

Quel avenir pour la souris mdx comme modèle de la dystrophie musculaire de Duchenne ? Histopathologie comparée des dystrophinopathies

Les souris mâles hémizygotés pour la mutation *mdx*, portée par le chromosome X, sont dépourvues de dystrophine du fait d'une mutation non-sens dans la séquence codante du gène. Les fibres musculaires déficientes en dystrophine dégénèrent à la suite de lésions membranaires entraînant, notamment, une entrée du calcium dans la cellule, l'hypercontraction des fibres musculaires et l'activation de protéases intracellulaires. Contrairement à la situation chez les malades humains souffrant de la myopathie de Duchenne, la nécrose cellulaire est cependant longtemps compensée, chez la souris déficiente, par une régénération des cellules musculaires. Malgré les différences importantes entre la symptomatologie chez les souris et les hommes myopathes, le modèle murin est extrêmement utile pour les études physiopathologiques et la mise au point de traitements.

**Christian Pastoret
Alain Sébille**

Sept cents maladies neuromusculaires ont été décrites chez l'homme, parmi lesquelles les atteintes primaires du muscle occupent une place prépondérante. Parmi ces maladies, la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD), maladie récessive liée au chromosome X, impressionne par sa fréquence (1 garçon sur 3 500) et sa gravité (létale vers la 20^e année). Suspectée chez les jeunes garçons présentant des troubles de la marche et une élévation sérique des taux d'enzymes musculaires (en particulier créatine kinase et pyruvate kinase), le diagnostic est confirmé par l'électromyographie et par les biopsies musculai-

res qui révèlent la présence de fibres hypercontractées (fibres arrondies éosinophiles), de fibres en nécrose et de fibres en régénération dont la proportion diminue avec l'âge tandis que le tissu conjonctif (fibrose et adipeuse) progresse.

Les différentes théories (vasculaire, neurogène, membranaire, calcique et auto-immune [1]) échafaudées pour expliquer la maladie n'ont pas été éliminées par la découverte du gène DMD et par celle de la protéine déficiente, la dystrophine, puisque le rôle cellulaire exact joué par celle-ci reste inconnu. En particulier, les mécanismes de l'accumulation du calcium dans les fibres dystrophiques restent hypothétiques, de même que les

ADRESSE

J.C. Pastoret : *chercheur boursier de l'AFM.*
A. Sébille : *maître de conférences, praticien hospitalier.* Laboratoire de physiologie, faculté de médecine Saint-Antoine, 27, rue de Chaligny, 75571 Paris Cedex 12, France.

RÉFÉRENCES

1. Emery AEH. *Duchenne Muscular Dystrophy*. New York : Oxford University Press, 1987 : 1-315.
 2. Harris JB. Muscular dystrophy and other inherited diseases of skeletal muscle in animals. *Ann NY Acad Sci* 1979 ; 317 : 1-716.
 3. Bulfield G, Siller WG, Wight PAL, Moore KJ. X-chromosome linked muscular dystrophy *mdx* in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984 ; 81 : 1189-92.
 4. Chelly J, Kaplan JC. La myopathie de Duchenne : du gène DMD à la dystrophine. *médecine/sciences* 1988 ; 4 : 141-50.
 5. Hoffman EP, Brown RH, Kunkel LM. Dystrophin : the protein product of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Cell* 1987 ; 51 : 919-28.
 6. Miyatake M, Miike T, Zhao J, Yoshioka K, Uchino M, Usuku G. Dystrophin : localization and presumed function. *Muscle Nerve* 1991 ; 4 : 113-9.
 7. Bonilla E, Samitt CE, Miranda AF, et al. Duchenne muscular dystrophy : deficiency of dystrophin at the muscle cell surface. *Cell* 1988 ; 54 : 447-52.
 8. Ibraghimov-Beskrovnaya O, Ervasti JM, Leveille CJ, Slaughter CA, Sernett SW, Campbell KP. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* 1992 ; 355 : 696-702.
 9. Menke A, Jockusch H. Decreased osmotic stability of dystrophin-less muscle cells from the *mdx* mouse. *Nature* 1991 ; 349 : 69-71.
 10. Turner PR, Westwood T, Regen CM, Steinhardt RA. Increased protein degradation results from elevated free calcium levels found in muscle from *mdx* mice. *Nature* 1988 ; 335 : 735-8.
 11. Franco A, Lansman JB. Calcium entry through stretch-inactivated ion channels in *mdx* myotubes. *Nature* 1990 ; 344 : 670-3.
 12. Khurana TS, Hoffman EP, Kunkel LM. Identification of a chromosome 6 encoded dystrophin-related protein. *J Biol Chem* 1990 ; 265 : 16717-20.
- mécanismes réglant la régénération musculaire après la nécrose. C'est pourquoi la compréhension de la dystrophie humaine nécessite l'étude d'équivalents animaux de DMD. Les premiers modèles analogues ont été trouvés chez des mutants de la souris, du poulet et du hamster [2], qui présentaient des caractéristiques histopathologiques se rapprochant de celles observées chez DMD (Tableau I). Il était cependant difficile d'établir un parallèle entre la dystrophie humaine et des mutants qui présentent des atteintes multisystémiques (touchant muscles, vaisseaux, viscères et parfois système nerveux), provoquées par des déficiences génétiques d'origine autosomique encore inconnues aujourd'hui. La découverte du gène DMD et de la dystrophine ont permis de caractériser chez l'animal des dystrophies musculaires génétiquement identiques à celle de l'homme. La découverte chez la souris, puis chez le chien et le chat, de mutants homologues présentant la même déficience génétique que DMD a permis d'envisager une nouvelle approche expérimentale des dystrophies musculaires, et d'imaginer des moyens thérapeutiques propres à pallier la déficience en dystrophine. Il existe cependant des différences spécifiques présentées par ces animaux mutants. Après quelques généralités sur la dystrophine, cette revue décrira les anomalies cliniques et histopathologiques observées chez ces mutants, en insistant sur les particularités de la souris C57BL/10-*mdx* (*X-linked muscular dystrophy*) [3].

Découverte du gène DMD et de la dystrophine

La découverte du gène DMD a été une aventure génétique internationale sans précédent [4], par la rapidité avec laquelle les biologistes moléculaires sont passés de la découverte du locus en 1977 (translocations chez des filles présentant une dystrophie musculaire de Duchenne, avec une cassure chromosomique visible sur le locus Xp21), à la caractérisation du gène affecté en 1985 (emploi des premières sondes intragéniques et découverte, chez les malades, de délétions importantes du gène DMD), puis à la découverte en 1987 du produit du

gène : la dystrophine [5]. Elle a été localisée dans divers tissus dont les muscles et le système nerveux central [6]. Bien que la fonction de cette protéine cytosquelettique située sur la face interne de la membrane plasmique de la fibre musculaire [6] soit encore imprécise, la dystrophine est au centre de mécanismes qui maintiennent la structure morphologique et fonctionnelle de la fibre musculaire striée [7]. Son absence dans les muscles dystrophiques entraîne une fragilité osmotique de la membrane plasmique [8] ainsi qu'une élévation de la concentration calcique intracellulaire [9] reliée à la présence de canaux calciques à ouverture prolongée [10]. Ces anomalies conduisent inéluctablement à la nécrose des fibres musculaires. La découverte d'une autre forme de dystrophine (dont le gène est situé sur le chromosome 6) ainsi que le marquage biochimique de dystrophines homologues (*dystrophin related protein* ou *utrophine...*) [12, 13] sont à la base du concept d'une « superfamille de dystrophines » dont le rôle est encore mal compris [14].

