



HAL
open science

Comorbidité neurocognitive chez le chien GRMD

Nicolas van Caenegem

► **To cite this version:**

Nicolas van Caenegem. Comorbidité neurocognitive chez le chien GRMD. Médecine vétérinaire et santé animale. 2018. dumas-04945391

HAL Id: dumas-04945391

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04945391v1>


Submitted on 13 Feb 2025

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

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

Copyright

Année 2018



COMORBIDITÉ NEUROCOGNITIVE
CHEZ LE CHIEN GRMD

THÈSE

Pour le

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

Présentée et soutenue publiquement devant
LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE CRÉTEIL

le 23 octobre 2018

par

Nicolas, Franck VAN CAENEGEM

JURY

Président : Pr François LEMAIRE

Professeur à la Faculté de Médecine de Créteil

Membres

Directrice : Pr Caroline GILBERT

Professeure à l'École nationale vétérinaire d'Alfort

Co-directeur : Pr Stéphane BLOT

Professeur à l'École nationale vétérinaire d'Alfort

Assesseur : Pr Loïc DESQUILBET

Professeur à l'École nationale vétérinaire d'Alfort

Invitée : Dr Inès BARTHÉLÉMY

Ingénieure de recherche à l'École nationale vétérinaire d'Alfort

Invitée : Pr Fanny STORCK

Professeure à l'École nationale vétérinaire d'Alfort

LISTE DU CORPS ENSEIGNANTS

Janvier 2018

Directeur : M. le Professeur Christophe Degueurce

Directeur des formations : Pr Chateau Henry

Directrice de la scolarité et de la vie étudiante : Dr Catherine Colmin

Directeurs honoraires : MM. les Professeurs Charles Pilet, Bernard Toma, André-Laurent Parodi, Robert Moraillon, Jean-Pierre Cotard, Jean-Paul Mialot & Marc Gogny

Département d'élevage et de pathologie des Équidés et des Carnivores (DEPEC)

Chef du département : Pr Grandjean Dominique - **Adjoint** : Pr Blot Stéphane

| | |
|---|---|
| <p>Unité pédagogique de cardiologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Chetboul Valérie * - Dr Gkouni Vassiliki, Praticien hospitalier <p>Unité pédagogique de clinique équine</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Audigié Fabrice - Dr Bertoni Lélia, Maître de conférences - Dr Bourzac Céline, Maître de conférences contractuelle - Dr Coudry Virginie, Praticien hospitalier - Pr Denoix Jean-Marie - Dr Giraudet Aude, Praticien hospitalier - Dr Jacquet Sandrine, Praticien hospitalier - Dr Mespoulhès-Rivière Céline, Praticien hospitalier * - Dr Moiroud Claire, Praticien hospitalier <p>Unité pédagogique de médecine et imagerie médicale</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Benchekroun Ghita, Maître de conférences - Pr Blot Stéphane * - Dr Canonne-Guibert Morgane, Maître de conférences contractuelle - Dr Freiche-Legros Valérie, Praticien hospitalier - Dr Maurey-Guénéec Christelle, Maître de conférences | <p>Unité pédagogique de médecine de l'élevage et du sport</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Cléro Delphine, Maître de conférences - Dr Fontbonne Alain, Maître de conférences - Pr Grandjean Dominique * - Dr Maenhoudt Cindy, Praticien hospitalier - Dr Nudelmman Nicolas, Maître de conférences <p>Unité pédagogique de pathologie chirurgicale</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Fayolle Pascal - Dr Mailhac Jean-Marie, Maître de conférences - Dr Manassero Mathieu, Maître de conférences - Pr Viateau-Duval Véronique * <p>Discipline : anesthésie, réanimation, urgences, soins intensifs</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Verwaerde Patrick, Maître de conférences (convention EnvT) - Dr Zilberstein Luca, Maître de conférences <p>Discipline : ophtalmologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Chahory Sabine, Maître de conférences <p>Discipline : nouveaux animaux de compagnie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Pignon Charly, Praticien hospitalier |
|---|---|

Département des Productions Animales et de Santé Publique (DPASP)

Chef du département : Pr Millemann Yves - **Adjoint** : Pr Dufour Barbara

| | |
|--|---|
| <p>Unité pédagogique d'hygiène, qualité et sécurité des aliments</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Augustin Jean-Christophe * - Dr Bolnot François, Maître de conférences - Pr Carlier Vincent <p>Unité pédagogique de maladies règlementées, zoonoses et épidémiologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Dufour Barbara * - Pr Haddad/Hoang-Xuan Nadia - Dr Praud Anne, Maître de conférences - Dr Rivière Julie, Maître de conférences <p>Unité pédagogique de pathologie des animaux de production</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Adjou Karim - Dr Belbis Guillaume, Maître de conférences * - Dr Delsart Maxime, Maître de conférences associé - Pr Millemann Yves - Dr Ravary-Plumioën Bérangère, Maître de conférences - Dr Plassard Vincent, Praticien hospitalier | <p>Unité pédagogique de reproduction animale</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Constant Fabienne, Maître de conférences * - Dr Desbois Christophe, Maître de conférences (rattaché au DEPEC) - Dr Mauffré Vincent, Maître de conférences <p>Unité pédagogique de zootechnie, économie rurale</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Arné Pascal, Maître de conférences - Pr Bossé Philippe * - Dr De Paula Reis Alline, Maître de conférences - Pr Grimard-Ballif Bénédicte - Dr Leroy-Barassin Isabelle, Maître de conférences - Pr Ponter Andrew - Dr Wolgust Valérie, Praticien hospitalier |
|--|---|

Département des sciences biologiques et pharmaceutiques (DSBP)

Chef du département : Dr Desquilbet Loïc - **Adjoint** : Pr Pilot-Storck Fanny

| | |
|---|---|
| <p>Unité pédagogique d'anatomie des animaux domestiques</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Boissady Emilie, Maître de conférences contractuelle - Pr Chateau Henry - Pr Crevier-Denoix Nathalie - Pr Robert Céline * <p>Unité pédagogique de bactériologie, immunologie, virologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Boulouis Henri-Jean - Pr Eloit Marc - Pr Le Poder Sophie - Dr Le Roux Delphine, Maître de conférences * <p>Unité pédagogique de biochimie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Bellier Sylvain * - Dr Lagrange Isabelle, Praticien hospitalier - Dr Michaux Jean-Michel, Maître de conférences <p>Discipline : éducation physique et sportive</p> <ul style="list-style-type: none"> - M. Philips Pascal, Professeur certifié <p>Unité pédagogique d'histologie, anatomie pathologique</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Cordonnier-Lefort Nathalie, Maître de conférences - Pr Fontaine Jean-Jacques - Dr Laloy Eve, Maître de conférences - Dr Reyes-Gomez Edouard, Maître de conférences * | <p>Unité pédagogique de management, communication, outils scientifiques</p> <ul style="list-style-type: none"> - Mme Conan Muriel, Professeur certifié (Anglais) - Dr Desquilbet Loïc, Maître de conférences (Biostatistique, Epidémiologie) - Dr Fournel Christelle, Maître de conférences contractuelle (Gestion et management) * - Dr Marnigac Geneviève, Maître de conférences <p>Unité de parasitologie, maladies parasitaires, dermatologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Blaga Radu, Maître de conférences (rattaché au DPASP) - Dr Cochet-Faivre Noëlle, Praticien hospitalier (rattachée au DEPEC) - Dr Darmon Céline, Maître de conférences contractuelle (rattachée au DEPEC) - Pr Guillot Jacques * - Dr Polack Bruno, Maître de conférences - Dr Risco-Castillo Véronica, Maître de conférences <p>Unité pédagogique de pharmacie et toxicologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Kohlhauer Matthias, Maître de conférences - Dr Perrot Sébastien, Maître de conférences * - Pr Tissier Renaud <p>Unité pédagogique de physiologie, éthologie, génétique</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Chevallier Lucie, Maître de conférences (Génétique) - Dr Crépeaux Guillemette, Maître de conférences (Physiologie, Pharmacologie) - Pr Gilbert Caroline (Ethologie) - Pr Pilot-Storck Fanny (Physiologie, Pharmacologie) - Pr Tiret Laurent (Physiologie, Pharmacologie) * |
|---|---|

* responsable d'unité pédagogique

Professeurs émérites :

Mmes et MM. : Bénét Jean-Jacques, Chermette René, Combrisson Hélène, Enriquez Brigitte, Niebauer Gert, Panthier Jean-Jacques, Paragon Bernard.

REMERCIEMENTS

À Monsieur le Professeur à la faculté de Médecine de Créteil,

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse,

Mes hommages respectueux.

À Madame la Professeure Caroline Gilbert,

À Monsieur le Professeur Stéphane Blot,

Pour avoir accepté de diriger cette thèse, pour m'avoir permis de réaliser ce travail avec une liberté certaine et pour leur confiance,

Mes plus vifs remerciements.

À Monsieur le Professeur Loïc Desquilbet,

Pour avoir accepté d'être assesseur de cette thèse, pour son regard critique et sincère,

Mes plus vifs remerciements.

À Madame la Docteure Inès Barthélémy,

À Madame la Professeure Fanny Storck,

Pour leur investissement et leur aide sans faille, leurs précieux conseils, leurs relectures attentives et pour toutes ces discussions passionnantes,

Mes plus vifs remerciements.

À Monsieur le Docteur Nicolas Blanchard,

Pour son aide et pour sa persévérance à toute épreuve,

Mes plus sincères remerciements.

À l'ensemble de de l'unité d'étude et de thérapie des myopathies,

Pour son aide et pour sa patience,

Mes sincères remerciements.

À mes parents,

Pour avoir toujours été présents, pour votre soutien sans faille, pour m'avoir permis d'arriver jusque-là, pour être formidables, pour avoir sû affronter toutes ces épreuves.

À mes frères,

Pour avoir été à mes côtés depuis toujours.

À Marguerite,

Pour ton amour, pour tout ce que nous avons vécu depuis quatre ans, pour tout ce que nous allons vivre. Je t'aime.

À Antoine,

Pour ton soutien sans faille, pour être un ami, pour tout ce que tu m'as apporté.

À Le Page et Astrugue,

Pour ces cinq années passées à vos côtés, pour nos discussions passionnantes et pour tout ce que nous avons vécu.

À Legentil et Ollivier,

Pour être des poulots en or et pour tout ce que nous avons partagé.

À Boireau,

Pour avoir été une ANCIENNE formidable.

À la famille Guillot,

Pour m'avoir donné une deuxième famille, avoir été attentionné et m'avoir toujours accueilli les bras ouverts.

À mes amis Sanctoludoviens,

Pour ces deux années de galère, pour ce lien que nous entretenons depuis. J'espère qu'il perdurera.

À mes amis Alforiens,

Pour avoir vécu des années formidables à vos côtés. J'espère qu'il y en aura d'autres.

À mes amis Toulousains,

Pour cette année à venir.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|--|-----------|
| TABLE DES MATIÈRES | 1 |
| LISTE DES TABLEAUX | 7 |
| LISTE DES FIGURES | 9 |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS | 11 |
| INTRODUCTION | 17 |
| PREMIÈRE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE | 19 |
| I. Étude moléculaire | 21 |
| A. Du gène aux protéines | 21 |
| 1. Gène de la dystrophine..... | 21 |
| 2. Transcription et épissage..... | 21 |
| 3. Organisation de la protéine..... | 22 |
| a. <i>Structure générale</i> | 22 |
| b. <i>Spécificité de structure des isoformes tronquées</i> | 23 |
| 4. Localisation des différentes isoformes..... | 24 |
| a. <i>Dans le système nerveux central</i> | 24 |
| b. <i>Dans les autres organes</i> | 26 |
| B. Étiologie de la dystrophie musculaire de Duchenne | 26 |
| 1. Chez l'Homme | 26 |
| 2. Chez le Chien | 27 |
| 3. Chez la Souris..... | 28 |
| II. Étude physiopathologique | 29 |
| A. Rôles de la dystrophine dans le système nerveux central | 29 |
| 1. Fonction des régions cérébrales exprimant la dystrophine..... | 29 |
| a. <i>L'hippocampe</i> | 29 |
| b. <i>Le cortex cérébral</i> | 31 |
| i. <i>Aires corticales primaires</i> | 31 |
| ii. <i>Aires associatives</i> | 33 |
| c. <i>L'amygdale cérébrale</i> | 34 |
| d. <i>Le cervelet</i> | 34 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 2. | Les complexes dystrophine-glycoprotéines | 35 |
| 3. | Rôle de la dystrophine dans les synapses..... | 37 |
| | a. <i>Synapses inhibitrices</i> | 37 |
| | b. <i>Synapses excitatrices</i> | 39 |
| 4. | Rôle de la dystrophine dans la glie..... | 40 |
| | a. <i>Organisation générale de la glie</i> | 40 |
| | b. <i>Rôle de la dystrophine dans la barrière hémato-encéphalique</i> | 41 |
| | c. <i>Rôle de la dystrophine dans la barrière sang – liquide cébrospinal</i> | 42 |
| | d. <i>Rôle de la dystrophine dans les synapses</i> | 43 |
| 5. | Rôle de la dystrophine dans le développement de l'encéphale..... | 43 |
| 6. | Rôle de la dystrophine dans la plasticité cérébrale..... | 44 |
| | a. <i>Définitions et mécanismes généraux</i> | 44 |
| | i. <i>Plasticité à court terme</i> | 45 |
| | ii. <i>Plasticité à long terme</i> | 45 |
| | b. <i>Complexes dystrophine-glycoprotéines et plasticité neuronale</i> | 48 |
| | c. <i>Complexes dystrophine-glycoprotéines et plasticité non neuronale</i> | 50 |
| B. | Pathogénie neurocomportementale liée à la perte de la dystrophine | 50 |
| 1. | Chez l'humain atteint de la myopathie de Duchenne | 50 |
| | a. <i>Troubles structuraux</i> | 50 |
| | b. <i>Troubles fonctionnels</i> | 51 |
| 2. | Chez la souris <i>mdx</i> | 52 |
| | a. <i>Troubles structuraux</i> | 52 |
| | b. <i>Troubles fonctionnels</i> | 53 |
| | i. <i>Synapses inhibitrices</i> | 53 |
| | ii. <i>Synapses excitatrices</i> | 53 |
| | iii. <i>Métabolisme</i> | 54 |
| III. | Étude clinique | 55 |
| A. | Troubles musculaires..... | 55 |
| 1. | Chez l'humain atteint de la myopathie de Duchenne | 55 |
| 2. | Chez la souris <i>mdx</i> | 56 |
| 3. | Chez le chien GRMD | 56 |
| B. | Troubles neurocognitifs..... | 57 |
| 1. | Chez l'humain atteint de la myopathie de Duchenne | 57 |
| | a. <i>Troubles intellectuels</i> | 57 |
| | b. <i>Troubles comportementaux et psychosociaux</i> | 59 |

| | | |
|--|---|-----------|
| c. | <i>Troubles psychiatriques</i> | 60 |
| d. | <i>Troubles neurologiques</i> | 60 |
| 2. | Chez la souris <i>mdx</i> | 60 |
| a. | <i>Réactivité au stress et à la peur</i> | 60 |
| b. | <i>Comportements liés à l'anxiété</i> | 62 |
| c. | <i>Comportements exploratoires et locomotion</i> | 63 |
| d. | <i>Troubles de la mémoire</i> | 63 |
| e. | <i>Troubles neurologiques</i> | 64 |
| 3. | Chez le chien GRMD | 64 |
| C. | Troubles sensoriels | 64 |
| 1. | Troubles de la vision | 64 |
| 2. | Troubles de l'audition..... | 67 |
| 3. | Troubles de l'olfaction..... | 68 |
| D. | Troubles de l'hémostase | 68 |
| E. | Troubles de la reproduction | 69 |
| IV. | À la recherche de biomarqueurs d'atteinte neurocognitive | 69 |
| 1. | Le peptide β -amyloïde comme biomarqueur de troubles cognitifs | 70 |
| a. | <i>Origine</i> | 70 |
| b. | <i>Peptide β-amyloïde et troubles cognitifs</i> | 71 |
| c. | <i>Vers la validation d'un biomarqueur chez le patient atteint de la myopathie de Duchenne</i> | 72 |
| d. | <i>Et chez le chien GRMD ?</i> | 73 |
| 2. | Biomarqueurs de processus régénératifs des lésions cérébrales | 74 |
| a. | <i>Préambule</i> | 74 |
| b. | <i>Nerve Growth Factor</i> | 74 |
| c. | <i>Cellules exprimant la protéine CD34</i> | 74 |
| d. | <i>Cellules exprimant la protéine CD45</i> | 75 |
| e. | <i>Cellules exprimant la protéine Nestin</i> | 75 |
| V. | Bilan | 75 |
| DEUXIÈME PARTIE : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE | | 79 |
| I. | Objectifs de l'étude | 81 |
| II. | Objectif 1 – Étude de la répartition des isoformes de dystrophine dans le système nerveux central par western blot | 82 |

| | |
|---|-----------|
| A. Matériels et méthodes..... | 82 |
| 1. Animaux..... | 82 |
| 2. Extraction et dosage des protéines | 83 |
| 3. Électrophorèse | 83 |
| 4. Transfert en phase liquide..... | 83 |
| 5. Immuno-blot | 83 |
| B. Résultats | 84 |
| C. Discussion | 85 |
| III. Objectif 2 – Étude de faisabilité de l'évaluation de l'atteinte cognitive | 86 |
| A. Matériels et méthodes..... | 86 |
| 1. Animaux..... | 86 |
| 2. Examen clinique | 87 |
| 3. Dispositif expérimental..... | 88 |
| 4. Test d'appétence | 88 |
| 5. <i>Openfield</i> | 88 |
| 6. Conditionnement opérant | 89 |
| 7. <i>Holeboard</i> | 90 |
| 8. Analyses statistiques..... | 93 |
| B. Résultats | 93 |
| 1. Animaux..... | 93 |
| 2. <i>Openfield</i> | 94 |
| 3. Conditionnement opérant | 95 |
| 4. <i>Holeboard</i> | 96 |
| C. Discussion | 98 |
| 1. <i>Openfield</i> | 98 |
| a. <i>Faisabilité et anxiété</i> | 98 |
| b. <i>Activité</i> | 99 |
| c. <i>Intérêts et limites de la tâche</i> | 99 |
| d. <i>Pistes d'amélioration</i> | 99 |
| 2. Conditionnement opérant | 99 |
| a. <i>Faisabilité</i> | 99 |
| b. <i>Courbe d'apprentissage</i> | 100 |
| c. <i>Intérêts et limites de la tâche</i> | 100 |

| | | |
|----------------------------|---|------------|
| d. | <i>Pistes d'amélioration</i> | 100 |
| 3. | <i>Holeboard</i> | 101 |
| a. | <i>Faisabilité</i> | 101 |
| b. | <i>Courbes d'apprentissages</i> | 102 |
| c. | <i>Intérêts et limites de la tâche</i> | 102 |
| d. | <i>Pistes d'amélioration</i> | 103 |
| 4. | Effets d'une tâche cognitive sur la facilitation d'apprentissage | 104 |
| 5. | Application aux essais thérapeutiques | 105 |
| 6. | Proposition d'autres tâches d'évaluation cognitive pour des études futures | 105 |
| a. | <i>Labyrinthe en T</i> | 105 |
| b. | <i>Tâche de non-appariement différé à une position</i> | 106 |
| i. | <i>Paradigme expérimental</i> | 106 |
| ii. | <i>Variantes</i> | 107 |
| c. | <i>Tâche de discrimination d'objet et d'apprentissage inversé</i> | 108 |
| | | |
| IV. | Objectif 3 – Recherche d'un biomarqueur par mesure plasmatique de peptide β-amyloïde 42 par ELISA | 108 |
| A. | Matériels et méthodes..... | 108 |
| 1. | Animaux..... | 108 |
| 2. | Procédure | 109 |
| 3. | Analyses statistiques..... | 110 |
| B. | Résultats | 110 |
| 1. | Animaux..... | 110 |
| 2. | Courbe standard..... | 110 |
| 3. | Mesure plasmatique de peptide β -amyloïde 42 dans l'échantillon..... | 111 |
| C. | Discussion | 112 |
| | | |
| CONCLUSION | | 115 |
| BIBLIOGRAPHIE | | 117 |
| ANNEXES | | 135 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|-----|
| Tableau 1 – Expression des différentes isoformes de dystrophine dans le système nerveux central en fonction des promoteurs du gène au cours des différents stades de la vie de l'individu..... | 25 |
| Tableau 2 - Détail des chiens prélevés | 82 |
| Tableau 3 – Détail des chiens évalués cognitivement | 87 |
| Tableau 4 – Comparaison des valeurs de l'examen clinique des chiens GRMD et des chiens sains | 94 |
| Tableau 5 – Comparaisons post-hoc du ratio de mémoire de référence au cours des cinq sessions d'entraînement du <i>holeboard</i> | 98 |
| Tableau 6 - Détail des chiens prélevés | 109 |
| Tableau 7 – Résultats de l'analyse du modèle linéaire à effets mixtes | 111 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| Figure 1 – Organisation du gène de la dystrophine..... | 21 |
| Figure 2 – Organisation des isoformes de 427 kDa de la dystrophine..... | 23 |
| Figure 3 – Organisation des isoformes de la dystrophine..... | 24 |
| Figure 4 – Localisation des mutations sur le gène de la dystrophine chez le chien..... | 28 |
| Figure 5 – Schéma du fonctionnement général de l'hippocampe..... | 30 |
| Figure 6 – Vue latérale de l'hémisphère cérébral montrant les aires somesthésiques primaires chez le chien..... | 31 |
| Figure 7 – Voies visuelles centrales impliquées dans la perception consciente..... | 32 |
| Figure 8 – Organisation du cortex cérébelleux..... | 35 |
| Figure 9 – Localisation des complexes dystrophine-glycoprotéines dans les cellules cérébrales..... | 36 |
| Figure 10 – Organisation hypothétique de la synapse GABAergique..... | 38 |
| Figure 11 – Organisation de la membrane gliale et constitution de la barrière hémato-encéphalique..... | 41 |
| Figure 12 – Organisation de la membrane des pieds astrocytaires périvasculaires..... | 42 |
| Figure 13 – Modèle du transport cellulaire de l'AMPA durant la potentialisation et la dépression à long terme..... | 47 |
| Figure 14 – Quotient intellectuel global en fonction de l'effet cumulatif de la perte des isoformes de dystrophine chez les patients atteints de la myopathie de Duchenne..... | 58 |
| Figure 15 – Électrorétinogrammes de cônes et bâtonnets chez des patients atteints de la myopathie de Duchenne présentant uniquement une perte de la Dp427 et des témoins..... | 65 |
| Figure 16 – Électrorétinogrammes chez un chien GRMD (3,5 ans) et un témoin assorti du même âge..... | 66 |
| Figure 17 – Potentiels évoqués auditifs chez la souris <i>mdx</i> | 68 |
| Figure 18 – Mécanisme de protéolyse de l' <i>Amyloid Precursor Protein</i> en peptide β -amyloïde..... | 71 |
| Figure 19 – Résultats du western blot avec marquage du domaine ROD et du domaine C-terminal de la dystrophine dans le cortex, le cervelet et l'hippocampe chez un chien sain et trois chien GRMD..... | 85 |

| | |
|--|-----|
| Figure 20 – Exemple de western blot avec marquage du domaine C-terminal de la dystrophine et exposition photographique longue chez un chien sain | 86 |
| Figure 21 - Photographie de Jappy dans l'openfield | 89 |
| Figure 22 - Photographie de Jt lors du conditionnement opérant | 90 |
| Figure 23 – Schéma d'un pot en coupe longitudinale | 91 |
| Figure 24 - Photographie de Febreze lors du premier jour de la phase d'habituation | 92 |
| Figure 25 – Schéma des deux motifs de pots récompensés..... | 92 |
| Figure 26 – Résultat de l' <i>openfield</i> | 95 |
| Figure 27 – Nombre d'essais réussis en fonction des sessions de conditionnement opérant | 96 |
| Figure 28 – Nombre de pots visités en fonction des sessions d'habituation du <i>holeboard</i> | 97 |
| Figure 29 – Résultat des sessions d'entraînement du <i>holeboard</i> | 97 |
| Figure 30 - Schéma du labyrinthe en T..... | 106 |
| Figure 31 - Schéma du paradigme expérimental de la tâche de <i>delayed non-matching to position</i> (DNMP)..... | 107 |
| Figure 32 - Courbe standard de la densité optique en fonction de la concentration sérique de peptide β -amyloïde 42..... | 111 |
| Figure 33 – Comparaison de la concentration sérique en peptide β -amyloïde 42 entre les chiens sains et les chiens GRMD..... | 112 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AMPAR : récepteur activé par l'acide alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique

