

SOMMAIRE

<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</u>	3
INTRODUCTION.....	3
<u>I- LA MYOPATHIE CENTRONUCLEAIRE</u>	4
<u>A- Etude génétique</u>	4
<u>B- Etude clinique</u>	4
1- Symptômes.....	4
2- Examen neurologiques.....	5
<u>C- Etude paraclinique</u>	5
1- Examens biochimique.....	5
2- Etude électromyographique.....	6
<u>D- Etude anatomopathologique</u>	6
1- Histologie musculaire.....	6
1.1- Analyse morphologique.....	6
1.2- Morphométrie.....	7
1.3- Histoenzymologie.....	7
2- Etude morphologique des structures nerveuses.....	7
<u>II- FACTEURS INFLUENCANT LA DETERMINATION DES FIBRES DE</u>	

3.4- Chronologie des transformations du muscle rapide en muscle lent	18
4- Dissociation entre l'influx nerveux et le flux axoplasmique	19
4.1- Effet de la tétrodoxine sur la régénération d'un muscle lent	20
4.2- Association de la tétrodoxine et de la vinblastine, effet sur l'expression des MHC	21
5- La calcineurine : un médiateur intracellulaire de la spécification des fibres lentes par l'activité nerveuse	21
5.1- Effets d'inhibiteurs de la calcineurine sur le typage des fibres musculaires.....	21
5.2- Mise en évidence de l'action de la calcineurine au niveau musculaire	22
5.3- Mécanisme d'action.....	23

III- APPROCHE EXPERIMENTALE DE LA REGENERATION MUSCULAIRE

A- Modèles classique d'induction de la nécrose musculaire..... 25

1- Nécrose induite par des lésions musculaires focales	25
2- Ischémie vasculaire.....	25
3- Utilisation de substances myotoxiques	26

B- Un exemple d'induction nécrotique : la notexine 27

1- Présentation de la notexine	27
2- Nécrose musculaire par injection intra-musculaire de notexine	27
2.1- Détermination de la dose de notexine.....	27
2.2- Aspect histologique de la nécrose/régénération musculaire	28
3- Action neurotoxique de la notexine	29
4- Mécanisme d'action.....	29
4.1- Myotoxicité.....	29
4.2- Neurotoxicité	30

C- La régénération musculaire 31

1- Présentation des cellules satellites	31
2- Activation des cellules satellites	32
3- Différenciation des fibres néoformées.....	32

DEUXIEME PARTIE, EXPERIMENTALE : ETUDE DE LA REGENERATION MUSCULAIRE CHEZ LES LABRADORS SAINS ET MYOPATHES..... 35

INTRODUCTION..... 35

I- MATERIEL ET METHODES..... 36

A- Choix des animaux..... 36

B- Choix de la myotoxine..... 36

C- Méthodes..... 37

1- Réalisation de dosages biochimiques 37

2- Réalisation des biopsies musculaires et induction de la nécrose 37

3- Cryofixation des biopsies..... 39

4- Techniques d'histologie musculaire 39

II- RESULTATS..... 41

A- Résultats biochimiques et électrolytiques..... 41

B- Résultats histologiques..... 44

1- Histologie, avant injection de notexine 44

2- Histologie, 4 jours post-injection de notexine 44

3- Histologie, 14 jours post-injection..... 67

4- Histologie, 30 jours post-injection 68

5- Histologie, à 90 jours..... 68

III- DISCUSSION 69

A- Critique de la méthodologie employée 69

1- Choix de la myotoxine 69

2- Qualité des prélèvements..... 69

3- Choix de l'analyse semi-quantitative 70

B- Comparaison des résultats..... 70

1- Comparaison des résultats obtenus chez le témoin par rapport aux données publiées.... 70

2- Comparaison des résultats entre le témoin et le malade..... 71

C- Hypothèses pouvant expliquer le tableau histopathologique de la CNM 73

CONCLUSION..... 77

ANNEXE 79

BIBLIOGRAPHIE..... 81

INTRODUCTION

Les myopathies des carnivores domestiques sont des affections rares, présentant des symptômes non spécifiques et dont le diagnostic nécessite des examens complémentaires.

Pour la plupart, l'origine moléculaire et les mécanismes physiopathologiques liés à ces maladies demeurent inconnus. L'étude des myopathies animales connaît aujourd'hui un regain d'intérêt. En effet, certaines représentent des modèles spontanés de maladies humaines homologues pour lesquelles peu de données sont disponibles. Des résultats obtenus plus facilement chez le Chien, apporteront une approche diagnostique et thérapeutique très attendues, chez l'Homme.

Parmi les myopathies, la myopathie centronucléaire (CNM) du Labrador Retriever s'inscrit dans cette optique, par les similitudes phénotypiques qu'elle présente avec des formes de la maladie humaine du même nom. Il s'agit d'une maladie héréditaire congénitale, se traduisant par une faiblesse musculaire généralisée et une amyotrophie marquée. Histologiquement, elle se traduit principalement par une prédominance des fibres musculaires de type physiologique lent et par la présence d'une centralisation nucléaire.

Afin de comprendre le mécanisme de la prédominance des fibres lentes dans cette maladie, nous nous sommes intéressé aux différents facteurs pouvant influencer, chez l'individu sain, la prédominance des fibres lentes aussi bien lors de la myogenèse que chez l'adulte. Nous avons ensuite utilisé un modèle de régénération musculaire induite par nécrose musculaire provoquée chez le chien sain et myopathe. Cette étude a été engagée pour répondre à deux questions :

- le potentiel de régénération des muscles est-il maintenu chez les animaux myopathes ?
- si le muscle régénère, adopte-t-il un phénotype sauvage ou muté ?

Pour répondre à ces questions, nous avons suivi deux paramètres lors de la régénération musculaire, l'expression des chaînes lourdes de la myosines et le pourcentage de centralisation nucléaire, chez un chien sain et un mutant.

PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION

L'objectif de la revue bibliographique est de présenter les connaissances clinique, neurologique, électrophysiologique et histologique actuelles de la myopathie centronucléaire du Labrador Retriever, étudiée à l'école vétérinaire d'Alfort.

Une des caractéristiques histologiques de cette maladie est l'évidente prédominance des fibres de type physiologique lent (9,58). Nous nous intéresserons donc aux différents facteurs pouvant influencer cette prédominance, aussi bien lors de la myogénèse embryonnaire que chez l'adulte.

Parmi ces facteurs, l'innervation semble être un élément capital dans le maintien du phénotype musculaire et dans la détermination des types de fibres (48).

Nous étudierons, ensuite, les différentes techniques d'induction d'une régénération provoquée, dont l'utilisation de myotoxine.

Nous jugeons utile de rappeler au lecteur qu'une myopathie héréditaire du Labrador Retriever (MHLR), au phénotype remarquablement similaire à celui des chiens nés en France (Annexe 1), a été décrite par le passé aux Etats-Unis (e.g.33) et en Angleterre (e.g.38). Eventuellement, des mentions à ces cas anglo-américains seront faites dans notre revue bibliographique, sans que l'on puisse pourtant, en l'absence d'étiologie moléculaire établie, les assimiler rigoureusement en une seule et même maladie.

I- LA MYOPATHIE CENTRONUCLEAIRE

Les myopathies sont des affections rares et difficiles à diagnostiquer. Elles concernent un dysfonctionnement des fibres musculaires striées, indépendant d'une anomalie primaire de l'innervation.

A- Etude génétique

Les premiers animaux atteints ont été amenés en consultation à l'école vétérinaire d'Alfort en 1991, soit en cas référé, soit spontanément par leur propriétaire.

L'étude de leur pedigree, ainsi que différents croisements réalisés, ont permis de montrer que la CNM est une affection héréditaire congénitale transmise selon le mode autosomique récessif (8,58).

B- Etude clinique

1- Symptômes

Les chiens myopathes présentent généralement, dès la naissance, un retard pondéral en comparaison des chiens sains de la portée.

Les animaux atteints de CNM montrent le plus souvent les premiers signes cliniques dès l'âge de deux mois. Les signes précoces sont une amyotrophie et une faiblesse locomotrice d'apparition progressive.

L'aspect des animaux est fortement modifié, avec une silhouette fine et élancée contrastant avec l'allure habituelle des Labrador Retriever. Cette modification résulte de l'amyotrophie particulièrement marquée de certaines masses musculaires (muscles temporaux, du dos et des membres) (9,58).

Les chiens présentent également une ventro-flexion de la nuque et une démarche raide avec, lors de la course, une mobilisation simultanée des deux postérieurs imitant la locomotion du lapin (« bunny hopping gait »)(8,11,33,58).

L'examen des articulations montre une ouverture exagérée des carpes, tarses, un jarret presque droit, et un écartement des doigts à l'appui.

On note une intolérance marquée à l'effort pouvant être exacerbée lors de crises transitoires provoquées par le froid, le stress ou un exercice prolongé (8,9,33).

Ces symptômes sont variables en intensité selon les animaux. Cependant, on retrouve de façon constante l'amyotrophie et la faiblesse musculaire, premiers signes d'appel.

Les signes cliniques se stabilisent lentement vers l'âge d'un an et n'influencent pas la durée de vie des animaux. Au jour de l'écriture de ce manuscrit, l'animal le plus vieux est âgé de 11 ans. On peut néanmoins insister sur des complications respiratoires qui mettent parfois la vie de l'animal en péril. En effet, la myopathie touche la musculature striée de l'œsophage des chiens qui développent pour certains d'entre eux un mégaoesophage dont la principale conséquence est l'existence de régurgitation suivie de fausses routes.

2- Examen neurologique

L'examen neurologique révèle une aréflexie ou une hyporéflexie tendineuse, en particulier pour le réflexe fémoro-patellaire, signe le plus précoce de la maladie et décelable dès l'âge de 4 semaines (8,52,58).

C- Etude paraclinique

1- Examens biochimiques

L'analyse des paramètres impliqués dans des troubles métaboliques responsable d'une affection neuromusculaire secondaire (glycémie, urémie, créatinémie, cholestérolémie, natrémie, kaliémie, calcémie et dosages des protéines totales) n'est pas significativement différent entre les animaux témoins et les malades (7,58).

Le taux de créatine kinase (CK), marqueur relativement spécifique, sensible au delà de 300 UI/L et précoce de lésions musculaires, est normal (58).

2- Etude électromyographique

Chez les animaux malades, le silence électrique est remplacé par une activité électrique spontanée anormale.

Elle se présente le plus fréquemment sous la forme simultanée de potentiels de fibrillation et d'ondes positives lentes.

On rencontre, plus occasionnellement, surtout dans les muscles de la tête et du cou, des potentiels de fasciculation, des décharges complexes répétitives et des potentiels d'unité motrice à composante satellite (5,9,44,58).

Ces tracés se retrouvent dans des affections neuropathiques et myopathiques.

L'intensité de l'activité électrique spontanée varie en fonction du muscle étudié avec une intensité plus importante pour les muscles de la tête, les muscles paravertébraux et les muscles appendiculaires proximaux.

Il semble également que cette activité diminue avec l'âge des animaux.

D- Etude anatomopathologique

1- Histologie musculaire

1.1- Analyse morphologique

L'examen des biopsies musculaires, après congélation et coloration hématoxyline/éosine (HE), révèle une importante inégalité de calibre des fibres musculaires. Certaines fibres sont atrophiées, anguleuses ou rondes, et d'autres sont au contraire des fibres hypertrophiées. Cette inégalité de calibre est plus marquée pour le muscle biceps fémoral que pour le muscle tibial crânial et sujette à une certaine variabilité d'un mutant à l'autre (9).

Certaines fibres comportent des noyaux centralisés, dont le pourcentage augmente avec l'âge des malades. En effet, chez chiot de 4 mois, aucune centralisation n'est observée, alors qu'on dénombre 5% de noyaux centralisés à 6-7 mois et jusqu'à 65% chez l'adulte de 90 mois.

Chez les animaux les plus âgés, certaines fibres musculaires paraissent être remplacées par des adipocytes.

De très rares cas de nécroses et de signes de régénération sont observés (58), contrairement à ce qui a pu être décrit dans certains cas de MHLR (Annexe 1) (38).

1.2- Morphométrie

La distinction des différents types de fibres musculaires repose sur plusieurs techniques dont la plus classique est l'exploration de l'activité ATPasique différentielle des chaînes lourdes de myosine à différentes valeurs de pH. Par ces techniques, il a pu être montré que l'inégalité de calibre et la centralisation nucléaire touchent aussi bien les fibres lentes, de type I, que les fibres rapide, de type II (58).

Ces colorations révèlent surtout une importante modification de la proportion des deux types de fibres avec une prédominance des fibres lentes dans le biceps fémoral mais pas dans le tibial crânial. De plus, avec l'âge, cette prédominance s'accroît et s'accompagne d'une réduction du diamètre moyen des fibres de type I (9,58).

L'intensité de ces modifications est variable d'un mutant à l'autre et est variable suivant le muscle étudié et l'âge des animaux.

1.3- Histoenzymologie

Les colorations oxydatives (SDH, NADH-TR) montrent, chez les chiots, une légère altération du réseau mitochondrial et intermyofibrillaire sur certaines fibres atrophiques ainsi qu'une accumulation de l'activité oxydative au centre des fibres.

Chez les adultes, on note pour certaines fibres atrophiées une forte activité oxydative dans la zone centrale ou un halo clair périnucléaire, et parfois la distribution oxydative ébauche un arrangement radial du réseau intermyofibrillaire (58).

2- Etude morphologique des structures nerveuses

Aucune anomalie sur les structures nerveuses périphériques (aucune dégénérescence axonale, pas de réduction de densité en fibres nerveuses) et centrales (morphologie normale des motoneurones de la moelle épinière et du tronc cérébral) n'a été observée.

Conclusion

Ainsi, la myopathie centronucléaire est caractérisée cliniquement par une faiblesse locomotrice, l'absence de réflexe tendineux et une amyotrophie marquée. Histologiquement, elle est caractérisée par une prédominance des fibres musculaires de type physiologique lent, et par une centralisation nucléaire en l'absence de signes de nécrose, dont l'importance est corrélée à l'âge croissant.

La CNM présente de nombreuses similitudes cliniques, biochimiques et surtout histologiques avec une myopathie humaine, la myopathie centronucléaire humaine dans sa forme dite infantile (Annexe 1). C'est d'ailleurs pour cette raison que l'appellation de « centronucléaire » a été choisie pour désigner la maladie canine.

En vue de la description de la CNM, on constate qu'elle présente à la fois des caractéristiques de myopathie et de neuropathie. En effet, dans les myopathies, on peut retrouver l'inégalité de calibre des fibres, la centralisation nucléaire, l'absence d'anomalie des structures nerveuses et les modifications architecturales des fibres.

Cependant, un certain nombre de caractéristiques font suspecter une neuropathie périphérique chronique héréditaire avec dénervation chronique, comme l'hyporéflexie, l'inégalité de calibre et l'atrophie des fibres.

L'étude de cette maladie ne permet donc pas encore clairement sa classification dans le groupe des myopathies primaires ou des neuropathies (9,58).

De nombreuses questions demeurent sans réponse :

la prédominance des fibres de type physiologique lent dans la CNM résulte-t-elle d'un dysfonctionnement des lignées de cellules myogéniques, éventuellement prédisposées dans la formation des fibres lentes, ou d'une transformation des fibres de type II en type I sous l'influence de facteurs extrinsèques, ou enfin d'une disparition sélective des fibres de type II suivie d'un remplacement par des fibres lentes ?

Pour cela, nous allons rappeler quels sont les facteurs pouvant influencer le typage des fibres musculaires, et par quel déterminisme une fibre devient lente ou rapide.

II- FACTEURS INFLUENCANT LA DETERMINATION DES FIBRES DE TYPES PHYSIOLOGIQUES DIFFERENTS

A- Présentation des types de fibres musculaires chez l'adulte

Le muscle strié squelettique présente une grande diversité structurale et fonctionnelle, montrée par les différents types de fibres qui le composent.

Ces types de fibres diffèrent dans leur morphologie, leurs propriétés contractiles et biochimiques. Leur répartition, au sein des muscles, est très variable d'un muscle à l'autre.

On distingue quatre types de fibres musculaires chez les souris, réparties en deux groupes majoritaires, les fibres lentes et les fibres rapides (49,51) :

- **Les fibres lentes de type I** : fibres à vitesse de contraction lente. Elles ont une teneur élevée en enzymes oxydatives, une faible teneur en glycogène et une forte densité en mitochondrie. Elles sont riches en myoglobine et en capillaires sanguins. Elles présentent une grande résistance à la fatigue. On les retrouve dans les muscles à fonction posturale.
- **Les fibres rapides de type II** : ces fibres à contractions rapides, sont subdivisées en fibres de type IIA (riches en enzymes oxydatives et résistantes à la fatigue) et en fibres de type IIB et IID, fibres des muscles à fonction phasique (riches en enzymes glycolytiques et rapidement fatigables). Dans de rares cas, le type intermédiaire IIC est retrouvé. Les fibres de type IIB ne semblent pas exister chez les grands mammifères (6,7,13,14,49) et le type IID n'a pas encore été mis en évidence chez le chien (68).

La différence de vitesse de contraction de ces fibres est due aux propriétés de leurs protéines contractiles et en particulier à la myosine. Celle-ci est composée de deux chaînes lourdes (MHC) et de 4 chaînes légères, codées par de multiples gènes. (21,48,49,60,69).

La distinction des types de fibres musculaires peut s'effectuer par différentes méthodes comme l'activité ATPasique de la myosine précédemment citée, l'électrophorèse et

l'immunohistochimie des MHC. Ces dernières techniques permettent de révéler l'existence de différentes isoformes de la MHC, caractéristiques d'un type de fibre.

On retrouve la MHC I, IIA, IIB et IID respectivement dans les fibres de type I, IIA, IIB et IID. De nombreux hybrides de MHC peuvent être co-exprimés et des formes spécifiques du développement, les MHC embryonnaire et fœtale, (48,49) sont parfois détectées dans des situations particulières de régénération ou d'anomalie de la différenciation des fibres.

Le muscle présente une grande adaptabilité et le phénotype des fibres peut facilement être modifié, comme lors d'augmentation ou de diminution de l'activité neuro-musculaire.

Le changement en isoformes de MHC suit un schéma général et réversible, permettant le passage d'une forme rapide en lente et inversement (48,69) :

MHC I ↔ MHC II A ↔ MHC II D ↔ MHC II B

Un certain nombre de facteurs contrôlent la différenciation des fibres musculaires et leur éventuelle transformation d'un type à l'autre.

B- Facteurs musculaires précoces impliqués dans le typage des fibres musculaires

1- Présentation du programme myogénique lors du développement embryonnaire

La myogenèse des mammifères s'effectue à partir des somites dérivés du mésoderme paraxial. Les cellules précurseurs des muscles, les myoblastes, en sont issus et migrent dans différentes régions de l'embryon et forment la musculature des membres du corps, à l'exception des muscles de la face qui dérivent des crêtes neurales.

Ces myoblastes, initiés par l'expression de facteurs de régulations myogéniques (MyoD, Myf5, myogénine)(30,50), après multiplication, forment un syncytium ou myotube, résultant de la fusion des myoblastes entre eux. La multinucléation des myotubes résulte uniquement de la fusion des cellules myogéniques et non de la multiplication des noyaux d'un seul myoblaste (51).

Certaines cellules myogéniques mononuclées, les cellules satellites, ne fusionnent pas et restent plaquées entre la lame basale et le sarcolemme.

Dans les stades précoces de la myogenèse, le mésoderme somitique segmenté ne présente pas de spécificité régionale. En effet, si on implante des somites d'origine cervicale à la place de somites brachiaux (chez le poulet), ils donnent naissance à la musculature typique des membres. Les cellules myogéniques des somites sont donc dépourvues de toute détermination régiospécifique et donnent la musculature de leur nouvel environnement (51,54).