Dystrophies musculaires animales liées au chromosome X

Au cours de l'évolution, l'arrangement linéaire de certains gènes situés sur différents chromosomes a persisté chez les mammifères. Le chromosome X a été le mieux conservé [15], et l'équivalent du gène DMD ainsi que des mutations de ce gène conduisant à l'absence de dystrophine ont été trouvés chez le chien, le chat et la souris [16].

Le chien dystrophique : CXMD

En 1986 et 1988, des chiens présentant une dystrophie musculaire progressive liée au chromosome X avec absence de dystrophine ont été décrits [17, 18]. Ces chiens présentaient une mutation d'un site consensus d'épissage avec excision anormale de l'exon 7, ce qui produit un changement de phase de lecture et la rencontre d'un codon stop prématuré dans le gène [19]. La maladie, appelée *CXMD* (*canine X-linked muscular dystrophy*) ou *GRMD* (*golden retriever muscular dystrophy*), débute aux alen-

Tableau I							
RÉCAPITULATION DE L'ENSEMBLE DES CRITÈRES HISTOPATHOLOGIQUES OBSERVÉS CHEZ LES PRINCIPAUX MUTANTS DE DIVERSES ESPÈCES							
	Poulet	Hamster	Souris dy	Souris mdx	Chat HFMD	Chien CXMD	DMD*
Chromosome	autosomique	autosomique	10	X	X	X	X
Dystrophine	+	nd	+	-	-	-	-
Faiblesse musculaire progressive	++	±	++	-	-	++	++
Élévation des enzymes sériques	+	+	+	+	+	+	+
Atteinte cardiaque	-	++	-	±	+	+	+
Nécrose des fibres musculaires	+	+	+	+	+	+	+
Clivage	+	+	+	+	+	+	+
Variabilité de taille des fibres	+	+	+	+	+	+	+
Hypertrophie musculaire	+	-	-	±	++	±	±
Régénération musculaire	+	+	±	+	±	±	±
Fibrose	+	±	+	±	+	++	++
Mort prématurée	-	+	+	±	+	+	++

* La dernière colonne permet d'effectuer une comparaison avec les observations relevées dans la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD)

- : absent, + : présent, ++ : éventuellement sévère, ± : variable ou évoluant avec l'âge, nd : non déterminé.

dy : dystrophia muscularis ; mdx : X-linked muscular dystrophy ; HFMD : hypertrophic feline muscular dystrophy ; CXMD : canine X-linked muscular dystrophy.

tours de l'âge de 8 semaines par une faiblesse musculaire qui s'aggrave progressivement durant plusieurs mois. Les anomalies touchent l'ensemble de la musculature, réduisant notamment la capacité respiratoire. La mort survient en général précocement, puisque certains animaux ne survivent pas après la naissance, d'autres présentent de graves altérations de l'état général à l'âge de 1 an, tandis que d'autres ne souffrent de cardiomyopathie évoluée qu'à l'âge de 6 ans [20]. L'absence d'atteinte du système nerveux et la présence de signes histopathologiques habituels de dystrophie musculaire

(nécrose des fibres musculaires, inflammation, régénération, variabilité de taille et de forme des fibres, fibrose...) ont établi le diagnostic de dystrophie musculaire primaire [17]. L'identité génétique et la progressive aggravation de la dystrophie musculaire font de CXMD l'équivalent le plus proche de DMD (Tableau I).

Le chat dystrophique : HFMD

En 1989, Carpenter *et al.* [21] ont décrit deux chats âgés de 2 ans présentant des troubles de la marche résultant d'une myopathie, avec absence de dystrophine. Les examens cliniques et histopathologiques ont

montré une hypertrophie prononcée du diaphragme, de la langue et de divers autres muscles, parallèlement aux anomalies habituellement observées dans les dystrophies musculaires (Tableau I). Deux cas similaires ont été rapportés depuis [22], et la découverte de ces animaux dénommés *mdx cat* puis *HFMD* (*hypertrophic feline muscular dystrophy*) a mis en évidence qu'il pouvait exister des différences d'expression importantes entre les dystrophinopathies, suivant les espèces où elles apparaissent. La mutation n'a pas été précisément caractérisée, et aucune colonie de ces animaux n'a pu être établie.

La souris dystrophique : mdx

• Découverte

En 1984, Bulfield *et al.* [3], qui recherchaient des mutants du métabolisme de la glycolyse chez la souris, ont découvert quelques animaux de la souche C57BL/10 présentant des taux sériques anormalement élevés de pyruvate kinase et de créatine kinase, évoquant l'existence d'une dystrophie musculaire. Les observations génétiques ont établi que la maladie était liée au chromosome X, et les examens histologiques et ultrastructuraux ont révélé des lésions primaires des fibres musculaires, sans atteinte du système nerveux. Le mutant fut dénommé *mdx* (*X-linked muscular dystrophy*), et, en 1987, la mise en évidence de l'absence de dystrophine dans les muscles l'a fait considérer comme un homologue de DMD [5]. Les aspects moléculaires de la mutation ont été étudiés par Sicinski *et al.* en 1989 [23] : le remplacement d'une cytosine par une thymine en position 3185 de la séquence codante du gène entraîne l'apparition d'un codon stop qui termine prématurément la traduction de la dystrophine. Il ne s'agit donc pas de délétions comme dans la majorité des cas de DMD, bien qu'il ne soit pas exclu que la dystrophie humaine puisse être aussi la conséquence de mutations ponctuelles [23].

• Données cliniques et physiologiques

La possibilité d'accouplement entre mutants (femelles homozygotes *mdx/mdx* et mâles hémizygotés *mdx/Y*), et la quasi-normalité de leur durée de vie ont favorisé le développement

RÉFÉRENCES

13. Helliwell TR, N'Guyen Thi Man, Morris GE, Davies KE. The dystrophin-related protein, utrophin, is expressed on the sarcolemma of regenerating human skeletal muscle fibres in dystrophies and inflammatory myopathies. *Neuromuscular Dis* 1992 ; 2 : 177-84.
14. Léger JJ, Augier N, Léger J, Morinet D, Pons F. La ou les dystrophine(s), trois années après leur découverte. *médecine/sciences* 1991 ; 7 : 805-19.
15. Avner P. Genetics of the mouse X chromosome and the X-inactivation process. *Bull Inst Pasteur* 1989 ; 87 : 105-24.
16. Partridge TA. Animal models of muscular dystrophy : what can they teach us ? *Neuropath Appl Neurobiol* 1991 ; 17 : 353-63.
17. Valentine BA, Cooper BJ, Cummings JF, De Lahunta A. Progressive muscular dystrophy in a golden retriever dog : light microscope and ultrastructural features at 4 and 8 months. *Acta Neuropath (Berl)* 1986 ; 71 : 301-10.
18. Kornegay JN, Tuler SM, Miller DM, Levesque DC. Muscular dystrophy in a litter of golden retriever dogs. *Muscle Nerve* 1988 ; 11 : 1056-64.
19. Sharp NJH, Kornegay JN, Van Camp SD, *et al.* An error in dystrophin mRNA processing in golden retriever muscular dystrophy, an animal homologue of Duchenne muscular dystrophy. *Genomics* 1992 ; 13 : 115-21.
20. Valentine BA, Winand NJ, Pradhan D, *et al.* Canine X-linked muscular dystrophy as an animal model of Duchenne muscular dystrophy : a review. *Am J Med Genet* 1992 ; 42 : 352-6.
21. Carpenter JL, Hoffman EP, Romanul FC, *et al.* Feline muscular dystrophy with dystrophin deficiency. *Am J Pathol* 1989 ; 135 : 909-19.
22. Gaschen FP, Hoffman EP, Gorospe JRM, *et al.* Dystrophin deficiency causes lethal muscle hypertrophy in cats. *J Neurol Sci* 1992 ; 110 : 149-59.
23. Sicinski P, Geng Y, Ryder-Cook AS, Barnard EA, Darlison MG, Barnard PJ. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse : a point mutation. *Science* 1989 ; 244 : 1578-80.

