dystrophin deficiency in a case of congenital myopathy. *J Neurol* 1992; 239: 76-78.
- ☞ Quinlan JG, Hahn HS, Wong BL, Lorenz JN, Wenisch AS, Levin LS. Evolution of the mdx mouse cardiomyopathy: physiological and morphological findings. *Neuromuscul Disord*. 2004; 14(8-9): 491-6
- ☞ Rae, C., et al., Brain biochemistry in Duchenne muscular dystrophy: a 1H magnetic resonance and neuropsychological study. *J Neurol Sci*, 1998; 160(2): 148-57.
- ☞ Rando TA. Oxidative stress and the pathogenesis of muscular dystrophies. Review. *Am J Phys Med Rehabil*. 2002; 81(11 Suppl): S175-86.
- ☞ Rando TA. The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle Nerve*. 2001; 24(12): 1575-94.
- ☞ Reeves HL, Burt AD, Wood S, Day CP. Hepatic stellate cell activation occurs in the absence of hepatitis in alcoholic liver disease and correlates with the severity of steatosis. *J Hepatol*. 1996; 25(5): 677-83.
- ☞ Reeves WH, Satoh M. Features of autoantigens. *Mol Biol Rep*. 1996; 23(3-4): 217-26.

- ☞ Rhodin JAG: Ultrastructure of mammalian venous capillaries, venules, and small collecting veins. *J Ultrastruct Res* 1968; 25: 452-500.
- ☞ Riser BL, Denichilo M, Cortes P, Baker C, Grondin JM, Yee J, Narins RG. Regulation of connective tissue growth factor activity in cultured rat mesangial cells and its expression in experimental diabetic glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol*. 2000; 11(1): 25-38.
- ☞ Rosman, N.P. and B.A. Kakulas, Mental deficiency associated with muscular dystrophy. A neuropathological study. *Brain*, 1966; 89(4): 769-88.
- ☞ Russ JC, Dehoff TC. *Practical stereology*, 2000; 2nd edition, Plenum Press.
- ☞ Saitoh O, Periasamy M, Kan M, Matsuda R. cis-4-Hydroxy-L-proline and ethyl-3,4-dihydroxybenzoate prevent myogenesis of C2C12 muscle cells and block MyoD1 and myogenin expression. *Exp Cell Res*. 1992; 200(1): 70-6
- ☞ Sampaolesi M, Blot S, D'Antona G, Granger N, Tonlorenzi R, Innocenzi A, Mognol P, Thibaud JL, Galvez BG, Barthélémy I, Perani L, Mantero S, Guttinger M, Pansarasa O, Rinaldi C, Cusella De Angelis MG, Torrente Y, Bordignon C, Bottinelli R, Cossu G. Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature*. 2006; 444(7119): 574-9.
- ☞ Sander M, Chavoshan B, Harris SA, Iannaccone ST, Stull JT, Thomas GD, Victor RG. Functional muscle ischemia in neuronal nitric oxide synthase-deficient skeletal muscle of children with Duchenne muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97(25): 13818-23.
- ☞ Sanderson N, Factor V, Nagy P, Kopp J, Kondaiah P, Wakefield L, Roberts AB, SpornMB, Thorgeirsson SS. Hepatic expression of mature transforming growth factor β 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92(7): 2572-6.
- ☞ Sandri M, Minetti C, Pedemonte M, Carraro U. Apoptotic myonuclei in human Duchenne muscular dystrophy. *Lab Invest*. 1998; 78(8): 1005-16.
- ☞ Sanes JR, Schachner M, Covault J. Expression of several adhesive macromolecules (N-CAM, L1, J1, NILE, uvomorulin, laminin, fibronectin, and a heparan sulfate proteoglycan) in embryonic, adult, and denervated adult skeletal muscle. *J Cell Biol*. 1986; 102(2): 420-31.
- ☞ Sato K, Li Y, Foster W, Fukushima K, Badlani N, Adachi N, Usas A, Fu FH, Huard J. Improvement of muscle healing through enhancement of muscle regeneration and prevention of fibrosis. *Muscle Nerve*. 2003; 28(3): 365-72
- ☞ Schmalbruch H. Regenerated muscle fibers in Duchenne muscular dystrophy: a serial section study. *Neurology*. 1984; 34(1): 60-5.
- ☞ Schnaper H.W., Kopp J.B, Poncelet A.C et al. Increased expression of extracellular matrix proteins and decreased expression of matrix proteases after serial passage of glomerular mesangial cells. *J. Cell Sci*. 1996; 109: 2521–2528.
- ☞ Scholte HR, Busch HF. Early changes of muscle mitochondria in Duchenne dystrophy. Partition and activity of mitochondrial enzymes in fractionated muscle of unaffected boys and adults and patients. *J Neurol Sci*. 1980; 45(2-3): 217-34.
- ☞ Schwabe RF, Schnabl B, Kweon YO, Brenner DA. CD40 activates NF-kappa B and c-Jun N-terminal kinase and enhances chemokine secretion on activated human hepatic stellate cells. *J Immunol*. 2001; 166(11): 6812-9.
- ☞ Selman M, King TE, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann. Intern. Med*. 2001; 134: 136–151.
- ☞ Sewry CA, Sansome A, Clerk A, Sherratt TG, Hasson N, Rodillo E, Heckmatt JZ, Strong PN, Dubowitz V. Manifesting carriers of Xp21 muscular dystrophy; lack of correlation between dystrophin expression and clinical weakness. *Neuromuscul Disord*. 1993; 3(2): 141-8.
- ☞ Shen W, Li Y, Tang Y, Cummins J, Huard J. NS-398, a cyclooxygenase-2-specific inhibitor, delays skeletal muscle healing by decreasing regeneration and promoting fibrosis. *Am J Pathol*. 2005; 167(4): 1105-17
- ☞ Sicinski P, Geng Y, Ryder-Cook AS, Barnard EA, Darlison MG, Barnard PJ. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science*. 1989; 244(4912): 1578-80
- ☞ Sifringer M, Uhlenberg B, Lammel S et al. Identification of transcripts from a subtraction library which