Le développement des muscles est donc caractérisé par la migration des myoblastes provenant des somites, de leurs multiplications et de leur fusion en myotubes.

La maturation des myotubes en fibre musculaire passe par la synthèse des protéines contractiles et par la migration des noyaux du centre vers la périphérie de la fibre.

La myogenèse se déroule en deux phases distinctes, faisant intervenir deux sous-populations de myoblastes migrant de façon décalée dans le temps (16,18,21,40,50,51,54,64,65), on parle de :

- Myogenèse primaire pour la formation des myotubes primaires issus de myoblastes embryonnaires, les premiers à migrer vers les membres.
- Myogenèse secondaire pour la formation de myotubes secondaires issus de myoblastes migrant plus tardivement, les myoblastes fœtaux.

Lors de leur différenciation, les myotubes vont exprimer la MHC. Les myotubes primaires donneront des fibres lentes et les myotubes secondaires des fibres préférentiellement rapides (6,16,31,40,50,51,64).

Les myotubes semblent donc être différents quant à leur différenciation en fibres musculaires rapides ou lentes. Cette différence résulte-t-elle de deux lignées distinctes de myoblastes donnant des fibres rapides ou lentes, ou les myoblastes sont-ils identiques, des facteurs extrinsèques modulant secondairement l'expression des gènes vers un type de fibre musculaire?

2- Les myoblastes sont-ils intrinsèquement prédéterminés?

L'analyse de cultures de myoblastes permet de distinguer deux populations de myoblastes. Elles diffèrent quant à l'expression des MHC rapides ou lentes et ont des exigences de croissances différentes en culture (18,21,50). Les myoblastes semblent donc prédisposés génétiquement dans l'expression de la MHC qu'ils expriment.

De plus, quand on injecte en période postnatale des myoblastes de muscles de la mâchoire de Chat dans la région du membre, les fibres nouvellement formées expriment la MHC typique des muscles de la mâchoire et non la MHC de leur nouvel environnement (30) .

Afin de tester, la possibilité d'une différence intrinsèque des myoblastes vis à vis de l'expression de la MHC, des cultures de myoblastes humains prélevés à différents moments du développement sont réalisées (16). On constate alors que tous les myoblastes ont la capacité d'exprimer la MHC lente, en culture. Ils ont donc tous le matériel génétique pour exprimer la MHC lente.

L'expression différente de la MHC, des myotubes primaires et secondaires, est donc certainement due à l'environnement des fibres qui les oriente vers un type particulier.

Il est cependant possible que les myoblastes soient différents intrinsèquement, au moins au début de la myogenèse, mais on pense de plus en plus que l'influence des facteurs environnementaux, permet d'outrepasser cette différence et est responsable de la différenciation des myotubes en fibres rapides ou lentes.

3- Facteurs extrinsèques influençant le type de fibres lors de la myogenèse

3.1- Importance de l'innervation

On sait que la myogenèse primaire est indépendante de l'innervation, au moins dans son commencement. En effet, la formation des myotubes primaires débute avant la mise en place d'une innervation fonctionnelle. De plus, une dénervation précoce ne modifie pas le nombre de myotubes formés (40,51).

La myogenèse secondaire, elle, est nerf-dépendante, la dénervation inhibant la formation des myotubes secondaires (21,40,51,64).

L'innervation est indispensable à l'expression de MHC lente dans les myotubes secondaires (16,21,56) issus de muscle lent.

3.2- Importance de la fusion

Des myoblastes primaires et secondaires, marqués par un rétrovirus, fusionnent in vivo aussi bien avec des fibres rapides que des fibres lentes et il semble que les myoblastes qui fusionnent avec des fibres préexistantes adoptent leur phénotype (54).

L'expression du programme intrinsèque des myoblastes est dépassé par la fusion avec les fibres préexistantes. Cependant, ceci n'est pas valable pour les premières fibres formées pour lesquelles l'environnement nerveux et hormonale oriente leur différenciation (16,30,54).

En culture, il semble que les myoblastes qui fusionnent avec des fibres de petit diamètre, expriment leur propre phénotype alors que lorsque la fusion s'effectue avec de grandes fibres, ils expriment le phénotype de la fibre hôte.

3.3- Importance de la calcineurine et des hormones

Comme chez l'adulte (Cf. partie II/C/5), la calcineurine intervient dans l'expression de la MHC lente lors du développement. En effet lorsqu'on transfecte les myoblastes avec de la calcineurine activée, l'expression de la MHC lente augmente considérablement (64).

Les hormones thyroïdiennes semblent également importantes lors du développement puisqu'elles permettent la transition de l'isoforme MHC néonatale vers la forme adulte rapide (26).

Ainsi, il semble que les deux facteurs intrinsèques et extrinsèques interviennent dans le développement.

Les facteurs extrinsèques, les plus importants, permettent d'outrepasser le programme intrinsèque des fibres. Les myoblastes établissent leur programme d'expression de la MHC de façon précoce lors du développement. Ils sont ensuite moduler en fonction de leur environnement.

L'environnement des fibres à leur formation oriente donc leur destinée en fibre rapide ou lente.

En définitive, certains auteurs (50,64) suggèrent que chez le Rat, il existe 3 populations de myoblastes : lent, lent/rapide et rapide.

- Les myoblastes lents ou embryonnaires donnent les myotubes primaires et expriment typiquement la MHC lente.

- Les 2 autres, myoblastes fœtaux, donnent des myotubes secondaires. On distingue :
 - les myoblastes fœtaux rapide qui forment les fibres rapides (IIA, IIB, IID).
 - les myoblastes fœtaux rapide/lent pouvant devenir des fibres rapides (IIA) ou des fibres lentes (I) suivant leur environnement.

C- Influence de l'innervation sur le typage des fibres musculaires

Les fibres musculaires de type I et II sont innervées par des motoneurons alpha lents ou rapides. Aucun marqueur ne permet de les distinguer à ce jour mais ils diffèrent par la nature de leurs influx électriques (15).

L'innervation n'assure pas seulement un rôle de commande motrice sur le muscle mais aussi un rôle trophique.

En effet, les motoneurons sont essentiels pour la croissance des fibres musculaires, le maintien de leur taille, et, de leur type (59,60). De plus, on constate que les fibres innervées par un même motoneurone, c'est à dire appartenant à la même unité motrice, contiennent des isoformes de MHC identiques et ce, malgré la grande diversité de ces isoformes (48).

Le nerf semble donc intervenir dans la détermination et le maintien de l'expression phénotypique des fibres musculaires.

Cependant, l'influence neurale sur la physiologie et la morphologie musculaire n'est pas encore totalement élucidée. Est-ce par le biais de l'activité électrique ou par le flux axoplasmique que le nerf régule l'expression des gènes musculaires ?

Pour répondre à cette question, différentes expériences ont été réalisées chez des souris.

1- Effet de la dénervation sur le typage des fibres musculaires

L'impact de l'innervation sur le muscle est montré par des expériences de dénervation. Dans ces expériences, le muscle présente rapidement des changements morphologiques dramatiques: atrophie des fibres musculaires, perte de leur forme polygonale, centralisation nucléaire et nécrose (66).

L'absence d'innervation a également des répercussions sur le type de fibres musculaires, entraînant des modifications phénotypiques. Un muscle lent devient plus rapide et inversement (48).

En effet, le muscle soléaire de souris (SOL), muscle lent, comportant principalement de la MHC I, après dénervation, contient de la MHC IIB, isoforme non exprimée normalement. De même, un muscle rapide de souris composé en majorité de MHC IIB, après dénervation, contient préférentiellement la MHC IIA (myosine des fibres IIA dont la contraction est plus lente que les fibres IIB) et II D (66).

On note donc une modification du profil des types de fibres musculaires lors de dénervation de muscle adulte, ce qui montre l'importance du nerf dans le maintien du phénotype des fibres.

De nombreuses expériences utilisent des muscles dénervés et en situation de régénération provoquée, dans le but de voir l'influence de l'innervation sur la régénération musculaire.

Le muscle lent témoin, lorsqu'il est innervé, exprime les MHC IIB et IID les 4 premiers jours de régénération. Puis ces isoformes diminuent en faveur de la MHC I qui deviendra prédominante jusqu'à la régénération complète. Le moment d'apparition de la MHC lente correspond à l'établissement des premières connections nerveuses (19,43,60) .

La régénération du même muscle mais cette fois dénervé, aboutit à un changement phénotypique par rapport au témoin puisqu' aucune fibre ne contient la MHC I. Les fibres co-expriment en revanche les 3 types de MHC rapides (41,43,60).

Ceci suggère que l'apparition de la myosine lente dans un muscle lent en régénération n'a lieu qu'en présence de l'innervation.

Certains auteurs (41,43,60) attribuent l'apparition des isoformes rapides à un « programme par défaut » qui, en l'absence d'innervation, exprime les formes rapides de la myosine.

Le motoneurone joue donc un rôle important en modifiant ce programme par défaut et en déterminant le phénotype des fibres musculaires.

2- Expériences d'innervations croisées

Pour confirmer l'influence du nerf sur le phénotype musculaire, des expériences d'innervations croisées ont été réalisées. Elles consistent à innover un muscle lent par un nerf innervant normalement un muscle rapide et réciproquement.

On constate alors des modifications importantes dans le profil des enzymes du métabolisme, du reticulum endoplasmique, des capillaires et des protéines musculaires (17,32,55).

On note aussi un changement dans le profil de type des fibres musculaires. Un muscle lent devient rapide lorsqu'il est nouvelle

157.40005 Tm(nt312 1135 136.69998 Tmvien(inne1té)Tf0.00011 Tc 01

Ces expériences mettent en évidence que les motoneurones interviennent dans le déterminisme de l'expression phénotypique des fibres musculaires.

Ces changements sont imputés au type d'impulsion nerveuse délivré par les motoneurones. En effet, les motoneurones lents et rapides diffèrent dans leurs influx électriques : le motoneurone lent présente une activité électrique tonique de faible fréquence alors que l'activité du motoneurone rapide est de haute fréquence phasique (15).

3- Expérience d'électrostimulation directe et indirecte

Pour étudier l'effet de l'activité électrique du nerf sur le phénotype des fibres musculaires, des modèles expérimentaux d'électrostimulation mimant l'activité spécifique des motoneurones ont été développés.

3.1- Principe

Deux modèles d'électrostimulation ont été mis au point : (69)

- Electrostimulation directe : stimulation d'un muscle dénervé par des électrodes placées sur le muscle.
- Electrostimulation indirecte : stimulation du muscle par des électrodes placées sur le nerf.

L'électrostimulation, par rapport aux autres techniques d'augmentation de l'activité neuromusculaire telle que l'exercice physique, présente de nombreux avantages. Elle permet de délivrer une activité contractile standardisée et reproductible, de cibler une zone musculaire précise et d'établir une relation dose/effet par variation du taux d'activité contractile (48).

L'électrostimulation reproduit les effets des motoneurones rapides ou lents sur les muscles, en fonction de l'intensité et de la fréquence de la stimulation par les électrodes. Un motoneurone lent, tonique et de faible fréquence, peut être mimé par une stimulation de 10-20 Hz. Un nerf rapide est mimé par une stimulation intermittente à 100 Hz (47,48,69).

3.2- Effet de l'électrostimulation sur un muscle rapide

La stimulation directe d'un muscle rapide de rat dénervé (muscle long extenseur des doigts, EDL) avec une fréquence mimant le motoneurone lent, le transforme en un muscle présentant les caractéristiques physiologiques du muscle lent avec une prédominance des fibres de type I (49,59,69).

Cette transformation s'effectue en différentes étapes puisqu'après trois semaines de stimulations, les fibres de type II B sont remplacées par des fibres de type II A et quelques fibres de type I. Il faut attendre deux mois de stimulation pour que les fibres de type I soient majoritaires dans le muscle stimulé (69).

Aucun signe de nécrose ou de régénération n'est observé. Ces transformations s'effectuent donc dans les fibres préexistantes.

Pendant ces transformations, une co-expression de MHC rapide et lente est notée.

Par contre, cette même stimulation sur le muscle en situation de régénération provoquée, entraîne une expression plus rapide des fibres de type I (60).

Ainsi, le nerf par son activité électrique est capable de transformer le phénotype d'un muscle rapide en un muscle lent.

En l'absence de stimulation, le muscle EDL dénervé est atrophié et contient principalement des fibres de type IIA au lieu des fibres IIB caractéristiques. Une stimulation mimant le motoneurone rapide prévient son atrophie et les fibres détectées sont de type II B, comme dans le muscle témoin.

Aucune différence n'est observée par électrostimulation indirecte. La présence physique du nerf n'est donc pas nécessaire. C'est son activité électrique qui intervient dans le maintien du phénotype musculaire.

3.3- Effet de l'électrostimulation sur un muscle lent

La stimulation à faible fréquence du muscle SOL dénervé permet le maintien de son phénotype lent.

En revanche, une stimulation « type motoneurone rapide » sur le SOL, entraîne une transformation de celui-ci en un muscle rapide. Il est remarquable que cette transformation n'est que partielle car ce muscle exprime toujours la MHC lente dans certaines fibres (48).

3.4- Chronologie des transformations du muscle rapide en muscle lent

La transformation du muscle rapide en muscle lent est visible par une modification de la couleur du muscle, qui passe d'un rouge de pâle à un rouge vif (augmentation de la myoglobine et des capillaires).

Les changements du muscle rapide en muscle lent, suite à l'électrostimulation, s'effectuent suivant des étapes successives (49). On note tout d'abord, une augmentation de la densité des capillaires, la modification des enzymes du métabolisme (augmentation des enzymes oxydatives) et la diminution du réticulum sarcoplasmique. La modification des protéines myofibrillaires arrive en dernier.

Cette transition entraîne une augmentation du taux de calcium libre dans le cytosol, par une diminution de sa séquestration dans le réticulum sarcoplasmique et une diminution importante des protéines fixant le calcium (48,49,59).

La stimulation électrique, et donc l'influx nerveux, est responsable dans le muscle d'une modification du taux de calcium intracellulaire. Des auteurs (48,49,59) ont suggéré que le calcium agirait comme un second messenger, contrôlant l'expression des gènes musculaires.

Ces expériences ont donc montré le rôle important de l'influx nerveux dans le maintien et le changement du phénotype des fibres musculaires. Elle suggèrent que le calcium intracellulaire pourrait jouer le rôle de second messenger.

4- Dissociation entre l'influx nerveux et le flux axoplasmique

Bien que les expériences d'électrostimulation ont montrées l'importance de l'activité électrique du nerf dans le maintien de la différenciation d'un muscle dénervé ou dans sa transformation, suivant la fréquence de stimulation, il a été suggéré que le flux axonal par le biais de facteurs trophiques, pourraient jouer un rôle annexe dans la détermination du type de fibre musculaire.

Dans cette optique, des expériences ont été conduites. La distinction entre l'influence de l'activité électrique et celle, hypothétique, du flux axoplasmique, est réalisée par l'emploi de drogues spécifiques les inhibant (41,43) :

- la tétrodoxine : inhibiteur des canaux rapides au sodium, voltage-dépendant, bloque la dépolarisation pré et post synaptique et donc l'influx électrique du nerf.
- la vinblastine : bloque le flux axoplasmique sans dommage pour le nerf (24).

4.1- Effet de la tétrodoxine sur la régénération d'un muscle lent

Après traitement du nerf sciatique avec la tétrodoxine, la régénération du muscle lent (SOL) de rat est modifiée.

En effet, le muscle régénéré n'exprime plus la MHC lente mais uniquement les isoformes rapides, MHC IIB et IID. L'isoforme MHC IIA est exprimé dans les fibres jusqu'au septième jour de régénération puis elle diminue progressivement (41).

Il semble donc que la synthèse de la myosine lente dans un muscle lent en régénération n'intervienne qu'en présence de l'activité électrique du motoneurone lent.

L'absence des fibres de type I dans le muscle lent est retrouvée aussi bien lors de dénervation chirurgicale que lors du blocage chimique de l'activité électrique, alors qu'elles prédominent dans ce muscle en présence du nerf.

De plus, au septième jour de régénération, l'isoforme MHC II A se retrouve dans le muscle innervé, dénervé chirurgicalement et dénervé chimiquement. L'apparition de cette isoforme ne semble donc pas être sous la dépendance de l'innervation mais d'une capacité intrinsèque des fibres musculaires à l'exprimer (« programme par défaut ») (41,43,60).

Lorsqu'on compare l'expression de la MHC IIA selon les différentes méthodes de dénervation, on remarque que l'isoforme est fortement exprimé dans la dénervation chirurgicale et très faiblement avec la dénervation chimique (dans ce cas, on parle de « motoneurone silencieux » (41,43,59) car le nerf est bien présent physiquement mais son influx électrique est supprimé).

La différence entre les deux dénervations est l'absence totale de contact nerf/muscle lors de la dénervation chirurgicale.

Ceci suggère qu'il y aurait une inhibition de l'expression de l'isoforme IIA dans les fibres avec le motoneurone silencieux et que cette inhibition pourrait être due au flux axoplasmique, qui véhiculerait jusqu'au muscle un facteur inhibiteur (41,43).

4.2- Association de la tétrodoxine et de la vinblastine, effet sur l'expression des MHC

Un muscle lent en régénération, dont le nerf sciatique est traité localement par la vinblastine seule, présente une expression de MHC IIA supérieure à celle d'un muscle innervé. Les fibres expriment aussi MHC I et la majorité des fibres expriment ces deux isoformes associées.

Si on associe les deux traitements, la MHC IIA prédomine largement et la MHC I n'est pas exprimée (41).

Il semble donc que le flux axoplasmique véhicule un facteur inhibant l'expression de la MHC IIA et que lors du traitement à la vinblastine, la levée de cette inhibition est responsable d'une surexpression de cette isoforme.

Ainsi, l'activité électrique du nerf est un déterminant majeur pour l'expression de la MHC lente dans les muscles lents en modifiant un programme par défaut. Il permet l'expression du phénotype lent des fibres, agissant néanmoins de concert avec un inhibiteur axoplasmique des fibres de type IIA .

Le nerf, via son influx électrique, est donc un facteur important dans le typage des fibres musculaires puisque sa présence est nécessaire pour le maintien de la différenciation phénotypique des fibres. Il permet de moduler le type des fibres en fonction des besoins physiologiques.

Le nerf agit sans doute indirectement dans le déclenchement de l'expression du génome des fibres. Des seconds messagers cellulaires, dont le calcium semble jouer un rôle important.

5- La calcineurine : un médiateur intracellulaire de la détermination des fibres lentes par l'activité nerveuse

Le type de fibres musculaires est donc régulé, au moins en partie, par l'activité électrique du nerf.

Les expériences d'électrostimulation ont montré que la fréquence de l'influx électrique nerveux permettait de moduler les fibres musculaires et que l'un des premiers changements cellulaires observés était une modification du taux intracellulaire en Ca^{2+} .

De plus, le taux de Ca^{2+} intracellulaire diffère entre les fibres lentes et rapides avec une concentration en calcium plus élevée pour les fibres lentes (47).

Le Ca^{2+} pourrait donc être un second messenger de l'influx nerveux et jouer un rôle important dans le contrôle de l'expression phénotypique des gènes musculaires.

Des études se sont intéressées particulièrement à une protéine phosphatase, Ca^{2+} / calmoduline dépendante, activée par un changement du taux de Ca^{2+} intracellulaire, la calcineurine.

En effet, la calcineurine est une protéine cytoplasmique ubiquitaire mais surtout présente dans le cerveau et le muscle.

On a suggéré, en outre, qu'elle jouait un rôle dans la régulation des fibres musculaires lentes car des patients transplantés traités avec de la cyclosporine A (CsA), immunosuppresseur et inhibiteur de la calcineurine, développaient dans certains cas des myopathies squelettiques avec une perte des capacités oxydatives du muscle (46).

5.1- Effets d'inhibiteurs de la calcineurine sur le typage des fibres musculaires.