APP : *Amyloid Precursor Protein* (protéine précurseur de l'amyloïde)

AQP4 : Aquaporine de type 4

ARN_m : Acide RiboNucléique messenger

Aβ : Peptide β-amyloïde

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

CA : aire de la Corne d'Ammon

CCDS : *Canine Cognitive Dysfunction Syndrome* (syndrome de dysfonctionnement cognitif canin)

CKCS-MD : *Cavalier King Charles Spaniels with dystrophin-deficient Muscular Dystrophy* (Cavalier King Charles déficient en dystrophine musculaire)

CXMDJ : beagle-based Canine X-linked Muscular Dystrophy in Japan (dystrophie musculaire canine liée à l'X issus de Beagle au Japon)

DGC : *Dystrophin-Glycoproteins Complex* (complexe dystrophine-glycoprotéines)

DMD : *Duchenne Muscular Dystrophy* (dystrophie musculaire de Duchenne)

DMTP : *Delayed Matching To Position task* (tâche d'appariement différé à une position)

DMTS : *Delayed Matching To Sample task* (tâche d'appariement différé à un modèle)

DNMTP : *Delayed Non-Matching To Position task* (tâche de non-appariement différé à une position)

DNMTS : *Delayed Non-Matching To Sample task* (tâche de non-appariement différé à un modèle)

Dp : Dystrophine

ELISA : *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (dosage d'immunoabsorption par enzyme liée)

ERG : Électrorétinogramme

GABA : *Gamma-AminoButyric Acid* (acide γ-aminobutyrique)

GEF : *Guanine Exchange Factor* (facteur d'échange de la guanine)

GRMD : *Golden Retriever Muscular Dystrophy* (dystrophie musculaire du Golden Retriever)

GSHPMD : *German Short Haired Pointer model for Duchenne Muscular Dystrophy* (Braque allemand à poil court modèle de la dystrophie musculaire de Duchenne)

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

kDa : kiloDalton

LCS : Liquide CérébroSpinal

LINE : *Long Interspersed Nuclear Element* (long élément nucléaire intercalé)

LRMD : *Labrador Retriever Muscular Dystrophy* (dystrophie musculaire du Labrador Retriever)

LTD : *Long-Term Depression* (dépression à long terme)

LTP : *Long-Term Potentiation* (potentialisation à long terme)

MAGUK : *Membrane-Associated GUanylate Kinase* (guanylate kinase associée à la membrane)

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

NL2 : NeuroLigine de type 2

NMDAR : récepteur activé par le N-Méthyl-D-Aspartate

nNOS : *neuronal Nitric Oxide Synthase* (oxyde nitrique synthase neuronale)

OP : *Oscillatory Potentials* (potentiels oscillatoires)

PPSE : Potentiel PostSynaptique Excitateur

PPSI : Potentiel PostSynaptique Inhibiteur

PSD : *Post-Synaptic Density* (densité postsynaptique)

PTP : *Post-Tetanic Potentiation* (potentialisation post-tétanique)

QI : Quotient Intellectuel

RMR : *Reference Memory Ratio* (ratio de mémoire de référence)

RT-PCR : *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (amplification en chaîne par polymérase après transcription inverse)

SNC : Système Nerveux Central

STD : *Short-Term Depression* (dépression à court terme)

STP : *Short-Term Potentiation* (potentialisation à court terme)

S-SCAM : *Synaptic-SCAffolding Molecule* (molécule d'échafaudage synaptique)

TBARS : *Thiobarbituric Acid Reactive Substances* (substances réagissant à l'acide thiobarbiturique)

WMR : *Working Memory Ratio* (ratio de mémoire de travail)

« Entre le possible et le souhaitable se dessine la frontière entre la biologie et l'éthique. Nous avons acquis, un jour, par hasard, au détour des avatars du vivant dans le corps de nos ancêtres, le pouvoir d'influer, en tant qu'individus, sur le cours « naturel » des choses. Le pouvoir d'imaginer, et de comprendre le monde – de le modifier à mesure que nous le comprenons et de le comprendre et de l'imaginer à mesure que nous le modifions. C'est un pouvoir merveilleux et terrible. Il nous a donné l'extraordinaire capacité de nous libérer, pour partie, des règles du jeu de la matière du vivant qui nous ont fait naître, après plusieurs milliards d'années. Mais ce pouvoir inouï nous impose aussi sans doute, en retour, un devoir. Si nous sommes les enfants d'une évolution aveugle qui nous a donné naissance sans nous « prévoir » ni nous « anticiper », nous avons nous-mêmes acquis un jour le pouvoir de prévoir. D'imaginer à l'avance les conséquences possibles de nos actes au-delà de la durée de notre existence. D'inventer les règles du jeu que nous acceptons de jouer. Indissociable de notre capacité de comprendre et de changer le cours du vivant, se dessine une autre aventure, celle de nos choix, de nos codes de conduite, le devoir de nous penser responsables de nos actes. La pratique exigeante et difficile que nous appelons l'éthique. »

– **Jean-Claude Ameisen**, *La sculpture du vivant : le suicide cellulaire ou la mort créatrice*

INTRODUCTION

Le gène *DMD*, codant pour la dystrophine, est l'un des plus longs du génome humain. Il est exprimé dans de nombreux tissus. La dystrophine y joue un rôle structural et fonctionnel fondamental. Chez l'Homme, lorsqu'une mutation de ce gène conduit à la production d'une protéine tronquée non fonctionnelle, survient la dystrophie musculaire de Duchenne. Au niveau mondial, il s'agit de la dystrophie musculaire la plus fréquente avec une incidence estimée à 1 cas pour 3500 naissances de garçons (Emery, 1991). Elle est très handicapante et réduit considérablement la durée de vie. Les progrès thérapeutiques ont permis de doubler l'espérance de vie pour atteindre 30 à 40 ans (Kieny *et al.*, 2013).

Bien que les troubles les plus importants soient d'ordre musculaire, il est aujourd'hui admis qu'une mutation du gène codant pour la dystrophine induise des troubles cognitifs. La compréhension des conséquences neurocomportementales et psychosociales semble aujourd'hui fondamentale. Ces troubles ont un impact majeur sur la qualité de vie des patients et de leur entourage. En particulier, les déficits cognitifs et leurs conséquences sur les performances académiques de ces enfants – vivant déjà dans des conditions physiques difficiles – peuvent avoir un effet négatif sur leur qualité de vie (Snow *et al.*, 2013a). De plus, le fonctionnement neurocomportemental et psychosocial de ces patients peut avoir un impact sur la compréhension et l'observance des traitements. Par exemple, les anti-inflammatoires stéroïdiens sont aujourd'hui le traitement de référence pour retarder la progression de la maladie. Or la principale raison de sa mauvaise observance ou de son arrêt est la présence d'effets secondaires importants sur l'humeur et le comportement. Ainsi, comprendre les conséquences de la maladie permettrait d'aider à distinguer les problèmes comportementaux et émotionnels liés à la maladie de ceux induits par les anti-inflammatoires stéroïdiens ; et ainsi aider à leur bonne observance (Poysky, 2007).

A l'heure actuelle, seul le modèle murin *mdx* a été étudié sur le plan neurocognitif. Cependant il ne présente que de faibles altérations musculaires et locomotrices, contrairement aux patients myopathes et au modèle canin Golden Retriever. Il semble ainsi essentiel d'étudier ce dernier afin de mieux comprendre l'atteinte neurocognitive secondaire à la mutation.

Le but de cette thèse est ainsi de décrire la comorbidité neurocognitive liée à la perte de l'isoforme de 427 kilodaltons de la dystrophine chez le Golden Retriever. Il sera discuté de la faisabilité de tests éthologiques en lien avec les difficultés motrices de ces chiens. L'objectif à terme est d'inclure l'évaluation neurocognitive dans les essais thérapeutiques et d'améliorer les conditions de vie de ces animaux en tenant compte des éventuelles altérations cognitives qui seront identifiées.

PREMIÈRE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Étude moléculaire

A. Du gène aux protéines

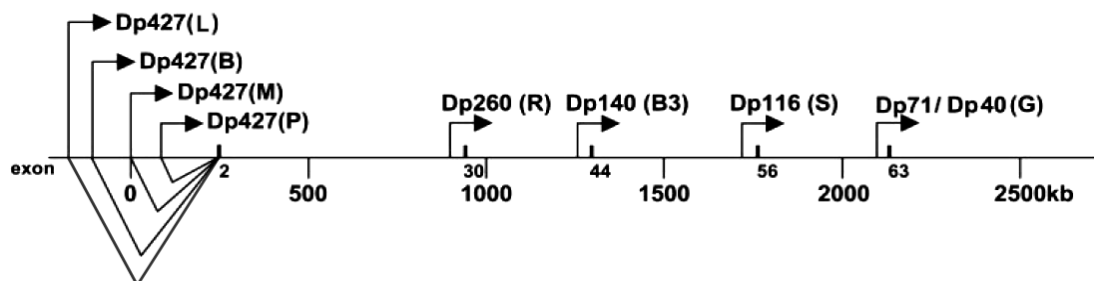
1. Gène de la dystrophine

La dystrophine est une protéine codée par le gène *DMD* porté par le chromosome X sur le locus Xp21. C'est un des plus longs gènes du génome humain. Il mesure environ 2,5 millions de paires de bases et est constitué de 79 exons. Les introns comptent pour 99 % du gène (Blake *et al.*, 2002).

2. Transcription et épissage

La séquence comprend huit promoteurs (Figure 1). Les quatre premiers sont régulés indépendamment et sont situés dans le premier exon. On les nomme L (*Lymphocyte*), B (*Brain*), M (*Muscle*) et P (*Purkinje cells*). Ils codent les isoformes *full-length* longues de 427 kDa (Dp427). On suppose que ces quatre isoformes ont un fonctionnement analogue car elles ne diffèrent que de quelques acides aminés. Les quatre autres promoteurs sont internes au gène. Ils sont à l'origine d'acides ribonucléiques messagers (ARN_m) plus courts, codant pour des isoformes tronquées en partie C-terminale : R (*Retinal*), B3 (*Brain-3*), S (*Schwann cells*) et G (*General*), codant respectivement les isoformes de 260 kDa (Dp260), 140 kDa (Dp140), 116 kDa (Dp116) et 71 kDa (Dp71) (Blake *et al.*, 2002). Une isoforme de 40 kDa a été mise en évidence chez le rat (Tinsley *et al.*, 1993). Elle proviendrait du même promoteur que la Dp71, et partagerait donc une séquence en partie N-terminale identique. En revanche, cette isoforme diffère par sa séquence C-terminale provenant d'un arrêt au niveau de l'exon 70 au lieu de l'exon 79 (Tozawa *et al.*, 2012).

Figure 1 - Organisation du gène de la dystrophine (d'après Blake *et al.*, 2002 ; Waite *et al.*, 2012). Les flèches indiquent le sens de lecture du gène 5' → 3'.



Un épissage alternatif en région 3' de l'ARN messager générerait un plus grand nombre d'isoformes (Feener *et al.*, 1989). Il permettrait de réguler le site d'attachement de la dystrophine aux protéines membranaires (Blake *et al.*, 2002). Par exemple il a été

montré que l'épissage alternatif de la Dp71 serait responsable d'une modulation de sa localisation subcellulaire dans les différentes lignées cellulaires (Marquez *et al.*, 2003).

Le passage du gène de la dystrophine à la protéine finale est donc un phénomène complexe, permettant d'obtenir un grand nombre d'isoformes exprimées dans des types cellulaires et tissulaires variés. Cela illustre l'importance de ce gène dans l'organisme et laisse supposer de multiples fonctions.

3. Organisation de la protéine

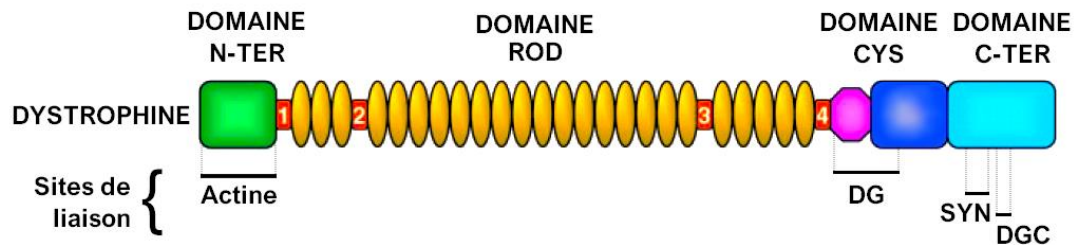
a. Structure générale

La Dp427 est une protéine du cytosquelette divisée en quatre parties (Figure 2 ; Koenig *et al.*, 1988) :

- 1) **Le domaine N-terminal** ne varie que de quelques acides aminés selon les isoformes, en lien avec la position du promoteur sur le premier exon. Il contient au moins trois sites de liaison à l'actine (Rybakova *et al.*, 1996). Il comprend également deux sites d'interaction avec la calmoduline (Bonet-Kerrache *et al.*, 1994 ; Jarrett et Foster, 1995) ;
- 2) **Le domaine central en bâtonnets (ROD)** est composé de 24 unités de triples hélices α répétées semblables à celles présentes dans la β -spectrine et l' α -actinine. Ces unités sont interrompues en quatre endroits par des régions riches en proline, donnant à la protéine une structure flexible (Koenig et Kunkel, 1990). Le domaine ROD contient notamment le site de liaison avec l'oxyde nitrique synthase neuronale (*neuronal Nitric Oxide Synthase*, nNOS) (Zhao *et al.*, 2016) ;
- 3) **Le domaine riche en cystéines** possède deux sites de liaison au calcium, un site de liaison au zinc et un site de liaison à la protéine transmembranaire β -dystroglycane (Koenig *et al.*, 1988 ; Ponting *et al.*, 1996) ;
- 4) **Le domaine C-terminal** possède un site de liaison à la syntrophine et un site de liaison au complexe dystrophine-glycoprotéines (*Dystrophin-Glycoproteins Complex*, DGC) (Sadoulet-Puccio *et al.*, 1997 ; Waite *et al.*, 2012).

Il existe une grande homologie de structure protéique entre les espèces (humain, poule, chien, porc, *etc.*) particulièrement en région C-terminale, suggérant un rôle essentiel de cette région dans les différentes fonctions cellulaires (Lemaire *et al.*, 1988 ; Mehler, 2000).

Figure 2 – Organisation des isoformes de 427 kDa de la dystrophine (d'après Blake *et al.*, 2002). La dystrophine est organisée en quatre domaines : NH₂-terminal (N-TER) ; central (ROD) ; riche en cystéines (CYS) ; et COOH-terminal (C-TER). Les régions riches en proline au sein du domaine *ROD* sont numérotées de 1 à 4. La dystrophine possède des sites de liaison à l'actine, au β -dystroglycane (DG), aux syntrophines (SYN) et au complexe dystrophine-glycoprotéines (DGC).



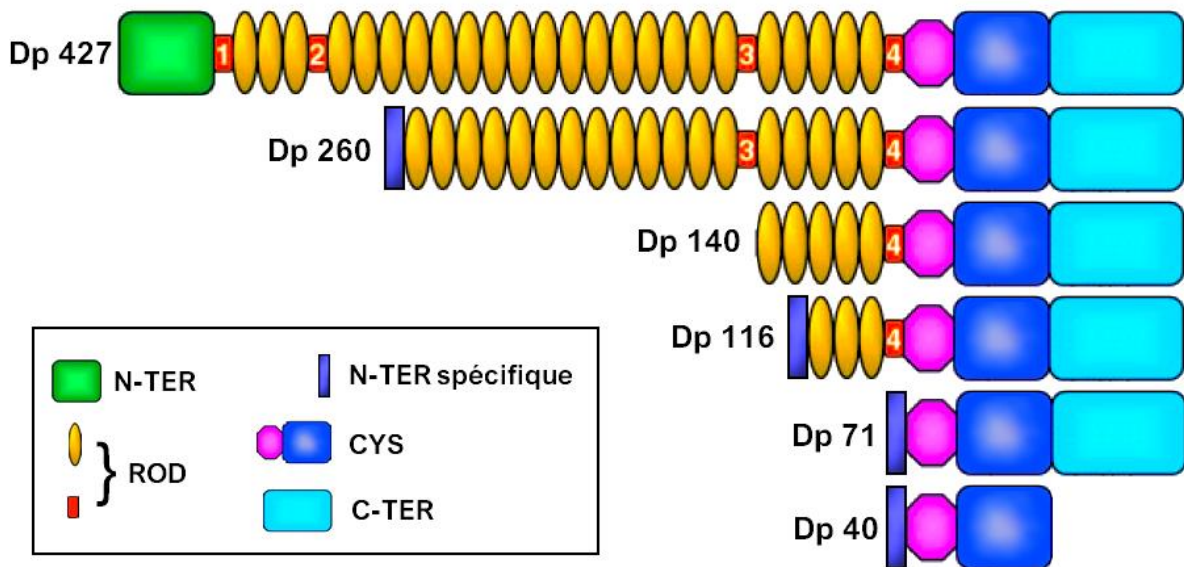
b. Spécificité de structure des isoformes tronquées

Les promoteurs internes du gène codant pour la dystrophine (R, B3, S et G) sont à l'origine de séquences tronquées en partie 5'. Il en résulte des isoformes tronquées en partie N-terminale avec le plus souvent un premier exon spécifique (Figure 3) :

- 1) **La Dp260**, dont la transcription débute à l'exon 30, possède 13 acides aminés spécifiques dans sa partie N-terminale ;
- 2) **La Dp140**, dont la transcription débute à l'exon 45, présente une partie N-terminale confondue avec le domaine central. C'est la seule isoforme ne présentant pas d'acides aminés spécifiques par rapport à la Dp427 ;
- 3) **La Dp116**, dont la transcription débute à l'exon 56, possède 15 acides aminés spécifiques en partie N-terminale ;
- 4) **La Dp71**, dont la transcription débute à l'exon 63, ne possède pas de domaine central. Sa partie N-terminale est constituée de sept acides aminés spécifiques et constitue un site de liaison à l'actine (Howard *et al.*, 1998) ;
- 5) **La Dp40** ne possède ni le domaine central, ni le domaine C-terminal des autres isoformes. Ceci a pour conséquence l'inefficacité des anticorps généralement utilisés pour marquer les autres isoformes car ils sont pour la plupart spécifiques de la partie C-terminale. En revanche, sa partie N-terminale est identique à celle de la Dp71 (Tozawa *et al.*, 2012).

Les domaines riches en cystéines et C-terminal sont conservés dans les isoformes tronquées de la dystrophine, hors Dp40 (Blake *et al.*, 2002).

Figure 3 – Organisation des isoformes de la dystrophine (d'après Blake *et al.*, 2002 ; Tozawa *et al.*, 2012). Les isoformes tronquées de la dystrophine possèdent pour la plupart une partie N-terminale (N-TER) spécifique. Seules les Dp71 et Dp40 ne possèdent pas de domaine central (ROD). Seule la Dp40 ne possède pas le domaine C-terminal (C-TER). En revanche, toutes les isoformes tronquées possèdent le domaine riche en cystéines (CYS).



4. Localisation des différentes isoformes

a. Dans le système nerveux central

Sept des huit promoteurs du gène codant la dystrophine sont actifs dans le système nerveux central (SNC). L'activité des promoteurs varie en fonction du type cellulaire, des tissus et du stade de développement de l'individu (Tableau 1) : (1) le promoteur B est actif dans les neurones pyramidaux du cortex cérébral et dans les aires 1 à 3 de la corne d'Ammon (CA1 à CA3) dans l'hippocampe ; (2) le promoteur M est actif dans les cellules gliales et les cellules vasculaires endothéliales ; (3) le promoteur P est actif dans les cellules de Purkinje du cervelet et le cortex cérébral fœtal ; (4) le promoteur R est actif dans les couches nucléaires interne (corps des cellules bipolaires, horizontales et amacrines) et externe (corps cellulaires des photorécepteurs et des cellules de Müller) de la rétine ; (5) le promoteur B3 est actif dans les astrocytes du neuropile au cours du développement, dans le cortex cérébral, dans le cervelet, à la surface des méninges et au niveau des vaisseaux sanguins pénétrants de la neurohypophyse et du nerf olfactif ; (6) le promoteur S est actif dans le diencéphale durant la vie fœtale et néonatale ; enfin (7) le promoteur G est actif dans les cellules souches embryonnaires, les zones d'interaction entre mésenchyme et épithélium, le mésencéphale et le rhombencéphale embryonnaires, l'encéphale périnatal et surtout le prosencéphale de l'état embryonnaire précoce à l'adulte, spécifiquement dans le cortex cérébral, les neurones granulaires dans le gyrus

denté de l'hippocampe, le bulbe olfactif, l'hypophyse, la membrane limitante interne de la rétine, la glie du cortex et du cervelet, les régions néocorticales présentant une neurogenèse continue et une plasticité synaptique (Doorenweerd *et al.*, 2017 ; D'Souza *et al.*, 1995 ; Lumeng *et al.*, 1999 ; Mehler, 2000 ; Tadayoni *et al.*, 2012 ; Tinsley *et al.*, 1993 ; Tozawa *et al.*, 2012 ; Wersinger *et al.*, 2011).