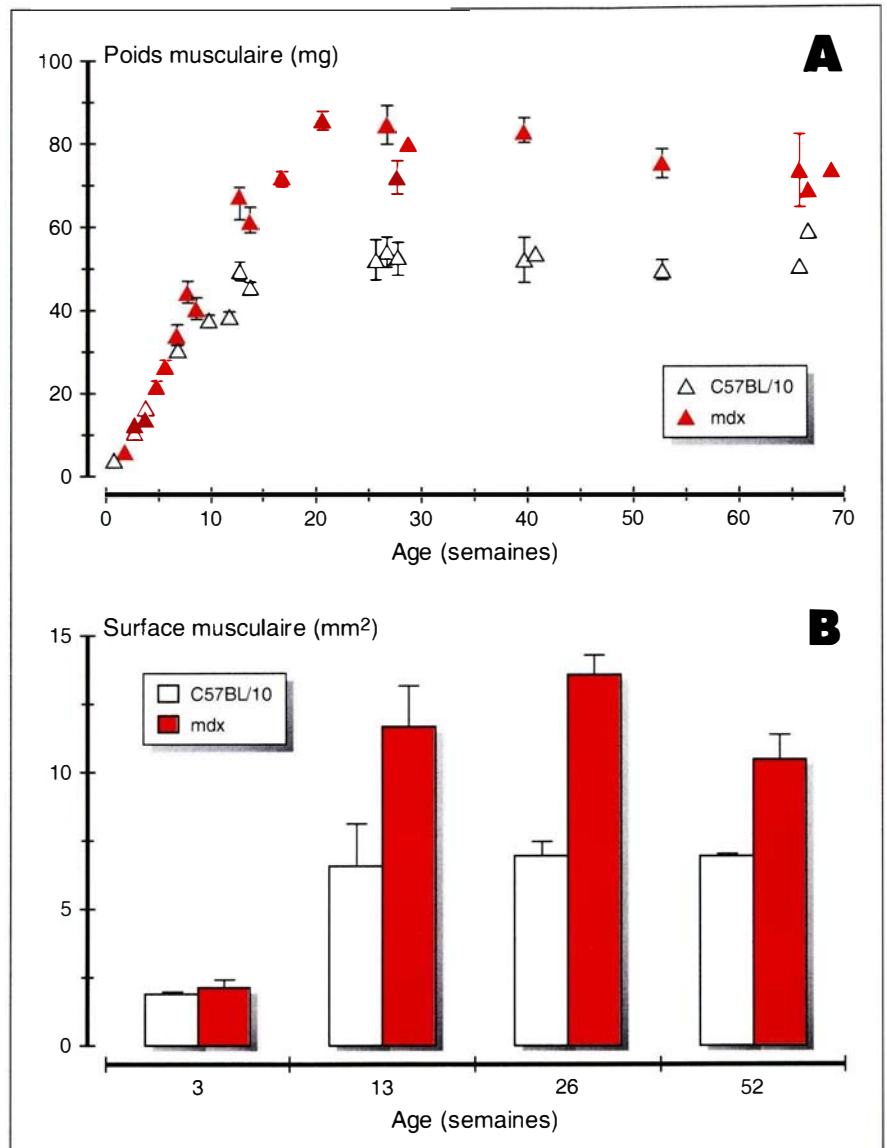


Figure 1. **Poids (A) et surface (B) musculaires du muscle jambier antérieur représentés en fonction de l'âge des animaux normaux C57BL/10 et mdx.** L'hypertrophie musculaire est décelable chez mdx à partir de 10 semaines d'âge, et est maximale entre 6 et 12 mois d'âge.

d'importantes colonies, permettant l'étude des aspects cliniques, physiologiques et histopathologiques de cette dystrophie musculaire murine. Sur le plan clinique, les déficits fonctionnels très discrets observés chez les mutants jusqu'à l'âge de 12 mois ne sont en rien comparables à la gravité des symptômes décrits dans d'autres dystrophies musculaires animales. Les muscles des mutants adultes (2-12 mois) développent des tensions musculaires équivalentes à celles des

muscles d'animaux témoins de la souche C57BL/10 [24]. Cependant, une différence importante existe si ce paramètre est rapporté au poids ou à la surface musculaire. En effet, l'apparition d'une hypertrophie musculaire chez mdx (figure 1) sans augmentation parallèle de la tension fait apparaître un rapport tension/poids (ou surface) systématiquement inférieur chez le mutant adulte par rapport aux contrôles [25]. Trois hypothèses non exclusives peuvent expli-

quer l'hypertrophie musculaire : l'hypertrophie des fibres (accroissement du diamètre des fibres avec augmentation du matériel contractile), l'hyperplasie (néosynthèse de fibres) ou bien l'augmentation anormale du tissu conjonctif. Chez le mutant adulte, bien qu'une discrète accumulation du collagène ait été décrite [26], cette hypothèse, pas plus que les deux précédentes, ne peut être responsable isolément des augmentations de poids et de surface musculaire. Cette hypertrophie, maximale entre 6 et 12 mois d'âge, régresse ensuite pour aboutir chez les animaux âgés de plus de 18 mois à une atrophie musculaire importante.

• Données histopathologiques

- Fibres hypercontractées et nécrose

La présence de fibres hypercontractées (*figure 2a*) est notée dès la naissance dans les muscles *mdx* [27] et au moins jusqu'à l'âge de 18 mois. Les fibres hypercontractées sont le reflet d'un stade précoce de la nécrose, dû à l'entrée massive de Ca^{2+} dans un segment de la fibre musculaire, provoquant une contraction anormale des sarcomères. En conséquence, l'activation de protéases musculaires sensibles au Ca^{2+} favorise le catabolisme des protéines musculaires pour aboutir à la nécrose cellulaire. Chez *mdx*, la nécrose des fibres musculaires, accompagnée de réaction inflammatoire (*figure 2a*), est clairement observable à partir de 3 semaines [28], âge correspondant au sevrage qui oblige les animaux à déployer une activité musculaire plus importante qu'auparavant. La nécrose est un phénomène transitoire qui touche très peu de fibres simultanément (rarement plus de 2 % sur le nombre total de fibres). La présence de foyers nécrotiques est observable de façon continue au moins jusqu'à l'âge de 15 mois (*figure 3b*), et l'on considère qu'il existe une dégradation musculaire continue [29], compensée par la régénération jusqu'à 18-20 mois. Les fibres musculaires de petit diamètre, telles que celles des muscles extrinsèques de l'œil, ne sont pas affectées par la nécrose [30].