L'administration d'un inhibiteur de la calcineurine, la cyclosporine A (CsA), à des rats adultes pendant 3 mois, entraîne des modifications de leur phénotype musculaire.

Dans le muscle SOL, normalement innervé, on constate une diminution du taux de MHC I et une augmentation de l'expression de MHC IIA, corrélé à la dose de CsA utilisée.

Aucun changement n'est observé dans un muscle rapide (4).

L'utilisation de CsA ou d'un autre inhibiteur de la calcineurine (FK 506), lors de régénération musculaire provoquée, entraîne une prédominance de la MHC IIA et une diminution de l'expression de la MHC I dans le muscle lent (62).

Lors de dénervation, aucune différence n'est observé avec le muscle témoin.

La calcineurine n'a donc aucun effet sur les muscles rapides, et son action sur les fibres lentes ne peut s'effectuer qu'en présence de l'innervation.

La calcineurine semble donc être nécessaire dans le maintien du phénotype lent des fibres musculaires et être nécessaire à l'induction de l'expression des gènes lents. Elle permettrait la phénoconversion de la MHC IIA vers la MHC I, via l'activité nerveuse.

Cependant, la mise en évidence de l'importance de la calcineurine dans l'expression du phénotype musculaire lent, n'est basé que sur des inhibitions pharmacologiques.

Or, la CsA possède des cibles cellulaires autres que la calcineurine, et la calcineurine est abondamment exprimée dans les neurones où elle intervient dans la transmission synaptique et la plasticité synaptique (46,62).

Les changements phénotypiques, induit par les traitement à la CsA, ne sont donc pas nécessairement le reflet d'un blocage de l'activité de la calcineurine au niveau musculaire, mais peut-être d'une inhibition de la calcineurine dans le motoneurone, ou de l'inhibition d'une autre molécule.

5.2- Mise en évidence de l'action de la calcineurine au niveau musculaire

Pour tester si l'effet de la CsA est dû à un effet direct sur le muscle ou à cause d'un effet indirect médié par le nerf, des études se sont intéressées à l'effet de la CsA sur un muscle lent dénervé en régénération et électrostimulé avec une fréquence de « type motoneurone lent ».

On constate alors que le taux de MHC 1 dans le muscle est réduit, alors que sans traitement, la MHC I est fortement exprimée.

Ceci indique que l'effet de la CsA sur l'inhibition de l'expression de la myosine lente est bien dû à un effet direct sur les fibres musculaires (62), et non le reflet d'une action sur le nerf puisque celui n'est pas physiquement indispensable pour induire les transformations.

De plus, cette expérience montre que le nerf n'agit pas seul dans l'expression de la MHC lente puisque l'action de l'activité électrique est inhibé par CsA.

La calcineurine semble donc bien nécessaire pour la formation des fibres de type I, en collaboration avec le motoneurone lent.

L'action directe de la calcineurine est montrée par des souris transgéniques qui surexpriment la forme active de la calcineurine (46). Ces souris présentent une expression très augmentée de la MHC lente aussi bien dans les muscles lents que rapides.

Il semble donc que la calcineurine agisse bien sur la différenciation des fibres musculaires en favorisant l'expression des gènes des fibres de type I.

De plus, des méthodes d'immunodétection ont permis de constater que la calcineurine est plus abondante dans les fibres de type lent et très faible dans les muscles rapides (4).

Ainsi, la calcineurine semble être un facteur indispensable dans le maintien du phénotype lent des fibres musculaires et dans l'expression des gènes lents via l'activité électrique. Elle pourrait donc être un second messager indispensable à l'expression des gènes lents du muscle.

5.3- Mécanisme d'action

Les études menées sur la calcineurine ont débuté sur les lymphocytes T. Elles ont montré que la protéine est activée par des concentrations élevées et prolongées en Ca^{2+} mais insensible à des pics de forte amplitude. Elle permet par son activité enzymatique de déphosphoryler un Facteur Nucléaire d'Activation des lymphocytes T (NFAT), alors capable de se translater dans le noyau des cellules et de se combiner avec d'autres facteurs de la transcription (comme MEF2) et permettre la transcription des gènes (15,47).

Or, dans le muscle, la stimulation tonique du motoneurone lent entraîne une élévation continue de Ca^{2+} à des concentrations de l'ordre de 100 à 300 nM, concentrations capables d'activer la calcineurine (15). De plus, le facteur NFAT est retrouvé dans les cellules musculaires et on a remarqué que plusieurs gènes codant pour les fibres lentes contiennent des sites de fixations pour NFAT (4,15,46,47,64).

Un modèle moléculaire a donc été proposé pour expliquer comment l'activité électrique du motoneurone contrôle l'expression des gènes des fibres de type I (15,46,47).

L'activité électrique du motoneurone lent sur les fibres musculaires entraîne une modification de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire à un niveau permettant l'activation de la calcineurine cytoplasmique. L'activité phosphatase de la calcineurine déphosphoryle alors NFAT, permettant son passage dans le noyau des fibres. NFAT avec d'autres facteurs, se fixe

sur la molécule d'ADN, au niveau d'un site promoteur de la transcription des gènes codant pour les protéines des fibres lentes et permet leur synthèse.

Dans les fibres rapides, les motoneurones rapides phasiques sont responsables de fortes amplitudes de Ca^{2+} , incapables de stimuler la calcineurine. NFAT reste donc phosphorylé et ne peut pas atteindre le noyau. Le programme génomique lent est donc inhibé et les gènes codant pour les protéines des fibres rapides sont exprimés.

Cependant, il semble qu'au niveau cellulaire, une autre voie que la calcineurine puisse intervenir. En effet, la voie Ras-MAPK-ERK (Mitogen-Activated Protein Kinase-Extracellulaire signal-Regulated Kinase) via l'innervation permet également l'expression des gènes des fibres lentes (45).

Conclusion

Ainsi, la formation des fibres de type physiologique lent dépend de l'innervation et en particulier de la fréquence de l'influx nerveux électrique. Elle permet le maintien du phénotype lent dans les fibres, mais permet aussi, en fonction de la fréquence du motoneurone, de transformer des fibres rapides en fibres lentes.

Cependant, le nerf n'est pas directement responsable de l'expression phénotypique des fibres lentes. Il agirait sur différents facteurs dont une voie Ca^{2+} /calcineurine dépendante, permettant l'expression des gènes lents.

Ainsi, toutes perturbations de la voie de régulation de l'expression des fibres lentes, comme une mutation dans le métabolisme de la calcineurine ou une modification de la fréquence des motoneurones, peuvent entraîner une prédominance des fibres lentes dans le muscle.

III- APPROCHE EXPERIMENTALE DE LA REGENERATION MUSCULAIRE

Le muscle strié squelettique est doué d'un fort potentiel de régénération après une lésion musculaire.

Les expériences de nécrose sont très utilisées afin d'induire une régénération musculaire et d'en étudier la physiologie. De plus, certaines expériences de nécrose/régénération, facilement reproductibles, permettent d'obtenir des modèles expérimentaux de maladies dégénératives, d'en étudier la physiopathogénie, et d'envisager des perspectives thérapeutiques.

A- Modèles classique d'induction de la nécrose musculaire

Le choix d'un facteur nécrosant est très important dans ce type d'expérience. Il peut influencer la régénération musculaire (rapidité de régénération, qualité de la régénération) en fonction des composants tissulaires touchés par la nécrose : étendue de la nécrose des fibres musculaires, atteinte du réseau vasculaire et des structures nerveuses, nécrose du tissu conjonctif. Au final, la régénération obtenue est très variable, au niveau quantitatif (masse musculaire et force musculaire) et au niveau qualitatif (morphogénèse et fibrose).

1. Nécrose induite par des lésions musculaires focales

L'induction de la nécrose peut se faire par sections transversales du muscle, par écrasement ou par congélation locale (51,63). Ces lésions concernent, en général, une faible masse tissulaire, rendant la quantification de la nécrose et de la régénération difficile. La nécrose atteint la lame basale et les cellules satellites (surtout pour la congélation) et *in fine* une fibrose musculaire s'installe. De plus, ces expériences sont peu reproductibles, car le gradient lésionnel varie en fonction du manipulateur.

2. Ischémie vasculaire

Les lésions musculaires sont générées par section du hile vasculo-nerveux d'un muscle choisi. La nécrose obtenue est vaste mais relativement hétérogène du fait d'une persistance possible de connexions vasculaires par les extrémités tendineuses et par l'épimysium (51).

Elle touche, outre la micro-vascularisation et l'innervation, la matrice extra-cellulaire et les cellules satellites au centre de la zone nécrotique (34,51,63). La régénération est de ce faite ralentie (28 jours) et la masse musculaire régénérée est faible (35 à 80 % de la masse musculaire de départ) avec une fibrose importante.

3. Utilisation de substances myotoxiques

Les substances myotoxiques sont très nombreuses et de natures différentes : anesthésiques locaux (bupivacaïne, lidocaïne), myotoxines extraites de venin de serpents (notexine, taïpoxine, bothropstoxine, crotoxine).

Elles entraînent une nécrose rapide et irréversible, dose-dépendante, suivie d'une régénération *ad integrum* rapide (21 jours) et de bonne qualité (pas de fibrose).

La micro-circulation et la matrice extracellulaire sont conservées, et les cellules satellites sont résistantes. Les jonctions neuro-musculaires sont rapidement rétablies (34,51,57,63).

Parmi ces substances, la bupivacaïne atteint plus les fibres lentes que les fibres rapides (51).

Les myotoxines sont les substances les plus adaptées dans l'étude expérimentale de la nécrose/régénération musculaire, car elles sont faciles d'emploi et sûre, la régénération obtenue est rapide, totale et les manipulations sont reproductibles.

Parmi ces substances, nous retenons tout particulièrement la notexine, une des plus puissantes myotoxines. La nécrose musculaire qu'elle induit, est semblable à celle rencontrée dans certaines myopathies (dystrophie musculaire de Duchenne) (63) et s'avère donc un outil d'étude physiopathologique très important pour ces maladies. Par la suite, la notexine sera notre molécule de référence.

B- Un exemple d'induction nécrotique : la notexine

1- Présentation de la notexine

La notexine est une substance myotoxique et neurotoxique issue du venin d'un serpent d'Australie, *Notechis scutatus scutatus*.

Les morsures naturelles de ce serpent (injection en moyenne de 12,7 mg de notexine par morsure), sur les hommes et les animaux domestiques sont relativement fréquentes et difficiles à diagnostiquer. Les chiens envenimés peuvent présenter une mydriase avec une absence de réflexe pupillaire, vomissement, tachypnée, hypothermie et une paralysie flasque en moins de 2 heures (35,36,37). Une nécrose musculaire importante et rapide est relevée au niveau du site de morsure, entraînant une myoglobinurie responsable d'insuffisance rénale aiguë (36).

La notexine est une phospholipase A2 de 119 acides aminés (13,574 Kda) douée d'activité neurotoxique présynaptique et d'une puissante myotoxicité (22,70). Elle est facilement disponible, relativement sûre d'emploi. Elle entraîne une nécrose musculaire, mais laisse intact la microcirculation, les cellules satellites et la lame basale, entraînant une régénération rapide et complète.

Ces propriétés présentent un grand intérêt dans l'étude physiopathologique de la dégénérescence/régénération musculaire et dans l'étude de l'expression de la myosine lors de la régénération (22,63).

2- Nécrose musculaire par injection intra-musculaire de notexine

2.1- Détermination de la dose de notexine

Suivant la dose de notexine utilisée, la nécrose est plus ou moins étendue. Lorsqu'on injecte 5 µg ou 10 µg de notexine, la nécrose musculaire est dramatique et touche toute l'épaisseur du muscle, sur 5 cm de part et d'autre du site d'injection. L'injection de 1µg de notexine est responsable d'une nécrose plus modérée, sur 4 cm. A la dose de 0,1 µg de notexine, la nécrose est inférieure à un centimètre de part et d'autre du site d'injection, et est insuffisante pour une analyse correct de la régénération (63).

2.2- Aspect histologique de la nécrose/régénération musculaire

Quelques heures après une injection intra-musculaire de notexine, le muscle devient plus pâle. A 4 heures, la moitié des myofibres sont séparées entre elle par un œdème avec une infiltration importante de polynucléaires neutrophiles. Au bout de 24 heures, la nécrose est nette (75 % des myofibres) et l'inflammation s'amplifie. Le tissu musculaire est infiltré par des macrophages. Une coloration rouge d'alizarine est notée dans de nombreuses myofibres, signe d'une augmentation du taux de calcium (63).

Trois jours post-injection, l'architecture du fascicule commence à se restaurer avec l'apparition des premiers myotubes à la périphérie des fibres nécrotiques, sous la lame basale. On note une grande cellularité avec une multiplication des cellules satellites. Les macrophages sont encore très nombreux.

Le rétablissement de l'innervation a lieu entre le 3^{ème} et 4^{ème} jour.

Dès le 7^{ème} jour, les myofibres sont de petites tailles et immatures, avec un tissu interstitiel abondant séparant les fibres néoformées. De rare cas de centralisation nucléaire sont notés.

Quatorze jours après l'injection, le diamètre des fibres augmente et l'espace interstitiel diminue. La morphologie musculaire est restaurée. Des colorations oxydatives permettent la distinction entre les fibres rapides et lentes.

Au bout de 21 jours, le muscle est totalement régénéré et est morphologiquement identique au témoin. On peut juste noter certaines fibres plus petites et la présence de noyaux centraux.

Rapidement après injection de notexine, une réaction inflammatoire s'installe donc avec une infiltration de polynucléaires neutrophiles et surtout de macrophages qui nettoient le muscle des débris cellulaires nécrosés. Une augmentation importante du taux de calcium intracellulaire est notée.

La régénération débute rapidement et est totale en 21 jours. Cette régénération est de bonne qualité car la notexine ne détériore pas les cellules endothéliales des capillaires, préservant la micro-circulation. La lame basale et les cellules satellites restent intactes et la réinnervation est précoce.

3- Action neurotoxique de la notexine

L'effet myotoxique de la notexine a longtemps masqué sa neurotoxicité.

Une heure après injection de la notexine en sous cutanée chez des rats, on remarque des lésions physiques sur les nerfs terminaux : mitochondrie à morphologie anormale, structure lysosomale, absence de vésicules synaptiques (28).

Entre 3 et 6 heures, certains nerfs sont dépourvus d'architecture interne et on note des débris de mitochondrie. La destruction des nerfs terminaux et des axones intra musculaires est totale à 24h.

Dès le 4^{ème} jour, la réinnervation est entamée mais on constate rapidement la présence de réinnervation collatérales (innervation de fibres musculaires voisines par le même axone). Aucune innervation multiple n'est constatée (innervation de fibre par plusieurs axones).

4- Mécanisme d'action

4.1- Myotoxicité

Le mécanisme d'action de la notexine n'est pas entièrement élucidée. Son activité phospholipase A2 (PLA2) semble être primordiale mais pas suffisante car certaines PLA2 ne sont pas myotoxiques. De ce fait, on pense qu'en plus de son action hydrolytique, cette toxine nécessite la présence d'un récepteur spécifique et l'accès à un substrat.

Deux hypothèses ont été formulées (22) :

- la toxine doit se fixer sur le sarcolemme, causant une destruction physique de la membrane par son activité phospholipase. Il en résulte une augmentation non spécifique de sa perméabilité avec un afflux de Ca^{2+} qui entraîne une hypercontraction des myofibrilles puis une autolyse des fibres par activation via le Ca^{2+} d'une protéase.
- l'autre possibilité serait que la notexine entre dans les fibres musculaires par endocytose. Une fois dans le cytosol, elle induit une destruction des organelles (mitochondrie, réticulum). Ceci entraînerait un relargage de Ca^{2+} puis une hypercontraction des fibres et une autolyse.

Des études réalisées par Dixon et al (22), chez le rat, montrent que le site de fixation de la notexine est le sarcolemme. Aucune internalisation de la molécule n'est notée.

La première hypothèse semble donc être la plus vraisemblable.

Cependant ces études ont également révélé que les fibres oxydatives du muscle SOL sont plus sensibles que les fibres glycolytiques du muscle EDL. Ceci est pour le moment non expliqué si ce n'est par la présence d'un substrat spécifique présent sur les fibres lentes et en faible quantité dans les fibres rapides, ou d'une incapacité de gagner ce substrat dans ces fibres malgré une fixation normale sur le sarcolemme.

4.2- Neurotoxicité

Quelques heures après l'injection de la notexine, on constate une perte de vésicules synaptiques dans le nerf terminal (3,70).

Cette perte peut s'expliquer par différents processus :

- un taux excessif d'exocytose
- un manque de recyclage des vésicules après décharge de leur contenu
- une destruction des vésicules

Des études ont montré que lors de l'utilisation de notexine, le taux d'exocytose des vésicules est multiplié par trois par rapport au taux normal. Cette augmentation ne permet pas à elle seule d'expliquer la perte des vésicules.

On constate en plus, la formation de grosses vésicules anormales dans le nerf terminal et sur sa membrane. Ceci suggère un défaut de recyclage des vésicules.

La destruction des vésicules serait due à l'activité phospholipase de la notexine avec le même mécanisme d'action que pour la myotoxicité.

La disparition des vésicules pré-synaptiques peut donc faire intervenir les trois mécanismes.

C- La régénération musculaire

Le muscle strié squelettique est doué d'un fort pouvoir de régénération après une lésion.

Cette régénération s'effectue par l'intervention des cellules myogéniques précurseurs, les cellules satellites.

1- Présentation des cellules satellites

Les cellules satellites, sont des cellules mononuclées, localisées entre la lame basale et la sarcolemme. Chez l'adulte, elles sont dans un état quiescent, avec un noyau de petite taille et un cytoplasme pauvre en organelles (2,14,53,61).

Elles sont peu nombreuses au sein du muscle adulte puisqu'elles représentent environ un pour-cent des noyaux. Leur nombre diminue avec l'âge.

Les cellules satellites sont plus nombreuses à proximité des capillaires vasculaires et proche des plaques motrices. On constate que les fibres de type lent contiennent plus de cellules satellites que les fibres rapides (29).

Des expériences d'hybridation entre caille et poule, ont montré une origine somitique des cellules satellites (51).

Cependant, on pense de plus en plus, qu'une origine extra somitique des cellules satellites est également possible. En effet, on a constaté que des cellules dérivées de l'aorte exprimaient des marqueurs myogéniques identique à ceux des cellules satellites. Après leur implantation dans un membre, elles participent à la régénération musculaire (61).

De plus, des cellules souches hématopoïétiques dérivant de la moelle osseuse ont également les capacités de participer à la régénération musculaire (27,29,61).

Les cellules souches de l'organisme pourraient être des cellules multipotentes qui en fonction de leur environnement participeraient à la régénération du tissu concerné. Ceci pourrait avoir des répercussions thérapeutiques, comme par exemple le transfert de cellules multipotentes de la moelle osseuse dans la restauration des capacités musculaires (23).

2- Activation des cellules satellites

Les cellules satellites quiescentes, en réponse à un stimulus comme une lésion musculaire, une dénervation ou un exercice, vont s'activer. On note alors un changement morphologique des cellules avec un noyau plus volumineux et le développement des organites cytoplasmiques. Elles expriment aussi de nombreux marqueurs myogéniques, typique de la prolifération (MyoD) puis de la différenciation (Myogénin), qu'elles n'exprimaient pas à l'état quiescent. Après une phase de multiplication intense, elles vont fusionner entre elles ou avec des fibres préexistantes et reconstituer le tissu musculaire après leur différenciation terminale (2,53,61).

L'activation et la régulation des cellules satellites nécessitent de nombreux facteurs, dont la réponse inflammatoire et des facteurs provenant de la vascularisation (cytokines, growth factors divers) et l'innervation.

En effet, après une lésion musculaire, on constate une infiltration très rapide des cellules de l'immunité, les lymphocytes neutrophiles, qui initient l'activation des cellules satellites.