might be responsible for the mild phenotype in an intrafamilially variable course of Duchenne muscular dystrophy. *Hum Genet* 2004; 114: 149–56.

☞ Song W, Jackson K, McGuire PG. Degradation of type IV collagen by matrix metalloproteinases is an important step in the epithelial-mesenchymal transformation of the endocardial cushions. *Dev Biol.* 2000; 227(2): 606-17.

☞ Sparks, B.F., et al., Brain structural abnormalities in young children with autism spectrum disorder. *Neurology*, 2002; 59(2): 184-92.

☞ Stedman HH, Sweeney HL, Shrager JB, Maguire HC, Panettieri RA, Petrof B, Narusawa M, Leferovich JM, Sladky JT, Kelly AM. The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature.* 1991; 352(6335): 536-9.

☞ Stefanutti D, Benoist MR, Scheinmann P, Chaussain M, Fitting JW. Usefulness of sniff nasal pressure in patients with neuromuscular or skeletal disorders. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 162(4 Pt 1): 1507-11.

☞ Stephens HR, Duance VC, Dunn MJ, Bailey AJ, Dubowitz V. Collagen types in neuromuscular diseases. *J Neurol Sci.* 1982; 53(1): 45-62.

☞ Straino S, Germani A, Di Carlo A, Porcelli D, De Mori D, Mangoni A, Napolitano M, Martelli F, Biglioli P and Capogrossi MC. Enhanced arteriogenesis and wound repair in dystrophin-deficient mdx mice. *Circulation* 2004; 110: 3341-3348,

☞ Strieter RM, Belperio JA, Keane MP. Host innate defenses in the lung: the role of cytokines. *Curr Opin Infect Dis.* 2003; 16(3): 193-8.

☞ Suelves M, Vidal B, Serrano AL, Tjwa M, Roma J, López-Aleman R, Luttun A, de Lagrán MM, Díaz-Ramos A, Jardí M, Roig M, Dierssen M, Dewerchin M, Carmeliet P, Muñoz-Cánoves P. uPA deficiency exacerbates muscular dystrophy in MDX mice. *J Cell Biol.* 2007; 178(6): 1039-51.

☞ Sugino S, Miyatake M, Ohtani Y, Yoshioka K, Miike T, Uchino M. Vascular alterations in Fukuyama type congenital muscular dystrophy. *Brain Dev.* 1991; 13(2): 77-81.

☞ Sugino, S., et al., Vascular alterations in Fukuyama type congenital muscular dystrophy. *Brain Dev*, 1991; 13(2): 77-81.