- Résistance des fibres régénérées à une nouvelle nécrose ?

Devant l'absence d'atteinte clinique

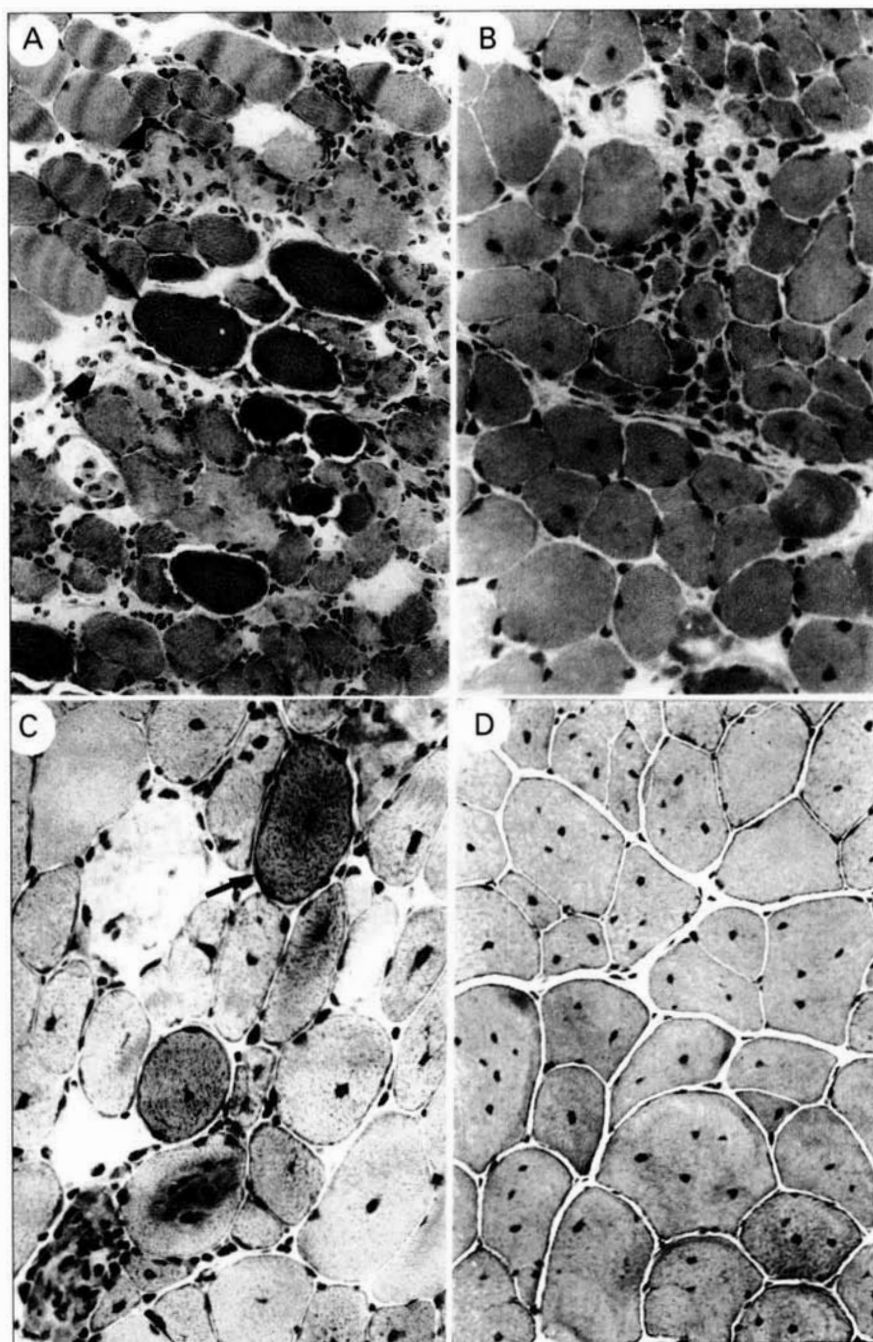


Figure 2. Aspect des muscles *mdx* jeunes et adultes (3 semaines-12 mois). (A) muscle jambier antérieur *mdx*, 3 semaines : foyer de fibres hypercontractées (petite flèche) et en nécrose (grosse flèche) avec envahissement de cellules inflammatoires (tête de flèche) ; (B) muscle jambier antérieur *mdx*, 8 semaines : petit foyer de fibres en régénération (flèche) ; (C) muscle jambier antérieur *mdx*, 8 semaines : foyer nécrotique dans lequel on distingue une fibre régénérée hypercontractée (flèche) ; (D) muscle jambier antérieur *mdx*, 12 mois : on note le clivage et d'importantes variations de taille et de forme des fibres musculaires centronucléées. Échelle : (A) = 50 μ m, (B, C, D) = 32 μ m.

RÉFÉRENCES

24. Quinlan JG, Johnson SR, McKee MK, Lyden SP. Twitch and tetanus in mdx mouse muscle. *Muscle Nerve* 1992 ; 15 : 837-42.
25. Sacco P, Jones DA, Dick JRT, Vrbova G. Contractile properties and susceptibility to exercise-induced damage of normal and mdx mouse tibialis anterior muscle. *Clin Sci* 1992 ; 82 : 227-36.
26. Marshall PA, Williams PE, Goldspink G. Accumulation of collagen and altered fiber-type ratios as indicators of abnormal muscle gene expression in the mdx dystrophic mouse. *Muscle Nerve* 1989 ; 12 : 528-37.
27. Torres LFB, Duchen LW. The mutant mdx : inherited myopathy in the mouse : morphological studies of nerves, muscles and end-plates. *Brain* 1987 ; 110 : 269-99.
28. Coulton GR, Morgan JE, Partridge TA, Sloper JC. The mdx mouse skeletal muscle myopathy : I. A histological morphometric and biochemical investigation. *Neuropath Appl Neurobiol* 1988 ; 14 : 54-70.
29. MacLennan PA, Edwards RHT. Protein turnover is elevated in muscle of mdx mice *in vivo*. *Biochem J* 1990 ; 268 : 795-7.
30. Karpati G, Carpenter S, Prescott S. Small-caliber skeletal muscle fibers do not suffer necrosis in mdx mouse dystrophy. *Muscle Nerve* 1988 ; 11 : 795-803.
31. Karpati G. Correlation of dystrophin deficiency and skeletal muscle fiber damage in Duchenne and mdx muscular dystrophies : possible clues for therapeutic approaches. In : Serratrice G, et al., eds. *Myélopathies neuropathies et myopathies : acquisitions récentes*. Paris : Expansion Scientifique Française, 1988 : 207-12.
32. Anderson JE, Ovalle WK, Bressler BH. Electron microscopic and autoradiographic characterization of hindlimb muscle regeneration in the mdx mouse. *Anat Rec* 1987 ; 219 : 243-57.
33. Anderson JE. Dystrophic changes in mdx muscle regenerating from denervation and devascularization. *Muscle Nerve* 1991 ; 14 : 268-79.
34. Bradley WG. Muscle fiber splitting. In : Mauro A, et al., eds. *Muscle Regeneration*. New York : Raven Press, 1979.