Les macrophages migrent dans le site lésionnel très rapidement et vont rester les cellules prédominantes pendant 48 heures. Elles jouent non seulement un rôle de détergence des débris nécrotiques mais aussi dans la sécrétion de facteurs mitogènes (29,42,61), favorisant la prolifération des cellules satellites.

Un ensemble de mécanisme complexe, faisant intervenir des facteurs de croissance (IGF,PDGF,FGF), des facteurs chémoattractifs (HGF) et des facteurs de la différenciation, conduit à l'activation, à la prolifération et à la fusion des cellules satellites.

3- Différenciation des fibres néoformées

La différenciation des fibres musculaires correspond à l'expression des protéines contractiles spécifiques du type de fibres musculaires. Elle peut être suivie en s'intéressant à l'expression de la myosine.

L'expression de la myosine apparaît avec une séquence déterminée et semblable à la myogénèse. La myosine embryonnaire et néonatale précèdent les formes adultes lentes ou rapides (1,68).

Les fibres musculaires immatures ou en régénération expriment l'isoforme néonatale de la myosine qui sert donc d'indicateur de maturité des fibres puisqu'elle n'est pas exprimée chez l'adulte.(68)

La myosine néonatale est la première détectable dès le troisième jour de régénération. Elle va être présente jusqu'au 21^{ème} jour post lésionnel mais uniquement dans certaines fibres.

La myosine lente est détectée le 4^{ème} jour de régénération, mais en co-expression avec la myosine néonatale et rapide. Les 1^{ères} fibres lentes apparaissent vers le 7^{ème} jour, les fibres rapides vers le 10^{ème} jour, et la distinction des fibres est nette le 14^{ème} jour.

La régénération total du muscle s'effectue en 56 jours bien qu'il existe encore des co-expression de myosine dans certaines fibres (68).

Ainsi, la régénération musculaire peut être induite par injection de myotoxine dans le muscle, entraînant une nécrose intense. La régénération du muscle est rapide et complète faisant intervenir les cellules satellites qui reforment de nouvelles fibres. La maturation des fibres néoformées peut être suivie par la synthèse des isoformes de myosines qui montrent la restauration progressive des types de fibres musculaires.

Rapport-Gratuit.com

DEUXIEME PARTIE, EXPERIMENTALE :

ETUDE DE LA REGENERATION MUSCULAIRE CHEZ LES LABRADORS SAINS ET MYOPATHES

INTRODUCTION

L'étude qui suit porte sur l'observation de la régénération musculaire après l'induction d'une nécrose localisée, sur un chien témoin et un chien atteint de la CNM, par injection musculaire d'une myotoxine : la notexine.

Le but de cette étude est de comparer la régénération du tissu sain et atteint, en suivant deux paramètres : le phénotype des fibres musculaires et la centralisation nucléaire.

Les moyens mis en œuvre pour répondre à ces objectifs sont la réalisation de biopsies musculaires et l'analyse de coupes histologiques à différents moments de la régénération. La caractérisation phénotypique des fibres a été établie selon la séquence d'expression des isoformes de chaîne lourde de la myosine pendant 90 jours.

I- MATERIEL ET METHODES

A- Choix des animaux

Pour cette étude, nous avons choisi deux chiens mâles de 34 mois issus de la même portée. Un chien atteint de la CNM, Magic (figure 1a) et un chien témoin, Momo (figure 1b).



Figure 1a : chien atteint de CNM.



Figure 1b : chien sain, Momo.

Figure 1 : Profil d'un chien sain et d'un chien malade

B- Choix de la mytoxine

Parmi les différentes techniques d'induction de nécrose musculaire, nous avons choisi une mytoxine provenant du venin d'un serpent *Notechis scutatus scutatus* : la notexine.

Cette phospholipase A2 présente l'avantage d'entraîner une nécrose de part et d'autre du site d'injection musculaire. L'importance de la nécrose est proportionnelle à la dose, le niveau de destruction musculaire peut donc facilement être modulé. De plus, la nécrose entraîne une régénération musculaire rapide et complète, avec préservation de la lame basale. Elle n'endommage pas les cellules satellites et permet une restauration rapide de l'innervation. Elle n'a pas d'effet sur la microcirculation et la fibrose post-régénération est faible.

La dose de notexine choisie dans cette étude est de $1\mu\text{g}$ diluée dans 0,1 ml de solution. A cette dose, la nécrose musculaire est intense et s'étend sur 4 cm (63).

C- Méthodes

1- Réalisation de dosages biochimiques

Des dosages sériques ont été réalisés avant la première biopsie et avant l'injection de la notexine, afin de révéler une éventuelle anomalie de l'homéostasie. Ils comprennent des

La première biopsie et les injections de notexine sont alors réalisées.

- Biopsie :

deux incisions longues de 3 cm et profondes de 0,5 cm, parallèles au sens des fibres, sont réalisées. Les attaches proximales et distales sont sectionnées libérant le fragment musculaire, placé directement dans un flacon hermétique refroidi sur un lit de glace, avant d'être fixé (Cf. infra)

- Nécrose :

la notexine (1 μ g de notexine par injection) est alors injectée lentement dans un faisceau musculaire, après avoir trempé l'aiguille dans du charbon, afin de marquer le site d'injection. Le faisceau injecté est signalé pour les biopsies ultérieures en mettant en place un point de suture diamétralement opposé au site d'injection avec un fil irrésorbable de décimale 4.

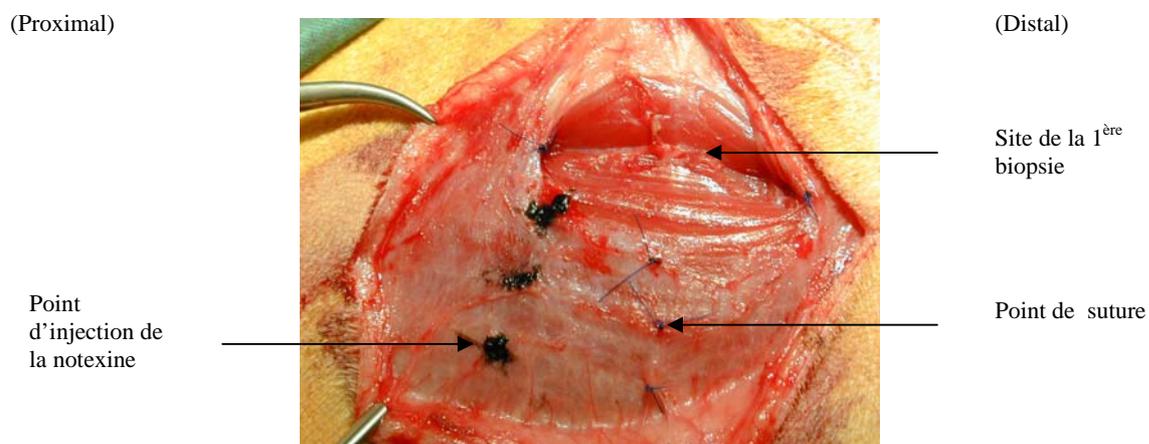


Figure 2 : Technique de biopsie et de marquage lors d'injection de notexine

(Biceps fémoral, chien sain)

L'opération d'injection de la myotoxine est reproduite sur 4 faisceaux musculaires adjacents.

Le fascia et le tissu sous-cutané sont suturés par un surjet (VicrylND décimale 2). La peau est refermée par des agrafes chirurgicales.

La même manipulation est réalisée sur le muscle controlatéral, afin d'alterner le coté de prélèvement, lors des biopsies réalisées les jours suivants.

Un traitement antibiotique est alors instauré (Céfalaxine 30mg/kg/j) pendant 10 jours.

Des photographies numériques sont réalisées à chaque étape pour nous permettre de nous repérer pour les prélèvements à venir.

Les biopsies sont réitérées sur les deux chiens au bout de 4, 14, 30 et 90 jours après l'injection de la notexine.

3- Cryofixation des biopsies

Les fragments musculaires sont congelés dans un délai inférieur à 30 minutes selon un protocole standard d'analyse du tissu musculaire (10,12,14).

Les biopsies, montées sur un support de liège et de gomme adragante, ont subi une congélation rapide, par immersion dans un bain d'isopentane refroidi par de l'azote liquide (30-40 secondes à -140°C). Les prélèvements sont alors conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

Des coupes de 10 μm et de 6 μm d'épaisseur perpendiculaires au grand axe des fibres ont été réalisées pour, respectivement, l'histologie morphologique et l'immunohistologie, à l'aide d'un cryostat. Elles sont ensuite montées entre lame et lamelle, et, colorées.

4- Techniques d'histologie musculaire (12,13)

Une coloration à l'hématoxyline-éosine (HE) a été réalisée. Elle permet une analyse globale de la morphologie musculaire.

Les techniques d'histoenzymologie ont été utilisées pour le typage des fibres musculaires.

Les activités oxydatives des fibres ont été mises en évidence par l'action de la nicotinamine adénine-dinucléotide tétrazolium réductase (NADH-TR) et par l'activité ATPasique de la myosine à pH 9,40 et 4,35. Ces colorations autorisent un typage des fibres musculaires qui apparaissent plus ou moins claires en fonction du pH d'incubation (Tableau I).

	Fibres type I	Fibres type II A	Fibres type II C
Coloration NADH-TR	Foncées	Intermédiaires- claires	Intermédiaires
ATPase PH 9,40	Claires	Foncées	Foncées
ATPases PH 4,35	Foncées	Claires	Incolores

Tableau I : Profil histologique des fibres musculaires de Chien selon la coloration utilisée.

La dernière technique utilisée est une méthode d'immunohistochimie. Elle permet grâce à des anticorps monoclonaux spécifiques des différents types de chaînes lourdes de la myosine (Novocastra dilution 1/20) de mettre en évidence, dans les fibres musculaires, la présence de myosine néonatale, lente ou rapide (7).

II- RESULTATS

A- Résultats biochimiques et électrolytiques

Le résultat des analyses biochimiques et des ionogrammes, avant injection, sont regroupés dans le tableau II.

	Chien témoin	Chien malade
Glycémie (g/l)	0,86	1
Protéine totale (g/l)	53	53
PAL	71	82
ALAT	85	86
Ca²⁺ (mg/l)	100	102
Na⁺ (mmol/l)	147	141
K⁺ (mmol/l)	4,5	3,9
Cl⁻(mmol/l)	120	114
Réserves alcalines (mmol/l)	19	22

Tableau II : Résultats de l'examen biochimique et du ionogramme.

Tous les résultats sont dans les normes et aucune différence n'est observée entre le chien sain et le chien malade.

Concernant les analyses des paramètres rénaux, réalisées les deux premiers jours de l'expérience (Tableau III), aucune différence n'est relevée entre les animaux. On ne note pas d'augmentation des valeurs suite à l'injection de la notexine. La dose de notexine utilisée dans l'expérience est donc bien adaptée pour le chien et n'entraîne pas d'effet secondaire sur le rein.

		Chien témoin	Chien malade
J0	Urée	0,56	0,19
	Créatinine	10	5
J+1	Urée	0,51	0,30
	Créatinine	10	6
J+2	Urée	0,36	0,22
	Créatinine	9	6

Tableau III : Résultats des paramètres rénaux. (Urée (g/l) et Créatinine (g/l), J0 : avant injection de notexine, J+1 : 24 heures après injection, J+2 : 48 heures après injection)

Le résultat des dosages des créatines kinases est représenté par la figure 3. Aucune différence n'est observée entre les deux chiens. Un pic de CK (9300 UI/L pour le malade et 10100 UI/L pour le témoin) est obtenu, 24 heures après l'injection de la notexine, reflétant la nécrose des fibres musculaires et la libération des enzymes sarcoplasmiques dans le torrent sanguin. Le retour à des valeurs physiologiques s'effectue en 4 jours. La durée de demi-vie des enzymes étant courte (6 heures), cette diminution rapide du taux de CK, montre l'absence d'un effet durable de la toxine sur le muscle.

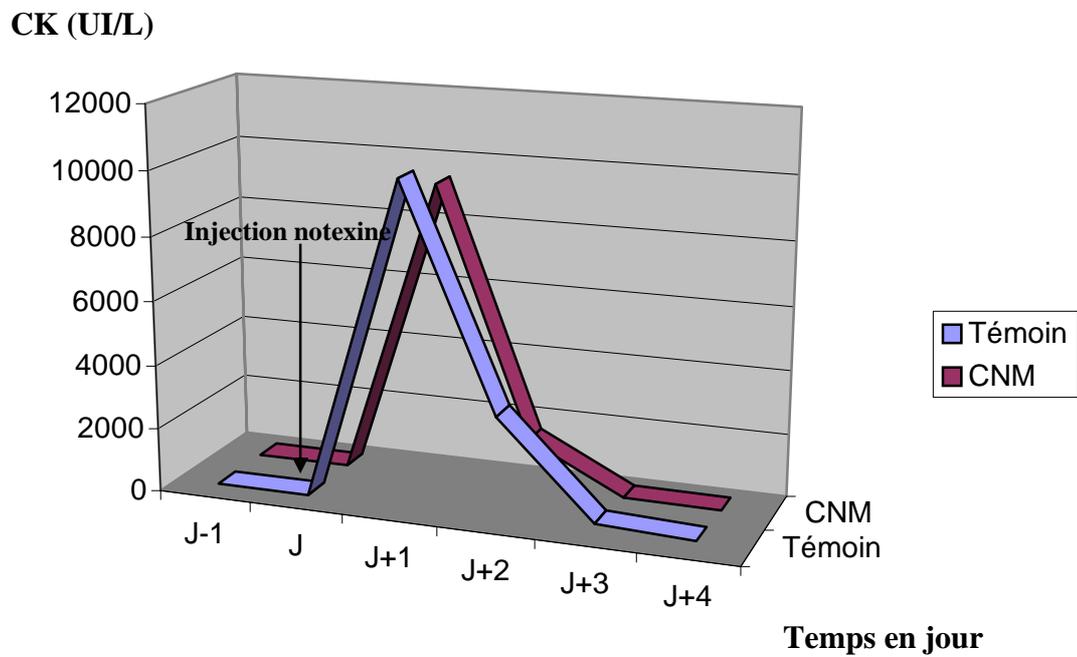


Figure 3 : Evolution des Créatines kinases, chez le chien atteint de CNM et le témoin, après injection de notexine.

B- Résultats histologiques

1- Histologie avant injection de notexine (Figures 5,6)

L'analyse histologique des biopsies avant l'injection de la notexine, permet de différencier le muscle atteint et le muscle sain.

La coloration HE montre que la morphologie du muscle (Figures 5a, 5c, 5e) est modifiée chez le chien myopathe. Le tissu musculaire est moins dense avec de larges plages remplacées par du tissu graisseux. On note une inégalité prononcée du calibre des fibres musculaires, avec des fibres atrophiées angulaires ou rondes, le plus souvent regroupées, et des fibres hypertrophiques (Figure 5b).

La perte de la répartition des types de fibres en une mosaïque aléatoire est nette (Figures 5d,5f). On rencontre une prédominance des fibres de type I. Elles représentent 92 % du total des fibres (Tableau IV). Vingt sept pourcent des fibres contiennent un noyau en position centrale (Figure 4).

L'immunohistologie ne révèle aucune expression de la myosine néonatale chez les deux chiens (Figures 6a, 6b). Chez le chien témoin, la myosine rapide est exprimée dans 64 % des fibres alors que la myosine lente est détectée dans 36 % des cas (Figures 6c, 6e, Tableau IV). Chez le chien atteint, la disproportion entre les fibres rapides et lentes se retrouvent avec cette coloration puisque la quasi totalité des fibres sont positives pour la myosine lente (92%) et de rares fibres expriment le myosine rapide (8%) (Figures 6d, 6f).

2- Histologie, 4 jours post-injection de notexine (Figures 7,8)

Quatre jours après la destruction du tissu musculaire, aucune fibre intacte n'est observée avec la colorations HE. On note une hypercellularité et des noyaux en grands nombres aussi bien chez le chien sain que myopathe (Figures 7). Les cellules observées sont des cellules satellites et des cellules inflammatoires.. La coupe histologique du chien atteint révèle la présence de tissu graisseux sous forme circulaire.

Les résultats immunohistologiques montrent que la régénération musculaire a débuté avec la formation de nouvelles fibres, qui toutes expriment la myosine néonatale.

Temps	Chien	% I ; % II (nombre total de fibres comptées)	% myosine néonatale	% co- expression type I/II	% noyaux centraux (nombre total de fibres)
T₀	Sain	36;64 (454)	0	0	0 (316)
	CNM	93;7 (536)	0	0	27 (349)
T₄	Sain	28;72 (146)	100	-	-
	CNM	90;10 (203)	100	-	-
T₁₄	Sain	21;60 (591)	0	19	14 (357)
	CNM	33;17 (394)	0	50	22 (406)
T₃₀	Sain	36;64 (757)	0	0	16 (381)
	CNM	92;8 (622)	0	0	33 (526)
T₉₀	Sain	36;64 (471)	0	0	12 (315)
	CNM	98;2 (613)	0	0	31 (523)

Tableau IV : Résultats histologiques. (Temps, en jour, après injection de notexine, %I;%II : pourcentage de fibres de type I et de type II)

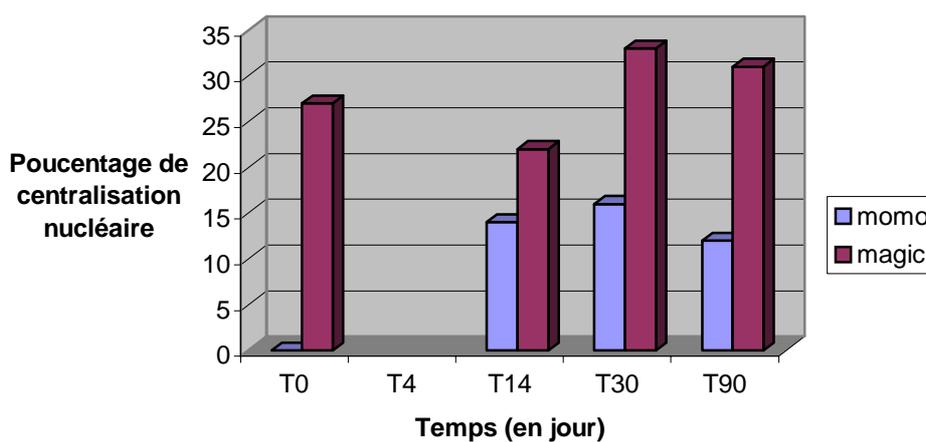


Figure 4 : Evolution de la centralisation nucléaire, chez le témoin (Momo) et le chien atteint (Magic), au cours de la régénération musculaire. (T₄ : pourcentage non déterminé)

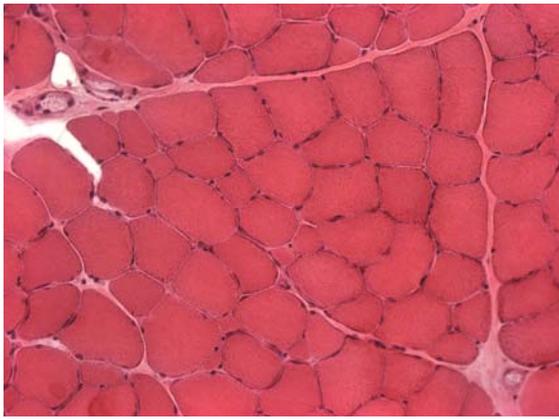


Fig.5a : Chien témoin, coloration HE.

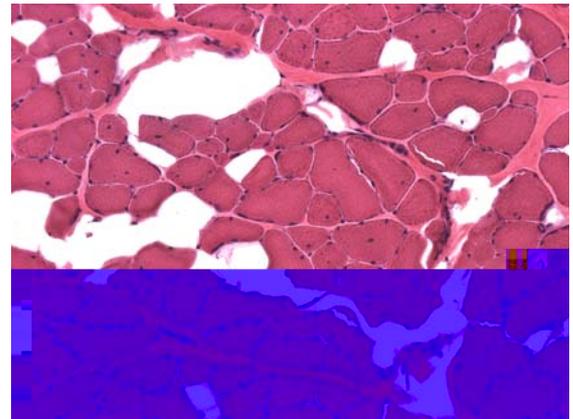


Fig. 5b : Chien malade, coloration HE



Fig.5c : Chien témoin, coloration NADH-TR.