☞ Sun G, Haginoya K, Wu Y, Chiba Y, Nakanishi T, Onuma A, Sato Y, Takigawa M, Inuma K, Tsuchiya S. Connective tissue growth factor is overexpressed in muscles of human muscular dystrophy. *J Neurol Sci.* 2008; 267(1-2): 48-56

☞ Sun GL, Zhao S, Li P, Jiang HK. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in progression muscular dystrophy. *Neurosci Bull.* 2006; 22(2): 85-90.

☞ Suthers GK, Davies KE. Phenotypic heterogeneity and the single gene. *Am J Hum Genet* 1992; 50: 887–91.

☞ Tanabe Y, Esaki K, Nomura T. Skeletal muscle pathology in X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) mouse. *Acta Neuropathol.* 1986; 69(1-2): 91-5.

☞ Taniguchi M, Kurahashi H, Noguchi S, Sese J, Okinaga T, Tsukahara T, Guicheney P, Ozono K, Nishino I, Morishita S, Toda T. Expression profiling of muscles from Fukuyama-type congenital muscular dystrophy and laminin- α 2 deficient congenital muscular dystrophy; is congenital muscular dystrophy a primary fibrotic disease? *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 342(2): 489-502.

☞ Tápanes FJ, Vásquez M, Ramírez R, Matheus C, Rodríguez MA, Bianco N. Cluster analysis of antinuclear autoantibodies in the prognosis of SLE nephropathy: are anti-extractable nuclear antibodies protective? *Lupus.* 2000; 9(6): 437-44.

☞ Tidball JG, Wehling-Henricks M. Macrophages promote muscle membrane repair and muscle fibre growth and regeneration during modified muscle loading in mice in vivo. *J Physiol.* 2007; 578(Pt 1): 327-36.

☞ Tidball JG, Wehling-Henricks M. The role of free radicals in the pathophysiology of muscular dystrophy. *J Appl Physiol.* 2007; 102(4): 1677-86.

☞ Tihy F, Vogt N, Recan D, Malfoy B, Leturcq F, Coquet M, Serville F, Fontan D, Guillard JM, Kaplan JC, et al. Skewed inactivation of an X chromosome deleted at the dystrophin gene in an asymptomatic mother and her affected daughter. *Hum Genet.* 1994; 93(5): 563-7.

☞ Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of

connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002; 3(5): 349-63.

☞ Torres LF, Duchen LW. The mutant mdx: inherited myopathy in the mouse. Morphological studies of nerves, muscles and end-plates. *Brain.* 1987; 110 (Pt 2): 269-99.

☞ Toussaint M, Steens M, Soudon P. Lung function accurately predicts hypercapnia in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Chest.* 2007; 131(2): 368-75.

☞ Tracey, I., et al., An in vivo and in vitro H-magnetic resonance spectroscopy study of mdx mouse brain: abnormal development or neural necrosis? *J Neurol Sci,* 1996; 141(1-2): 13-8.

☞ Tracey, I., et al., Brain abnormalities in Duchenne muscular dystrophy: phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy and neuropsychological study. *Lancet,* 1995; 345(8960): 1260-4.

☞ Tracey, I., J.F. Dunn, and G.K. Radda, Brain metabolism is abnormal in the mdx model of Duchenne muscular dystrophy. *Brain,* 1996; 119 (Pt 3): 1039-44.

☞ Tuffery S, Chambert S, Bareil C, Sarda P, Coubes C, Echenne B, Demaille J, Claustres M. Mutation analysis of the dystrophin gene in Southern French DMD or BMD families: from Southern blot to protein truncation test. *Hum Genet.* 1998; 102(3): 334-42.

☞ Tuffery S, Lenk U, Roberts RG, Coubes C, Demaille J, Claustres M. Protein truncation test: analysis of two novel point mutations at the carboxy-terminus of the human dystrophin gene associated with mental retardation. *Hum Mutat.* 1995; 6(2): 126-35.

☞ Turk R, Sterrenburg E, de Meijer EJ, van Ommen GJ, den Dunnen JT, 't Hoen PA. Muscle regeneration in dystrophin-deficient mdx mice studied by gene expression profiling. *BMC Genomics.* 2005; 6: 98

☞ Uchikama K, li U hanayama K, tsuji T, fujiwara T, Tschino N. Functional status and muscle strength in people with duchenne muscular dystrophy living in the community. *J. of Rehab. Medecine* 2004; 36: 124-129

☞ Uchino M, Araki S, Miike T. Correlative study of the incidence of opaque, necrotic and regenerative fibers in Duchenne dystrophy. *Acta Neuropathol.* 1988; 75(3): 308-12.