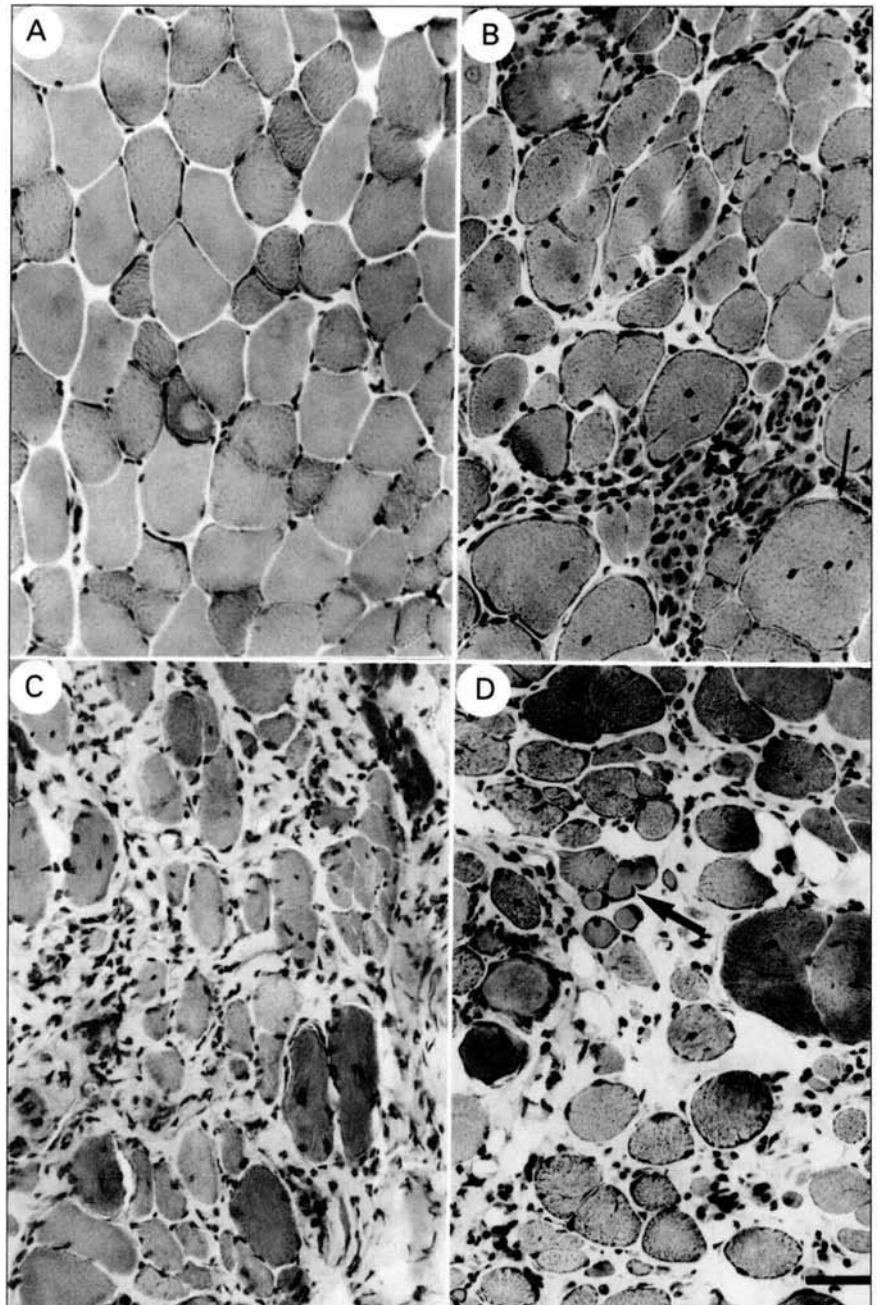


Figure 3. **Aspect des muscles mdx âgés (15-24 mois).** (A) muscle EDL (extenseur commun des orteils) normal C57BL/10, 26 mois : les fibres possèdent une forme polygonale et un noyau périphérique ; (B) muscle jambier antérieur mdx, 15 mois : foyer nécrotique avec inflammation (étoile), fibre anormalement large (grosse flèche) ; (C, D) dans les muscles soléaires mdx, 20 mois (C) et EDL mdx, 24 mois (D), la fibrose et la détérioration musculaires sont extrêmement importantes. On note également l'atrophie de certaines fibres (flèche). Échelle (A, B, C, D) : 50 μ m.

chez le mutant jusqu'à 12 mois, la présence de dystrophine(s) homologue(s) a été proposée comme un mécanisme propre à empêcher les fibres dystrophine-négatives de subir un nouvel épisode de nécrose une fois régénérées [31]. En fait, la présence de fibres possédant un noyau central (post-régénérées) et hypercontractées (pré-nécrotiques) (figure 2c), les observations ultrastructurales de multiples couches de lame basale autour des fibres musculaires [32], et le retour des signes pathologiques dans des muscles *mdx* lésés expérimentalement puis régénérés en totalité [33] prouvent que la nécrose peut affecter également les fibres musculaires régénérées. Il existe donc une succession de cycles de nécrose/régénération dans les muscles des souris affectées par la mutation *mdx*.

- Fibres clivées

Le clivage des fibres musculaires (*splitting*) observé à tous les stades adultes chez *mdx* (figure 2d) peut être le résultat de la fusion incomplète des myotubes au cours de la régénération d'une fibre musculaire, ou la consé-

quence de l'hypertrophie cellulaire, qui oblige une fibre ayant atteint son diamètre maximal à se diviser longitudinalement en plusieurs petites fibres, afin de conserver un métabolisme et une vascularisation adéquats. Ces fibres sont fonctionnelles et persistent dans le muscle [34]. De plus, leur proportion augmente avec l'âge dans les muscles soumis à des cycles de nécrose/régénération.

- Fibrose

Une fibrose (accumulation interstitielle du collagène synthétisé par les fibroblastes) discrète apparaît dans les muscles squelettiques des mutants à partir d'un an et augmente avec l'âge (figures 3c et 3d), alors qu'elle est absente dans les muscles normaux, même âgés (figure 3a). Cette augmentation chez les mutants de plus de 12 mois est probablement une conséquence de la diminution du nombre ou des capacités prolifératives des cellules myogéniques (voir paragraphe suivant), laissant place à un développement anormal du tissu conjonctif dans les muscles squelettiques, alors que le diaphragme présente précocement

des caractéristiques fonctionnelles altérées [35] en relation avec une fibrose abondante [36].