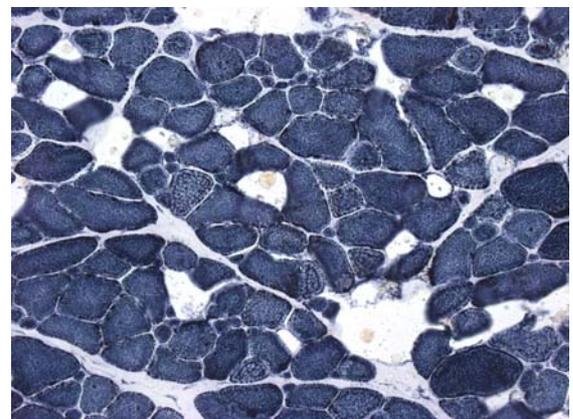


Fig.5d : Chien malade, coloration NADH-TR.

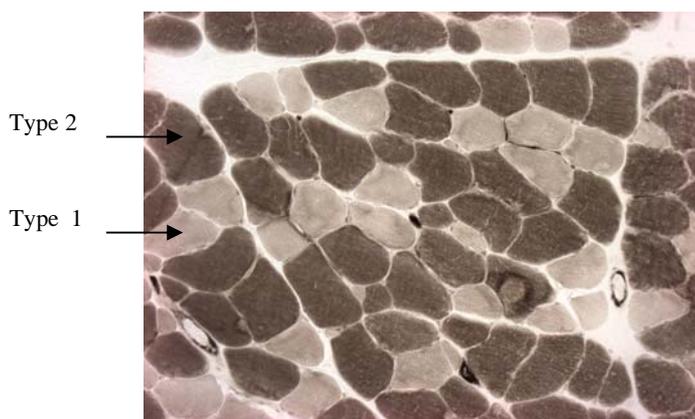


Fig.5e : Chien témoin, coloration ATPase
pH 9,40

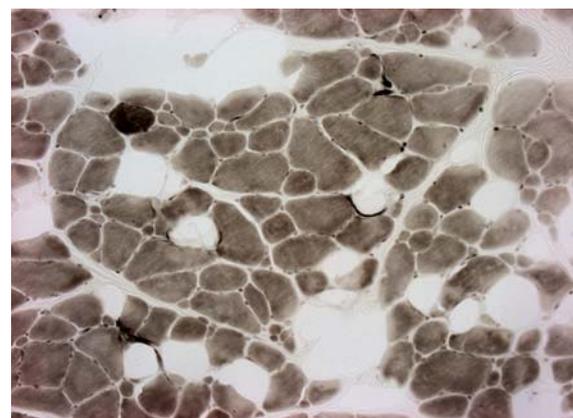


Fig.5f : Chien malade, coloration ATPase
pH 9,40

Figure 5 : Histologie musculaire du biceps fémoral, avant injection de notexine, chez le chien témoin et le chien atteint de CNM (x20)
(Type 1 :fibres musculaires lentes ;Type 2 :fibres rapides)

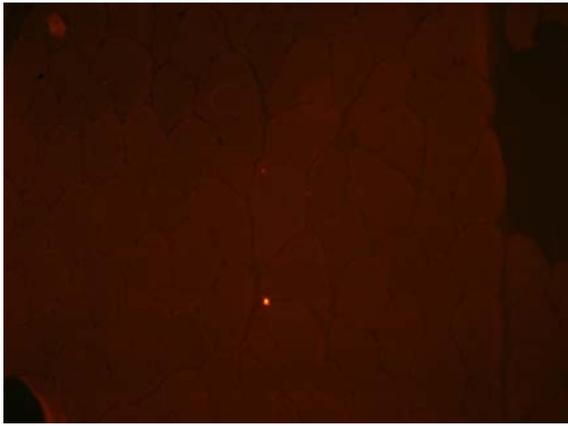


Fig.6a : Chien témoin, myosine néonatale.

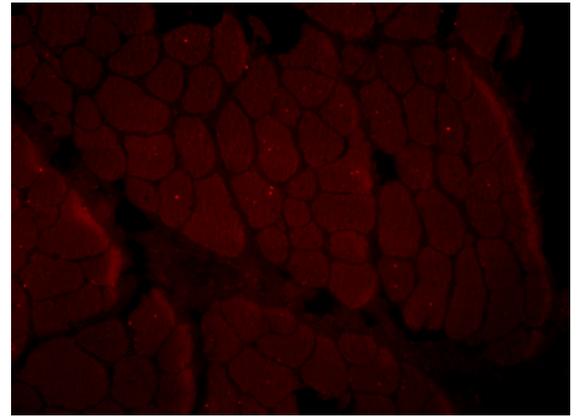
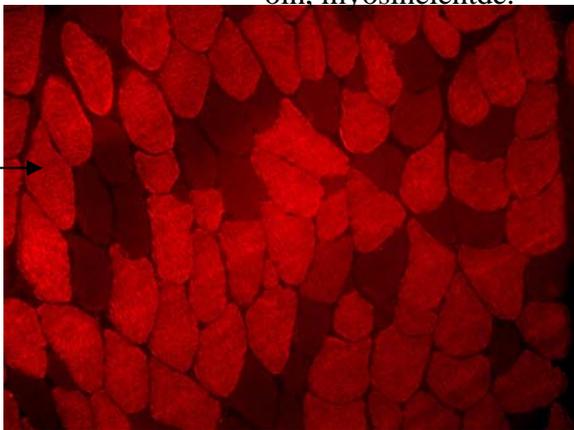


Fig.6b : Chien malade, myosine néonatale.

oin, myosinelentde.



Type 2

Fig.6c : Chien témoin, myosine rapide.

lade, myosinelentde.

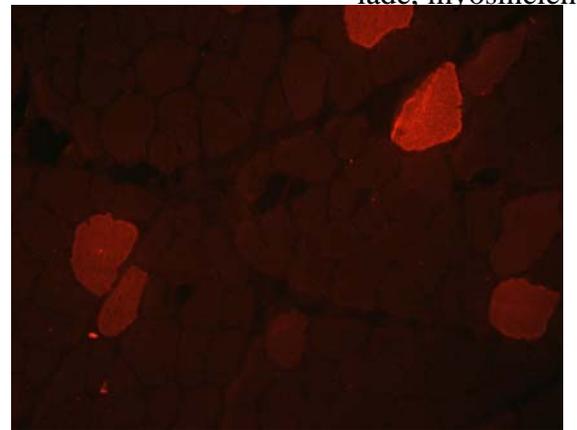
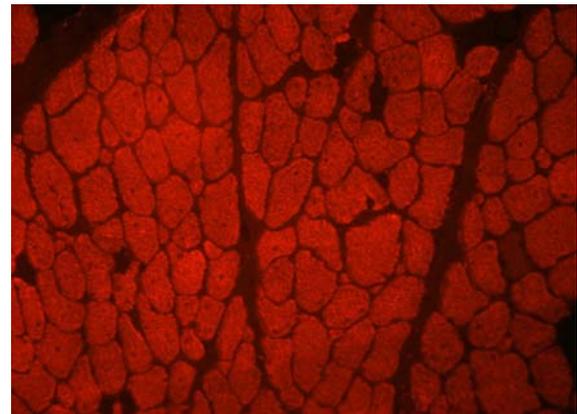
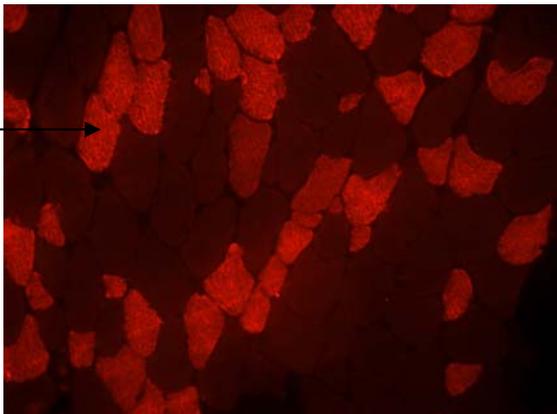


Fig.6d : Chien malade, myosine rapide.

Type 1



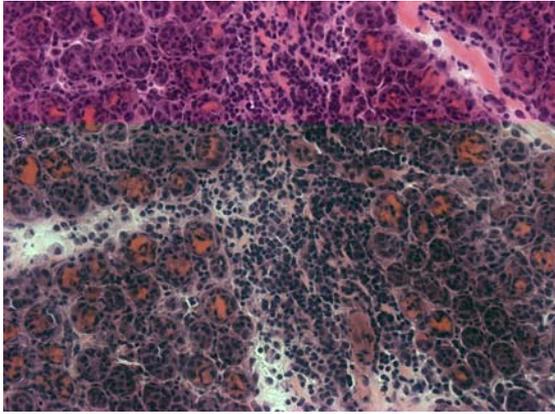


Fig.7a : chien témoin, coloration HE.

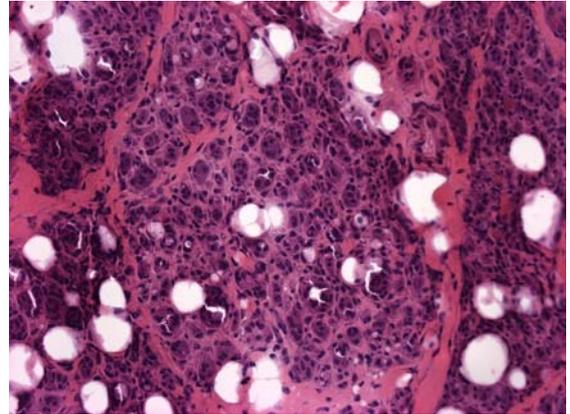


Fig.7b : Chien malade, coloration HE.

Figure 7 : Histologie musculaire, biceps fémoral, 4 jours après injection de notexine. (x20)

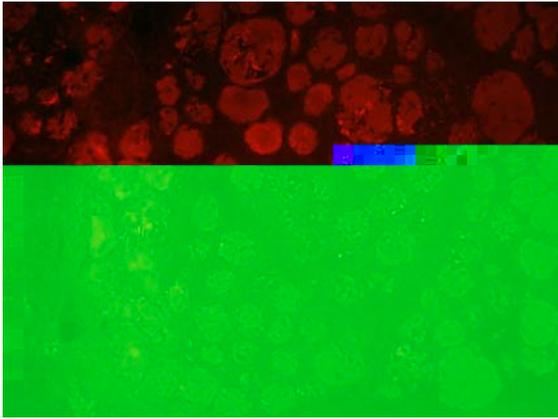


Fig.8a : Chien témoin, myosine néonatale.

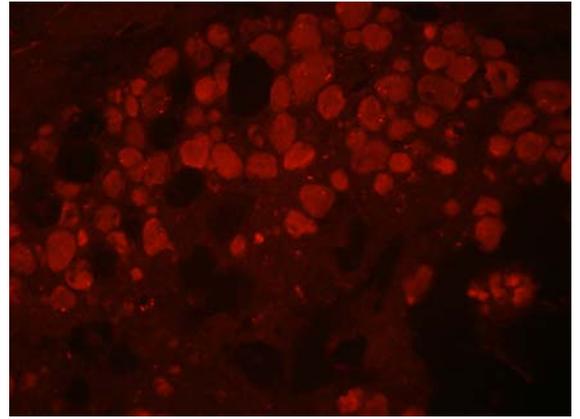


Fig.8b : Chien malade, myosine néonatale.

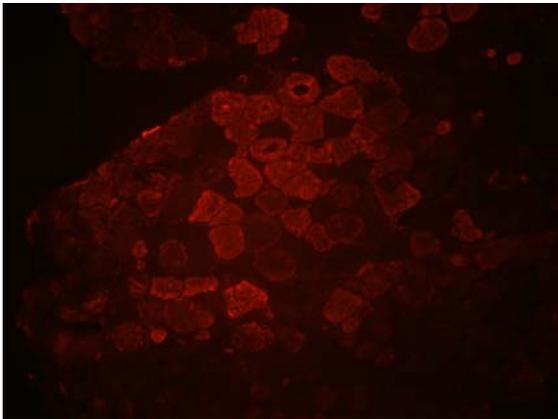


Fig.8c : Chien témoin, myosine rapide.

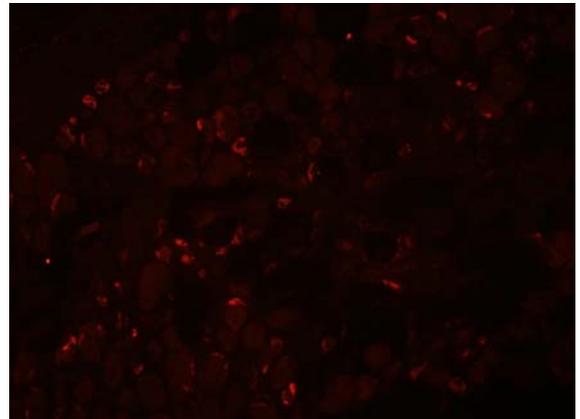


Fig.8d : Chien malade, myosine rapide.

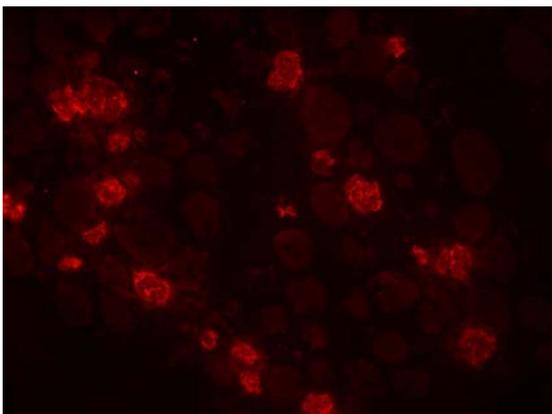


Fig.8e : Chien témoin, myosine lente.

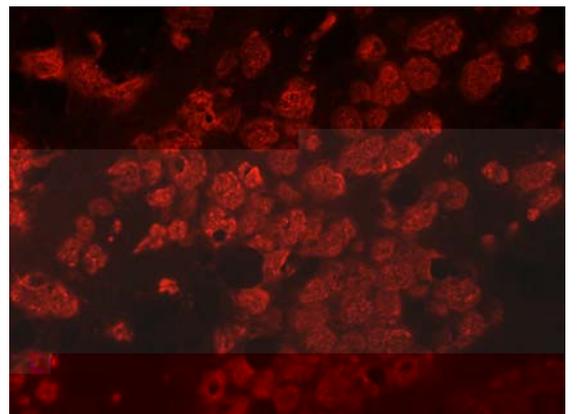


Fig.8f : Chien malade, myosine lente.

Figure 8 : Immunohistologie, 4 jours après injection de notexine. (x20)

Rapport-Gratuit.com

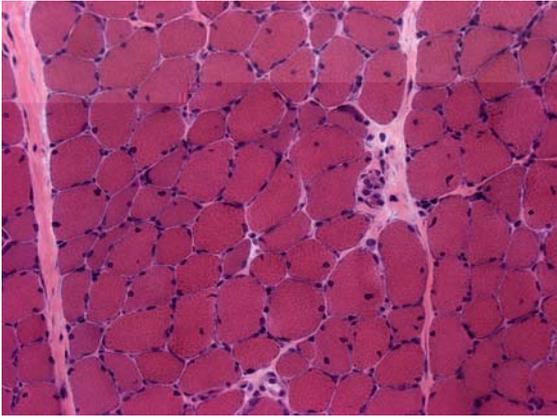


Fig.9a : Chien témoin, coloration HE.

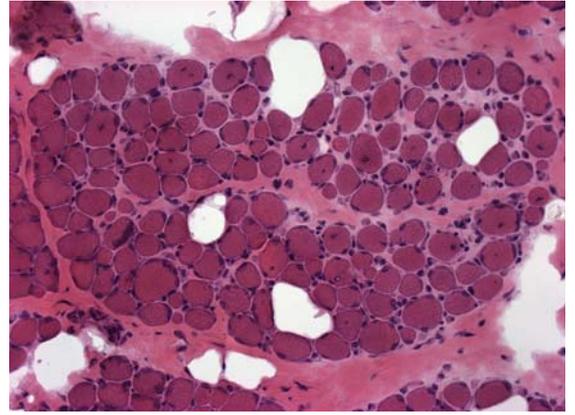


Fig.9b : Chien malade, coloration

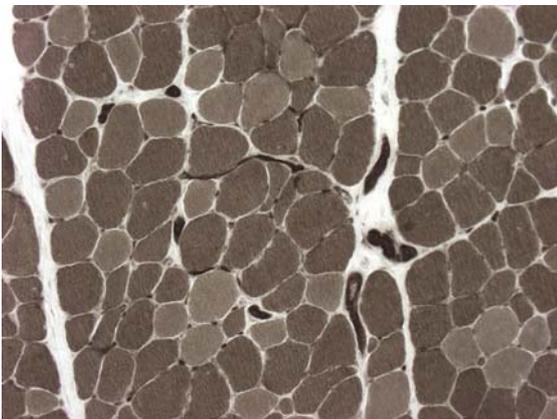


Fig.9c : Chien témoin, coloration ATPase
pH 9,40.

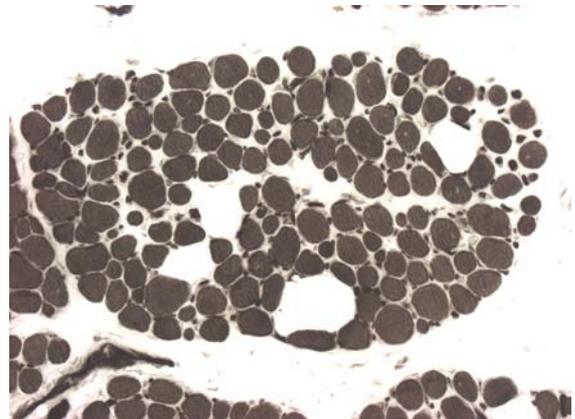


Fig.9d : Chien malade, coloration ATPase
pH 9,40.

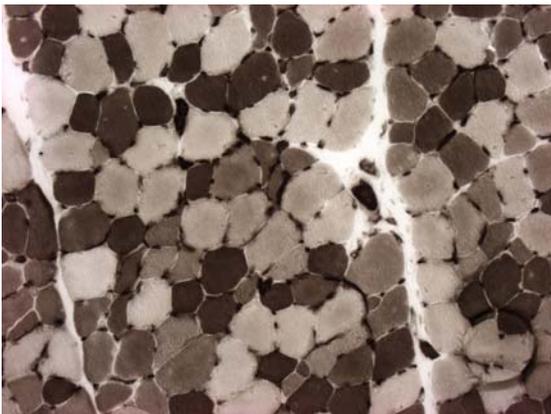


Fig.9e : Chien témoin, coloration ATPase
pH 4,35.

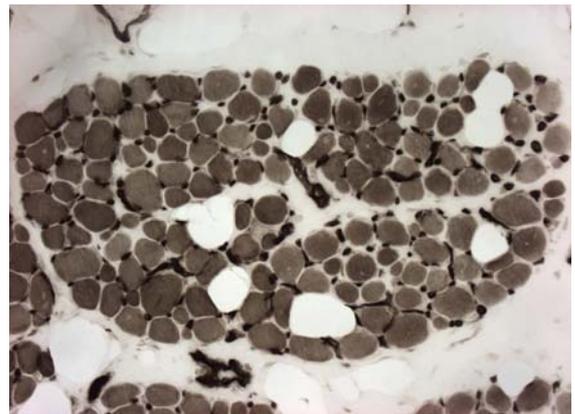


Fig.9f : Chien malade, coloration ATPase
pH 4,35.