Tableau 1 - Expression des différentes isoformes de dystrophine dans le système nerveux central en fonction des promoteurs du gène au cours des différents stades de la vie de l'individu (Doorenweerd *et al.*, 2017 ; D'Souza *et al.*, 1995 ; Lumeng *et al.*, 1999 ; Mehler, 2000 ; Tadayoni *et al.*, 2012 ; Tinsley *et al.*, 1993 ; Tozawa *et al.*, 2012 ; Wersinger *et al.*, 2011).

| Promoteur | Isoforme | Localisation de l'expression de l'isoforme |
|-----------|----------|--|
| B | Dp427 | Neurones pyramidaux dans le cortex cérébral et les aires CA1 à CA3 (hippocampe) |
| M | Dp427 | Cellules gliales ; cellules vasculaires endothéliales |
| P | Dp427 | Développement : cellules de Purkinje (cervelet) ; cortex cérébral fœtal Adulte : cellules de Purkinje (cervelet) |
| R | Dp260 | Couches nucléaires interne et externe de la rétine |
| B3 | Dp140 | Développement : astrocytes du neuropile Adulte : cortex cérébral ; cervelet ; surface des méninges ; vaisseaux sanguins pénétrants de la neurohypophyse et du nerf olfactif |
| S | Dp116 | Développement : diencephale durant la vie fœtale et néonatale |
| G | Dp71 | Développement : cellules souches embryonnaires ; partie ventrale du tube neural ; mésencéphale et rhombencéphale embryonnaires ; encéphale périnatal Adulte : cortex cérébral ; neurones granulaires du gyrus denté (hippocampe) ; bulbe olfactif ; hypophyse ; régions du néocortex associées à la neurogenèse et la plasticité synaptique ; cellules gliales du cortex et du cervelet ; membrane limitante interne de la rétine |
| G | Dp40 | Développement : encéphale Adulte : hippocampe |

Les isoformes Dp427 seraient également exprimées dans les neurones pyramidaux de l'amygdale cérébrale, dans la couche nucléaire externe de la rétine (en particulier dans le corps cellulaire des bâtonnets), dans la couche plexiforme externe de la rétine (au niveau de la membrane postsynaptique des cellules bipolaires dans les synapses avec les photorécepteurs) et dans la couche nucléaire interne de la rétine (au niveau des dendrites des cellules bipolaires ON liés aux cônes et dans les cellules amacrines), bien qu'on ne connaisse pas les promoteurs spécifiquement impliqués (Sekiguchi *et al.*, 2009 ; Wersinger *et al.*, 2011). Au niveau subcellulaire, la Dp427 issue du promoteur B est présente dans les microdomaines somadendritiques (Mehler, 2000).

La Dp71 serait présente dans les vésicules synaptiques, les microsomes et les mitochondries (Mehler, 2000).

L'isoforme Dp40 est également traduite à partir du promoteur G. Elle a initialement été mise en évidence au cours du développement cérébral et dans l'hippocampe du rat par northern blot et amplification en chaîne par polymérase après transcription inverse (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*, RT-PCR), puis par western blot dans l'hippocampe de souris adultes. Des techniques d'immunoprécipitation et d'immunofluorescence ont permis de montrer une colocalisation de cette isoforme avec les vésicules présynaptiques dans l'hippocampe de souris adultes. En revanche on ne connaît pas encore sa répartition exacte car le développement d'anticorps permettant de la marquer n'est que récent (Tinsley *et al.*, 1993 ; Tozawa *et al.*, 2012).

b. Dans les autres organes

La dystrophine est exprimée dans de nombreux organes. Les promoteurs B et M, codant pour la Dp427, sont actifs dans les muscles striés et le muscle cardiaque. Le promoteur R, codant pour la Dp260, est actif dans le muscle cardiaque. Le promoteur B3, codant pour la Dp140, est actif dans le rein durant son développement et à l'âge adulte. Le promoteur S, codant pour la Dp116, est actif dans le développement des nerfs périphériques et dans les cellules de Schwann. Enfin le promoteur G, codant pour la Dp71 et la Dp40, est actif dans le foie, l'épithélium rénal, le poumon, le testicule, les plaquettes et le muscle cardiaque. La Dp71 aurait de plus un rôle dans l'adhérence entre les cellules de nombreux tissus de l'organisme et durant la mitose en régulant la localisation et la stabilité des pôles mitotiques (Austin *et al.*, 1995 ; Bar *et al.*, 1990 ; Byers *et al.*, 1993 ; D'Souza *et al.*, 1995 ; Haenggi et Fritschy, 2006 ; Lumeng *et al.*, 1999 ; Muntoni *et al.*, 2003 ; Tadayoni *et al.*, 2012).

B. Étiologie de la dystrophie musculaire de Duchenne

1. Chez l'Homme

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) a été décrite pour la première fois en 1868 par le neurologue Guillaume Duchenne de Boulogne (Duchenne, 1868). C'est une maladie génétique à transmission récessive liée au chromosome X (Cooper *et al.*, 1988). Elle affecte ainsi quasi-exclusivement les garçons et est transmise par la mère. À l'échelle mondiale, on estime l'incidence de la maladie à 1 cas pour 3500 naissances de garçons (Emery, 1991).

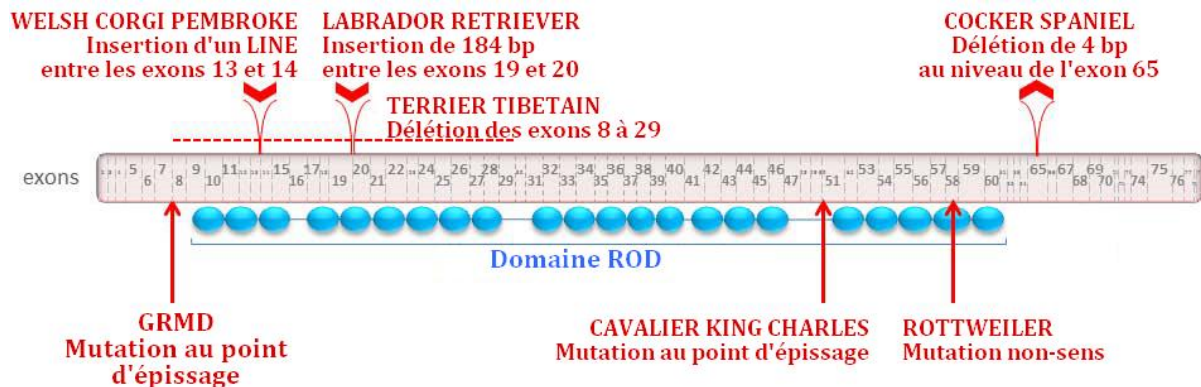
Le taux de mutation est relativement élevé : un tiers des patients DMD présenteraient une mutation *de novo*. Ceci sous-tend une large variété de mutations possibles (Bladen *et al.*, 2015). On estime que 68 % des cas de DMD correspondent à une délétion et 11 % à une duplication d'un ou plusieurs exons. Ces délétions et duplications

peuvent survenir partout sur le gène mais sont concentrées respectivement entre les exons 45 et 55, et entre les exons 2 et 10 (voir la Figure 1 pour la localisation des promoteurs). Si ces mutations ne rompent pas le cadre de lecture, le transcrit produit est plus court. Les protéines alors traduites sont modifiées en leur centre mais les domaines N- et C-terminaux sont intègres. Ces mutations sont responsables de la Dystrophie Musculaire de Becker (*Becker Muscular Dystrophy*). En revanche, lorsque les délétions et duplications rompent le cadre de lecture, il apparait des codons « stop » à l'origine de transcrits de dystrophine tronqués. Ces mutations sont responsables de la Dystrophie Musculaire de Duchenne. Il en résulte une perte du domaine permettant la jonction à la matrice extracellulaire. Ces dystrophines sont généralement non fonctionnelles et instables (Aartsma-Rus *et al.*, 2016 ; Blake *et al.*, 2002).

2. Chez le Chien

De nombreux modèles canins spontanés de la dystrophie musculaire de Duchenne ont été identifiés. Ils présentent tous une perte de dystrophine fonctionnelle (Figure 4). Dans les cas de déficience en dystrophine chez le Braque allemand à poil court (*German Short Haired Pointer model for Duchenne Muscular Dystrophy*, GSHPMD), le cocker spaniel et le terrier tibétain, la mutation incriminée est une délétion. Chez le Cocker Spaniel, il y a délétion de quatre nucléotides sur l'exon 65 en région 3'. Chez le Terrier Tibétain, les exons 8 à 29 sont délétés. Dans le cas du Welsh Corgi Pembroke déficient en dystrophine et la dystrophie musculaire du Labrador Retriever (*Labrador Retriever Muscular Dystrophy*, LRMD), la mutation incriminée est une insertion respectivement d'un long élément nucléaire intercalé (*Long Interspersed Nuclear Element*, LINE) au niveau de l'intron 13 et d'un pseudo-exon de 184 nucléotides au niveau de l'intron 19. Dans le cas de la dystrophie musculaire du Golden Retriever (*Golden Retriever Muscular Dystrophy*, GRMD), du Cavalier King Charles déficient en dystrophie musculaire (*Cavalier King Charles Spaniels with dystrophin-deficient Muscular Dystrophy*, CKCS-MD) et du Rottweiler déficient en dystrophine, la mutation incriminée est ponctuelle et se situe respectivement au niveau de l'intron 6 se traduisant par un épissage de l'exon 7 avec l'apparition rapide d'un codon stop dans l'ARN_m, au niveau de l'intron 50 se traduisant par une perte de l'exon 50 dans l'ARN_m et au niveau de l'exon 58 se traduisant par l'apparition d'un codon stop. Il a également été décrit des cas de déficience en dystrophine fonctionnelle chez le Malamute de l'Alaska, le Bobtail, le Braque de Weimar et le Lurcher mais leur nature génétique n'a pas été étudiée (Baltzer *et al.*, 2007 ; Brinkmeyer-Langford et Kornegay, 2013 ; Giannasi *et al.*, 2015 ; Ito *et al.*, 2011 ; Kornegay *et al.*, 2012 ; McGreevy *et al.*, 2015 ; Ng *et al.*, 2012 ; Schatzberg *et al.*, 1999 ; Smith *et al.*, 2011 ; Walmsley *et al.*, 2010 ; Wieczorek *et al.*, 2006).

Figure 4 – Localisation des mutations sur le gène de la dystrophine chez le chien (d'après Brinkmeyer-Langford et Kornegay, 2013). Les 79 exons du gène sont représentés. Leur taille relative est approximativement à l'échelle. Les insertions et délétions sont présentées au-dessus du gène. Les mutations ponctuelles sont représentées par des flèches en-dessous du gène.



Parmi les animaux mutants listés précédemment, il a été établi des colonies de GRMD, LRMD, GSHPM, CKCS-MD et Welsh Corgi Pembroke déficient en dystrophine. Par la suite, il a été développé une colonie croisant le GRMD et beagle (*beagle-based Canine X-linked Muscular Dystrophy in Japan, CXMD_J*). Ces chiens ont un phénotype similaire à celui des GRMD en termes d'évolution de la présentation clinique, du taux sanguin en créatinine kinase et des lésions anatomopathologiques à l'exception de la dégénérescence des fibres musculaires de la langue qui n'est pas présente chez les CXMD_J. Ces chiens présentent cependant l'avantage d'être plus petits et donc plus faciles à manipuler (Shimatsu *et al.*, 2005). Parallèlement il a été développé une colonie croisant le GRMD et le Labrador Retriever (*Golden Labrador Retriever Muscular Dystrophy, GLRMD*). Ces chiens présentent un phénotype anatomopathologique moins marqué que les GRMD, en particulier pour le degré de nécrose des myofibres et de la différenciation des types de myofibres. L'hypothèse avancée est que l'*outbreeding* pourrait diminuer la sévérité de la maladie en réduisant l'héritage simultané de gènes modificateurs potentiellement délétères (Miyazato *et al.*, 2011). Aucune de ces mutations n'ayant été étudiée du point de vue neurocognitif, nous n'aborderons que le cas du chien GRMD par la suite.

3. Chez la Souris

Bulfield *et al.* (1984) ont découvert une souris mutante (C57BL/10ScSn-Dmd<*mdx*>) présentant une dystrophie musculaire liée à l'X (*muscular dystrophy X-linked, mdx*). Cette souche présente un codon stop prématuré au niveau de l'exon 23 du gène de la dystrophine conduisant à la perte de la Dp427. En revanche, les isoformes courtes ne sont pas affectées par la mutation. La souche mutante *mdx* est aujourd'hui le principal modèle animal de la DMD (Ng *et al.*, 2012).

Depuis, six autres souches murines *mdx* ont été générées. Chez la souris *mdx*^{5cv}, la mutation est située au niveau de l'intron 10 et il y a perte de l'isoforme Dp427. Chez la

souris *mdx*^{2cv}, la mutation est située au niveau de l'intron 42 conduisant à la perte des isoformes Dp427 et Dp260. Chez les souris *mdx*⁵² et *mdx*^{4cv}, la mutation est située respectivement au niveau des exons 52 et 53, conduisant à la perte des isoformes Dp427, Dp260 et Dp140. Chez les souris *mdx* ^{β geo} et *mdx*^{3cv}, la mutation est située respectivement au niveau de l'exon 63 et de l'intron 65, conduisant à la perte des isoformes Dp427, Dp260, Dp140, Dp116 et Dp71 (Im *et al.*, 1996 ; Ng *et al.*, 2012).

La mutation GRMD n'affectant que l'isoforme Dp427 et la souche *mdx*^{5cv} n'ayant pas été étudiée sur le plan neurocognitif, nous n'aborderons que le cas de la souche *mdx* par la suite.

II. Étude physiopathologique

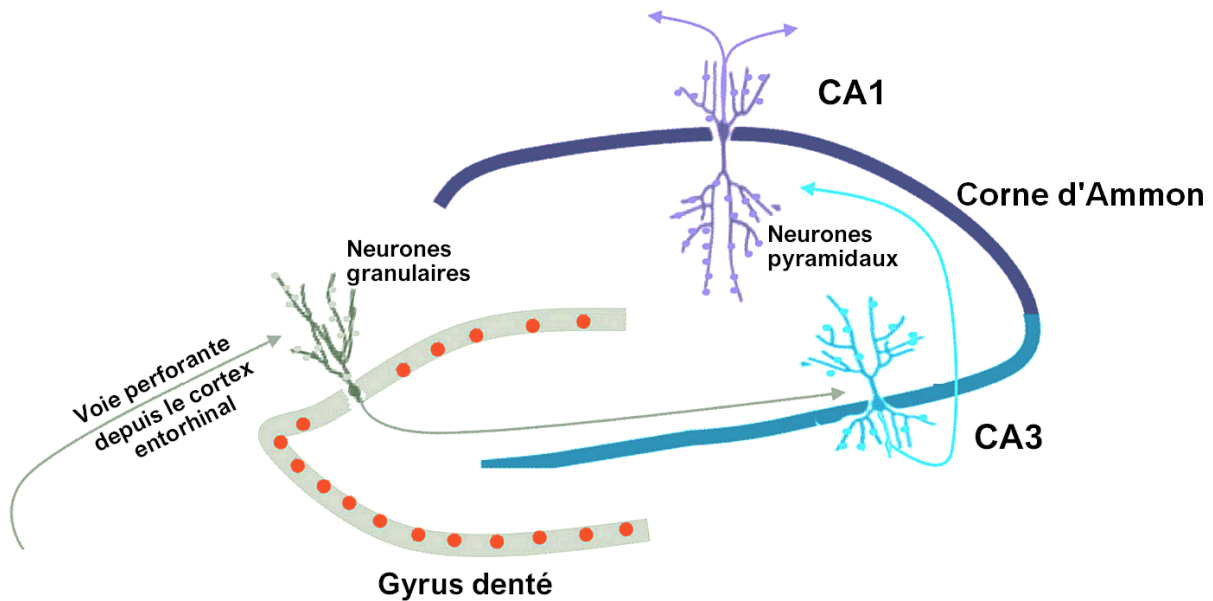
A. Rôles de la dystrophine dans le système nerveux central

1. Fonction des régions cérébrales exprimant la dystrophine

a. L'hippocampe

Les informations sensorielles corticales transitent du cortex entorhinal vers l'hippocampe, via la voie perforante (Figure 5). Elles sont ensuite simplifiées et dissociées dans le gyrus denté. Les neurones granulaires du gyrus denté envoient des branches axonales par la voie des fibres moussues vers les synapses dendritiques des neurones pyramidaux de l'aire CA3. Ceux-ci envoient enfin l'influx nerveux vers les neurones pyramidaux de l'aire CA1 par la collatérale de Schaeffer. Il en résulte une modification dynamique de l'organisation des neurones granulaires préexistants du gyrus denté et des neurones pyramidaux des aires CA1 et CA3 par extension ou rétractation des dendrites. Ceci est accompagné par la formation ou la perte de synapses (Leuner et Gould, 2010 ; Mehler, 2000).

Figure 5 – Schéma du fonctionnement général de l'hippocampe (d'après Leuner et Gould, 2010). Les nouveaux neurones du gyrus denté sont représentés en rouge, les neurones granulaires en gris et les neurones pyramidaux en bleu. L'information arrive à l'hippocampe par la voie perforante au niveau du gyrus denté, où elle est transmise des neurones granulaires aux neurones pyramidaux de la corne d'Ammon dans les aires CA1 et CA3.



Ce mécanisme, grâce aux cellules de lieu et aux cellules d'orientation, permet notamment d'élaborer et de stocker des représentations de l'espace dans lequel l'animal se déplace et finalement de construire une carte cognitive de cet espace. L'hippocampe pourrait ainsi assurer la construction des représentations combinatoires de lieux, récoltées au cours de différents épisodes comportementaux. Il pourrait également intégrer les informations topologiques à partir des unités de construction de la carte cognitive. Ces informations vont ensuite quitter l'hippocampe pour être envoyées simultanément vers le cortex pariétal postérieur et vers le cortex préfrontal (Campan et Scapini, 2002). L'hippocampe est ainsi au centre du traitement de l'information spatiale et en particulier de l'encodage de la mémoire spatiale. Plus largement, l'hippocampe semble jouer un rôle dans les apprentissages, bien que son importance varie en fonction des types de mémoire impliqués. Des études récentes montrent également un rôle dans les troubles de l'humeur – comme l'anxiété et la dépression, la régulation du stress et les comportements sociaux. Enfin, l'hippocampe semble être directement impliqué dans un certain nombre de maladies neuropsychiatriques, telles que les addictions, la schizophrénie, la maladie d'Alzheimer et l'épilepsie (Leuner et Gould, 2010).

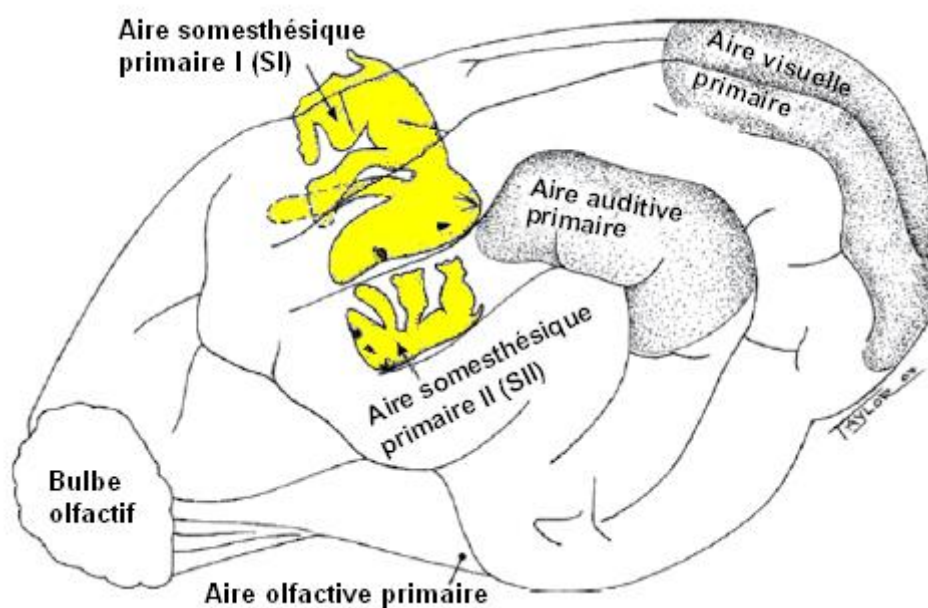
b. Le cortex cérébral

i. Aires corticales primaires

Le cortex cérébral est divisé en cinq aires fonctionnelles uniques appelées les aires corticales primaires (Uemura, 2015).

L'aire somesthésique (ou somatosensorielle) reçoit des fibres sensibles depuis le thalamus. Pour chaque point de cette aire correspond un point à la surface du corps. La surface du corps est ainsi cartographiée dans le cortex cérébral. Chez l'humain ces cartes obtenues par microstimulation ressemblent à un petit homme appelé homonculus sensitif. Cette représentation cérébrale est fonction de l'importance de l'analyse sensorielle de chaque point de la surface du corps et non fonction de sa taille physique. Ainsi les doigts, contenant un grand nombre de récepteurs à leur surface, sont agrandis chez l'homonculus sensitif. De telles cartes existent également chez le chien (Figure 6). On distingue deux aires somesthésiques primaires, une dans le lobe frontal (SI) et l'autre dans le lobe temporal (SII) (Uemura, 2015).