- Régénération musculaire

La nécrose musculaire est suivie dans le muscle squelettique d'une régénération due à la prolifération des cellules myogéniques (figure 2b). Chez *mdx*, elle est mise en évidence par la présence de foyers basophiles visibles dès 2-3 semaines d'âge. A partir de 3 mois, 80 à 90 % des fibres des muscles squelettiques du mutant possèdent un noyau central [37], indice d'une régénération antérieure. Les foyers de régénération sont ensuite décelables au moins jusqu'à l'âge de 18 mois. Le processus de régénération dans les muscles du mutant *mdx* est semblable à celui observé en général dans les modèles expérimentaux de régénération chez les rongeurs [38], et ne paraît pas résulter de facultés exceptionnelles du muscle *mdx*, mais plutôt de conditions favorables de régénération. En effet, peu de fibres musculaires sont simultanément affectées, l'intégrité de la lame basale est conservée, et les vaisseaux comme les terminaisons nerveuses et les fuscaux neuromusculaires ne dégèrent pas [32, 39]. Une diminution des capacités de régénération musculaire a été constatée dans les muscles des mutants les plus âgés [32, 40], mais il est bien établi que la capacité de régénération musculaire diminue avec l'âge dans la plupart des espèces [41]. Cette diminution pourrait résulter soit d'une réduction du nombre des cellules myogéniques disponibles, soit d'une capacité moindre à se différencier et à fusionner, soit enfin d'une altération des capacités des cellules phagocytaires chargées de l'élimination des débris cellulaires [42]. Malgré la diminution progressive des capacités régénératives des muscles *mdx*, les animaux dont l'âge est inférieur à 12-15 mois gardent une activité motrice comparable à celle des animaux sauvages, et les caractéristiques de contraction et l'aspect histologique de leurs muscles squelettiques varient peu.

- *mdx* et le *bFGF*

Les études menées *in vitro* ont permis de mettre en évidence le rôle des facteurs de croissance et de diverses hormones sur la prolifération, la fusion

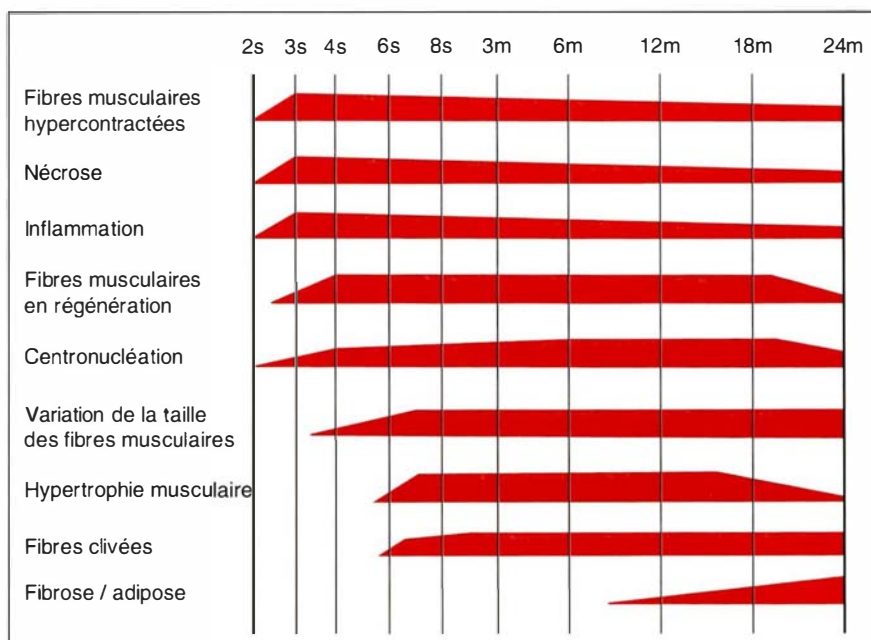


Figure 4. **Récapitulation et chronologie des principales observations histopathologiques observées chez les mutants *mdx* âgés de 2 semaines à 24 mois (aucune étude prénatale n'a été effectuée).** La hauteur des bandes est relative à l'intensité de chaque phénomène.

RÉFÉRENCES

35. Dupont-Versteegden EE, McCarter RJ. Differential expression of muscular dystrophy in diaphragm versus hindlimb muscles of *mdx* mice. *Muscle Nerve* 1992 ; 15 : 1105-10.
36. Stedman HH, Sweeney HL, Shrager JB, et al. The *mdx* mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 1991 ; 352 : 536-9.
37. Carnwath JW, Shotton DM. Muscular dystrophy in the *mdx* mouse : histopathology of the soleus and extensor digitorum longus muscles. *J Neurol Sci* 1987 ; 80 : 39-54.
38. Plaghki L. Régénération et myogénèse du muscle strié. *J Physiol (Paris)* 1985 ; 80 : 51-110.
39. Cullen MJ, Jaros E. Ultrastructure of the skeletal muscle in the X chromosome-linked dystrophic (*mdx*) mouse : comparison with Duchenne muscular dystrophy. *Acta Neuropathol (Berl)* 1988 ; 77 : 69-81.
40. DiMario J, Uzman A, Strohmman RC. Fiber regeneration is not persistent in dystrophic *mdx* mouse skeletal muscle. *Dev Biol* 1991 ; 148 : 314-21.
41. Carlson BM. Muscle regeneration and aging. *Monogr Dev Biol* 1992 ; 23 : 189-95.
42. Zacks SI, Sheff MF. Age-related impeded regeneration of mouse minced anterior tibial muscle. *Muscle Nerve* 1982 ; 5 : 152-61.
43. Florini JR, Ewton DZ, Magri KA. Hormones, growth factors, and myogenic differentiation. *Annu Rev Physiol* 1991 ; 53 : 201-16.
44. DiMario J, Strohmman RC. Satellite cells from dystrophic *mdx* mouse muscle are stimulated by fibroblast growth factor *in vitro*. *Differentiation* 1988 ; 39 : 42-9.
45. Anderson JE, Liu L, Kardami E. Distinctive patterns of basic fibroblast growth factor (bFGF) distribution in degenerating and regenerating areas of dystrophic *mdx* striated muscles. *Dev Biol* 1991 ; 147 : 96-109.
46. Hoffman EP, Morgan JE, Watkins SC, Partridge TA. Somatic reversion/suppression of the mouse *mdx* phenotype *in vivo*. *J Neurol Sci* 1990 ; 99 : 9-25.