Figure 9 : Histologie du biceps fémoral, 15 jours après injection de notexine. (x20)

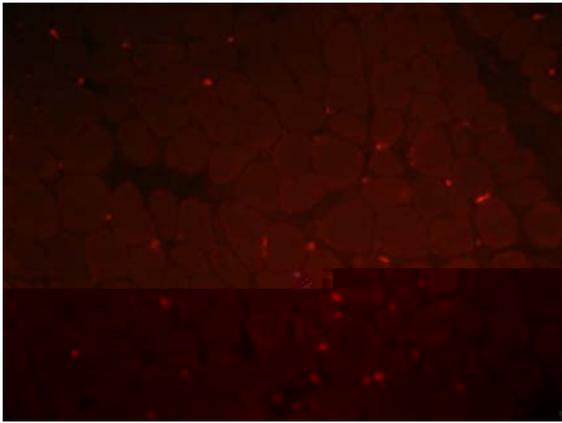


Fig.10a : Chien témoin, myosine néonatale.

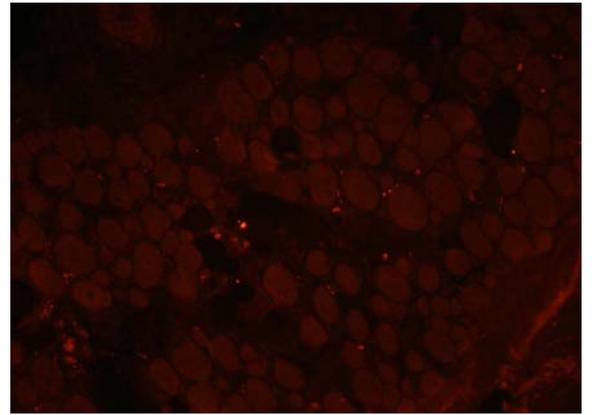


Fig.10b : Chien malade, myosine néonatale.

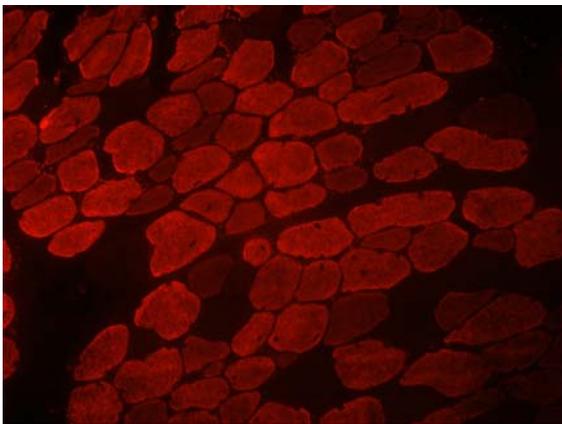


Fig.10c : Chien témoin, myosine rapide.

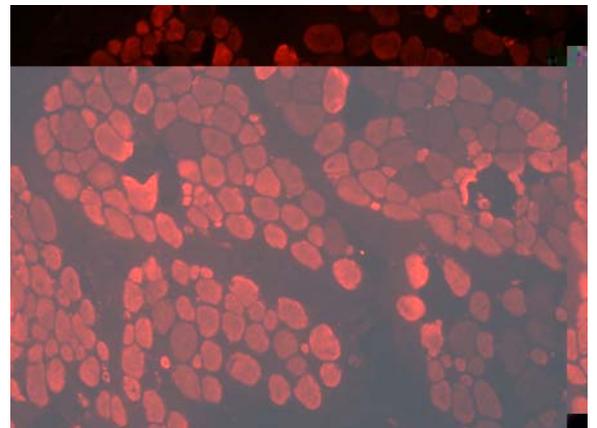


Fig.10d : Chien malade, myosine rapide.

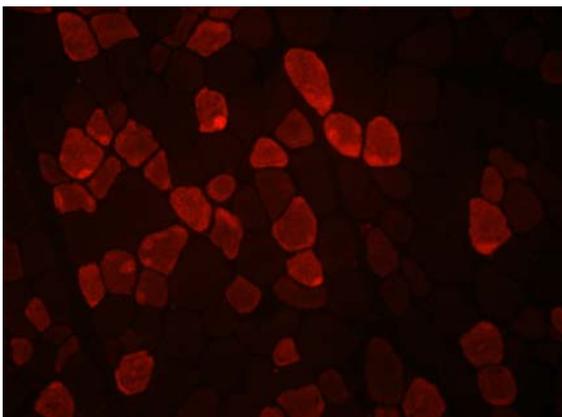


Fig.10e : Chien témoin, myosine lente.

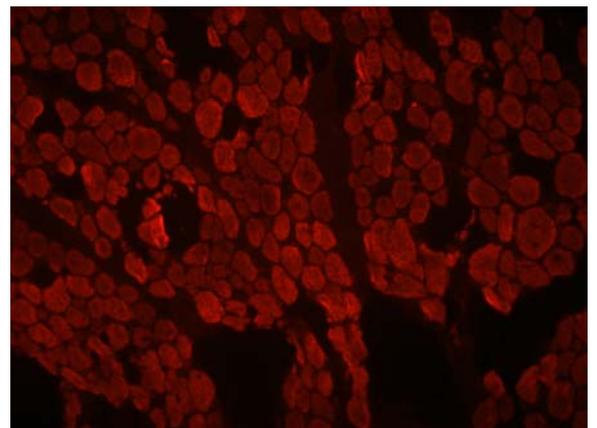


Fig.10c : Chien malade, myosine lente.

Figure 10 : Immunohistologie, 15 jours après injection de notexine. (x20)

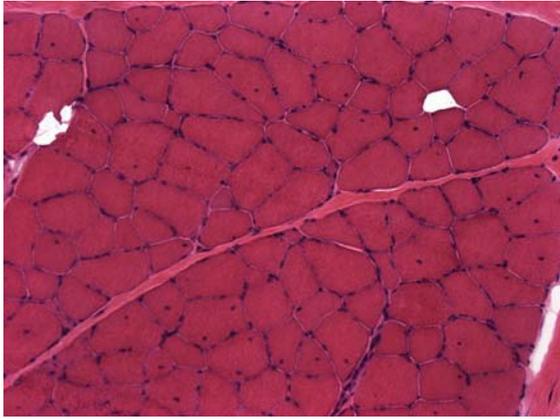


Fig.11a : Chien témoin, coloration HE.

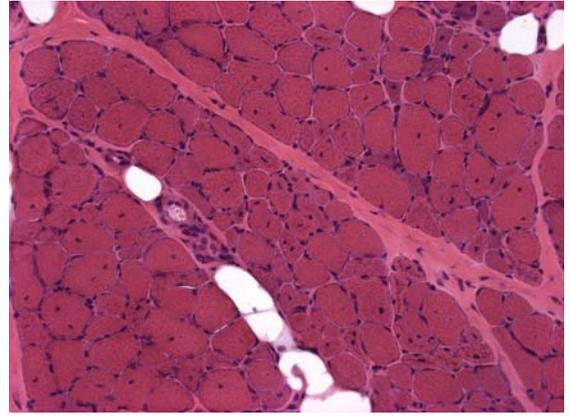


Fig.11b : Chien malade, coloration HE.

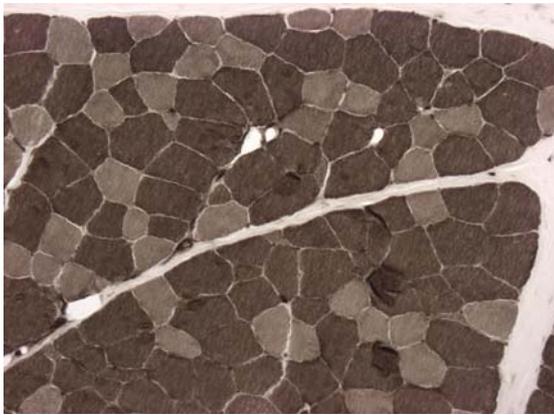


Fig.11c : Chien témoin, coloration ATPase
pH 9,40.

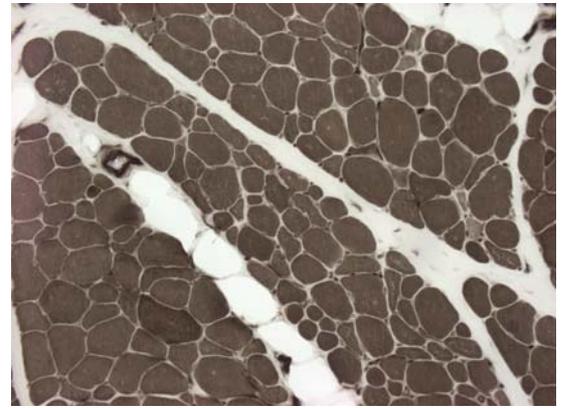


Fig.11d : Chien malade, coloration ATPase
pH 9,40.

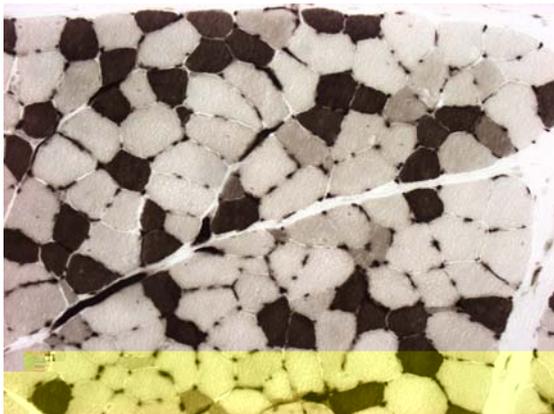


Fig.11e : Chien témoin, coloration ATPase
pH 4,35.

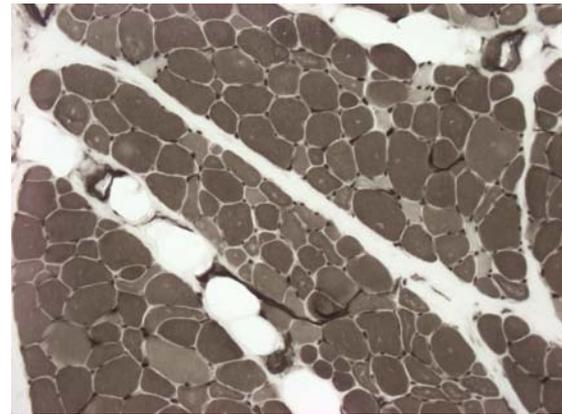


Fig.11f : Chien malade, coloration ATPase
pH 4,35.

Figure 11 : Histologie, biceps fémoral, 30 jours après injection de notexine.
(x20)

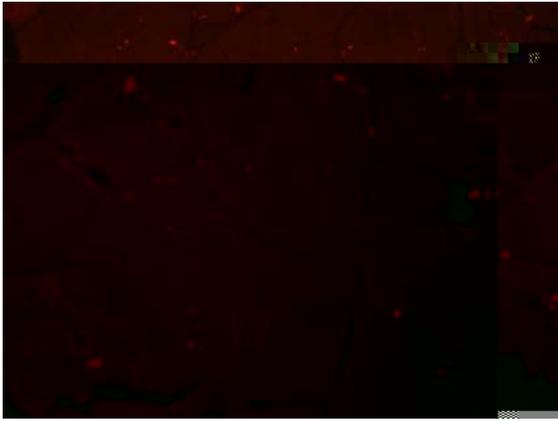


Fig.12a : Chien témoin, myosine néonatale.

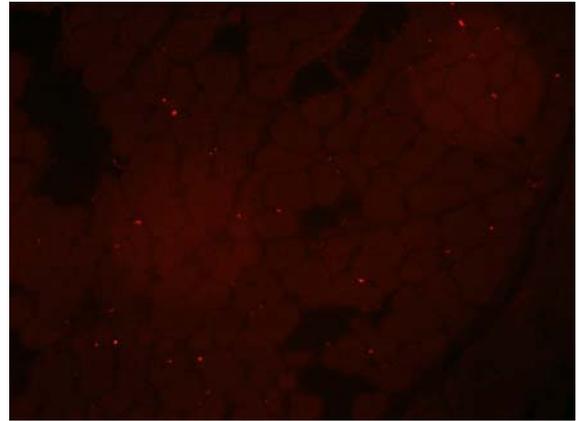


Fig.12b : Chien malade, myosine néonatale.

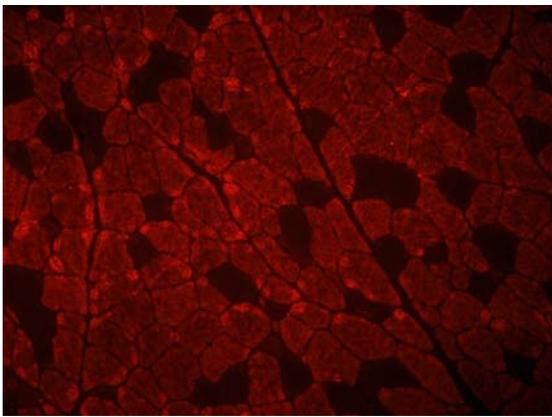


Fig.12c : Chien témoin, myosine rapide.

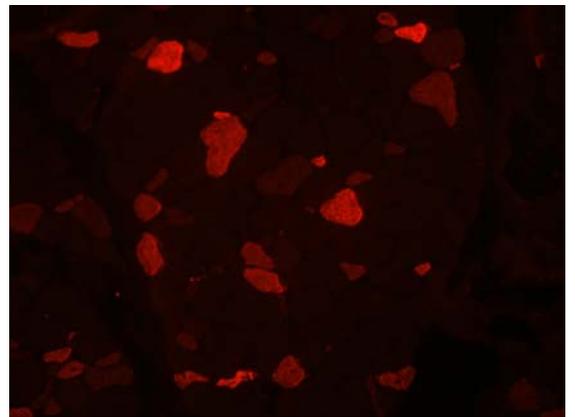


Fig.12d : Chien malade, myosine rapide.

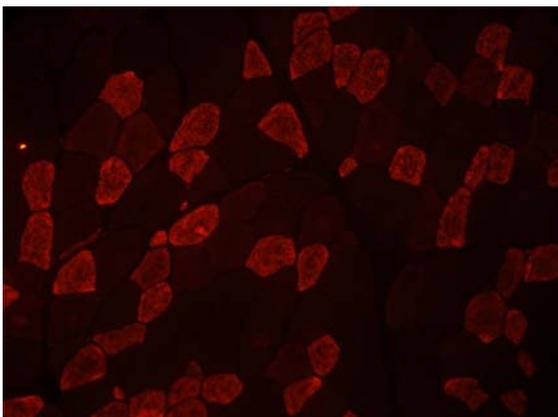


Fig.12e : Chien témoin, myosine lente.

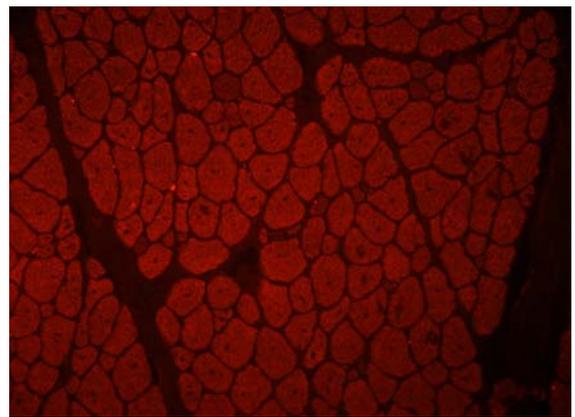


Fig.12f : Chien malade, myosine lente.

Figure 12 : Immunohistologie, 30 jours après injection de notexine. (x20)

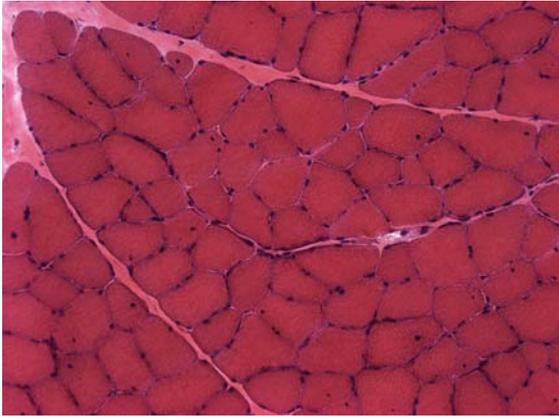


Fig.13a : Chien témoin, coloration HE.

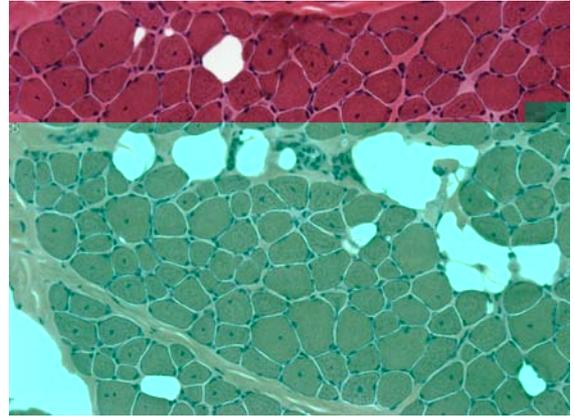


Fig.13b : Chien malade, coloration HE.

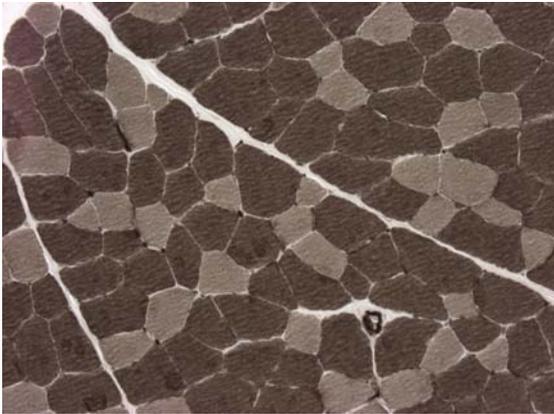


Fig.13c : Chien témoin, coloration ATPase
pH 9,40.

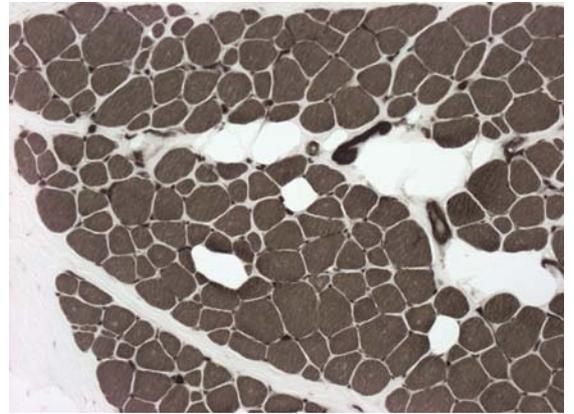


Fig.13d : Chien malade, coloration ATPase
pH 9,40.

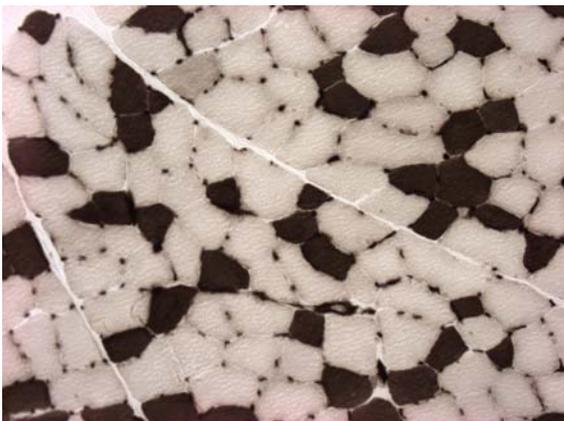


Fig.13e : Chien témoin, coloration ATPase
pH 4,35.