Figure 6 - Vue latérale de l'hémisphère cérébral montrant les aires somesthésiques primaires chez le chien (d'après Uemura, 2015).

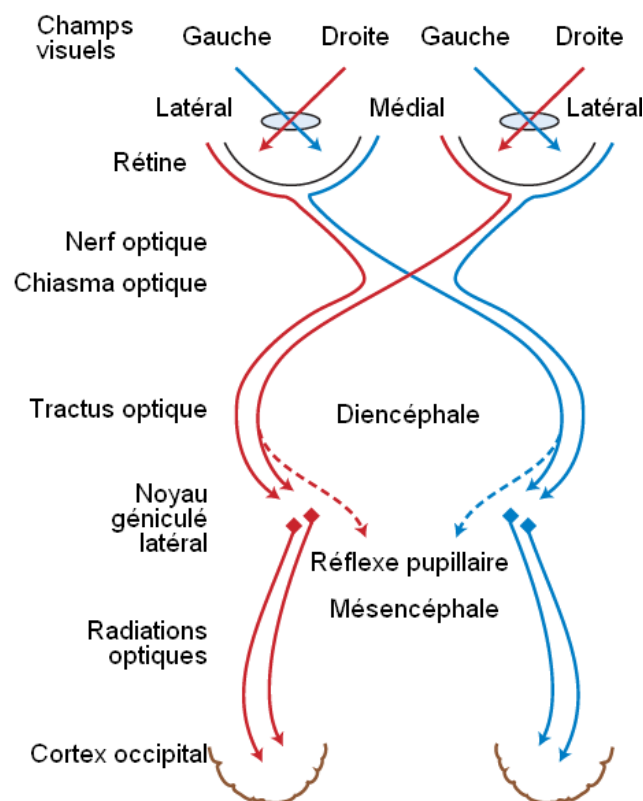


L'aire motrice primaire contrôle la musculature appendiculaire, cervicale et de la tête. Elle est ainsi le centre de plus haut niveau de l'activité motrice volontaire. Elle est sous influence d'autres aires du cortex cérébral, en particulier le cortex somesthésique. Chez le chien la représentation corticale précise de l'aire motrice primaire n'est pas bien établie (Uemura, 2015).

L'aire olfactive primaire est confondue avec le lobe piriforme (Figure 6). Les fibres olfactives transmettent le signal nerveux depuis le bulbe olfactif vers le lobe piriforme *via* le tractus olfactif latéral ipsilatéral. Contrairement aux autres systèmes sensoriels, le système olfactif n'a pas de noyau thalamique spécifique. Le développement de la partie olfactive du rhinencéphale varie énormément d'une espèce à l'autre. Elle est ainsi extrêmement développée chez le chien. On parle d'espèce macrosmatique. C'est l'inverse chez les primates. On parle d'espèces microsmatiques (DeLahunta *et al.*, 2015 ; Uemura, 2015).

L'aire visuelle primaire est située dans le lobe occipital (Figure 6). Le cortex visuel reçoit des fibres depuis le noyau géniculé latéral du thalamus. Les neurones de ce cortex sont sensibles à des stimuli visuels particuliers. Par exemple ils répondent préférentiellement à une direction d'un mouvement, à la survenue ou l'extinction d'une illumination, *etc.* (Uemura, 2015). Il existe de nombreuses connexions entre les cortex visuels des deux hémisphères cérébraux *via* le corps calleux, mais aussi avec le cortex moteur des deux hémisphères, le cervelet par la voie du pont, le colliculus rostral et le tegmentum mésencéphalique. De manière similaire au tractus optique, le noyau géniculé latéral, les radiations optiques et le cortex visuel d'un côté du cerveau contiennent des neurones stimulés par la lumière arrivant dans la moitié controlatérale des champs visuels de chaque œil (Figure 7 ; DeLahunta *et al.*, 2015).

Figure 7 - Voies visuelles centrales impliquées dans la perception consciente (d'après DeLahunta *et al.*, 2015).



L'aire auditive primaire est située dans le lobe temporal (Figure 6). Les informations auditives quittent le colliculus caudal, qui joue un rôle de centre réflexe auditif, vers le noyau géniculé médial du thalamus avant de rejoindre le cortex auditif primaire dans le lobe temporal. Dans cette aire, chaque cochlée est cartographiée bilatéralement. Le cortex auditif est nécessaire au décodage et à l'extraction de certaines caractéristiques de l'information auditive. Les informations sont ensuite intégrées dans les aires associatives. Le cortex auditif joue également un rôle dans le réflexe de sursaut acoustique en envoyant des efférences vers le colliculus rostral (Uemura, 2015).

ii. Aires associatives

Les récepteurs périphériques envoient des signaux sensoriels spécifiques vers le cortex sensoriel primaire. En atteignant ce cortex primaire, ces signaux spécifiques vont produire des sensations bien définies (par exemple le toucher). Cependant la reconnaissance d'un stimulus demande un certain niveau perceptif. Ainsi il y aura association progressive d'un stimulus primaire vers des combinaisons plus complexes. Par exemple le cortex auditif primaire perçoit des influx auditifs simples et les interprète, mais c'est le cortex associatif qui va permettre l'appréciation de sons complexes. Ceci permet notamment d'inhiber les informations distrayantes. Ce mécanisme est aussi nécessaire pour les autres sens. Il y a alors combinaison d'influx tactiles, proprioceptifs et barométriques pour percevoir la forme, la taille et la texture. Cependant la reconnaissance finale d'un objet peut demander de mélanger les sens, en faisant par exemple appel autant aux impressions visuelles qu'auditives. Tout ceci permet l'organisation de sorties comportementales cohérentes, et donc la prise de décision et la prise d'initiative (Mehler, 2000 ; Uemura, 2015).

Cette fonction réceptive-perceptive du cortex associatif nécessite une autre grande fonction du cortex cérébral : la mémoire associative. La capacité à se remémorer des expériences sensorielles ou motrices passées, et de corréler de tels souvenirs avec de nouvelles expériences, est la base de l'apprentissage. La façon dont les animaux répondent à de nombreuses combinaisons de stimuli sensoriels et moteurs est ainsi influencée par les expériences sensorielles et motrices passées. La mémoire associative est stockée dans les zones associatives du cortex cérébral et ce de manière permanente. Le cortex préfrontal joue un rôle central dans ce processus d'apprentissage en favorisant notamment la réorganisation sémantique des informations encodées, la consolidation des souvenirs par migration depuis l'hippocampe vers le cortex préfrontal médian où ils seront plus stables et le rappel des souvenirs. Il serait ainsi impliqué dans les fonctions multimodales de la mémoire de travail qui est une forme de mémoire à court terme où les informations sont ensuite oubliées ou intégrées vers la mémoire à long terme *via* un processus de répétition (Lafontaine et Lippé, 2011 ; Mehler, 2000 ; Uemura, 2015).

c. *L'amygdale cérébrale*

L'amygdale cérébrale est très fortement impliquée dans les émotions, en particulier la peur et l'anxiété. Elle est ainsi fortement engagée dans les apprentissages associatifs. Ces rôles l'impliqueraient dans les fonctions cognitives liées à la socialité. Il a par exemple été montré que l'amygdale cérébrale influence les interactions avec les congénères, soit vers une interaction affiliative soit vers une interaction aversive. Elle reçoit des afférences depuis le bulbe olfactif, l'hypothalamus, le thalamus, le tronc cérébral, l'hippocampe et le cortex cérébral ; et envoie des efférences vers l'hypothalamus, le thalamus, le tronc cérébral, le striatum et le cortex cérébral (Bickart *et al.*, 2014).

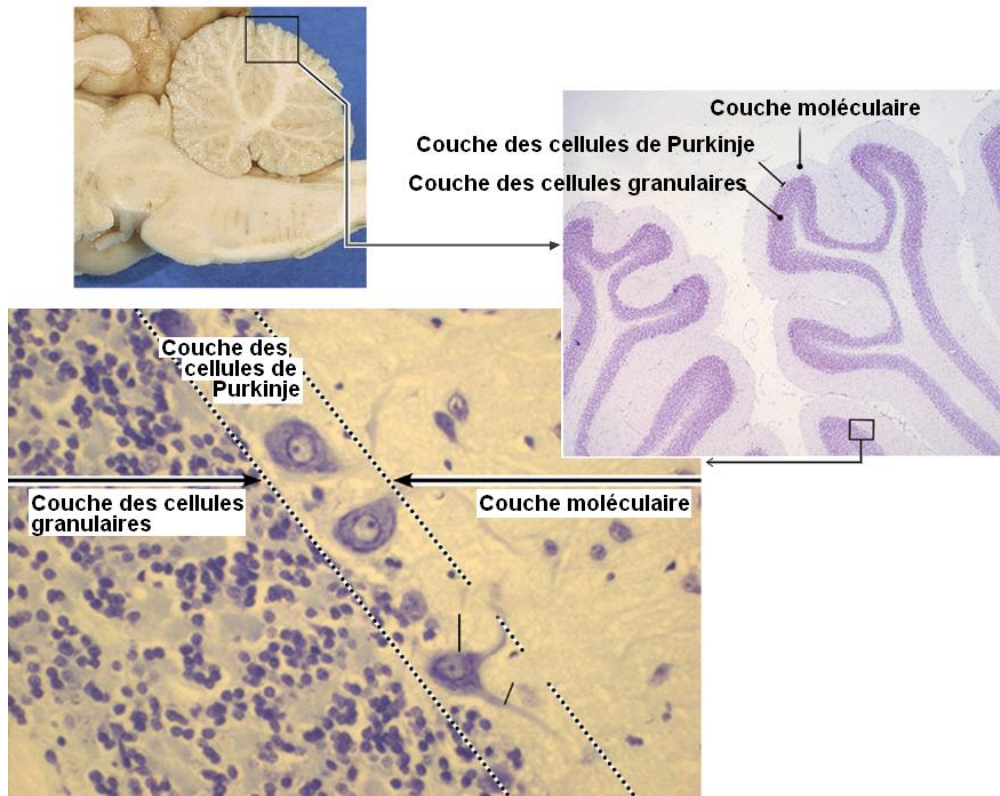
d. *Le cervelet*

Le cortex cérébelleux est organisé en trois couches : interne contenant les cellules granulaires et des interneurons ; intermédiaire contenant le corps des cellules de Purkinje ; et externe moléculaire contenant des fibres parallèles pénétrant perpendiculairement l'arbre dendritique des cellules de Purkinje (Figure 8). Ces éléments forment des modules corticaux cérébelleux consistant en une petite grappe de neurones dans le noyau olivaire inférieur, un ensemble de longues et étroites bandes de cellules de Purkinje dans le cortex cérébelleux et un petit groupe de neurones dans l'un des noyaux cérébelleux profonds. Ils sont organisés en matrices ordonnées à l'origine d'un maillage de l'ensemble du cervelet. Ils sont comparables à des microprocesseurs capables de traiter une grande quantité de données. Le constituant primaire est la cellule de Purkinje. Celle-ci analyse la majeure partie des informations entrantes et est responsable de toutes les sorties du module. Son rôle est donc fondamental et une altération de sa structure peut avoir des conséquences graves sur l'efficacité du signal émis (DeLahunta *et al.*, 2015).

Les boucles cérébro-cérébelleuses connectent les parties latérales des hémisphères cérébelleux (le long des noyaux dentelés) et le cortex cérébral. Les différentes zones associatives du cortex cérébral (en particulier les zones frontale, temporale et pariétale) envoient des informations – *via* les noyaux du pont (fibres moussues), le noyau rouge et l'olive bulbaire (fibres grimpanes) – vers le cortex cérébelleux. Ainsi le cervelet reçoit des informations visuelles, auditives et somatosensorielles depuis les lobes postérieurs du cortex cérébral, des informations motrices depuis le lobe frontal et traite les informations multisensorielles depuis d'autres zones associatives. Le cervelet interagirait également de manière étroite avec l'hippocampe. En retour, le cervelet peut influencer l'activité cérébrale en projetant des informations dans ces zones *via* les noyaux dentelés et le thalamus. De même, il semblerait que le cortex moteur primaire et le cortex préfrontal dorsolatéral reçoivent différentes projections depuis des groupes distincts de cellules de Purkinje du cervelet. Ces projections semblent appartenir à des boucles fermées suggérant une séparation entre les voies motrices et non motrices. Leur traversée dans le

cerveau se fait de manière distincte (DeLahunta *et al.*, 2015 ; Mehler, 2000 ; Palesi *et al.*, 2017).

Figure 8 - Organisation du cortex cérébelleux (d'après Uemura, 2015).



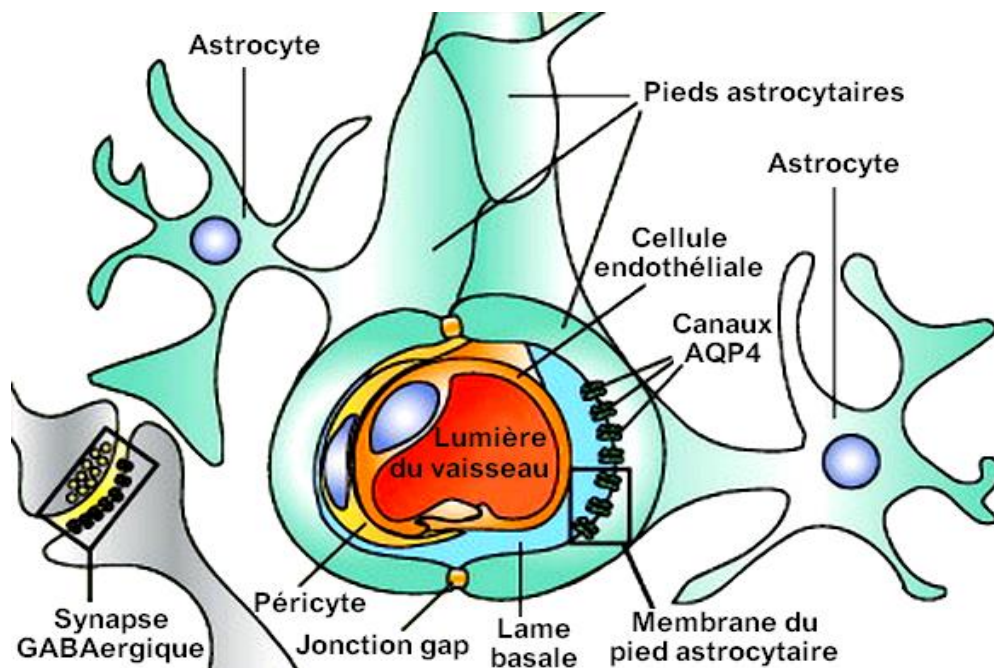
Le cervelet serait ainsi responsable de la coordination des informations motrices (motricité volontaire, posture, maintien de l'équilibre, coordination sensorimotrice), mais aussi de la coordination d'informations cognitives (anticipation, mémoire de travail verbale, apprentissages moteurs, émotions, manipulation mentale des symboles et lecture). Bien qu'il existe de nombreuses théories pour expliquer cette dernière fonction, elles s'accordent toutes sur le rôle du cervelet dans l'optimisation, l'automatisation et l'amélioration des performances cognitives dans certains domaines *via* les boucles cérébro-cérébelleuses. Une atteinte du cervelet résulterait ainsi en des performances cognitives suboptimales et non forcément en des déficits marqués (Cyrulnik et Hinton, 2008 ; Leuner et Gould, 2010 ; Mehler, 2000).

2. Les complexes dystrophine-glycoprotéines

Plusieurs composants des complexes associés aux dystrophines sont présents dans l'encéphale (Figure 9). L' α -dystroglycane, le β -dystroglycane, les syntrophines, l' α -dystrobrevine-1 et la chaîne α_2 de la laminine sont présents au niveau de l'interface glie-vaisseaux, où ils forment des DGC. La Dp71 est ainsi exprimée dans les astrocytes où le

DGC ancre le canal aquaporine de type 4 (AQP4) de façon polarisée sur la membrane faisant face aux vaisseaux sanguins. Les DGC sont également présents dans les neurones du cortex, de l'hippocampe et du cervelet où ils interagissent avec les récepteurs de l'acide γ -aminobutyrique (*Gamma-AminoButyric Acid*, GABA) de type A, les canaux potassiques Kir2 et Kir4.1, les protéines de la famille des guanylate kinases associées à la membrane (*Membrane-Associated GUanylate Kinase*, MAGUK) comme la PSD95 (Blake *et al.*, 1999 ; Tian *et al.*, 1996 ; Waite *et al.*, 2012). La diversité des DGC dans le cerveau est expliquée par la présence de nombreuses isoformes de dystrophine et la présence d'autres composants – non exprimés dans le muscle – tels que la β -dystrobrevine et les γ -syntrophines (γ_1 et γ_2). Ces dernières ont la capacité de se lier notamment aux dystrophines, aux canaux sodiques, à la monoxyde d'azote synthétase neuronale (*neuronal Nitric Oxide Synthase*, nNOS) et aux différentes kinases (Piluso *et al.*, 2000). Les DGC semblent donc jouer un rôle important dans la transduction des signaux à la membrane, en intervenant dans la localisation des protéines de signalisation intracellulaire.

Figure 9 - Localisation des complexes dystrophine-glycoprotéines dans les cellules cérébrales (d'après Waite *et al.*, 2012). La dystrophine et les composants du complexe dystrophine-glycoprotéines sont présents dans l'encéphale, où ils participent aux complexes protéiques qui ancrent des récepteurs à des sites membranaires spécialisés, tels que les canaux aquaporine de type 4 (AQP4) au niveau de la membrane du pied astrocytaire engainant les vaisseaux sanguins et péricytes associés, et les récepteurs GABA_A postsynaptiques des neurones GABAergiques.



3. Rôle de la dystrophine dans les synapses

Les synapses inhibitrices – de type GABAergique et glycinergique – sont formées au niveau de l'arbre dendritique, du corps cellulaire et des premiers segments axonaux. En revanche, les synapses excitatrices – de type glutamatergique – se trouvent au niveau des épines dendritiques, qui sont des excroissances de la membrane neuronale. L'organisation postsynaptique des synapses excitatrices est aujourd'hui mieux connue que celle des synapses inhibitrices. Au niveau de la membrane postsynaptique des neurones, on observe une zone dense, appelée densité postsynaptique (*Post-Synaptic Density*, PSD) (Sheng et Kim, 2011). Il a été montré que la dystrophine est présente au niveau des PSD des neurones pyramidaux du cortex cérébral et de l'hippocampe, ainsi que des cellules de Purkinje du cervelet (Kim *et al.*, 1992).

a. *Synapses inhibitrices*

Le récepteur le plus important des synapses inhibitrices est le récepteur ionotrope GABA_A (Sheng et Kim, 2011). On le trouve en particulier dans le cortex cérébral, l'hippocampe et le cervelet des mammifères. Chaque isoforme du récepteur est composée de cinq sous-unités glycoprotéiques entourant un canal sélectif des anions chlorures. La fixation du GABA au récepteur ouvre le canal. L'entrée des ions chlorures dans le canal hyperpolarise la membrane du neurone postsynaptique et l'inhibe en éloignant le potentiel du seuil d'activation des canaux sodiques voltage-dépendant. Le récepteur GABA_A est localisé soit dans la membrane postsynaptique, soit dans la membrane extra-synaptique où il confère une inhibition à long terme (Sigel et Steinmann, 2012).

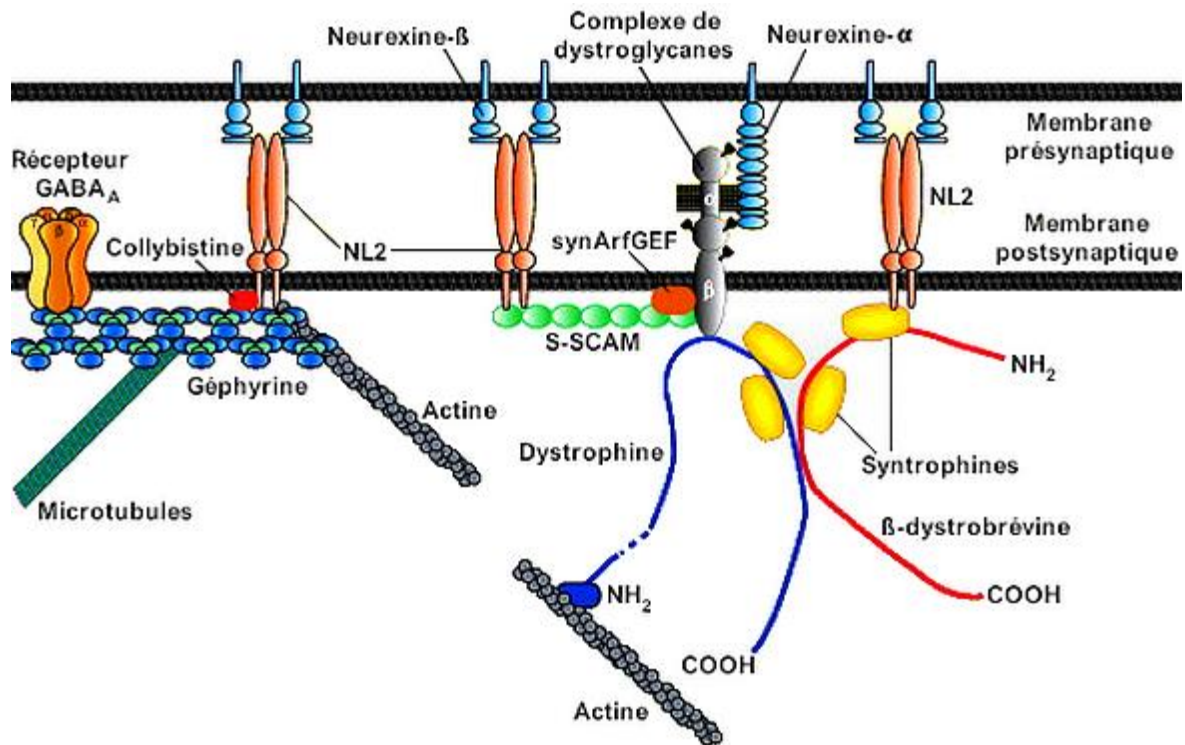
L'ancrage et le regroupement de certains récepteurs GABA_A dans les synapses inhibitrices sont médiés par deux types de complexes (Figure 10).

Le premier complexe est composé de géphyrine et de collybistine, qui est un facteur d'échange de la guanine (*Guanine Exchange Factor*, GEF). La collybistine est lié à la neurologine de type 2 (NL2), qui est présente exclusivement dans les synapses inhibitrices et forme une liaison avec les neurexines β présynaptiques (Waite *et al.*, 2012).