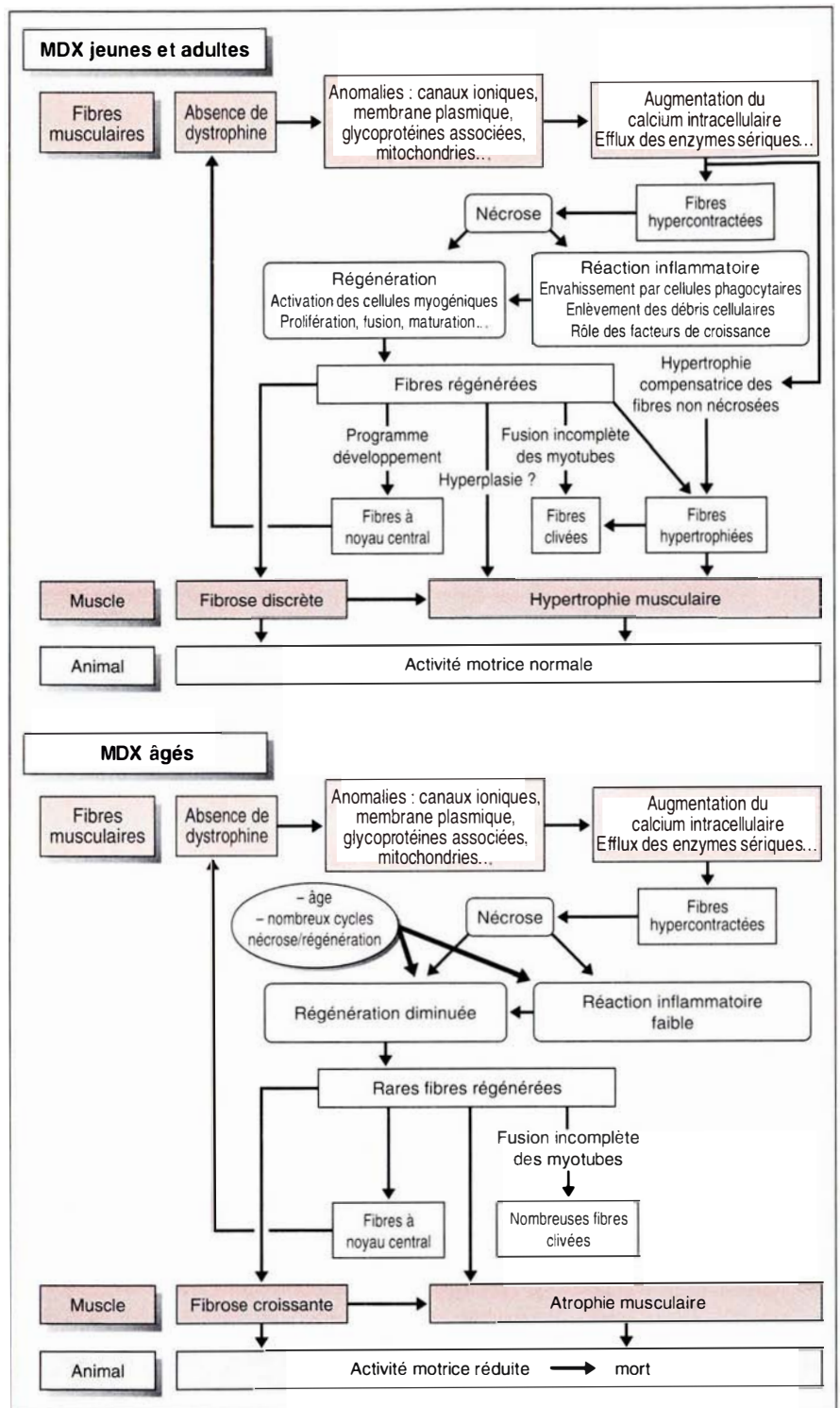


Figure 5. **Mise en place des principaux éléments observés dans la dystrophie musculaire développée chez le mutant *mdx*.** Ces schémas prennent essentiellement en compte les observations histologiques des muscles squelettiques des animaux jeunes et adultes (3 semaines à 12-15 mois) et âgés (18 à 24 mois). Le premier tableau présenté est remplacé progressivement par le second, faisant passer par exemple les muscles d'un stade hypertrophique à atrophique et l'activité motrice des animaux, de normale à réduite.

et la différenciation des cellules myogéniques [43]. Il a été suggéré que la régénération observée dans le muscle *mdx* était en rapport avec la présence accrue d'un facteur particulier. Les études réalisées sur le bFGF (*basic fibroblast growth factor*) [44, 45] ont conclu que ce facteur de croissance serait en quantité accrue chez *mdx*, et que les cellules satellites posséderaient des récepteurs membranaires dont l'affinité au bFGF serait augmentée. Les autres facteurs de croissance et hormones n'ont pas été étudiés.

- Au total

La figure 4 récapitule les différents éléments des modifications anatomo-pathologiques et de la régénération des muscles squelettiques *mdx*. La figure 5 permet d'apprécier comment ces différents éléments s'imbriquent les uns par rapport aux autres dans les fibres dystrophine-négatives, et ce qu'il en résulte pour l'activité motrice globale du mutant. Au cours de la vie de la souris *mdx*, les altérations tissulaires prennent une place de plus en plus importante (atrophie musculaire, clivage des fibres, fibrose...) et provoquent vraisemblablement la mort des animaux lorsqu'elles touchent des muscles essentiels tels que le diaphragme [35, 36], le cœur [28, 37] ou les muscles antigravitaires. En effet, les mutants ont une durée de vie sensiblement réduite (20-24 mois) par rapport à celle des animaux normaux (24-30 mois). La figure 6 résume cet équilibre évoluant au cours du temps entre les mécanismes pathologiques et régénératifs dans les muscles du mutant *mdx*.

Des souris et des hommes : *mdx* et DMD

Le point commun entre *mdx* et DMD est la déficience génétique en dystrophine. Il en résulte dans les deux cas une accumulation de calcium intracellulaire suivie d'une nécrose des fibres musculaires, mais l'on note d'autres points communs sur l'ensemble des données histopathologiques (*Tableau I*), comme la présence d'une faible proportion de fibres dystrophine-positives, appelées fibres révertantes [46, 47]. En revanche, la nécrose est compensée par une régénération musculaire continue chez les mutants *mdx* jeunes et adultes (3 semaines à 15 mois), qui s'estompe progressive-

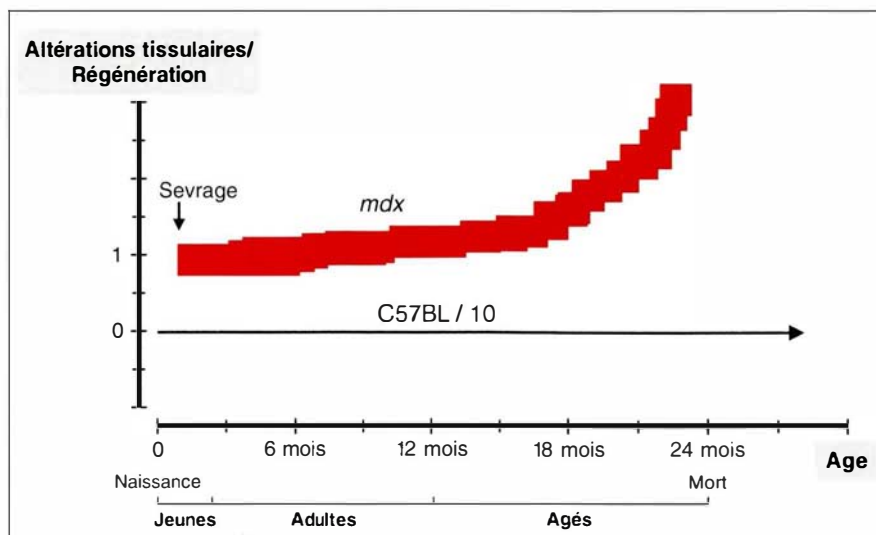


Figure 6. **Représentation symbolique de la dystrophie musculaire progressive développée par le mutant *mdx* durant les principales phases de sa vie :** (1) les muscles squelettiques des animaux très jeunes sont peu ou pas affectés par la maladie jusqu'au sevrage, (2) les muscles d'animaux jeunes et adultes ont la capacité de régénérer leurs fibres musculaires frappées de dégénérescence, ce qui permet un développement et une activité motrice normaux, (3) les muscles de mutants âgés ont des signes histopathologiques évidents. Axe des ordonnées : 0 signifie que les animaux normaux ne sont pas touchés par la maladie (pathologie = 0) et permet de mettre en évidence que leur durée de vie est plus longue que celle des mutants ; 1 met en évidence que le rapport pathologie/régénération est constant chez les animaux jusqu'à 15-18 mois, où la nécrose est systématiquement compensée par la régénération. Lorsque la régénération ne compense plus suffisamment la nécrose, le rapport dépasse 1 (pathologie > régénération).

ment chez les mutants âgés (18-24 mois), où la dégénérescence musculaire et la fibrose prédominent, comme dans la maladie humaine. C'est la différence majeure qui existe entre *mdx* et l'homme atteint de DMD, dont les muscles squelettiques sont précocement affectés (3-5 ans), la perte de fonction ambulatoire survenant aux alentours de 10-12 ans.