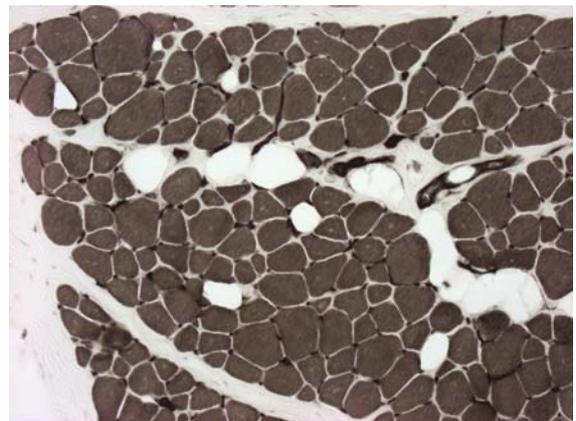


Fig.13f : Chien malade, coloration ATPase
pH 4,35.

Figure 13 : Histologie, 90 jours après injection de notexine. (x20)

Rapport-Gratuit.com

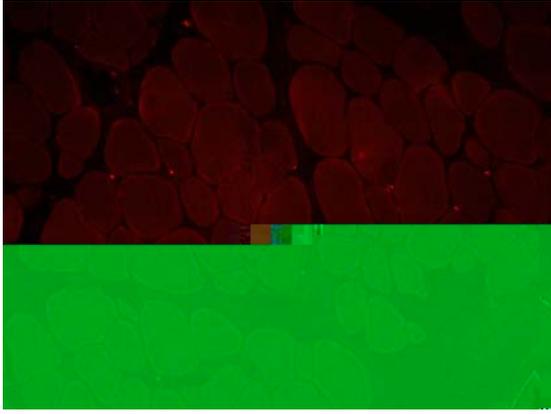


Fig.14a : Chien témoin, myosine néonatale.

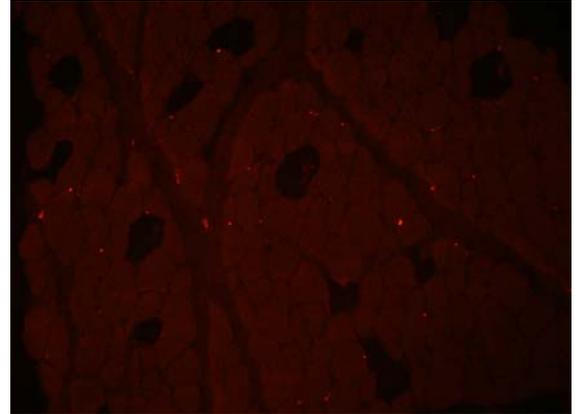


Fig.14b : Chien malade, myosine néonatale.

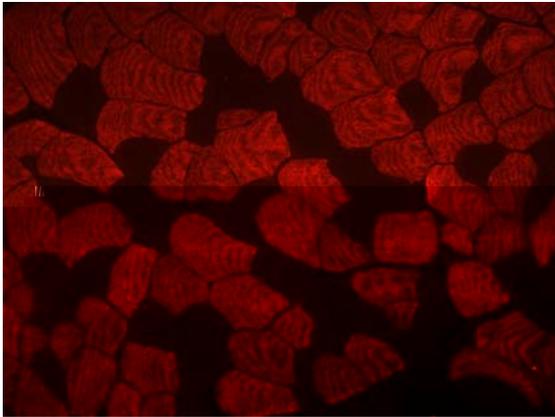


Fig.14c : Chien témoin, myosine rapide.

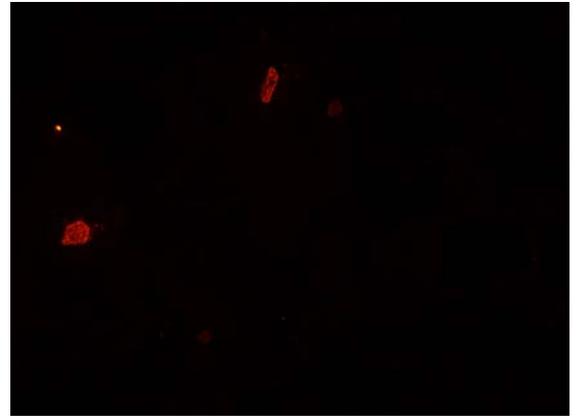


Fig.14d : Chien malade, myosine rapide.

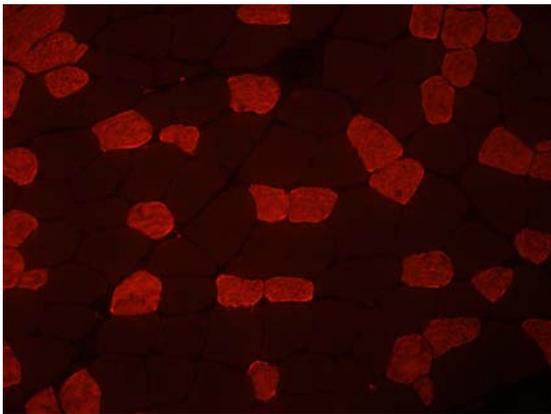


Fig.14e : Chien témoin, myosine lente.

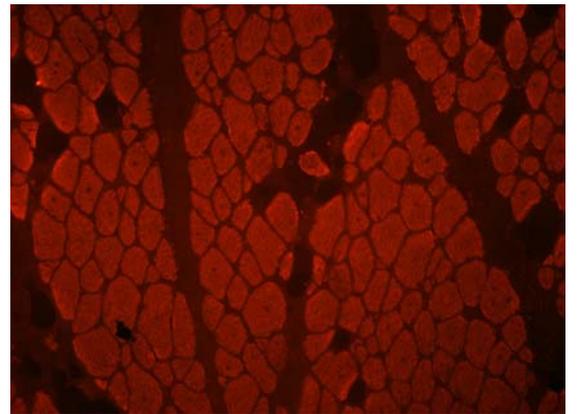


Fig.14f : Chien malade, myosine lente.

Figure 14 : Immunohistologie, 90 jours après injection de notexine.
(x20)

Chez le sujet sain, on note que certaines fibres expriment la myosine lente et/ou rapide, mais en co-expression avec la myosine néonatale.

Chez le chien atteint, 90 % des fibres sont fluorescentes à la myosine lente, en co-expression avec la forme néonatale, alors que la myosine rapide n'est décelée que dans de rares cas (10 %) (Figures 8) et toujours en co-expression.

La centralisation nucléaire n'a pas pu être comptée du fait de l'immaturation des fibres.

3- Histologie, 14 jours post-injection

Chez le témoin, on note une restauration quasi totale de l'architecture du tissu musculaire avec des fibres de type I et II réparties aléatoirement. Quelques noyaux centralisés sont repérés (14%) (Figures 9a, 9c, 9e).

L'histologie du chien atteint de CNM montre des fibres de petit diamètre, circulaires et non jointives. Elles sont séparées les unes des autres par un tissu conjonctif développé (Figures 9b, 9d, 9f). On dénombre 22% de noyaux centralisés (Figure 4).

La myosine néonatale n'est plus détectée chez les deux sujets (Figures 10a, 10b). A ce stade de régénération, on note que l'intensité des réactions immunohistologiques est hétérogène. Certaines fibres co-expriment la myosine lente et rapide.

Ainsi, chez le témoin, on dénombre 21 % de type I et 60 % de type II bien différenciées, et 19 % de fibres qui expriment les deux types de myosines adultes .

Chez le malade, les proportions de fibres de type I et II sont respectivement de 33% et 17%. La co-expression myosine lente/rapide est plus élevée que chez le témoin. Elle concerne 50 % des fibres (Tableau IV).

4- Histologie, 30 jours post-injection (Figures 11, 12; Tableau IV)

Chez le témoin, l'histologie musculaire est totalement restaurée, avec des pourcentages de fibres de types I et II identiques à ceux calculés avant l'injection de notexine (T₀).

Au bout de 30 jours de régénération, les fibres musculaire du chien myopathe présentent toujours une inégalité de calibre avec des amas de fibres de petits diamètres. Les fibres sont encore pour la plupart circulaires et l'espace interstitiel commence à se réduire.

On dénombre 92% de fibres de type I. Les fibres rapides sont rares et présentent dans la majorité des cas un diamètre très petit. La centralisation nucléaire est plus importante chez le myopathe que chez le témoin avec respectivement 33% et 16% (Tableau IV et Figure 4).

5- Histologie à 90 jours (Figures 13, 14)

Le muscle témoin, 90 jours après la nécrose, présente un aspect similaire au muscle de départ. On note, cependant, la présence de centralisation nucléaire (12%) et des fibres de plus petite taille.

Le muscle du chien malade est également peu modifié par rapport au temps T₀. En effet, après 3 mois de régénération, le muscle atteint retrouve ses caractéristiques histopathologiques avec un nombre supérieur de des fibres lentes (98%) et une centralisation nucléaire importante (31%) (Figure 4).

On note, néanmoins, une accentuation de l'inégalité de calibre des fibres et une augmentation des fibres de forme anguleuse ou circulaire.

III- DISCUSSION

A- Critique de la méthodologie employée

1- Choix de la mytoxine

L'expérience de régénération musculaire provoquée, par injection de notexine, est un bon modèle d'induction de nécrose et de régénération chez le Chien. En effet, la dose de notexine utilisée dans l'expérience est responsable d'une nécrose musculaire importante, permettant l'analyse de la régénération. Elle est sans danger pour les animaux puisque aucun effet secondaire n'a été noté. De plus, la régénération observée chez le témoin est rapide (30 jours) et complète, avec restauration de l'architecture musculaire sans aucune modification de la formule histochimique.

La notexine est donc une molécule facile d'emploi, sûre et efficace. C'est un outil important dans l'étude des mécanismes de la régénération musculaire.

2- Qualité des prélèvements

L'expérience nécessite la réalisation de biopsies musculaires à différents temps après injection de la notexine. Or, dès le 4^{ème} jour post administration de la toxine, le tissu musculaire est fortement modifié (muscle pâle, très inflammatoire) rendant le repérage des faisceaux musculaires à biopser difficile. Pour éviter toute erreur, l'injection de la notexine s'effectue avec un marquage au charbon du point d'injection. Des photographies numériques ont de plus été réalisées à chaque manipulation pour faciliter notre repérage.

La certitude d'avoir prélever un fragment musculaire ayant subi la nécrose/régénération est acquise lors de l'analyse histologique. On note la présence de fibres de plus petit diamètre et de noyaux centralisés, stigmates de la nécrose musculaire.

3- Choix de l'analyse semi-quantitative

Pour notre étude, nous n'avons utilisé que deux animaux. Les résultats obtenus ne sont donc pas statistiquement significatifs mais permettent une première approche de l'étude de la régénération musculaire provoquée.

Des inexactitudes peuvent être présentes dans nos résultats concernant le pourcentage de co-expression des fibres de type I et II. En effet, l'appréciation de la co-expression s'effectue sur une différence d'intensité de coloration des fibres, ce qui est relativement subjectif.

La réalisation de coupes sériées, ou l'emploi de deux anticorps de colorations différentes pour la myosine lente et rapide permettront dans les études à venir d'apprécier plus exactement la co-expression de la myosine dans les fibres musculaires.

B- Comparaison des résultats

1- Comparaison des résultats obtenus chez le témoin par rapport aux données publiées

L'étude de la régénération musculaire chez le témoin permet de constater que l'expression de la myosine débute à 4 jours, avec une expression de la forme néonatale dans toutes les fibres suivie d'une expression des formes lente et rapide dans respectivement 28% et 72% des fibres.

Wilson *et al* dans son expérience, constate que la synthèse de la myosine néonatale débute le 2^{ème} jour de régénération. Les formes lente et rapide sont exprimées dès le 4^{ème} jour mais toujours en co-expression entre elles et la myosine néonatale. Le pourcentage de fibres co-exprimant les myosines néonatale, lente et rapide n'a pas pu être déterminé dans notre expérience en raison de l'absence de coupe sériées et par l'absence d'une coloration nette des fibres.

D'après Wilson, les premières fibres exclusivement lentes et rapides ne sont obtenues qu'au bout de 14 jours mais certaines co-expriment les isoformes lente, rapide et/ou néonatale. Nous avons également constater ceci avec 19 % de fibres qui co-expriment la forme rapide et lente de la myosine. Cependant, aucune fibre n'exprimant la forme néonatale n'est plus observée dans notre étude après le 14^{ème} jour contrairement à l'auteur qui constate dans certains cas la présence de la myosine néonatale jusqu'au 28^{ème} jour.

Dans l'étude de Wilson, l'architecture musculaire est restaurée, dès le 21^{ème} jour, avec cependant des fibres plus petites et la présence de noyaux centraux (68). De même, nous ne constatons plus de changement dans la morphologie du muscle après le jour 30.

Ainsi, nos résultats sont similaires avec ceux obtenus par Wilson et al, sauf en ce qui concerne la présence de myosine néonatale au delà du 14^{ème} jour.

2- Comparaison des résultats entre le témoin et le malade

La comparaison de la régénération musculaire entre le chien témoin et le chien malade nous permet de constater que le potentiel de régénération musculaire est conservé chez les chiens atteints de CNM, avec une régénération musculaire complète à 30 jours. Les cellules satellites de ces muscles sont donc compétentes, capables d'être activées, elles peuvent se multiplier et fusionner pour former de nouvelles fibres musculaires.

Cependant, on remarque que la chronologie de la régénération n'est pas identique entre les 2 chiens.

En effet, bien que les premiers temps de la régénération soient morphologiquement similaires, on constate dès le 14^{ème} jour, un retard de maturation des fibres musculaires dans le muscle CNM : on observe des fibres circulaires de petite taille, et un tissu interstitiel très développé. Au même stade chez le témoin, la morphologie du faisceau musculaire est déjà restaurée avec des fibres polygonales jointives. De plus, lorsqu'on regarde l'évolution de la centralisation nucléaire (Figure 4), on constate que chez le témoin le taux de centralisation ne varie plus après 14 jours, alors que chez le chien atteints, le taux de centralisation nucléaire n'est pas encore stabilisé (22%). Ceci montre que toutes les fibres ne sont pas encore régénérées chez le chien atteint ou indique la présence d'un phénomène de centralisation nucléaire secondaire, qui reste à démontrer.

L'étude de la différenciation métabolique des fibres a révélé de nombreuses disparités menant à la prédominance des fibres de type physiologique lent.

Dès le 4^{ème} jour de régénération, période de rétablissement de l'innervation, les fibres néoformées diffèrent quant à l'expression des formes adultes de myosine. Chez le chien malade, la quasi totalité des fibres co-expriment la forme lente et néonatale. La synthèse de la

myosine lente semble donc arriver plus rapidement et de façon plus importante chez le malade.

A 14 jour, les fibres de type I sont toujours prédominantes chez le chien malade, et plus de la moitié des fibres co-expriment les deux isoformes rapide et lent. Chez le témoin, les fibres rapides sont les plus nombreuses et la co-expression plus faible.

La co-expression est un phénomène se retrouvant dans le développement normale des fibres musculaires. En effet, entre le 4^{ème} jour de régénération et le 30^{ème} jour, les différentes formes de myosines co-existent dans les fibres néoformées (68). Le taux de co-expression chez le chien myopathe semble cependant être excessivement élevé.

La co-expression se retrouve aussi lors de transformation phénotypique, comme par exemple dans les expériences d'électrostimulation (49,69).

Au bout de 30 jours, on ne note plus de co-expression chez les deux sujets. La quasi-totalité des fibres néoformées dans le muscle du chien myopathe expriment la myosine lente. Les rares fibres rapides sont de petit diamètre.

La formule histochimique du biceps fémoral du chien myopathe est donc peu modifiée après régénération.

Globalement, la régénération musculaire chez le malade aboutit, au bout de 3 mois, au même niveau histopathologique d'avant nécrose.

Une hypothèse, qui restait à tester avant cette expérience, laissait envisager que la régénération musculaire après nécrose puisse être responsable de la formation d'un tissu musculaire vierge de toutes anomalies (phénotype sauvage du muscle), puisque issu de la genèse de nouvelles fibres. Or, l'état pathologique du biceps fémoral (phénotype muté) d'un chien de 34 mois est restauré en 90 jours. Tout se passe donc comme si les cellules musculaires présentaient une « mémoire pathologique ». Cependant, et la revue bibliographique appuie cette assertion, c'est très vraisemblablement l'environnement nerveux et/ou hormonal des fibres qui serait responsable de la restauration de ce niveau lésionnel.

C- Hypothèses pouvant expliquer le tableau histopathologiques de la CNM

Au cours de cette expérience, nous avons constaté que les fibres musculaires néoformées exprimaient préférentiellement la myosine lente, et ce dès le 4^{ème} jour de régénération.

La prédominance des fibres lentes ne semble donc pas résulter d'une disparition des fibres rapides en faveur des fibres lentes mais **d'une synthèse préférentielle de la forme lente**. Il se pourrait que l'environnement cellulaire, la machinerie cytoplasmique ou l'innervation soient responsables de ces modifications.

- La première hypothèse pour expliquer la prédominance des fibres de type I pourrait être un défaut d'innervation des motoneurones rapides ou, comme cela a été rapporté chez les souris (57), à une connexion plus rapide des motoneurones lents suite à une nécrose. Chez la souris, il a été montré que les motoneurones lents produisent alors des bourgeonnements axonaux, qui innervent plus de fibres. Une augmentation des fibres de type I, d'environ 10% à chaque phase de dégénérescence/régénération, a été observée (57).

Cette hypothèse semble être intéressante dans le cas de la CNM, car on constate une augmentation progressive du taux de fibre I avec l'âge, qui pourrait s'expliquer avec des nécrose et régénération successives conduisant, selon cette hypothèse, à une **augmentation de l'innervation des fibres musculaires par les motoneurones lents**.

L'expression de la myosine rapide, au début de la régénération, serait alors due à l'absence d'innervation de certaines fibres, qui par défaut expriment l'isoforme rapide de la myosine (41,43,60). Les motoneurones lents innervant alors ces fibres secondairement, serait responsable de la phénoconversion observée et de la co-expression type I/II.

Ainsi, si des vagues successives de nécrose/régénération avaient lieu, touchant le tissu neuromusculaire, de nombreuses observations histologiques de la CNM pourraient être expliquées, comme la centralisation nucléaire, l'inégalité de calibre des fibres, ainsi que les résultats de l'EMG qui suggèrent un processus de dénervation / réinnervation chronique (7,58).

La prédominance des fibres de type I serait alors une conséquence physiologique d'un phénomène de dégénérescence primaire responsable de la myopathie.

Cependant, l'hypothèse d'une régénération plus rapide des motoneurones lents **ne se vérifie pas dans notre expérience**. Chez le témoin, le taux de fibres lentes est identique avant et après nécrose. Cependant, nous n'avons utilisé qu'un témoin donc les résultats ne sont pas statistiquement significatifs.

De plus, dans la CNM, et contrairement à la MHLR (Annexe 1), de rares cas de fibres nécrotiques ont été observés dans les biopsies musculaires effectuées sur des chiens malades de tout âge (58). Ces cas de nécrose sont trop rares pour expliquer une telle augmentation des fibres lentes.

Afin de valider l'hypothèse, des expériences de régénération provoquée devraient être réalisées sur plusieurs témoins et malades. Elles permettraient de vérifier l'évolution du pourcentage des fibres lentes, en particulier chez le témoin. Elles seraient également utiles pour comparer la vitesse de régénération des cônes de croissance des motoneurons lents et rapides, par marquage spécifique des plaques motrices.

Enfin, d'autres expériences de régénération devraient être effectuées avec une section du nerf innervant le biceps fémoral, pour voir le comportement du muscle dénervé. Le muscle régénéré devrait alors exprimer uniquement la myosine rapide, seule à être synthétisée en l'absence d'innervation. Au cours de la régénération, si la prédominance des fibres lentes est encore observée, cela permettrait de dire que l'innervation n'intervient pas le processus pathologique de la maladie et d'envisager une autre hypothèse.