☞ Uitenbroek DG (1997) SISA Diagnostic accuracy. Quantitative skills, Sisa, Statistic, Diagnostic

☞ Van der Gaag RJ, Buitelaar J, Van den Ban E, Bezemer M, Njio L, Van Engeland H. A controlled multivariate chart review of multiple complex developmental disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 1995; 34(8): 1096-106.

☞ Van der Kooij, A.J. and Meulman, J.J. Categorical Principal Components Analysis. *SPPS Categories* 10.0. 1999; 1-9, 103-126, 221-237. In J.J. Meulman, W.J. Heiser, and SPSS Inc Chicago.

☞ Van Deutekom JC, Janson AA, Ginjaar IB, Frankhuizen WS, Aartsma-Rus A, Bremmer-Bout M, den Dunnen JT, Koop K, van der Kooij AJ, Goemans NM, de Kimpe SJ, Ekhardt PF, Venneker EH, Platenburg GJ, Verschuuren JJ, van Ommen GJ. Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *N Engl J Med.* 2007; 357(26): 2677-86.

☞ Van Essen AJ, Verheij JBG, Reefhuis J et al. The natural history of Duchenne muscular dystrophy: analysis of data from a Dutch survey and review of age-related events. *Leyden Muscular Dystrophy* 2004.

☞ Velasco MV, Colin AA, Zurakowski D, Darras BT, Shapiro F. Posterior spinal fusion for scoliosis in duchenne muscular dystrophy diminishes the rate of respiratory decline. *Spine.* 2007; 32(4): 459-65.

☞ Vidal B, Serrano AL, Tjwa M, Suelves M, Ardite E, De Mori R, Baeza-Raja B, Martínez de Lagrán M, Lafuste P, Ruiz-Bonilla V, Jardí M, Gherardi R, Christov C, Dierssen M, Carmeliet P, Degen JL, Dewerchin M, Muñoz-Cánoves P. Fibrinogen drives dystrophic muscle fibrosis via a TGF β /alternative macrophage activation pathway. *Genes Dev.* 2008; 22(13): 1747-52.

☞ Vignaud A, Ramond F , Ferry a. Differential recovery of neuromuscular function after nerve/muscle injury induced by crude venom from *Notechis scutatus*, cardiotoxin from *najaatra* and treatments in mice . *Neuroscience research* 2007; 58: 317-23.

☞ Vracko R, Benditt EP: Capillary basal lamina thickening: Its relationship to endothelial cell death and replacement. *J Cell Biol* 1970; 47: 281-285.

☞ Wagner PD. Skeletal muscle angiogenesis. A possible role for hypoxia. *Adv Exp Med Biol.* 2001; 502: 21-38.

☞ Wakayama Y, Schotland DL, Bonilla E, Orecchio E. Quantitative ultrastructural study of muscle satellite cells in Duchenne dystrophy. *Neurology.* 1979; 29(3): 401-7.

☞ Wehling M, Spencer MJ, Tidball JG. A nitric oxide synthase transgene ameliorates muscular dystrophy

in mdx mice. *J Cell Biol.* 2001; 155(1): 123-31.

☞ Wehling-Henricks M, Sokolow S, Lee JJ, Myung KH, Villalta SA, Tidball JG. Major basic protein-1 promotes fibrosis of dystrophic muscle and attenuates the cellular immune response in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet.* 2008; 17(15): 2280-92.

☞ Whitehead NP, Pham C, Gervasio OL, Allen DG. N-Acetylcysteine ameliorates skeletal muscle pathophysiology in mdx mice. *J Physiol.* 2008; 586(7): 2003-14.

☞ Whitehead NP, Yeung EW, Allen DG. Muscle damage in mdx (dystrophic) mice: role of calcium and reactive oxygen species. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2006; 33(7): 657-62.

☞ Wicksell RK, Khilgren M, Melin L, Orvar EO. Specific cognitive deficits are common in children with Duchenne Muscular Dystrophy. *Dev Med and Child Neurol* 2004; 46: 154–56.

☞ Wilcox MA, Wyszynski DF, Panhuysen CI, Ma Q, Yip A, et al. Empirically derived phenotypic subgroups – qualitative and quantitative trait analyses. *BMC Genetics* 2003; 4 (Suppl 1): S15.