Cette différence inter-espèces est peut-être d'origine mécanique : l'homme est un bipède dont les muscles sont soumis à des contraintes spécifiques différentes de celles des quadrupèdes. Des différences métaboliques (renouvellement des protéines plus important chez les petits animaux) ou la durée des cycles cellulaires (plus longs chez l'homme que chez la souris pour les cellules myogéniques) peuvent également être incriminées, particulièrement lors des cycles successifs de nécrose/régénération. Par contre, il n'est pas certain que les dystrophines homologues puissent jouer un rôle spécifique chez les mutants *mdx*, dans

la mesure où leur marquage immunohistochimique n'a pas révélé de différence entre *mdx* et DMD [48]. Il apparaît donc que si les points communs qui caractérisent les dystrophinopathies sont relativement bien établis, l'origine des différences d'expression clinique et le retentissement variable de l'absence de dystrophine sur la régénération suivant les espèces restent encore méconnus.

Perspectives : à quoi peut servir *mdx* ?

Durant les neuf années écoulées depuis sa découverte, le mutant *mdx* a été considéré principalement sous un aspect descriptif (génétique, histologique, physiologique...), et, aujourd'hui, un profil précis des conséquences phénotypiques de la mutation commence à se dessiner. Le fait de disposer, pour un faible coût, d'importantes colonies de mutants homologues de DMD offre la possibilité d'étudier les processus dégénératifs et/ou régénératifs d'une dystro-

RÉFÉRENCES

47. Fanin M, Danicli GA, Vitiello L, Senter L, Angelini C. Prevalence of dystrophin-positive fibers in 85 Duchenne muscular dystrophy patients. *Neuromuscular Dis* 1992 ; 2 : 41-5.
48. Khurana TS, Watkins SC, Chafey P, et al. Immunolocalization and developmental expression of dystrophin related protein in skeletal muscle. *Neuromuscular Dis* 1992 ; 1 : 185-94.
49. Weller B, Massa R, Karpati G, Carpenter S. Glucocorticoids and immunosuppressants do not change the prevalence of necrosis and regeneration in mdx skeletal muscles. *Muscle Nerve* 1991 ; 14 : 771-4.
50. Griggs RC, Karpati G. *Myoblast Transfer Therapy*. New York : Plenum Press, 1990 : 1-316.
51. Partridge TA. Myoblast transfer : a possible therapy for inherited myopathies ? *Muscle Nerve* 1991 ; 14 : 197-212.
52. Labrecque C, Bouchard JP, Malouin F, Roy R, Huard J, Tremblay JP. Approche thérapeutique de la myopathie de Duchenne par transplantation de myoblastes. *médecine/sciences* 1991 ; 7 : 821-9.
53. Gros F. Gene therapy : present situation and future prospects. *Neuromuscular Dis* 1991 ; 2 : 75-83.
54. Kahn A, Briand P. Thérapie génique : espoirs et limites. *médecine/sciences* 1991 ; 7 : 705-14.
55. Hoffman EP, Glorioso JC. Gene therapy : rational and possible application to Duchenne muscular dystrophy. *Acta Cardiomiologica* 1991 ; 3 : 315-29.
56. Ragot T, Vincent N, Chafey P, Vigne E, Gilgenkranz H, Couton D, Cartaud J, Briand P, Kaplan JC, Perricaudet M, Kahn A. Efficient adenovirus-mediated transfer of a human minidystrophin gene to skeletal muscle of mdx mice. *Nature* 1993 ; 361 : 647-50.
57. Ragot T, Vincent N, Gilgenkranz H. Transfert à l'aide d'un vecteur adénoviral d'un minigène de dystrophine dans des muscles de souris dystrophiques mdx. *médecine/sciences* 1993 ; 9 : 238-41.

phie musculaire primaire. Sur le plan thérapeutique, les études réalisées sur *mdx* avec succès pourraient être transposées chez le chien CXMD, préalablement aux essais cliniques chez DMD. Le mutant *mdx* ne se présente pas comme un candidat idéal pour des essais pharmacologiques visant, par exemple, à agir sur la masse musculaire [49], mais plutôt pour la mise au point de méthodes thérapeutiques originales aujourd'hui en plein essor : la majorité des résultats concernant la thérapie par transfert de myoblastes ont été obtenus à partir des travaux effectués sur *mdx* [50, 51]. Bien que de tels transferts de myoblastes aient été effectués chez quelques patients atteints de DMD [52], un certain nombre de questions ne sont pas résolues, telles que le nombre de cellules à utiliser, leur capacité de migration, la prévention du rejet des cellules greffées par le muscle hôte ou le stockage de cellules satellites saines dans le muscle greffé chez l'enfant afin de répondre à son développement. Une autre voie d'approche consiste à fournir directement la partie manquante du génome aux cellules somatiques, et cette thérapie génique semble applicable à toutes les maladies génétiques, musculaires ou non [53, 54]. Elle pose toutefois de nombreux problèmes tels que le choix du vecteur porteur du fragment d'ADN qui fait défaut, ou, particulièrement dans le cas de DMD, la longueur du gène à insérer dans ce vecteur. L'utilisation de virus comme vecteurs a donné des résultats encourageants, mais des précisions sur leur spécificité, leur absence de pathogénicité et leur efficacité *in vivo* à long terme restent encore à déterminer [55]. Toutes ces mises au point se font actuellement sur la souris *mdx* [56, 57], qui, loin d'être un mutant de plus, s'affirme comme un modèle de choix pour l'évaluation des moyens thérapeutiques les plus novateurs ■

Remerciements

Nous remercions le Dr J.-P. Lefaucheur pour ses commentaires, et Mlle J. Chandelier pour la partie iconographique. C. Pastoret est boursier de l'Association française contre les myopathies (AFM).

Summary

What future for the *mdx* mouse as an animal model of the Duchenne muscular dystrophy ?

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a severe form of an X-linked muscular dystrophy characterized by a progressive weakness of the striated muscles. Many animal models of DMD have been extensively studied for the last decades. Research which have been carried out on these models have substantially contributed to a better understanding of muscular pathology. The recent discovery of DMD gene and identification of its protein product, the dystrophin, brought a new insight in the molecular mechanisms which are involved in the disease. In addition, DMD gene characterization provides a new molecular tool for genetically based classification of mutant animal models. The present review particularly emphasizes the interest of one of these models, the *mdx* mouse. The main histopathological features of this animal model are shared in common with the other dystrophinopathies known today. The interest of *mdx* mouse in view of new therapeutic approaches is considered.

TIRÉS A PART

A. Sébille.