-La seconde hypothèse, pouvant expliquer cette supériorité numérique des fibres lentes, serait une anomalie dans le métabolisme de la calcineurine ou une anomalie des canaux Ca^{2+} responsable d'un taux de Ca^{2+} intracellulaire capable d'activer en permanence la calcineurine. Cette molécule intervient dans le contrôle de l'expression de la myosine lente. Sa synthèse dans les fibres musculaires sous forme active est responsable d'une augmentation du nombre de fibres lentes (46,62). Dans les fibres innervées par le motoneurone rapide, la présence de la calcineurine permet d'outrepasser l'information nerveuse et de transformer les fibres rapides en fibres lentes (46).

De plus, il semble que le second messager de la calcineurine, **NFAT, intervienne dans l'adipogénèse en favorisant la différenciation des cellules graisseuses** (4). Or chez les CNM, les coupes histologiques ont révélées une infiltration graisseuse du tissu musculaire.

En outre, la calcineurine est une protéine ubiquitaire, abondamment exprimée dans les neurones où elle intervient dans la transmission synaptique et la plasticité synaptique. Une forte expression de la calcineurine activée, prédispose à l'apoptose des neurones (42,62).

Un désordre dans le métabolisme de cette molécule pourrait donc avoir des effets neuromusculaires importants.

Cette hypothèse ne pourrait cependant pas expliquer, avec les connaissances actuelles, la présence de la centralisation nucléaire dans la CNM.

Dans l'avenir, il serait intéressant d'effectuer des expériences de régénération musculaire associées à l'administration d'un inhibiteur spécifique de la calcineurine.

CONCLUSION

La CNM est une entité pathologique bien définie d'un point de vue clinique, biochimique et histologique. La colonie de chiens myopathes, présente au sein de l'école vétérinaire d'Alfort, est un support d'étude unique pour élucider la physiopathogénie de cette maladie.

Le modèle de régénération musculaire provoquée par l'injection de la notexine est un modèle pertinent dans la compréhension des mécanismes de régénération. Il nous a permis de constater que le tableau histopathologique des Chien CNM est reconstitué à l'identique après 30 jour de régénération musculaire, alors qu'il s'est instauré progressivement dans la vie de l'animal, évoquant l'existence d'une « mémoire cellulaire pathologique ».

La poursuite de l'étude devrait s'orienter sur l'implication de l'innervation et de la calcineurine, deux facteurs pouvant avoir leur importance dans la pathogénie de la CNM.

Cette maladie présente un intérêt double. Un intérêt en pathologie comparée, en temps que seul modèle phénotypique spontanée de la myopathie centronucléaire humaine, et un intérêt en biologie cellulaire pour l'analyse de la centralisation nucléaire, sans signe de nécrose évident, et de la prédominance des fibres lentes.

ANNEXE

Tableau	Myopathie centronucléaire canine	Myopathie héréditaire du Labrador Retriever	Myopathie centronucléaire humaine
Clinique	<ul style="list-style-type: none"> - Atrophie et faiblesse musculaire - Ventroflexion de la nuque - Intolérance à l'effort - Angulations articulaires anormales 	<ul style="list-style-type: none"> - Atrophie et faiblesse musculaire - Ventroflexion de la nuque - Intolérance à l'effort - Angulations articulaires anormales 	<ul style="list-style-type: none"> - Syndromes diffus : atteinte faciale, cou , nuque ,tronc. - Déformations articulaires
Neurologique	<ul style="list-style-type: none"> - Aréflexie tendineuse - Hypotonie musculaire - Pas de déficits centraux 	<ul style="list-style-type: none"> - Aréflexie tendineuse - Pas de déficits centraux 	<ul style="list-style-type: none"> - Aréflexie tendineuse - Atteinte centrale possible - Crises d'épilepsie
Biochimique	<ul style="list-style-type: none"> - Taux de Créatine kinase normal 	<ul style="list-style-type: none"> - Taux de Créatine kinase modérément élevé 	<ul style="list-style-type: none"> - Taux de CK normal ou discrètement augmenté
Histologique	<ul style="list-style-type: none"> - Noyaux centralisés jusqu'à 65% à 7,5 ans - Inégalité de calibre des fibres - Prédominance du type I - Organisation radiale du sarcoplasme autour du noyau centralisé - Augmentation fibreuse du péri-mysium - Remplacement des fibres musculaires par du tissu adipeux 	<ul style="list-style-type: none"> - Noyaux centralisés - Inégalité de calibre des fibres - Prédominance du type I - Nécrose musculaire importante - Augmentation fibreuse du péri-mysium 	<ul style="list-style-type: none"> - Noyaux centralisés dans 30 à 95% des fibres - Organisation radiale du sarcoplasme autour du noyau centralisé - Prédominance des fibres de type I - Augmentation fibreuse du péri-mysium - Adipose interfasciculaire

BIBLIOGRAPHIE

1. ALBIS A, COUTEAUX R, MIRA JC, JANMOT C, ROULET A. Isoformes de la myosine synthétisées au cours de la régénération de muscles squelettiques à contraction rapide, en présence du nerf moteur et après dénervation. Etude chez le rat et la souris adultes. *Reprod. Nutr. Dev.*, 1988, **28**, 753-756.
2. BAILEY P, HOLOWACZ T, LASSAR AB. The origin of skeletal muscle stem cells in the embryo and the adult. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2001, **13**, 679-689.
3. BEHROOZ FATHI H, ROWAN EG, HARVEY AL. The facilitatory actions of snake venom phospholipase A2 neurotoxins at the neuromuscular junction are not mediated through voltage-gated K⁺ channels. *Toxicon*, 2001, **39**, 1871-1882.
4. BIGARD X, SANCHEZ H, ZOLL J *et al.* Calcineurin co-regulates contractile and metabolic components of slow muscle phenotype. *J. Biol. Chem.*, 2000, **275**(26), 19653-19660.
5. BLOT S. Electrodiagnostic des affections neuromusculaires. *Point Vét.*, 1991, **23**, 585-595.
6. BLOT S. Les myopathies des carnivores domestiques. Première partie : le muscle strié squelettique : structure, fonction et sémiologie. *Prat. Méd. Chir. Anim. Comp.*, 1995, **30**, 11-25.
7. BLOT S. *Caractérisation de deux mutations neuromusculaires animales. Une amyotrophie spinale chez la souris et une myopathie centronucléaire chez le Chien.* Thèse Docteur de l'université Paris VI, 1996.
8. BLOT S, FUHRER L. Les myopathies des carnivores domestiques. Deuxième partie : étude spéciale. *Prat. Méd. Chir. Anim. Comp.*, 1995, **30**, 27-43.
9. BLOT S, MORAILLON R. Myopathie héréditaire d'un Labrador Retriever. *Point Vét.*, 1991, **23**(139), 757-765.
10. BRAUND KG. Skeletal muscle biopsy. *Semin. Vet. Med. Surg.(small Anim.)*, 1989b, **4**, 108-115.
11. BRAUND KG *et al.* Hereditary myopathy in Labrador Retrievers. *Calif. Vet.*, 1985, **39**, 18-21.
12. BRAUND KG, AMLING KA. Muscle biopsy samples for histochemical processing : alterations induced by storage. *Vet. Pathol.*, 1988, **25**, 77-82.
13. BRAUND KG, HOFF EJ, RICHARDSON KEY. Histochemical identification of fiber types in canine skeletal muscle. *Am. J. Vet. Res.*, 1978, **39**, 561-565.

14. BRAUND KG, MCGUIRE JA, LINCOLN CE. Observations on normal skeletal muscle of mature dogs : A cytochemical, histochemical and morphometric study. *Vet. Pathol.*, 1982, **19**, 577-595.
15. CHIN *et al.* A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes Dev.*, 1998, **12**, 2499-2509.
16. CHO M, WEBSTER SG, BLAU HM. Evidence for Myoblast-extrinsic Regulation of Slow Myosin Heavy Chain Expression During Muscle Fiber Formation in Embryonic Development. *J. Cell. Biol.*, 1993, **121**(4), 795-810.
17. CLOSE R. Effect of cross-union of motor nerves to fast and slow skeletal muscles. *Nature*, 1965, **206**, 831-832.
18. CONDON K *et al.* Development of Muscle Fiber Types in the Prenatal rat Hindlimb. *Dev. Biol.* , 1990, **138**, 256-274.
19. DAVIS CE, HARRIS JB, NICHOLSON LVB. Myosin isoform transitions and physiological properties of regenerated and re-innervated soleus muscles of the rat. *Neuromusc. Disord.*, 1991, **1**, 411-421.
20. DE CASTRO RODRIGUES A, SCHMALBRUCH H. Satellite cells and myonuclei in long-term denervated rat muscles. *Anat. Rec.*, 1995, **243**, 430-437.
21. DIMARIO JX, STOCKDALE FE. Both myoblast lineage and innervation determine fiber type and are required for expression of the slow myosin heavy chain 2 gene. *Dev. Biol.*, 1997, **188**, 167-180.
22. DIXON RD, HARRIS JB. Myotoxic activity of the toxic phospholipase, notexin, from the venom of australian tiger snake. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1996, **55**, 1230-1237.
23. FERRAI G *et al.* Muscle regeneration by Bone Marrow-derived Myogenic Progenitors. *Science*, 1998, **279**, 1528-1530.
24. FITZGERALD M, WOOLF CJ, GIBSON SJ, MALLABURN PS. Alterations in structure, function and chemistry of C fibers following local application of vinblastine to the sciatic nerve of the rat. *J. Neurosci.*, 1984, **4**, 430-441.
25. FRIDAY B, HORSLEY V, PAVLATH GK. Calcineurin Activity Is Required for the Initiation of Skeletal Muscle Differentiation. *J. Cell. Biol.*, 2000, **149**(3), 657-665.
26. GAMBKE B, LYONS GE, HASELGROVE J, KELLY AM, RUBINSTEIN NA. Thyroidal and neural control of myosin transitions during development of rat fast and slow muscles. *FEBS Lett.*, 1983, **156**(2), 335-339.
27. GROUNDS MD. Muscle regeneration : molecular aspects and therapeutic implications. *Curr. Opin. Neurol.*, 1999, **12**, 535-543.

28. HARRIS JB, GRUBB BD, MALTIN CA, DIXON R. The neurotoxicity of the venom phospholipases A2, Notexin and Taipoxin. *Exp. Neurol.* , 2000, **161**, 517-526.
29. HAWKE TJ, GARRY DJ. Myogenic satellite cells : physiology to molecular biology. *J. Appl. Physiol.*, 2001, **91**(2), 534-551.
30. HUGHES SM, BLAU HM. Muscle Fiber Pattern Is Independent of Cell Lineage in Postnatal Rodent Development. *Cell*, 1992, **68**, 659-671.
31. HUGHES SM, SALINAS PC. Control of muscle fibre and motoneuron diversification. *Curr. Opin. Neurobiol.* , 1999, **9**, 54-64.
32. KARPATI G, ENGEL WK. Transformation of the histochemical profile of skeletal muscle by « foreign » innervation. *Nature*, 1967, **215**, 1509-1510.
33. KRAMER JW *et al.* A muscle disorder of Labrador Retrievers characterized by deficiency of type II muscle fibers. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1976, **169**, 817-820.
34. LEFAUCHEUR JP, SEBILLE A. The cellular events of injured muscle regeneration depend on the nature of the injury. *Neuromusc. Disord.*, 1995, **5**, 501-509.
35. LEWIS PF. Common tiger snake envenomation in dogs and mice, relationship between the amount of venom injected and the onset of clinical signs. *Aust. Vet. J.*, 1994, **71**, 130-132.
36. LEWIS PF. Some toxicity thresholds for the clinical effects of common tiger snake (*Notechis scutatus*) envenomation in the dog. *Aust. Vet. J.*, 1994, **71**, 133-135.
37. LEWIS PF. Myotoxicity and nephrotoxicity of common tiger snake (*Notechis scutatus*) venom in the dog. *Aust. Vet. J.*, 1994, **71**, 136-139.
38. McKERRELL RE, BRAUND KG. Hereditary myopathy in Labrador Retriever : a morphologic study. *Vet. Pathol.* ,1986, **23**, 411-417.
39. McKERRELL RE, BRAUND KG. Hereditary myopathy in Labrador Retriever : clinical variations. *J. Small Anim. Pract.* , 1987, **28**, 479-489.
40. McLENNAN IS. Neurogenic and myogenic regulation of skeletal muscle formation : a critical re-evaluation. *Prog. Neurobiol.* , 1994, **44**(2), 119-140.
41. MEGIGHIAN A, GERMINARIO E, ROSSINI K MIDRIO M, DANIELI-BETTO D. Nerve control of type 2A MHC isoform expression in regenerating slow skeletal muscle. *Muscle Nerve*, 2001, **24**, 47-53.
42. MERLY F, LESCAUDRON L, ROUAND T, CROSSIN F, GARDAHAUT MF. Macrophage enhance muscle satellite cell proliferation and delay their differentiation. *Muscle Nerve*, 1999, **22**, 724-732.

43. MIDRIO M, DANIELI-BETTO D, ESPOSITO A *et al.* Lack of type 1 and type 2A myosin heavy chain isoforms in rat slow muscle regenerating during chronic nerve block. *Muscle nerve*, 1998, **21**, 226-232.
44. MOORE *et al.* Electromyographic evaluation of adult Labrador Retrievers with type-II muscle fiber deficiency. *Am. J. Vet. Res.*, 1987, **48**, 1332-1336.
45. MURGIA M *et al.* RAS is involved in nerve-activity-dependent regulation of muscle genes. *Nat. Cell Biol.*, 2000, **2**, 142-147.
46. NAJA FJ, MERCER B, SHELTON J, RICHARDSON JA, WILLIAMS RS, OLSON EN. Stimulation of slow skeletal muscle fiber gene expression by calcineurin *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, 2000, **275**(7), 4545-4548.
47. OLSON EN, WILLIAMS RS. Remodeling muscles with calcineurin. *Bioessays*, 2000, **22**, 510-519.
48. PETTE D, STARON RS. Myosin isoforms, muscle fibers types, and transitions. *Microsc. Res. Tech.*, 2000, **50**, 500-509.
49. PETTE D, VRBOVA G. Invited review : neural control of phenotypic expression in mammalian muscle fibers. *Muscle Nerve*, 1985, **8**, 676-689.
50. PIN CL *et al.* Embryonic and fetal Rat Myoblasts Form Different Muscle Fiber Types in an Ectopic In Vivo Environment. *Dev. Dyn.*, 2002, **224**, 253-266.
51. PLAGHKI L. Régénération et myogénèse du muscle strié. *J. Physiol*, 1985, **80**, 51-110.
52. POUGET J, GASTA

58. SAVARY K. *Contribution a l'étude d'une maladie neuromusculaire canine : la myopathie centronucléaire du Labrador Retriever*. Thèse Méd. Vét., Alfort, 1995, 72p.
59. SCHIAFFINO S, MURGIA M, SERRANO AL, CALABRIA E, PALLAFACCHINA G. How is muscle phenotype controlled by nerve activity ? *Ital. J. Neurol. Sci.* , 1999, **20**, 409-412.
60. SCHIAFFINO S, SERRANO AL, JERKOVIC R, DI LISI R, MURGIA M. Neural regulation of myosin gene expression in regenerating skeletal muscle. *Acta. Physiol. Scand.*, 1998, **163**, S11-S15.
61. SEALE P, RUDNICKI MA. A new look at the origin, function, and « stem-cell » status of muscle satellite cells. *Dev. Biol.*, 2000, **218**, 115-124.
62. SERRANO AL *et al.* Calcineurin controls nerve activity-dependent specialisation of slow skeletal muscle fibers but not muscle growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2001, **98**(23), 13108-13113.
63. SHARP NJH, KORNEGAY JN, BARTLETT RJ, HUNG WY, DYKSTRA MJ. Notexin-induced muscle injury in the dog. *J. Neurol. Sci.* 1993, **116**, 73-81.
64. TORGAN CE, DANIELS MP. Regulation of Myosin Heavy Chain Expression during Rat skeletal muscle Development In Vitro. *Mol. Biol. Cell.*, 2001, **12**, 1499-1508.
65. WASCABAUGH CH *et al.* Role of the nerve in determining fetal skeletal muscle phenotype. *Dev. Dyn.*, 1998, **211**, 177-190.
66. WASHABAUGH CH *et al.* Effect of Chronic Denervation and Denervation-Reinnervation on Cytoplasmic Creatine Kinase Transcript Accumulation. *J. Neurobiol.* , 2001, **47**, 194-206.
67. WATSON ADJ *et al.* Myopathy in Labrador Retriever. *Aust. Vet. J.*, 1988, **65**, 226.-227.
68. WILSON LA, DUX L, COOPER BJ, DUBOWITZ V, SEWRY CA. Experimental regeneration in canine muscular dystrophy-2. Expression of myosin heavy chain isoforms. *Neuromusc. Disord.*, 1994, **4**, 25-37.
69. WINDISCH A, GUNDERSEN K, SZABOLCS M, DRUBER H, LOMO T. Fast to slow transformation of dernervated and electrically stimulated rat muscle. *J. Physiol.* ,1998, **510**(2), 623-632.
70. YANG C, CHANG L. The N-terminal amino group essential for the biological activity of notexin from *Notechis scutatus scutatus* venom. *Biochim. Biophys. Acta*, 1990, **1040**, 35-42.

TABLES DES ILLUSTRATIONS

LISTE DES FIGURES

Figure	Titre	Page
Figure 1	Profil d'un chien sain et d'un chien malade	36
Figure 2	Technique de biopsie et de marquage lors d'injection de notexine	38
Figure 3	Evolution des Créatines Kinases, chez le chien atteint de CNM et le témoin, après injection de notexine	43
Figure 4	Evolution de la centralisation nucléaire au cours de la régénération	45
Figure 5	Histologie musculaire du biceps fémoral, avant injection de notexine	47
Figure 6	Immunohistologie musculaire du biceps fémoral, avant injection de notexine	49
Figure 7	Histologie musculaire, biceps fémoral, 4 jours après injection de notexine	51
Figure 8	Immunohistologie, 4 jours après injection de notexine	53
Figure 9	Histologie du biceps fémoral, 15 jours après injection de notexine	55
Figure 10	Immunohistologie, 15 jours après injection de notexine	57
Figure 11	Histologie, biceps fémoral, 30 jours après injection de notexine	59
Figure 12	Immunohistologie, 30 jours après injection de notexine	61
Figure 13	Histologie, 90 jours après injection de notexine	63
Figure 14	Immunohistologie, 90 jours après injection de notexine	65

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Titre	Page
Tableau I	Profil histologique des fibres musculaires de Chien selon la coloration utilisée	40
Tableau II	Résultats de l'examen biochimique et du ionogramme	41
Tableau III	Résultats des paramètres rénaux	42
Tableau IV	Résultats histologiques	45

ANNEXE

Annexe	Titre	Page
Annexe 1	Comparaison de la myopathie centronucléaire du Labrador Retriever, de la myopathie héréditaire du Labrador Retriever et de la myopathie centronucléaire humaine.	80

LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS (ordre alphabétique)

ADN	Acide désoxyribonucléique
ALAT	Alanine aminotransférase
CK	Créatine Kinase
CNM	Myopathie centronucléaire
CsA	Cyclosporine A
EDL	Muscle long extenseur des doigts
EMG	Electromyographie
FGF	Fibroblast growth factor
HE	Hématoxyline éosine
HGF	Hepatocyte growth factor
IGF	Insulin-like growth factor
MEF2	Myocyte enhance factor 2
MHC	Chaîne lourde de la myosine
MHLR	Myopathie héréditaire du Labrador Retriever
Myf5	Facteur myogénique
MyoD	Facteur myogénique
NADH-TR	Nicotinamide adénine dinucléotide-tétrazolium réductase
NFAT	Facteur Nucléaire d'Activation des lymphocytes T
PAL	Phosphatases alcalines
PDGF	Platelet-derived growth factor
PLA2	Phospholipase A2
SDH	Succinate deshydrogénase
SOL	Muscle soléaire
UI	Unité internationale