☞ Wilcox MA, Wyszynski DF, Panhuysen CI, Ma Q, Yip A, et al. Two major spondylarthropathy phenotypes are distinguished by pattern analysis in multiplex families. *Arthritis Rheum* 2005; 53: 263–271.

☞ Williamson JR, Volger NJ, Kilo C: Estimation of vascular basement membrane thickness. *Diabetes* 1969; 18: 567-578.

☞ Willig TN, Carlier L, Legrand M, Rivière H, Navarro J. Nutritional assessment in Duchenne muscular dystrophy. *Dev Med Child Neurol.* 1993; 35(12): 1074-82.

☞ Wilton S. PTC124, nonsense mutations and Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord.* 2007; 17(9-10): 719-20

☞ Witte MB, Barbul A. Role of nitric oxide in wound repair. *Am J Surg.* 2002; 183(4): 406-12.

☞ Wynn TA, Hesse M, Sandler NG, Kaviratne M, Hoffmann KF, Chiaramonte MG, Reiman R, Cheever AW, Sypek JP, Mentink-Kane MM. P-selectin suppresses hepatic inflammation and fibrosis in mice by regulating interferon gamma and the IL-13 decoy receptor. *Hepatology* 2004; 39(3): 676-87.

☞ Wynn TA. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Review Nat Rev Immunol.* 2004; 4(8): 583-94.

☞ Yamane A, Akutsu S, Diekwisch TG, Matsuda R. Satellite cells and utrophin are not directly correlated with the degree of skeletal muscle damage in mdx mice. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005; 289(1): C42-8.

☞ Yamazaki M, Minota S, Sakurai H, Miyazono K, Yamada A, Kanazawa I, Kawai M. Expression of transforming growth factor- β 1 and its relation to endomysial fibrosis in progressive muscular dystrophy. *Am J Pathol.* 1994; 144(2): 221-6.

☞ Yeung D, Kharidia R, Brown SC, Górecki DC. Enhanced expression of the P2X4 receptor in Duchenne muscular dystrophy correlates with macrophage invasion. *Neurobiol Dis.* 2004; 15(2): 212-20.

☞ Yeung EW, Whitehead NP, Suchyna TM, Gottlieb PA, Sachs F, Allen DG. Effects of stretch-activated channel blockers on $[Ca^{2+}]_i$ and muscle damage in the mdx mouse. *J Physiol.* 2005; 562(Pt 2): 367-80.

☞ Yong, V.W., et al., Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS. *Trends Neurosci,* 1998; 21(2): 75-80.

☞ Yoshida H, Kondratenko N, Green S, Steinberg D, Quehenberger O. Identification of the lectin-like receptor for oxidized low-density lipoprotein in human macrophages and its potential role as a scavenger receptor. *Biochem J.* 1998; 334 (Pt 1): 9-13.

☞ Yu MK, Wright TL, Dettbarn W-D, et al: Pargyline-induced myopathy with histochemical characteristics of Duchenne muscular dystrophy. *Neurology (Minneapolis)* 1974; 24: 237-244.

☞ Zacharias JM, Anderson JE. Muscle regeneration after imposed injury is better in younger than older mdx dystrophic mice. *Neuromuscul Disord.* 2001; 11(8): 703-12.

☞ Zanotti S, Negri T, Cappelletti C, Bernasconi P, Canioni E, Di Blasi C, Pegoraro E, Angelini C, Ciscato P, Prella A, Mantegazza R, Morandi L, Mora M. Decorin and biglycan expression is differentially altered in several muscular dystrophies. *Brain* 2005; 128 (Pt 11): 2546-55.

☞ Zanotti S, Saredi S, Ruggieri A et al. Altered extracellular transcript expression and protein modulation in primary Duchenne muscular dystrophy myotubes. *Matrix Biol* 2007; 26(8): 615-24.

☞ Zhao Y, Haginoya K, Sun G, Dai H, Onuma A, Iinuma K. Platelet-derived growth factor and its receptors are related to the progression of human muscular dystrophy: an immunohistochemical study. *J*

Pathol. 2003; 201(1): 149-59.

☞ Zhou G, Li C, Cai L. Advanced glycation end-products induce connective tissue growth factor-mediated renal fibrosis predominantly through transforming growth factor β -independent pathway. *Am J Pathol.* 2004; 165(6): 2033-43.