Le second complexe est de type DGC. Bien qu'il ne soit pas en relation directe avec les récepteurs GABA_A, il a été montré que les DGC contribuent au fonctionnement des synapses GABAergiques. Ainsi, le dystroglycane est nécessaire à la localisation de la Dp427 dans les zones de regroupement des récepteurs GABA_A. L' α -dystroglycane est lié directement aux neurexines α présynaptiques. Le β -dystroglycane transmembranaire lie l' α -dystroglycane à la dystrophine. Le β -dystroglycane est également lié à la molécule d'échafaudage synaptique (*Synaptic-SCAffolding Molecule*, S-SCAM). Cette dernière appartient à la famille des MAGUK. Elle est aussi en relation avec NL2. La S-SCAM et le β -dystroglycane sont en relation avec une GEF, le synArfGEF. Enfin, la β -dystrobrévine est

également impliquée dans ce complexe en se liant à la dystrophine et aux syntrophines. Le complexe S-SCAM–NL2–DGC induirait un remodelage local du cytosquelette d'actine, permettant de réguler la diffusion latérale et la stabilisation des récepteurs GABA_A (Waite *et al.*, 2012).

Figure 10 - Organisation hypothétique de la synapse GABAergique (d'après Waite *et al.*, 2012). L'identité de la synapse GABAergique est déterminée par l'accumulation de récepteurs GABA_A au niveau de la membrane postsynaptique. Les complexes d'adhérence transsynaptiques neurexine-neurologine guident le recrutement postsynaptique de molécules d'échafaudage auxquelles les récepteurs GABA_A sont ancrés. La protéine d'échafaudage géphyrine est essentielle à leur regroupement. Elle est recrutée au niveau de la membrane postsynaptique suite à l'activation de la collybistine médiée par la neurologine de type 2 (NL2). Les complexes de type dystrophine-glycoprotéines participent à la formation des groupements de récepteurs GABA_A dans l'hippocampe et le cervelet. Ces complexes sont potentiellement recrutés dans la membrane postsynaptique par l'interaction directe entre la neurexine et le dystroglycane, et par l'interaction indirecte avec la NL2 et la protéine d'échafaudage synaptique S-SCAM. Le facteur d'échange de guanine synArfGEF a une localisation préférentielle pour les membranes postsynaptiques inhibitrices. Il est associé au complexe S-SCAM–NL2–DGC et pourrait induire un remodelage local du cytosquelette d'actine, permettant de réguler la diffusion latérale et la stabilisation des récepteurs GABA_A.



Il a été montré que la Dp427 est associée aux PSD des synapses inhibitrices GABAergiques (Kim *et al.*, 1995). L'hypothèse actuelle est que la Dp427 permettrait de stabiliser les complexes postsynaptiques des récepteurs GABA_A par interaction entre son domaine N-terminal et le cytosquelette d'actine. Ceci permettrait de limiter la diffusion des récepteurs en dehors de la synapse (Brünig *et al.*, 2002 ; Lévi *et al.*, 2002).

En revanche, la littérature actuelle ne permet pas d'identifier un quelconque rôle de la dystrophine dans les synapses glycinergiques. La principale molécule d'échafaudage des PSD de ce type de synapse serait la géphyrine (Lévi *et al.*, 2004).

b. Synapses excitatrices

De nombreuses protéines d'échafaudage maintiennent la PSD des synapses excitatrices en liant les récepteurs au glutamate aux autres récepteurs postsynaptiques, aux molécules d'adhérence et au cytosquelette. La PSD sert ainsi à lier les membranes pré- et postsynaptiques, regrouper les récepteurs postsynaptiques et coupler l'activation de ces récepteurs à la cascade de signalisation intracellulaire (Sheng et Kim, 2011). Chaque isoforme du récepteur au glutamate est composée de quatre sous-unités protéiques entourant un canal sélectif des cations. La fixation du glutamate au récepteur permet son ouverture. L'entrée de cations dans le canal dépolarise le neurone postsynaptique et l'active : le potentiel du neurone se rapproche alors du seuil d'activation des canaux sodiques voltage-dépendants (Traynelis *et al.*, 2010).

Le rôle de la dystrophine dans les synapses excitatrices est encore mal connu. Il a été montré que la Dp71 est un composant des PSD des synapses excitatrices (Blake *et al.*, 1999). Il existerait des interactions entre les DGC contenant la Dp71 et les protéines d'échafaudage transsynaptiques telles que les neurexines (Pilgram *et al.*, 2009). L'hypothèse actuelle est qu'un complexe contenant la Dp71 pourrait interagir avec les canaux glutamatergiques et aurait un rôle dans la plasticité de ces synapses (Waite *et al.*, 2012).

Bien que la Dp427 ne semble pas agir directement au niveau des synapses excitatrices, il a récemment été montré qu'elle jouerait un rôle indirect dans la régulation rétrograde du relargage présynaptique des synapses glutamatergiques dans l'aire CA1 de l'hippocampe. Chez la souris *mdx*, la zone de stockage des vésicules présynaptiques semble être plus petite que chez la souris saine, avec un plus grand nombre de vésicules amarrées à la membrane présynaptique. Ceci pourrait être à l'origine d'une altération de la physiologie de la synapse excitatrice avec une augmentation de la probabilité de relargage des vésicules dans la synapse. Or la perte de la Dp427 est à l'origine d'une surexpression d'une protéine liée aux DGC, la dysbindine, dans l'encéphale. Cette protéine est normalement exprimée dans les compartiments pré- et postsynaptiques tel que dans les synapses excitatrices dans l'aire CA1. Il a ainsi été émis l'hypothèse que la perte de Dp427 dans les compartiments postsynaptiques des cellules pyramidales favoriserait la relocalisation de la dysbindine vers les compartiments présynaptiques, conduisant à des altérations de l'organisation des vésicules présynaptiques, de la probabilité de relargage des neurotransmetteurs et donc de la plasticité synaptique (Miranda *et al.*, 2011).

Enfin, il a été montré que chez la drosophile, il existe une isoforme de 186 kDa (Dp186) exprimée exclusivement dans le système nerveux central, au niveau de la membrane postsynaptique des synapses excitatrices cholinergiques. De manière analogue à la Dp427 chez les mammifères, la Dp186 aurait un rôle dans la régulation rétrograde du relargage présynaptique. Ainsi, une perte de cette isoforme conduit à une augmentation du relargage d'acétylcholine au niveau de la membrane présynaptique (Pilgram *et al.*, 2009).

4. Rôle de la dystrophine dans la glie

a. Organisation générale de la glie

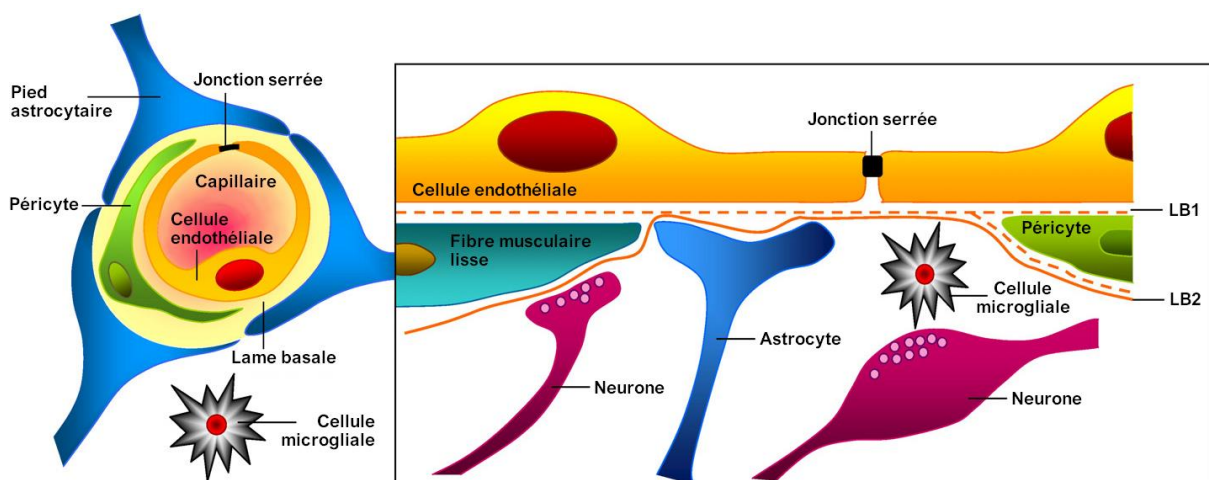
La glie est constituée par la macroglie – elle-même constituée par les astrocytes, les cellules épendymaires, les oligodendrocytes – et les cellules microgliales (Abbott *et al.*, 2010 ; Allen et Barres, 2009) :

- **Les astrocytes** ont un corps cellulaire étoilé avec de nombreux prolongements cytoplasmiques jointifs, assurant la cohérence et la solidité de la structure du système nerveux central. Ils engainent les capillaires sanguins et contribuent ainsi au métabolisme des neurones en jouant le rôle d'intermédiaire entre les deux ;
- **Les cellules épendymaires** sont proches des astrocytes mais ont un rôle d'intermédiaire entre neurones et liquide cébrospinal (LCS) des cavités du SNC ;
- **Les oligodendrocytes**, de manière analogue aux cellules de Schwann dans le système nerveux périphérique, forment la myéline engainant les axones des neurones du SNC dans la substance blanche. Ils effectuent également des échanges métaboliques avec les corps cellulaires des neurones de la substance grise ;
- **Les cellules microgliales** sont des phagocytes issus du sang et ont un rôle d'élimination des déchets. Elles sont les principales cellules présentatrices de l'antigène.

La macroglie présente de nombreux prolongements couvrant les synapses du SNC. Certains de ces prolongements forment les pieds astrocytaires à la surface de l'encéphale et de la moelle épinière. La macroglie permet ainsi de former une membrane gliale et des feuilletts périvasculaires, à l'origine de la barrière hémato-encéphalique (BHE) (Figure 11).

De manière complémentaire et analogue à la BHE, il existe une seconde barrière entre la circulation sanguine et le SNC : la barrière sang – liquide cébrospinal.

Figure 11 – Organisation de la membrane gliale et constitution de la barrière hémato-encéphalique (d'après Abbott *et al.*, 2010). Dans le système nerveux central, les cellules endothéliales sont jointes par des jonctions serrées fermant hermétiquement le capillaire sanguin. Les péricytes sont distribués de manière discontinue le long des capillaires sanguins et recouvrent ainsi partiellement l'endothélium. Ces deux types cellulaires sont engainés par une membrane formée par une matrice extracellulaire périvasculaire, la lame basale 1 (LB1). Cette dernière a une composition différente de la lame basale des pieds astrocytaires entourant le parenchyme de l'encéphale (lame basale 2, LB2). Les pieds astrocytaires forment un réseau complexe entourant les capillaires et les cellules associées permettant l'induction et le maintien des propriétés de barrière. Les projections axonales des neurones vers les cellules des fibres musculaires lisses vasculaires contiennent des neurotransmetteurs vasoactifs et des peptides, permettant ainsi de réguler le flux sanguin cérébral. La perméabilité de la BHE peut être régulée par le relargage de peptides vasoactifs et d'autres agents des cellules associées à l'endothélium. La microglie correspond aux cellules immunocompétentes de l'encéphale. Les flux de solutés à travers la BHE sont soit passifs, dirigés par des gradients de concentration du plasma vers le cerveau, les molécules lipophiles passant plus facilement ; soit facilités par des transporteurs actifs ou passifs des membranes des cellules endothéliales. Ces transporteurs permettent de contrôler l'entrée des molécules dans le SNC.



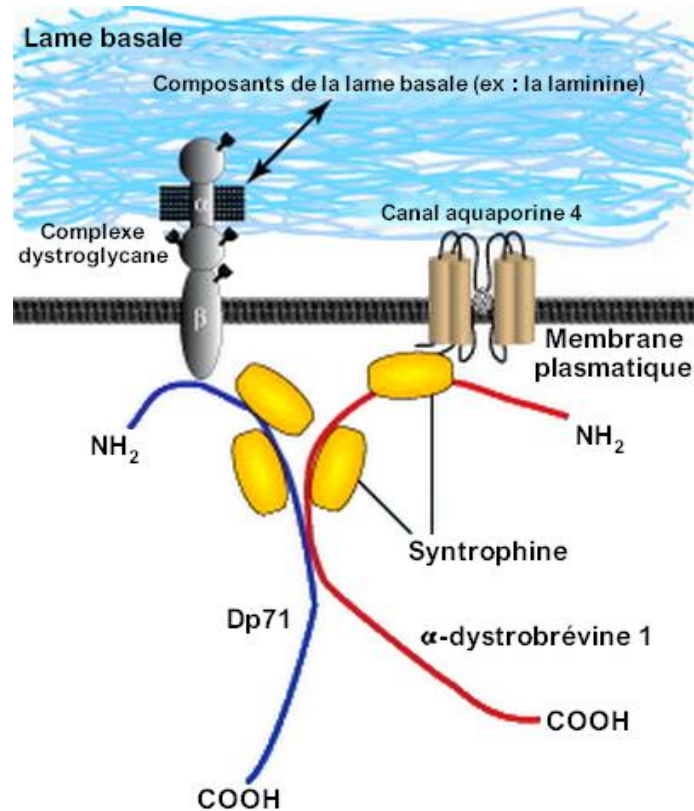
b. Rôle de la dystrophine dans la barrière hémato-encéphalique

Une régulation précise du microenvironnement ionique local autour des synapses et des axones est essentielle à la fiabilité de la communication neuronale. La BHE joue un rôle majeur dans l'homéostasie de cet environnement. Tous les organismes ayant un SNC développé possèdent une BHE (Abbott *et al.*, 2010).

Comme étudié précédemment, les astrocytes sont impliqués dans la structure même de la BHE. Ils induisent la formation de jonctions serrées et contrôlent les échanges en modulant l'expression des protéines associées à ces jonctions (Janzer et Raff, 1987). De plus il semblerait que les astrocytes jouent un rôle essentiel dans le maintien de la BHE. En effet, les pieds astrocytaires périvasculaires possèdent sur leur membrane des canaux AQP4 au contact de la lame basale périvasculaire, permettant une régulation partielle de la perméabilité de la BHE. Le regroupement de ces canaux aqueux est notamment permis par la présence de DGC composés de Dp71, α -dystrobrevine de type 1, syntrophines et complexes de dystroglycanes (Figure 12 ; Waite *et al.*, 2012). Il semblerait que la Dp427

soit également impliquée dans la formation de la BHE, mais on ne connaît pas son rôle exact (Nico *et al.*, 2003, 2004).

Figure 12 – Organisation de la membrane des pieds astrocytaires périvasculaires (d'après Waite *et al.*, 2012). Les complexes de type dystrophine-glycoprotéines de la membrane des pieds astrocytaires périvasculaires sont constitués de Dp71, α -dystrobrevine de type 1, de syntrophines et d'un complexe de dystroglycane (α et β). Ils permettraient de cibler le site d'ancrage des canaux aquaporines de type 4.



c. Rôle de la dystrophine dans la barrière sang – liquide cérébrospinal

Le LCS est sécrété par les cellules épithéliales du plexus choroïde vers le système ventriculaire cérébral, alors que le reste du fluide extracellulaire encéphalique – le fluide interstitiel – est dérivé des sécrétions de l'endothélium capillaire de la BHE. Le liquide interstitiel encéphalique et le LCS peuvent communiquer librement en de nombreux points. Leur sécrétion est dirigée par des gradients ioniques et osmotiques exprimés au niveau de l'endothélium de la BHE et de la membrane apicale de l'épithélium du plexus choroïde. Cette sécrétion est à l'origine de mouvements aqueux. De manière comparable à la BHE, ceci serait permis par la présence de canaux AQP4, également regroupés par des complexes de type DGC. Dans ces complexes, l'utrophine – qui est une protéine proche de la dystrophine – semble cependant plus impliquée que cette dernière (Abbott *et al.*, 2010 ; Johanson *et al.*, 2011).

d. Rôle de la dystrophine dans les synapses

Lors de la transmission d'un potentiel d'action, les neurones libèrent des ions potassium dans le milieu extracellulaire. Le bicarbonate est alors absorbé de manière plus importante par modification du potentiel de membrane. On observe ainsi une diminution du volume extracellulaire autour de la synapse. Les astrocytes – au contact de ces synapses – possèdent à leur surface des canaux aqueux AQP4 et des canaux potassiques Kir4.1. Il a été montré que ces deux types de canaux sont colocalisés. Le regroupement des canaux est permis par la présence de DGC composés notamment de Dp71. La réduction du volume extracellulaire est facilitée par le passage de l'eau *via* les canaux AQP4, favorisant ainsi l'élimination des déchets métaboliques, et l'élimination des ions potassium, *via* les canaux Kir4.1. Ces ions pouvant être à l'origine de troubles de la signalisation nerveuse, ce mécanisme assurerait le retour à la normale de la synapse (Nagelhus *et al.*, 2004). Il apparaît que les astrocytes auraient également un rôle dans la clairance des neurotransmetteurs dans l'espace synaptique et en dehors de celui-ci (Bergles *et al.*, 1999).

5. Rôle de la dystrophine dans le développement de l'encéphale

Le développement du système nerveux central est marqué par deux mécanismes principaux : la neurogenèse et la migration neuronale. De nombreux gènes sont impliqués dans le bon déroulement de la prolifération des cellules neuronales. Durant le développement embryonnaire du cortex, les neurones post-mitotiques – formés dans la zone ventriculaire au niveau des éminences ganglionnaires – migrent le long de la glie radiaire. Cette dernière est composée des cellules progénitrices de la zone ventriculaire qui vont se diviser pour produire les neurones. Ces cellules possèdent une extension cellulaire liée à la surface piale, conduisant à la formation d'un neuroépithélium pseudostratifié. Celui-ci évolue ensuite en une structure complexe organisée en six couches. Les premiers neurones formés sont situés dans la couche la plus profonde et les derniers formés résident dans les strates les plus superficielles. Des générations successives de neurones occupent ainsi les différentes couches du cortex et possèdent des caractères intrinsèques propres à chaque génération. On parle de processus « *Inside-Out* ». Les isoformes tronquées de la dystrophine sont impliquées dans le développement du tube neural. En outre, il apparaît que plusieurs complexes de type DGC sont impliqués dans la formation de la membrane basale et la migration neuronale durant le développement de l'encéphale. La dystrophine serait aussi impliquée dans la synaptogenèse, la spécialisation synaptique et le couplage entre membranes pré- et postsynaptiques (Mehler, 2000 ; Vaillend *et al.*, 2008).

Chez l'humain, le cerveau immature des enfants est sujet à une intense réorganisation des connexions synaptiques, mettant en jeu la dystrophine. Ceci explique

l'augmentation de la plasticité adaptative des enfants et leur capacité à apprendre. Il a également été montré que les enfants ont une forte capacité régénérative après des traumatismes cérébraux précoces. Le pic de plasticité correspond aux périodes de prolifération synaptiques et de remodelage des axones et dendrites en croissance, soit lors des deux premières années de vie, ainsi que durant la période d'élagage synaptique, soit jusqu'à 16 ans. Il est largement accepté que le substrat neurobiologique des souvenirs réside dans les modifications de la force des synapses et le remodelage structural des circuits neuronaux activés durant l'apprentissage (Vaillend *et al.*, 2008).

Alors que les neurones pyramidaux des aires CA1 et CA3 sont formés exclusivement durant le développement embryonnaire, la naissance et l'intégration fonctionnelle de nouveaux neurones ont été montrées dans deux zones du cerveau chez l'adulte, indiquant l'existence d'une neurogenèse faisant suite au développement cérébral initial : la zone sous-granulaire du gyrus denté et la zone sous-ventriculaire du ventricule latéral, d'où migrent les neurones néoformés vers le bulbe olfactif. L'hypothèse actuellement supportée par de nombreuses études est que l'expérience – ou l'intégration activité-dépendante de nouveaux neurones dans les réseaux neuronaux existants – constitue un mécanisme fonctionnel de la plasticité cérébrale à l'origine de fonctions mnésiques. Par exemple des études ont montré que l'activité physique, l'enrichissement environnemental et certains types d'apprentissages mettant en jeu l'hippocampe peuvent être à l'origine de neurogenèse. À l'inverse, l'arrêt de la neurogenèse peut-être induit expérimentalement chez l'adulte par un stress chronique, conduisant à la rétractation des dendrites et une perte synaptique. Ceci conduirait à des effets délétères dans certaines tâches d'apprentissage et la prévention des effets de l'enrichissement environnemental sur le développement de la mémoire (Leuner et Gould, 2010 ; Vaillend *et al.*, 2008).

Par sa localisation et son rôle dans l'ancrage et le regroupement des canaux ioniques neuronaux, la dystrophine pourrait jouer un rôle majeur dans le développement de l'encéphale et dans les tâches cognitives tout au long de la vie de l'individu.

6. Rôle de la dystrophine dans la plasticité cérébrale

a. Définitions et mécanismes généraux

La plasticité cérébrale est la capacité d'une activité neuronale générée par une expérience à modifier le fonctionnement d'un circuit neuronal et ainsi à modifier par la suite les pensées, les émotions et le comportement. La plasticité synaptique est un phénomène électrophysiologique. Il fait spécifiquement référence aux modifications de la force ou de l'efficacité de la transmission synaptique dans des synapses préexistantes, ces modifications dépendant de l'activité de l'individu. La plasticité synaptique jouerait ainsi

un rôle central dans la capacité du cerveau à incorporer des expériences éphémères en souvenirs persistants (Citri et Malenka, 2007).

i. Plasticité à court terme

La plasticité à court terme fait référence aux modifications de l'efficacité de la transmission synaptique de l'ordre de la milliseconde à la minute. Elle permet des adaptations à court terme face aux sensations, aux modifications éphémères des états comportementaux et aux formes courtes de la mémoire. La plupart des formes de la plasticité synaptique à court terme sont déclenchées par de courtes salves d'activité neuronale causant une accumulation temporaire de calcium dans les terminaisons nerveuses présynaptiques. L'augmentation présynaptique de calcium est à l'origine de modifications de la probabilité du relargage de neurotransmetteur par remaniement direct des processus biochimiques qui sous-tendent l'exocytose des vésicules synaptiques (Citri et Malenka, 2007).