☞ Zhou L, Porter JD, Cheng G, Gong B, Hatala DA, Merriam AP, Zhou X, Rafael JA, Kaminski HJ. Temporal and spatial mRNA expression patterns of TGF- β 1, 2, 3 and T β RI, II, III in skeletal muscles of mdx mice. *Neuromuscul Disord.* 2006; 16(1): 32-8.

☞ Zhou, Y., Poczatek, M.H., Berecek, K.H. & Murphy-Ullrich, J.E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006; 339: 633–641.

☞ Zhu J, Li Y, Shen W, Qiao C, Ambrosio F, Lavasani M, Nozaki M, Branca MF, Huard J. Relationships between transforming growth factor- β 1, myostatin, and decorin: implications for skeletal muscle fibrosis. *J Biol Chem.* 2007; 282(35): 25852-63.

Sub-phénotypes de la maladie de Duchenne et caractérisation de la myofibrose dystrophique humaine et expérimentale

(Isabelle Desguerre)

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est la maladie neuromusculaire la plus fréquente de l'enfant. Son évolution progressive inexorable conduit habituellement au décès dans la troisième décennie. La DMD constitue cependant une affection hétérogène pour la sévérité de l'atteinte musculaire, cognitive et cardiaque, et cette hétérogénéité n'est pas totalement expliquée par la localisation des mutations dans le gène de la dystrophine. Ma thèse comporte trois volets: (1) une analyse clinique multivariée d'une cohorte de DMD suivie à long terme qui nous a permis de définir 4 phénotypes distincts de DMD; (2) une étude de corrélation clinico-pathologique qui a identifié la fibrose endomysiale précoce comme seul facteur histologique prédictif de sévérité motrice; (3) la mise au point d'un modèle murin original de myofibrose dystrophique chez la souris *mdx* déficiente en dystrophine.

1- Étude multiparamétrique clinique. La saisie par la même équipe des données fonctionnelles musculaires, cardiaques, respiratoires et cognitives de 75 patients atteints de DMD (tous génotypés et présentant une absence complète de dystrophine musculaire), suivis pendant >10 ans, a permis d'établir un modèle multiparamétrique satisfaisant à deux dimensions principales, cognitive et motrice, et de définir 4 clusters phénotypiques : (i) DMD cognitive et motrice congénitale (20%), (ii) DMD classique (28%), (iii) DMD motrice pure modérée (22%), (iv) DMD motrice pure sévère (30%). La corrélation génotype-phénotype était restreinte à la seule atteinte cognitive. Des indicateurs pronostics précoce ont été identifiés et validés sur une 2ème série de 34 patients.

2- Étude histopathologique. Les variations de sévérité de l'atteinte musculaire n'étant pas expliquées par la génétique moléculaire, nous avons cherché à corréler les paramètres moteurs et la biopsie musculaire prélevée dans le quadriceps à un stade précoce (3-7 ans) chez 25 patients (analyse stéréologique des images numérisées pour les paramètres élémentaires: nécrose/régénération, fibres hypercontractées, adipocytes, fibrose endomysiale et périmysiale). Seule la fibrose endomysiale était associée à un pronostic moteur défavorable ($p < 0.002$) attesté par l'âge de perte de marche, la force du quadriceps et le testing musculaire global à 10 ans. Cette fibrose endomysiale dissociait les capillaires des myofibres (écartement $\times 2.5$), et s'accompagnait d'une augmentation sélective des macrophages CD206+ activés dans la voie alterne (M2) et d'une diminution relative des cellules satellites musculaires ($p < 0.0001$). Ces données suggèrent un rôle clé de la fibrose endomysiale (et des macrophages M2 profibrosant) et dans la sévérité clinique de la DMD.

3- Étude expérimentale. Ces éléments rendent nécessaire la mise au point d'un modèle expérimental de myofibrose dystrophique, la souris *mdx* présentant peu de fibrose et un déficit moteur modéré et tardif. Nous avons mis au point une nouvelle méthode de lésion musculaire focale profibrosante du tibialis antérieur chez la souris *mdx* (piqûres multiples quotidiennes pendant 15 jours). Une fibrose endomysiale attestée par un fort immunomarquage du collagène I (à 8, 30, 60 et 90 jours) a été quantifiée et corrélée à la perte de la force musculaire dans la patte lésée (comparée au muscle contralatéral).

Ces résultats légitiment et préparent les futures stratégies thérapeutiques "anti-fibrosantes" dans la DMD