Lorsque deux stimuli se succèdent sur un court intervalle, la réponse au second stimulus peut être facilitée ou déprimée. Lorsque l'intervalle dure moins de 20 ms, les canaux calciques ou sodiques voltage-dépendants sont inactivés car un nouveau *pool* de vésicules présynaptiques n'est pas encore prêt à être relargué. Il en résulte l'inhibition de la réponse au second stimulus. On parle de dépression à court terme (*Short-Term Depression*, STD). Si l'intervalle est plus long, entre 20 et 500 ms, la réponse est au contraire facilitée par la présence du calcium résiduel, alors utile à l'exocytose des vésicules présynaptiques. On parle de potentialisation à court terme (*Short-Term Potentiation*, STP). Lors du passage d'un train de potentiels d'action à haute fréquence (entre 5 et 100 ms d'intervalle) et prolongé (entre 200 ms et 5 s), on observe que le relargage de neurotransmetteurs est généralement facilité sur plusieurs secondes à plusieurs minutes par rapport au tout début de la série de stimulations : on parle de potentialisation post-tétanique (*Post-Tetanic Potentiation*, PTP). La plasticité synaptique à court terme joue ainsi le rôle de filtre des signaux transmis du neurone présynaptique au neurone postsynaptique (Citri et Malenka, 2007).

Ces mécanismes sont modulés à deux niveaux : présynaptique et postsynaptique. Il est intéressant de noter que les cellules gliales sont impliquées dans cette forme de plasticité par leur proximité avec les synapses en régulant la clairance des neurotransmetteurs et des ions.

ii. Plasticité à long terme

La plasticité à long terme fait référence aux modifications de l'efficacité de la transmission synaptique de l'ordre de la minute à la journée. Il est largement accepté que toute

expérience modifie le comportement ultérieur, au moins en partie. Le mécanisme impliqué est la modification durable de la force synaptique. Le cerveau encode les événements internes et externes à l'organisme en circuits neuronaux. Ce sont des patrons spatiotemporels complexes au sein de grands ensembles de neurones. Un point-clé définissant le comportement de tout circuit neuronal est le patron du poids de chaque synapse connectant les neurones au sein du circuit. Ainsi un souvenir est stocké lorsque l'activité dans un circuit neuronal provoque un changement sur une longue durée du patron du poids des synapses du circuit. La plasticité synaptique à long terme permet l'acquisition et l'utilisation de compétences motrices, correspondant à la mémoire implicite (procédurale) et le souvenir des expériences et informations acquises, correspondant à la mémoire explicite (déclarative) encodée dans l'hippocampe (Citri et Malenka, 2007).

La plasticité homosynaptique correspond au cas où la modification d'une synapse ne se propage pas aux synapses formées par d'autres neurones présynaptiques avec le même neurone postsynaptique. La plasticité hétérosynaptique correspond au cas inverse où la modification d'une synapse modifie à son tour les synapses formées par d'autres neurones présynaptiques avec le même neurone postsynaptique (Citri et Malenka, 2007).

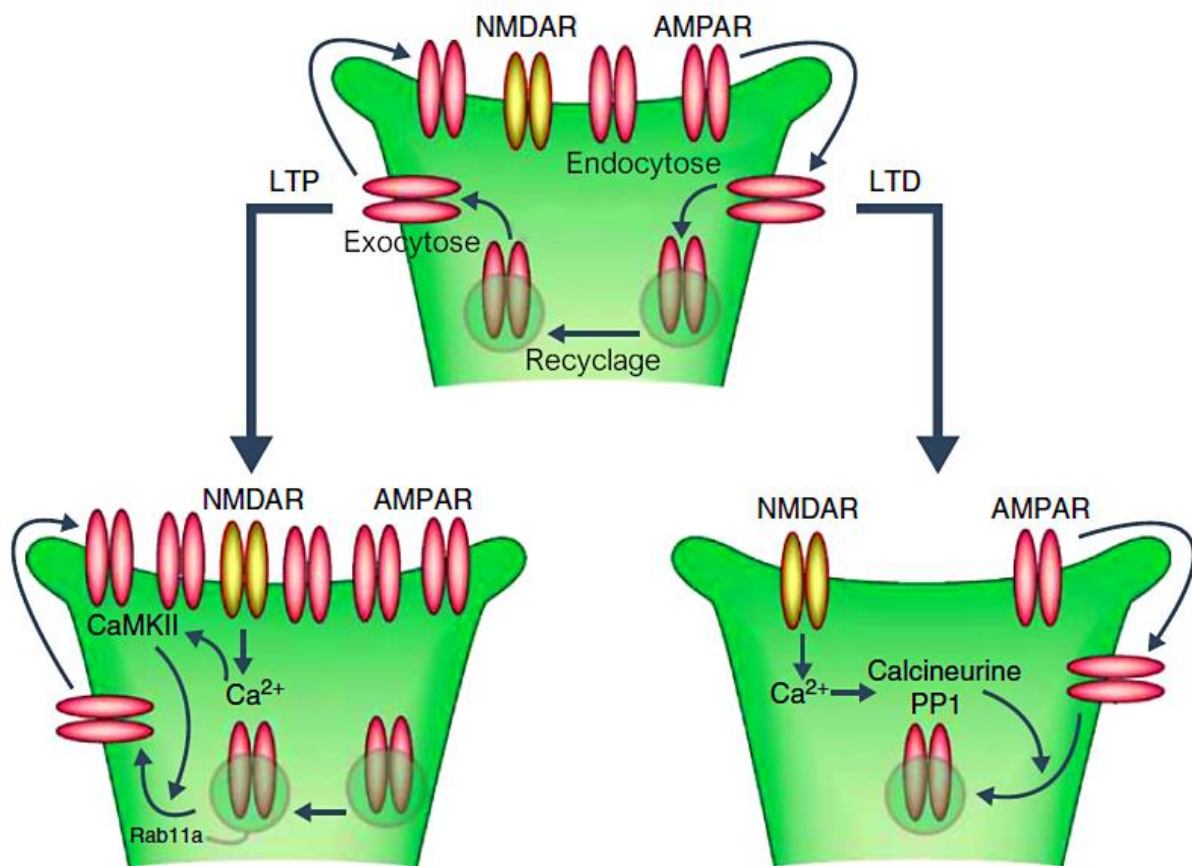
On parle de potentialisation à long terme (*Long-Term Potentiation, LTP*) lorsque la connexion synaptique est renforcée et de dépression à long terme (*Long-Term Depression, LTD*) lorsqu'elle est affaiblie. La LTP et la LTD ont surtout été étudiées dans l'aire CA1 de l'hippocampe pour les synapses excitatrices. Au niveau de ces synapses, deux récepteurs au glutamate sont colocalisés : le premier est un canal ionique au Ca^{2+} et Na^+ activé par le N-Méthyl-D-Aspartate (NMDAR) ; le second est un canal sodique activé par l'Acide α -Amino-3-hydroxy-5-Méthyl-4-isoxazolePropionique (AMPA) (Citri et Malenka, 2007).

Lorsque la membrane postsynaptique est au repos, les NMDAR sont bloqués par les ions Mg^{2+} . Ainsi, lorsque le glutamate est libéré par la terminaison présynaptique, il n'a d'action que sur les AMPAR, à l'origine de la dépolarisation du neurone. En revanche, lorsque la membrane du neurone postsynaptique est dépolarisée, l'ion Mg^{2+} se dissocie du canal NMDAR et le glutamate peut agir sur les deux récepteurs. Il y a ainsi entrée des ions Na^+ et Ca^{2+} . L'entrée massive des ions calcium induit une LTP et provoque une cascade d'activation intracellulaire de nombreuses kinases, induisant l'ancrage de nouveaux AMPAR au niveau de la membrane postsynaptique. Ceci a pour conséquence l'augmentation de la sensibilité au glutamate (Figure 13 ; Citri et Malenka, 2007).

En revanche, l'entrée modérée des ions calcium induit une LTD et active préférentiellement des phosphatases. Cela conduit à la dissociation des AMPAR et des échafaudages moléculaires de la PSD et leur diffusion latérale vers les zones d'endocytose. Les AMPAR sont alors séquestrés dans le neurone et peuvent être dégradés (Figure 13). Il existerait un mécanisme similaire de LTD, cette fois-ci dépendante du récepteur

métabotropique au glutamate. De plus, il a récemment été mis en évidence une forme de LTD induite par les endocannabinoïdes (Citri et Malenka, 2007).

Figure 13 – Modèle du transport cellulaire de l'AMPA durant la potentialisation et la dépression à long terme (d'après Citri et Malenka, 2007). À l'état initial (en haut), les AMPAR effectuent un cycle entre la membrane postsynaptique et les compartiments intracellulaires. Ils diffusent latéralement en dehors de la synapse jusqu'à une zone d'endocytose où ils sont intégrés dans des endosomes par un processus dépendant des clathrines et dynamines. Normalement, ces récepteurs sont transférés dans des endosomes de recyclage et sont exocytés au niveau de la membrane plasmique, suivi d'une diffusion latérale vers la synapse où ils sont ancrés par les protéines MAGUK. Suite à l'induction de la LTP (à gauche), il y a augmentation de l'exocytose des récepteurs, augmentation de leur stabilisation dans la synapse par un mécanisme dirigé par le calcium impliquant la protéine kinase Ca^{2+} /calmoduline-dépendante (CaMKII) et augmentation de la fusion des endosomes de recyclage médiée par la protéine Rab11a. Suite à l'induction de la LTD (à droite), il y a augmentation de l'endocytose au niveau des sites extrasynaptiques par un mécanisme Ca^{2+} -dépendant et impliquant des phosphatases, en particulier la calcineurine et les phosphatases 1 (PP1), séquestrant ainsi dans la cellule les AMPAR qui sont probablement dégradés.



La LTP et la LTD sont donc deux mécanismes antagonistes. Une faible variation de calcium postsynaptique peut induire l'une ou l'autre, suggérant une régulation très fine. Il a été mis en évidence que la LTP et la LTD sont directement impliquées dans l'encodage des expériences. Ces mécanismes seraient nécessaires aux apprentissages associatifs – comme le conditionnement classique, dit de Pavlov, et le conditionnement opérant, dit de Skinner – et aux apprentissages non associatifs – comme l'habituation et la sensibilisation. Ainsi, l'induction de la LTP dans le gyrus denté peut augmenter la neurogenèse dans

l'hippocampe. De plus, durant l'apprentissage et le rappel de nouveaux souvenirs spatiaux, des cellules granulaires néoformées sont préférentiellement activées, montrant une incorporation activité-dépendante de ces neurones dans les réseaux de la mémoire spatiale dans le gyrus denté. Enfin, la LTP et la LTD seraient fortement impliquées dans le développement précoce des circuits neuronaux : le seuil d'induction de la LTP est plus faible chez les jeunes neurones que chez les neurones matures. Ceci semble utile à la formation de nouveaux contacts synaptiques durant la formation de la mémoire. Un dysfonctionnement de ces mécanismes serait à l'origine de nombreux troubles psychiatriques, tels que l'autisme et la schizophrénie (Citri et Malenka, 2007).

Il existe également une plasticité liée à l'homéostasie du neurone. Elle consiste à réguler l'efficacité globale des transmissions synaptiques (excitatrices et inhibitrices) d'un réseau neuronal afin d'empêcher des modifications trop importantes de son niveau d'activité. Ainsi, la baisse importante de l'activité d'un réseau durant un long moment (> 24-48 heures) augmente la force de toutes les synapses excitatrices dans les neurones excitateurs de ce réseau (Citri et Malenka, 2007).

Enfin, on parle de métaplasticité pour la capacité des neurones à exprimer une plasticité à long terme. Il s'agit d'une forme de plasticité de plus haut niveau dans laquelle l'activité synaptique n'affecte pas directement l'efficacité de la transmission synaptique mais conduit à des modifications persistantes de la direction ou de l'amplitude de la plasticité synaptique qui en découle. Par exemple l'activation répétée des NMDAR dans l'hippocampe, de façon à ne pas favoriser la LTP ou la LTD, peut néanmoins conduire à rendre la LTP plus difficile à provoquer et favoriser l'induction de la LTD. Ainsi, il a été montré qu'en modifiant le niveau d'activité du cortex visuel durant le développement, en cachant expérimentalement un seul œil, les seuils de LTP et LTD sont décalés dans les neurones correspondant au traitement du signal de cet œil. Cela est probablement dû aux changements de la stœchiométrie des NMDAR synaptiques (modification du type des sous-unités du récepteur) (Citri et Malenka, 2007).

b. Complexes dystrophine-glycoprotéines et plasticité neuronale

La formation des synapses requiert l'activation de gènes codant pour les protéines synaptiques, ainsi que la formation, l'accumulation et le transport intracellulaire de vésicules contenant les complexes protéiques pré- et postsynaptiques. Une phase prolongée de maturation fait suite à la formation des jonctions synaptiques pour *in fine* obtenir des synapses complètement fonctionnelles. Le développement de ces connexions permettrait de transformer les circuits immatures en patrons organisés de connexions qui vont aider au fonctionnement de l'encéphale chez l'adulte. L'activité serait à l'origine de patrons qui joueront un rôle significatif dans la formation des circuits neuronaux en renforçant ou en affaiblissant des connexions émergentes. Les modifications de la

structure du cortex lors de son développement, ainsi que le maintien ou la perte de synapses fonctionnelles, semblent être contrôlés en grande partie par l'équilibre entre transmissions inhibitrices et excitatrices, et par les différentes formes de plasticité synaptique, comme la LTP et la LTD. La traduction d'un patron produit par une activité en processus de synaptogenèse est permise par le relargage local de neurotrophines comme le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*, BDNF) et la neurotrophine 4. Ces protéines permettraient de contrôler la survie et la différenciation des neurones, et semblent de surcroît agir au niveau des signaux rétrogrades lors du remodelage des synapses. Par exemple la LTD induit le rétrécissement des épines dendritiques ce qui peut contribuer aux processus d'élimination des synapses. Les mécanismes sous-jacents impliquent le désassemblage des molécules d'adhérence, la rupture des filaments d'actine dans les densités post-synaptique, et la réorganisation du réseau du cytosquelette (Vaillend *et al.*, 2008). Or nous avons vu précédemment que la dystrophine est principalement exprimée dans les zones présentant une très forte plasticité cérébrale, à savoir le cortex cérébral, l'hippocampe et le cervelet.

Il a été montré que l'expression de la dystrophine augmente tardivement au cours du développement, parallèlement à la baisse du niveau de plasticité synaptique. Or les DGC sont impliqués directement dans la liaison entre les membranes pré- et postsynaptiques via les jonctions neurexine-neuroligine (Brünig *et al.*, 2002). L'assemblage et le désassemblage des complexes regroupant les récepteurs postsynaptiques sont essentiels lors des processus de plasticité à long terme. Les DGC sont directement impliqués dans ces assemblages. La dystrophine aurait ainsi un rôle important dans la capacité des neurones à modifier le regroupement des récepteurs au niveau de la membrane postsynaptique et donc dans les mécanismes de plasticité synaptique (Grady *et al.*, 2006 ; Muir et Kittler, 2014). La dystrophine semble agir directement dans le mécanisme de la LTP en se liant à la calmoduline et la CaMKII (Anderson *et al.*, 1996 ; Pilgram *et al.*, 2009). Enfin, la dystrophine se situe au centre de cascades de régulation intracellulaires et occupe donc une place importante dans l'homéostasie des neurones, en particulier l'homéostasie calcique. Elle aurait ainsi un rôle important dans la régulation de la diffusion latérale des récepteurs GABA_A et dans le relargage présynaptique. Le rôle de la dystrophine dans la plasticité synaptique semble donc majeur, bien que présente uniquement au niveau postsynaptique (Lévi *et al.*, 2002 ; Mehler, 2000 ; Muir et Kittler, 2014).

Tous ces résultats suggèrent que la dystrophine permettrait de stabiliser les circuits neuronaux en figeant les synapses dans le réseau une fois un processus d'apprentissage acquis.

c. Complexes dystrophine-glycoprotéines et plasticité non neuronale

Depuis peu, les chercheurs s'intéressent à la plasticité des éléments non neuronaux, tels que les astrocytes, les oligodendrocytes et les vaisseaux sanguins. La gliogenèse et la croissance des prolongements astrocytaires semblent être modulées par l'expérience et l'apprentissage, ce qui pourrait augmenter les contacts entre les prolongements astrocytaires et les synapses. Il existerait également une plasticité de l'angiogenèse dépendante de l'expérience (Vaillend *et al.*, 2008).

Il semblerait que de telles formes de plasticité puissent être importantes dans la régulation du microenvironnement synaptique en réponse à l'augmentation de l'activité neuronale et du besoin en oxygène, ainsi que pour la régénération post-traumatique cérébrale. Or nous avons vu précédemment que les DGC sont présents au niveau des pieds astrocytaires synaptiques, permettant de regrouper les canaux ioniques impliqués dans la clairance de la synapse et au niveau des astrocytes périvasculaires. La dystrophine semble donc jouer un rôle important dans la mise en place de la plasticité non neuronale (Vaillend *et al.*, 2008).

B. Pathogénie neurocomportementale liée à la perte de la dystrophine

1. Chez l'humain atteint de la myopathie de Duchenne

Il a souvent été rapporté un retard mental chez les patients DMD. Savoir si ces troubles cognitifs sont primaires – c'est-à-dire directement induits par la perte de dystrophine dans l'encéphale, ou secondaires – c'est-à-dire induits par le contexte social et les difficultés rencontrées durant le développement en lien avec le handicap physique de ces patients – est un véritable défi (Ahn et Kunkel, 1993). Comme étudié précédemment, la Dp427 est impliquée dans de nombreuses structures et fonctions du système nerveux central. Il a ainsi été émis l'hypothèse que la perte de cette isoforme notamment induirait des altérations structurelles et fonctionnelles chez les patients DMD, à l'origine de troubles cognitifs primaires s'ajoutant à des troubles cognitifs secondaires évidents.

a. Troubles structuraux

Des autopsies de patients DMD menées par Jagadha et Becker (1988) ont mis en évidence une diminution importante de la longueur des dendrites et de l'arborisation neuronale dans le cortex visuel. Le volume cérébral et en particulier le volume de matière grise mesurés par imagerie par résonance magnétique (IRM) sont significativement plus faibles chez les patients DMD que chez des individus sains, et ce d'autant plus que la mutation est

distale (affectant ainsi davantage d'isoformes). Ceci semble être expliqué par un volume intracrânien plus faible (al-Qudah *et al.*, 1990 ; Doorenweerd *et al.*, 2014).

b. Troubles fonctionnels

L'étude du cerveau par tomographie par émission de positrons avec marquage au fluorodésoxyglucose ^{18}F a montré une réduction du métabolisme glucosique cérébelleux et cortical cérébral, en particulier de la zone sensorimotrice, du néocortex temporal et des structures temporales médiales chez des patients DMD (Bresolin *et al.*, 1994 ; Lee *et al.*, 2002). Il a également été montré que les patients DMD ont des ratios cérébraux de phosphate inorganique sur ATP, sur phosphomonoesters et sur phosphocréatine plus élevés que la population générale (Tracey *et al.*, 1995). Lv *et al.* (2011) ont montré par IRM fonctionnelle une baisse de la synchronisation locale neuronale et une baisse de la concentration en matière grise dans le cortex sensorimoteur. Cependant les études utilisant l'électro-encéphalographie n'ont pas mis en évidence de différence significative entre les patients DMD et des témoins supposés sains. Ainsi il est émise l'hypothèse que la baisse d'excitabilité du cortex moteur serait le résultat d'un fonctionnement synaptique aberrant, et non d'une modification de vitesse de conduction ni d'excitabilité lors de stimulation électrique (Anderson *et al.*, 2002). Il est ainsi suspecté que la perte de dystrophine dans les cellules de Purkinje du cervelet puisse avoir d'importantes conséquences sur l'apprentissage et le langage, notamment par interruption de la boucle cérébro-cérébelleuse. Ce phénomène serait également à l'origine d'une perte de coordination cognitive et motrice (Cyrulnik et Hinton, 2008). Les troubles locomoteurs trouveraient ainsi une origine musculaire et neurologique (cortex moteur et cervelet).

De manière cohérente avec les résultats précédents, le nombre de récepteurs GABA_A est significativement plus faible dans le cortex préfrontal chez les patients DMD que chez des individus sains (Suzuki *et al.*, 2017). Or comme étudié précédemment, ces récepteurs sont essentiels dans les tâches cognitives et ils jouent un rôle important dans de nombreuses maladies neuropsychiatriques telles que la schizophrénie et l'autisme (Hines *et al.*, 2013 ; Rudolph et Möhler, 2014). La DMD serait également associée à l'épilepsie (Pane *et al.*, 2013). Or les récepteurs GABA_A occupent une place centrale dans ce trouble. Une altération de leur fonction ou une diminution de leur quantité peut induire des décharges rythmiques spontanées à l'origine de crises convulsives. La perte de Dp427 – isoforme permettant l'ancrage et le regroupement de ces récepteurs – constituerait ainsi un mécanisme épileptogène (Hendriksen *et al.*, 2016 ; Knuesel *et al.*, 2001). Un second mécanisme est suspecté : des troubles de l'homéostasie potassique – régulée par les canaux Kir4.1 – et une altération de la distribution des canaux AQP4 dans la glie ont été observés chez les individus épileptiques. Or nous avons vu précédemment que la dystrophine joue un rôle central dans le regroupement et l'ancrage de ces canaux, bien que seule la Dp71 semble impliquée (Binder *et al.*, 2012).

2. Chez la souris *mdx*

En raison des contraintes éthiques évidentes, la pathogénie de la maladie a surtout été étudiée chez l'animal en particulier le modèle souris *mdx*.

a. Troubles structuraux

Une première étude menée par IRM sur quatre souris *mdx* et quatre souris saines n'a pas mis en évidence de différences statistiquement significatives du volume cérébral, de la taille des ventricules et de la taille des régions exprimant normalement la dystrophine en l'absence de Dp427. Ce résultat a été confirmé par microscopie électronique sur sections ultra-minces et par analyses volumétriques détaillées de certaines zones de l'hippocampe (Miranda *et al.*, 2009). Cependant une étude plus récente utilisant l'IRM et la spectroscopie par résonance magnétique sur huit souris *mdx* et sept souris saines a montré un élargissement significatif des ventricules latéraux en l'absence de Dp427 (Xu *et al.*, 2015). La différence entre ces deux études pourrait s'expliquer par la taille de l'échantillon. Cependant d'autres études sont nécessaires pour conclure.

Il a également été mis en évidence des altérations morphologiques se traduisant par une diminution du nombre de neurones dans le cortex moteur et une diminution du nombre de neurones pyramidaux dans la voie corticospinale (Miranda *et al.*, 2016 ; Sbriccoli *et al.*, 1995). Cependant la densité synaptique globale – mesurée par analyse stéréologique – et le ratio synapses sur neurones ne diffèrent pas significativement chez la souris *mdx*, suggérant que la perte de la Dp427 n'altère pas le processus initial de la synaptogenèse durant le développement. Enfin, l'analyse de la taille et de la circularité du noyau des neurones pyramidaux de l'aire CA1 n'a pas montré d'anomalie significative (Miranda *et al.*, 2009).

Chez la souris *mdx*, la BHE est endommagée. Les cellules endothéliales bordant la plupart des microvaisseaux sanguins dans le cerveau des souris *mdx* sont altérées, avec ouverture des jonctions serrées. Une partie des pieds périvasculaires gliaux contiennent des débris cellulaires et sont enveloppés par des microvaisseaux dégénératifs. Le nombre de canaux AQP4 et de protéines ZO-1 (protéine de la *zona occludens* impliquée dans les jonctions serrées) est diminué. Ces altérations de la BHE suggèrent l'existence de troubles de la perméabilité vasculaire, potentiellement impliquée dans la pathogénie des troubles neurologiques (Nico *et al.*, 2003). Par ailleurs une étude utilisant l'imagerie du tenseur de diffusion a montré une augmentation de la diffusion de l'eau dans le cortex préfrontal et une diminution de l'anisotropie fractionnelle dans l'hippocampe. Ces résultats suggèrent une perte de l'organisation cellulaire à l'origine notamment d'une modification des flux d'eau entre les cellules de l'hippocampe (Xu *et al.*, 2015).

b. Troubles fonctionnels

i. Synapses inhibitrices

L'absence de Dp427 conduit à la réduction marquée du nombre et de la taille des regroupements des récepteurs GABA_A dans l'aire CA1 de l'hippocampe, le noyau basolatéral de l'amygdale et le cervelet (Brünig *et al.*, 2002 ; Knuesel *et al.*, 1999 ; Sekiguchi *et al.*, 2009).

Dans l'aire CA1, l'altération de la fonction GABAergique induit l'augmentation de la fréquence des potentiels postsynaptiques inhibiteurs (PPSI) spontanés conduisant à la perte de la STP. En revanche, il n'y a pas de modification de la densité des synapses, ni de variation des PPSI évoqués. L'hypothèse est que l'augmentation de la fréquence de PPSI spontanés soit secondaire à une augmentation de la probabilité de relargage des vésicules présynaptiques (Graciotti *et al.*, 2008).

Dans les neurones pyramidaux du noyau basolatéral de l'amygdale, la perte de la Dp427 induit la diminution marquée de la fréquence des PPSI induits par la noradrénaline chez la souris *mdx* (Sekiguchi *et al.*, 2009).

Dans les cellules de Purkinje du cervelet, après administration de bicuculline (antagoniste GABAergique), l'amplitude des potentiels postsynaptiques excitateurs (PPSE) est plus grande chez les souris *mdx* et l'amplitude des PPSI est plus petite. Ces résultats montrent une diminution de la capacité inhibitrice des cellules de Purkinje en l'absence de Dp427 (Anderson *et al.*, 2003). La LTD hétérosynaptique de ces cellules est significativement réduite (Anderson *et al.*, 2004), alors que la LTD homosynaptique est augmentée, probablement en raison de troubles de l'homéostasie calcique (Anderson *et al.*, 2010). La fréquence et l'amplitude des PPSI spontanés sont diminués chez les souris *mdx*. Ce résultat est cohérent avec la diminution du nombre de regroupements de récepteurs GABA_A dans les PSD (Kueh *et al.*, 2008). L'enregistrement de l'activité électrique de couches de cervelet exposées au gaboxadol (agoniste GABAergique) montre une augmentation du nombre de récepteurs GABAergiques extrasynaptiques (Kueh *et al.*, 2011). Toutes ces données suggèrent que la perte de la Dp427 empêche le regroupement des récepteurs GABA_A au niveau des PSD des cellules de Purkinje, affectant ainsi l'efficacité des synapses inhibitrices (Waite *et al.*, 2012).

ii. Synapses excitatrices

La souris *mdx* présente des modifications ultrastructurelles des terminaisons axonales glutamatergiques dans l'aire CA1 de l'hippocampe. Alors que la distribution générale des vésicules synaptiques et la taille de la fente synaptique ne sont pas affectées, il y a

réduction de la taille de la zone de stockage des vésicules et augmentation de la densité des vésicules amarrées à la membrane plasmique. Il y aurait ainsi une augmentation de la probabilité de relargage de neurotransmetteurs des synapses excitatrices chez la souris *mdx*. Par conséquent, le seuil d'activation des récepteurs NMDA est altéré et la STD, la STP et la LTP (en phase initiale et en phase de maintenance) sont facilitées au niveau présynaptique en l'absence de Dp427 (Knuesel *et al.*, 1999; Miranda *et al.*, 2011; Vaillend *et al.*, 2004, 1999; Vaillend et Billard, 2002).

iii. Métabolisme

Il a été mis en évidence une augmentation statistiquement significative de la quantité en phosphocholine et en glutathion dans l'hippocampe ainsi qu'en taurine dans le cortex préfrontal chez la souris *mdx* par rapport à des souris saines. Par ailleurs il est rapporté une diminution statistiquement significative de la quantité en GABA dans l'hippocampe chez la souris *mdx* par rapport à des souris saines. Ces résultats suggèrent une modification structurelle de ces régions, une altération des défenses cellulaires anti-oxydantes et un dysfonctionnement de la neurotransmission GABAergique en l'absence de Dp427 (Xu *et al.*, 2015).

Par ailleurs les neurones granulaires du cervelet, pyramidaux corticaux et hippocampaux des souris *mdx* présentent un déficit de la régulation calcique de manière similaire aux fibres musculaires. Or l'accumulation du calcium intracellulaire conduit à des troubles excitotoxiques et une mort neuronale en condition d'hypoxie et d'ischémie. Ainsi ce déficit pourrait provoquer la destruction des neurones granulaires de manière analogue et donc contribuer au retard mental associé à la maladie (Haws et Lansman, 1991 ; Hopf et Steinhardt, 1992 ; Lopez *et al.*, 2016). Ces résultats sont à mettre en parallèle avec la mise en évidence d'une augmentation de la sensibilité à l'hypoxie des neurones de l'aire CA1 en l'absence de Dp427 (Mehler *et al.*, 1992). Une étude a mis en évidence que les souris *mdx* ont une augmentation de la PTP, mécanisme dépendant du calcium au niveau présynaptique, bien que ce phénomène n'ait pas été rapporté dans les études précédentes (Vaillend *et al.*, 1998).

Enfin il a été montré que les neurones pyramidaux corticaux et hippocampaux des souris *mdx* présentent des troubles de la régulation sodique intracellulaire de manière similaire aux fibres musculaires. Ces troubles seraient dépendants de l'âge des individus (Lopez *et al.*, 2016).

III. Étude clinique

A. Troubles musculaires

1. Chez l'humain atteint de la myopathie de Duchenne

Chez les patients DMD, les troubles musculaires sont les principaux signes cliniques de la maladie. L'ensemble des muscles (striés squelettiques, strié cardiaque et lisses) sont atteints. Chez certains enfants, il est possible d'observer un retard à l'acquisition de la marche. Entre 3 et 6 ans, les troubles de la marche sont marqués et se traduisent par une difficulté à la course et au saut et des chutes anormalement fréquentes. Progressivement, une lordose lombaire se manifeste avec une accentuation de la marche sur les orteils ayant pour origine une rétraction des tendons d'Achille. Des troubles statiques associés à une pseudo-hypertrophie des muscles des mollets ayant pour origine une infiltration par du tissu fibro-adipeux peuvent provoquer une démarche oscillante. On parle de signe de Gowers positif. Enfin, on note un retard de croissance dès les premières années de vie. Entre 6 et 10 ans, les chutes et fractures associées sont très fréquentes. L'enfant n'arrive plus à se relever seul. Une faiblesse musculaire progressive et bilatérale des membres et du tronc apparaît. Seuls les muscles innervés par les nerfs crâniens semblent épargnés. Ces patients présentent tous une scoliose importante, aggravée par la vie en fauteuil roulant. Une grande partie des enfants sont alors opérés du rachis. Autour de l'âge de 10 ans, la montée des escaliers puis la marche deviennent impossibles et le jeune patient est contraint à l'usage permanent du fauteuil roulant. L'utilisation des membres supérieurs se limite progressivement. En l'absence de traitement palliatif, la mort survient entre 10 et 29 ans (moyenne de $18,3 \pm 3,6$ ans). Elle est alors dans 90 % des cas d'origine respiratoire en raison de l'affaiblissement des muscles thoraciques et du diaphragme provoquant une hypoventilation et donc une rétention du dioxyde de carbone et une hypoxie, l'usage permanent du fauteuil roulant aggravant la symptomatologie respiratoire. Les infections respiratoires intercurrentes sont très fréquentes et le risque de fausse déglutition est fortement majoré en raison d'une macroglossie. Cependant, l'assistance ventilatoire invasive (par trachéotomie) comme non invasive ainsi que l'utilisation quasi-systématique de corticoïdes avant la perte de la marche ont permis d'augmenter considérablement l'espérance de vie, les patients atteignant en moyenne 36 ans. La défaillance cardiaque serait ainsi aujourd'hui à l'origine d'environ la moitié des décès sous ventilation artificielle. Une insuffisance cardiaque clinique est souvent rapportée, généralement autour de l'âge de 16 ans. Des anomalies électrocardiographiques sont visibles dans 60 à 90 % des cas et se traduisent par des ondes Q étroites et profondes, ainsi que de grandes ondes R. On peut également observer une tachycardie sinusale (Ishikawa *et al.*, 2011 ; Kieny *et al.*, 2013 ; McGreevy *et al.*, 2015 ; Mukoyama *et al.*, 1987 ; Parker *et al.*, 2005 ; Partridge, 1993 ; Sarrazin *et al.*, 2014).

2. Chez la souris *mdx*

Contrairement aux patients DMD, les souris *mdx* présentent peu de signes cliniques. Durant les deux premières semaines de vie, l'étude histologique des muscles ne montre aucune différence significative entre les souris *mdx* et des souris témoins. Entre trois et six semaines, les muscles commencent à se nécroser, mais restent stables en raison d'une régénération importante. Les muscles des membres sont souvent hypertrophiques durant cette phase. Les atteintes graves, telles que la dégénérescence musculaire, la scoliose ou l'insuffisance cardiaque, n'ont pas été observées avant l'âge de 15 mois ou plus. L'espérance de vie des souris *mdx* est réduite de 25 % environ, alors qu'elle est réduite de 75 % chez les patients DMD non traités (Chamberlain *et al.*, 2007 ; Li *et al.*, 2009 ; McGreevy *et al.*, 2015). Un nombre significatif des souris *mdx* âgées développe des sarcomes spontanés, en particulier une forme similaire au rhabdomyosarcome alvéolaire humain, cancer associé à un pronostic sombre (Chamberlain *et al.*, 2007). Cependant il est à noter que le diaphragme se détériore progressivement avec une perte d'élasticité, une fibrose et un déficit fonctionnel. Ce phénomène serait comparable à l'évolution des muscles des membres chez les patients DMD. De manière surprenante, on n'observe pas d'insuffisance respiratoire contrairement à l'humain. Ceci est expliqué par un remaniement de l'organisation cellulaire du diaphragme suffisant à compenser la dégénérescence musculaire diaphragmatique (Stedman *et al.*, 1991).

3. Chez le chien GRMD

La mortalité néonatale des chiens GRMD est d'environ 25 %, phénomène non rapporté chez l'humain. Lors de la première semaine de vie, certains chiens développent une forme dite « néonatale fulminante », avec nécrose massive de certains muscles, en particulier le diaphragme (à l'origine du décès par insuffisance respiratoire), les muscles trapèze, brachiocéphalique, deltoïde, extenseur radial du carpe, sartorius et la langue. Une part non négligeable des chiens présente dès les premières semaines de vie un retard de croissance se traduisant, entre un et six mois, par un poids 20 à 40 % inférieur à celui d'un chiot sain du même âge. À partir de l'âge de deux à trois mois, les chiots présentent une faiblesse des membres, une démarche raide mobilisant les deux postérieurs simultanément (*bunny hopping*), une abduction des coudes, une adduction des genoux, une hyperextension des carpes, une hyperflexion des tarses et une abduction des griffes, le tout se traduisant par des troubles locomoteurs marqués et évolutifs. Il est également rapporté une intolérance à l'effort, une incapacité à ouvrir complètement la bouche et une amyotrophie visible des muscles du tronc et des muscles temporaux. À l'âge de six mois, il est rapporté des contractures articulaires dues à la fibrose des muscles proximaux avec parfois cyphose ou lordose associée, une macroglossie et des troubles de la déglutition pharyngée et œsophagienne (à l'origine d'hypersalivation, dysphagie, régurgitation et fausse déglutition), une démarche anormale et une augmentation de la fréquence

respiratoire. Entre six et dix mois, la maladie peut soit rester relativement stable, soit s'aggraver progressivement. Une insuffisance cardiaque peut apparaître avec hypomotilité du ventricule gauche. Le décès intervient généralement avant l'âge de trois ans. Il est à noter la très grande similarité des signes cliniques observés chez les humains DMD et les chiens GRMD, bien que les manifestations cliniques soient hétérogènes d'un individu à l'autre, l'ensemble des signes cliniques précédemment décrits pouvant varier très fortement en termes d'intensité et d'âge d'apparition d'un individu à l'autre (Kornegay, 2017 ; McGreevy *et al.*, 2015 ; Valentine *et al.*, 1988, 1990, 1992).

B. Troubles neurocognitifs

1. Chez l'humain atteint de la myopathie de Duchenne

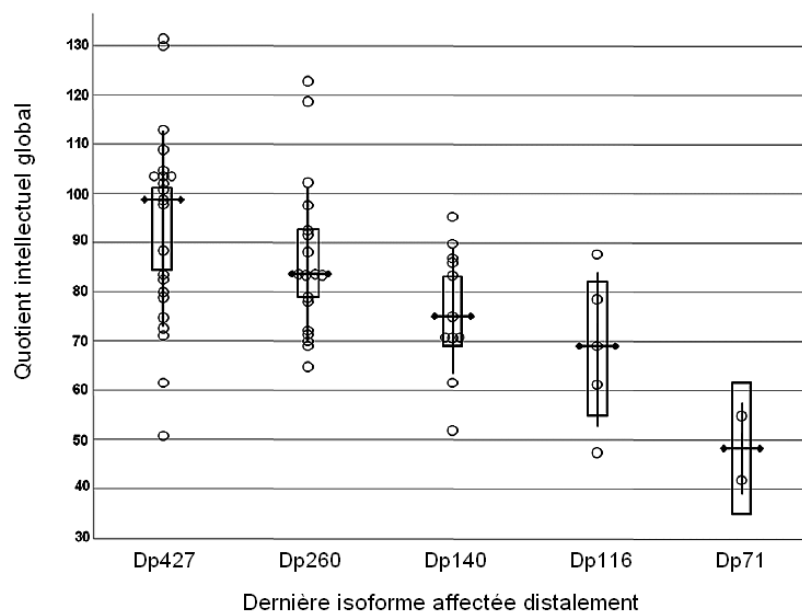
a. Troubles intellectuels

Bien qu'aucun consensus scientifique n'existe à l'heure actuelle sur la définition d'intelligence, des tests d'intelligence ont été développés chez l'humain afin d'évaluer d'éventuels déficits cognitifs. David Wechsler, dont les tests sont depuis longtemps considérés comme ceux de référence, a défini l'intelligence comme la capacité globale d'une personne à agir dans un but donné, à penser rationnellement et à interagir efficacement avec son environnement (Wechsler, 1944). L'interprétation des échelles d'intelligence de Wechsler, jusqu'à récemment, se faisait selon deux grandes catégories. La première est le quotient intellectuel (QI) verbal qui nécessite de répondre oralement à des questions formulées oralement et porte sur la compréhension générale, le raisonnement arithmétique, la mémoire immédiate, les analogies et le vocabulaire. La seconde est le QI performance qui nécessite de répondre de manière non orale à des questions formulées oralement, par exemple en interagissant avec des cartes, et met en jeu les qualités perceptives et les capacités d'analyse et de raisonnement du sujet. L'ensemble formé par le QI verbal et le QI performance constitue le QI global. Aujourd'hui, cette dichotomie a été remplacée par cinq indicateurs : compréhension verbale, aptitudes visuo-spatiales, raisonnement perceptif, mémoire de travail et vitesse de traitement. Le QI mesuré par les tests de Wechsler est un QI standard. Il correspond au rang relatif auquel se situe l'individu par rapport à la population générale suivant une loi normale (Kaufman *et al.*, 2006 ; Weiss *et al.*, 2016).

De très nombreuses études ont montré un déficit intellectuel chez les patients DMD. Leur QI global suit une distribution normale et est en moyenne inférieur d'un écart-type avec celui des frères et sœurs des patients testés. La comparaison avec la fratrie permet d'exclure en partie les biais liés aux facteurs socioéconomiques. Au sein d'une même école pour enfants atteints de maladies neuromusculaires, il a été montré que le QI global des

patients DMD était significativement plus bas que celui de patients présentant une amyotrophie spinale (maladie musculosquelettique progressive à l'origine de troubles moteurs similaires). Ces résultats suggèrent donc un déficit intellectuel primaire chez les patients DMD (Snow *et al.*, 2013a). Une méta-analyse, portant sur 32 études conduites entre 1960 et 1999 a montré que le QI global moyen des patients DMD était de 80, soit un écart-type en dessous de celui de la population générale (par définition à 100). Le QI verbal était en moyenne de 80 et le QI de performance était en moyenne de 85. Il est à noter une grande variabilité entre les individus testés (Cotton *et al.*, 2001). Bien que le score de QI global et le score de QI performance semblent stables au cours du temps, le score de QI verbal augmente avec l'âge, conduisant à une diminution de l'écart entre QI verbal et QI performance (Cotton *et al.*, 2005). Le score de QI verbal est significativement plus bas chez les patients DMD que chez les patients atteints d'amyotrophie spinale, alors que leur score de QI performance est comparable (Billard *et al.*, 1992). Ces résultats suggèrent que le déficit intellectuel est global chez les patients DMD mais qu'il est surtout verbal. Il existe aujourd'hui un consensus sur le lien entre génotype et phénotype intellectuel (Figure 14). Les mutations distales – affectant donc un grand nombre d'isoformes – conduisent à des troubles plus importants que les mutations proximales (Colombo *et al.*, 2017 ; Desguerre *et al.*, 2009 ; Moizard *et al.*, 2000 ; Snow *et al.*, 2013a ; Taylor *et al.*, 2010 ; Wingeier *et al.*, 2011).

Figure 14 – Quotient intellectuel global en fonction de l'effet cumulatif de la perte des isoformes de dystrophine chez les patients atteints de la myopathie de Duchenne (Taylor *et al.*, 2010). (Cercles) quotient intellectuel global des patients affectés ; (lignes verticales) écart-type de la moyenne ; (boîtes) intervalle de confiance à 95 % de la moyenne ; (barres horizontales) médiane.



Les études portant sur la mémoire des patients DMD montrent des résultats contradictoires ne permettant pas de conclure. Ceci est principalement expliqué par la différence du type de témoin utilisé dans ces études, par exemple des individus atteints

d'amyotrophie spinale, des individus atteints d'arthrite rhumatoïde juvénile, la fratrie des patients, *etc.* En revanche, il a été montré par de nombreuses études que les patients DMD présentent des troubles des fonctions cognitives supérieures telle que la fonction exécutive – par exemple la capacité à planifier (Snow *et al.*, 2013a).

Les enfants DMD semblent plus à risque pour trois troubles d'apprentissage : la dyslexie (difficulté de lecture), la dyscalculie (difficultés mathématiques) et la dysgraphie (difficulté à la communication écrite). Un déficit d'automatisation des compétences serait le point-clé de ces difficultés : automatisation des phonèmes et des mots dans la dyslexie, automatisation des nombres et procédures dans la dyscalculie, automatisation des tailles et des formes dans la dysgraphie. Il a été émis l'hypothèse que le cervelet puisse jouer un rôle important dans ce processus et qu'il soit même directement impliqué dans la dyslexie. Une atteinte cérébelleuse des patients DMD pourrait ainsi être un élément de réponse à l'incidence élevée des problèmes de lecture chez ces patients (Poysky, 2007). Ainsi une étude menée chez des enfants DMD présentant une perte de la Dp427 uniquement, ne souffrant ni de déficit intellectuel (mesuré par le QI) ni de troubles neuropsychiatriques (par exemple l'épilepsie, les troubles du spectre autistique, le déficit de l'attention avec hyperactivité) ni de troubles neurosensoriels (troubles de la vision ou de l'audition) et ne recevant pas de traitement corticoïde a montré que leur capacité d'apprentissage implicite était significativement plus faible que chez des enfants du même âge et à QI égal. Or il a été montré que les patients souffrant de lésions cérébelleuses en régions latérales du cervelet présentaient des troubles de l'apprentissage implicite et procédural (Vicari *et al.*, 2018). En complément, une étude utilisant le conditionnement par clignement d'œil n'a pas mis en évidence de différence significative entre les patients DMD et le groupe témoin. Ce conditionnement dépend en particulier de l'intégrité du cervelet intermédiaire, suggérant que cette partie soit préservée en l'absence de Dp427 (Schara *et al.*, 2015). Or il est à noter que la dystrophine est plus exprimée dans le cortex du cervelet latéral qui est une région récente dans l'évolution du cervelet et est impliquée dans les processus cognitifs, que dans le cervelet intermédiaire qui est une région ancienne et est impliquée notamment dans la coordination motrice (Snow *et al.*, 2013b).

b. Troubles comportementaux et psychosociaux

L'étude quantitative de la personnalité montre que les enfants DMD ont un score pour la catégorie « neuroticisme » significativement plus élevé et présentent significativement plus de troubles relationnels avec leurs pairs que les autres enfants (Fitzpatrick *et al.*, 1986). Le neuroticisme est défini comme une instabilité émotionnelle et une tendance à la négativité. Il conduit à des pertes du contrôle de soi, une faible capacité à gérer le stress psychologique et une tendance à se plaindre (Ormel *et al.*, 2012). Une méta-analyse a montré qu'un fort neuroticisme est notamment associé à des troubles anxieux,

psychotiques et schizophréniques, ainsi qu'à une tendance à la dépression (Jeronimus *et al.*, 2016).

L'étude du fonctionnement neurocomportemental et psychosocial a permis de confirmer les troubles relationnels avec leurs pairs. Ainsi presque un tiers des patients DMD présenterait des difficultés importantes à communiquer. Néanmoins il a été montré que les patients DMD seraient moins dépendants, moins déprimés et moins anxieux que d'autres patients présentant une maladie chronique (Snow *et al.*, 2013a).

L'administration de corticoïdes – qui est aujourd'hui le traitement de référence pour retarder l'évolution de la maladie – peut induire des effets comportementaux et modifier l'humeur. L'étude du fonctionnement psychosocial n'a pas permis de mettre en évidence de différence entre les patients DMD recevant un traitement par des corticoïdes et ceux n'en recevant pas (Darke *et al.*, 2006 ; Snow *et al.*, 2013a).

c. *Troubles psychiatriques*

L'étude des troubles psychiatriques montre une comorbidité entre la DMD et les troubles du spectre autistique (DMD : 15 – 33 % ; population générale : 0,8 – 2,5 %), le trouble de déficit de l'attention avec hyperactivité (DMD : 11,7 – 32 % ; population générale : 1,2 – 7,3 %), les troubles anxieux (DMD : 27 % ; population générale : 8,4 – 21,3 %) et les troubles obsessionnels compulsifs (DMD : 4,8 % ; population générale : 1,1 – 3,3 %) (Bandelow et Michaelis, 2015 ; Banihani *et al.*, 2015 ; Christensen, 2016 ; Fayyad *et al.*, 2007 ; Hinton *et al.*, 2009 ; Pane *et al.*, 2012 ; Poysky, 2007 ; Ruscio *et al.*, 2010 ; Snow *et al.*, 2013a).

d. *Troubles neurologiques*

Il a été montré une comorbidité entre la DMD et l'épilepsie partielle ou généralisée (DMD : 2 – 6,3 % ; population générale : 0,6 – 0,9 %) et les convulsions fébriles (DMD : 4 % ; population générale : 2 – 5 %) (Fiest *et al.*, 2017 ; Goodwin *et al.*, 1997 ; Nakamura *et al.*, 2008 ; Pane *et al.*, 2013 ; Shinnar, 2003 ; Tsao et Mendel, 2006).

2. *Chez la souris mdx*

a. *Réactivité au stress et à la peur*

En étant particulièrement exprimé dans l'amygdale cérébrale et les structures corticales, le gène de la dystrophine semble jouer un rôle central dans la réactivité au stress et à la peur chez plusieurs espèces animales. Ceci a d'abord été suggéré chez la souris *mdx* qui

exprime une forte réaction d'immobilisation tonique (*freezing*) en réponse à une contrainte physique (par exemple la prise du cou de la souris entre le pouce et l'index de l'expérimentateur). Cette réaction est significativement plus forte chez les souris *mdx* que les souris saines. Elle est également robuste, résistante à l'extinction¹, répétable et peut ainsi être induite de manière stable. Ce comportement a ensuite été décrit chez la caille japonaise où l'analyse à haut rendement d'un transcriptome chez plusieurs lignées a montré une association significative entre une région génomique comprenant le gène *DMD* et la durée de l'immobilisation tonique. Ce comportement inné, déclenché par la peur, serait également une réponse contre les prédateurs. Une étude par analyse génétique par puces à ARN a suggéré que le gène *DMD* soit également impliqué dans la réponse à la menace de prédation chez le têtard. Enfin une étude menée chez le porc a montré qu'une diminution de l'expression du gène *DMD* était associée avec un syndrome de stress, conduisant parfois à la mort que ce soit lors de contention, du transport vers l'abattoir ou à la suite d'anesthésie (Frésard *et al.*, 2012 ; Mori *et al.*, 2015 ; Nonneman *et al.*, 2012 ; Sekiguchi *et al.*, 2009 ; Vaillend et Chaussonot, 2017).

Il a été montré que les souris *mdx* ne présentent pas de différence significative en termes de néophobie ou de comportements de type dépressif, ce qui aurait pu contribuer à augmenter la peur. Cela a été vérifié par des tests de nage forcée et des tests de suspension caudale. Lors d'une contrainte physique conduisant au *freezing*, des mesures d'hormone de stress adrénocorticotropique (ACTH) et des mesures de corticostéronémie ne montrent pas de différence significative entre les souris *mdx* et saines. Enfin, il a été vérifié que le *freezing* ne correspond pas ici à de la catalepsie (Vaillend et Chaussonot, 2017 ; Yamamoto *et al.*, 2010).

L'administration intracérébrale d'oligomères permettant un saut d'exon et ainsi l'expression de la dystrophine cérébrale a induit une baisse du *freezing* chez les souris *mdx* (Sekiguchi *et al.*, 2009), confirmant le rôle cérébral dans ce comportement. L'administration systémique d'oligonucléotides antisens tricyclo-acide désoxyribonucléique (ADN) permettant l'expression de la dystrophine dans les muscles, le cœur et le cerveau a également induit une normalisation du *freezing* chez les souris *mdx* (Goyenvalle *et al.*, 2015).

¹ Lorsqu'un conditionnement est établi, son maintien n'est possible que si le stimulus inconditionnel (ici le danger) continue à être délivré. Si l'on cesse de présenter le stimulus inconditionnel après le stimulus conditionnel (ici la contention), la réponse conditionnée (ici le *freezing*) décroît progressivement pour finir par disparaître : c'est le phénomène d'extinction.

La résistance à l'extinction correspond à la persistance du comportement de défense malgré un stimulus conditionnel non suivi d'un stimulus inconditionnel et répété. Dans cette étude, une contrainte physique a été appliquée une fois par jour pendant six jours ou durant trois sessions de six essais sur la même journée. Le *freezing* restait stable entre les essais et était plus fort chez les souris *mdx* que chez les souris saines (Vaillend et Chaussonot, 2017).

Lorsqu'une souris *mdx* est placée dans une cage dans laquelle un congénère inconnu (mâle ou femelle) a été élevé durant les 2 jours précédents sans changement de la litière, le comportement de *freezing* à la suite d'une contrainte physique était significativement diminué et le comportement exploratoire (reniflements, locomotion et mise sur les pattes arrière) était significativement augmenté par rapport à une souris placée dans une cage propre. Le nombre de reniflements dans les cages ayant contenu un congénère inconnu auparavant était comparable à celui des souris saines. Les souris étant territoriales et déposant des marques olfactives, elles obtiennent par ce comportement des informations sur le résident, même en son absence. La réponse défensive à la contrainte physique était donc perturbée par les informations sensorielles nécessitant l'attention et la mise en mouvement chez la souris *mdx* (Yamamoto *et al.*, 2010).

Il a également été montré une augmentation des réponses défensives, conditionnées ou non, face à des chocs électriques passant par le sol. Les souris *mdx* semblent donc développer des comportements de défense – en réponse à un danger ou une menace – plus importants (Sekiguchi *et al.*, 2009). Le *freezing* observé chez la souris *mdx* est un comportement de peur et de réaction au stress spécifique de cette espèce. Or les patients DMD présenteraient des troubles dits « sensoriels » et correspondant à une hyper- ou une hyporéactivité en réponse à des informations auditives, visuelles, tactiles, olfactives ou vestibulaires. Ces troubles sont généralement rattachés aux troubles du spectre autistique. Chez les DMD, il s'agirait surtout d'hyperréactivité au toucher, phénomène comparable au *freezing* chez la souris (Yamamoto *et al.*, 2010).

b. Comportements liés à l'anxiété

Il n'existe pas de différence significative dans le comportement des souris *mdx* lorsqu'elles sont placées dans un labyrinthe en croix surélevé (*elevated plus maze*), suggérant que les souris *mdx* ne sont pas plus anxieuses que des souris saines (Sekiguchi *et al.*, 2009). Cependant lors de l'exploration d'un environnement nouveau – réalisé dans un test en terrain libre (*openfield*) – les souris *mdx* explorent significativement moins le centre du dispositif que les souris saines (Vaillend et Chaussenot, 2017). Il est donc difficile de conclure à ce stade quant au niveau d'anxiété des souris *mdx*.

Cette différence peut s'expliquer par la complexité à tester l'anxiété. Ainsi de nombreuses études ont montré que les effets des anxiolytiques varient fortement d'un test à l'autre en fonction de la cible pharmacologique, du génotype des souris testées et des conditions expérimentales (Clément *et al.*, 2009).

c. *Comportements exploratoires et locomotion*

Les activités horizontale (distance parcourue) et verticale (mise sur les pattes arrière) des souris *mdx* mesurées dans un *openfield* ne sont pas significativement différentes de celles des souris saines. Ce résultat a été vérifié en respectant le rythme circadien des souris et il n'existe pas de différence significative entre les deux génotypes que ce soit durant la phase lumineuse ou durant la phase nocturne (Vaillend et Chaussonot, 2017). Ces résultats sont à mettre en parallèle avec l'absence de troubles locomoteurs significatifs chez la souris *mdx* avant l'âge de 15 mois (McGreevy *et al.*, 2015).

Toutefois après un épisode stressant conduisant à un comportement de *freezing*, les souris *mdx* ont une activité horizontale et verticale significativement plus faible en *openfield* que les souris saines, jusqu'à 12 heures après, suggérant une adaptation plus faible aux événements stressants (Vaillend et Chaussonot, 2017). L'administration systémique d'oligonucléotides antisens tricyclo-ADN induit l'augmentation de l'activité horizontale et verticale en *openfield* après un événement stressant. Cette activité n'est alors significativement pas différente de celle d'une souris saine (Goyenvalle *et al.*, 2015).

d. *Troubles de la mémoire*

La diminution des regroupements de récepteurs GABA_A dans le cortex et l'hippocampe semble augmenter les comportements inhibiteurs – comme le *freezing* – lors de stimuli aversifs et améliorer le conditionnement par la peur (Crestani *et al.*, 1999). Bien que les souris *mdx* aient une diminution de ces regroupements et une forte réactivité à la peur, elles présentent des déficits lors de conditionnement pavlovien par la peur (Chaussonot *et al.*, 2015 ; Vaillend et Chaussonot, 2017).

Des souris *mdx* placées dans une boîte de Skinner (dispositif où l'individu doit actionner un levier pour obtenir une récompense) montraient des performances comparables aux souris saines lors d'un apprentissage à court terme (entraînement sur quatre jours consécutifs) mais des performances très altérées lors d'un test de rétention de l'apprentissage à long terme (22 jours après la dernière session d'entraînement). L'utilisation d'un labyrinthe en « T » (*T-maze*) où seul un des deux bras est récompensé a confirmé que les souris *mdx* étaient significativement moins performantes que les souris saines pour la rétention à long terme des apprentissages. Il a par ailleurs été suggéré que la mémoire spatiale soit altérée (Vaillend *et al.*, 1995). Afin de tester cette hypothèse, deux autres paradigmes expérimentaux utilisant un labyrinthe radial à huit bras n'ont pas montré de différence significative entre la performance des souris *mdx* et celle des souris saines. Il a été émise l'hypothèse que le labyrinthe radial à huit bras pourrait être moins discriminant que les tests précédemment décrits en raison du haut degré d'entraînement des individus lors de ces tests (Chaussonot *et al.*, 2015 ; Vaillend *et al.*, 1998). L'étude du comportement dans une piscine de Morris a montré que la progression de la performance

des souris *mdx* était altérée par rapport à celle des souris saines ainsi qu'un déficit de la rétention à long terme des apprentissages (Chaussonot *et al.*, 2015 ; Vaillend *et al.*, 2004).

Tous ces résultats suggèrent un lien direct entre la perte de la Dp427 et un déficit de la mémoire à long terme, ainsi qu'une altération des conditionnements par la peur. Cependant les souris *mdx* ne montrent pas d'altération de la flexibilité cognitive lorsqu'elles sont confrontées à différents paradigmes comportementaux. La Dp427 semble ainsi jouer un rôle durant l'acquisition des apprentissages associatifs et dans la consolidation des souvenirs (Chaussonot *et al.*, 2015).

e. Troubles neurologiques

La perte de Dp427 chez les souris *mdx* semble être associée à un risque épileptique. Ceci a notamment été montré par administration de molécules convulsivantes (De Sarro *et al.*, 2004). L'hypothèse avancée serait l'altération structurelle et fonctionnement de la BHE, secondairement à la perte de la Dp427 (Nico *et al.*, 2003, 2004, 2006), et associée à la pathogenèse de l'épilepsie (Marchi *et al.*, 2007).

3. Chez le chien GRMD

Chez le chien GRMD, présentant une perte de la Dp427 uniquement, aucune étude n'a été réalisée des points de vue neurologique, cognitif et comportemental. Celles réalisées sur ce modèle ont surtout permis de caractériser les troubles musculaires de ces chiens.

C. Troubles sensoriels

1. Troubles de la vision

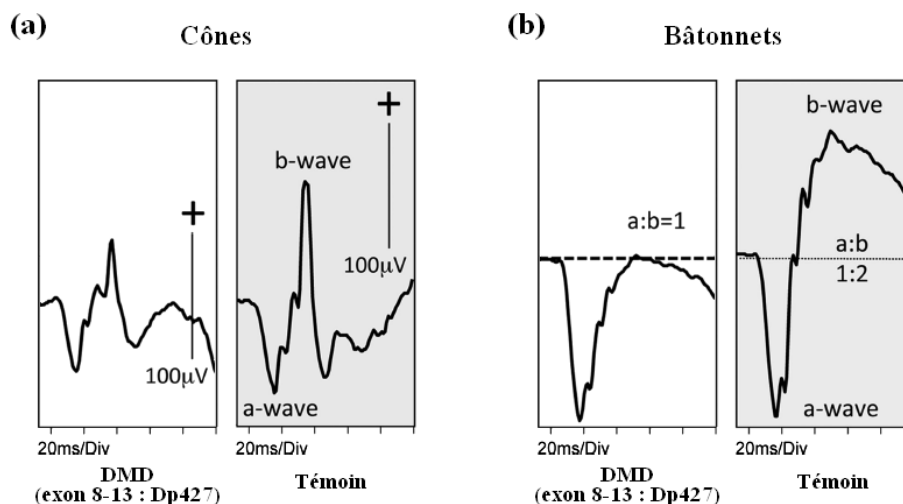
Toutes les isoformes de dystrophine, à l'exception de la Dp116, sont hautement exprimées dans la rétine. Les Dp427, Dp260 et Dp140 sont exprimées au niveau des neurones de la couche interne. Pour rappel, la Dp427 est exprimée dans la couche nucléaire externe de la rétine (en particulier dans le corps cellulaire des bâtonnets), dans la couche plexiforme externe de la rétine (au niveau de la membrane postsynaptique des cellules bipolaires dans les synapses avec les photorécepteurs) et dans la couche nucléaire interne de la rétine (au niveau des dendrites des cellules bipolaires ON liés aux cônes et dans les cellules amacrines) (Wersinger *et al.*, 2011).

L'électrorétinogramme (ERG) est un test courant permettant de tester le fonctionnement des cellules rétinienne en réponse à une stimulation lumineuse. Cette réponse représente la sommation des ondes produites par les différents composants.

L'onde a reflète l'activité des cellules photoréceptrices, bipolaires et de Müller (cellules gliales). L'onde b reflète l'activité des cellules bipolaires et de Müller. L'utilisation de nombreux stimuli lumineux et conditions environnementales permet d'isoler l'apport des cônes et l'apport des bâtonnets. Les potentiels oscillatoires (*Oscillatory Potentials*, OP) sont de petites ondes superposées à la partie croissante de l'onde b. L'origine exacte de chaque OP reste inconnue mais il semblerait que les cellules bipolaires, amacrines et interplexiformes soient impliquées.

Chez les patients DMD présentant une perte de la Dp427 uniquement, il a été mis en évidence par ERG une perturbation des ondes b des cônes, suggérant l'interruption du signal entre les photorécepteurs – fonctionnant normalement car l'onde a est normale – et les cellules bipolaires des cônes chez ces individus (Figure 15.a). L'amplitude de l'onde a des bâtonnets était subnormale chez cinq des sept patients étudiés et l'amplitude de l'onde b des bâtonnets était réduite avec un ratio a sur b de 1:1 (ratio normal de 1:2) chez l'ensemble des patients étudiés (Figure 15.b), suggérant une altération de la fonction photoréceptrice des bâtonnets. Il n'a pas été mis en évidence d'irrégularité ni de faiblesse anormale de la couche plexiforme externe par rapport à des individus sains par tomographie en cohérence optique, suggérant que les altérations observées à l'ERG soient dues à une altération de la transmission synaptique et de la polarisation membranaire. Ces résultats montrent que la dystrophine interviendrait dans la transmission du signal rétinien mais sont à nuancer par l'utilisation d'un flash très lumineux lors des ERG de l'étude et par la présence de troubles cognitifs chez certains patients, susceptibles d'induire un biais (Ricotti *et al.*, 2016).

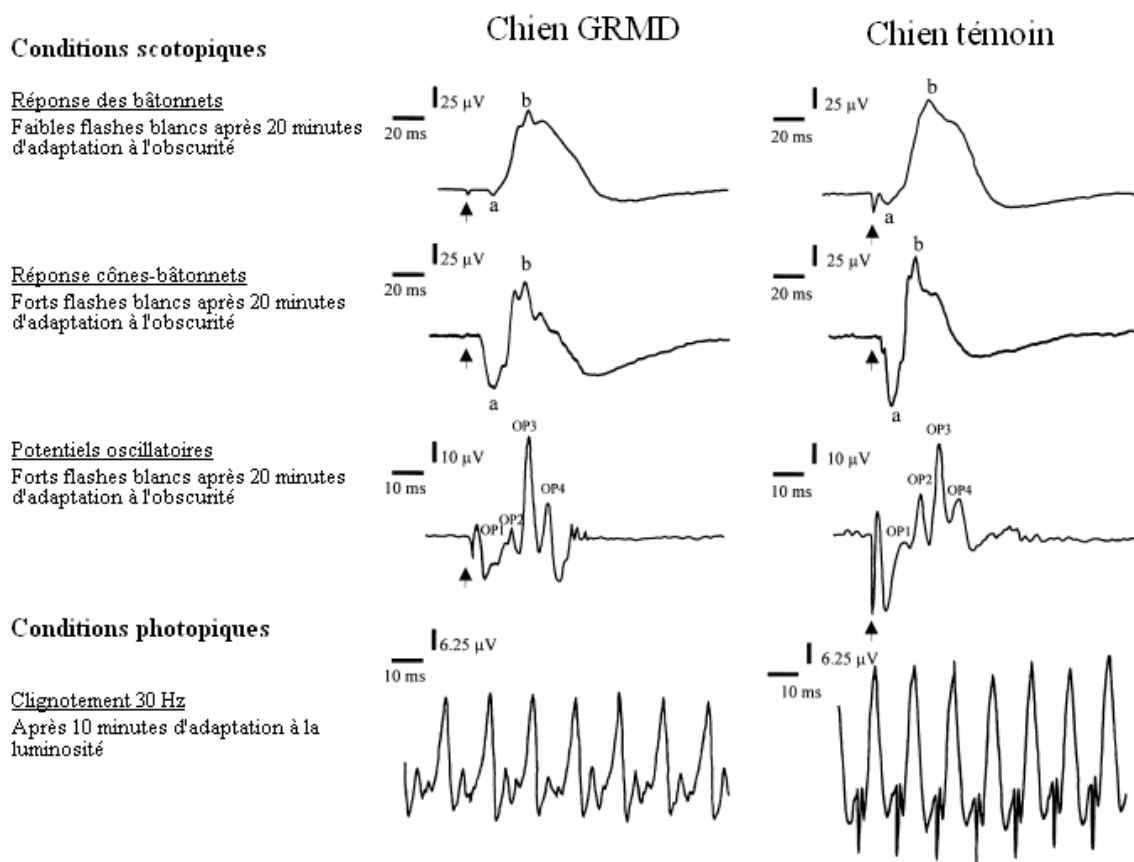
Figure 15 – Électrorétinogrammes de cônes et bâtonnets chez des patients atteints de la myopathie de Duchenne présentant uniquement une perte de la Dp427 et des témoins (d'après Ricotti *et al.*, 2016). (a) La morphologie des ondes de l'ERG des cônes montre que l'onde a est similaire chez les patients DMD et les témoins mais que l'amplitude de l'onde b est plus petite, altérant l'ensemble de la morphologie des ondes. (b) L'onde b pour les bâtonnets est réduite chez les patients DMD à la même taille que l'onde a donnant un ratio a sur b de 1, alors que chez l'individu témoin, l'onde b est plus grande que l'onde a avec un ratio a sur b de 1:2.



Malgré ces altérations de l'ERG, il n'est pas rapporté de troubles de la vision chez les patients DMD présentant une perte de la Dp427 uniquement, que ce soit l'acuité visuelle, la motilité oculaire ou la vision des couleurs (Costa *et al.*, 2007 ; De Becker *et al.*, 1994 ; Sigesmund *et al.*, 1994).

Chez le chien GRMD, il a été montré que l'amplitude des ondes a et b est réduite lors de la réponse des bâtonnets, suggérant une diminution de l'activité électrique des cellules photoréceptrices, bipolaires et/ou de Müller. La diminution de l'amplitude de l'onde a dans la réponse combinatoire cônes-bâtonnets pourrait avoir pour origine un trouble de la conduction du signal des bâtonnets. La diminution de la réponse au clignotement à 30 Hertz chez une partie des chiens GRMD pourrait en revanche montrer un trouble partiel du signal des cônes. De manière similaire à de précédentes études, la morphologie des OP varie d'un chien à l'autre mais les temps implicites n'étaient pas significativement différents. Les OP étaient présents et bien isolés chez tous les chiens testés. De manière similaire aux patients DMD présentant une perte de la Dp427 uniquement, les GRMD auraient de discrets troubles dans la transmission du signal rétinien, sans qu'il ne soit rapporté d'altération clinique de la vision (Figure 16 ; Beltran *et al.*, 2001).

Figure 16 – Électrorétinogrammes chez un chien GRMD (3,5 ans) et un témoin assorti du même âge (d'après Beltran *et al.*, 2001). L'onde a est représentée par la lettre « a » ; l'onde b est représentée par la lettre « b » et les potentiels oscillatoires sont représentés par « OP ».



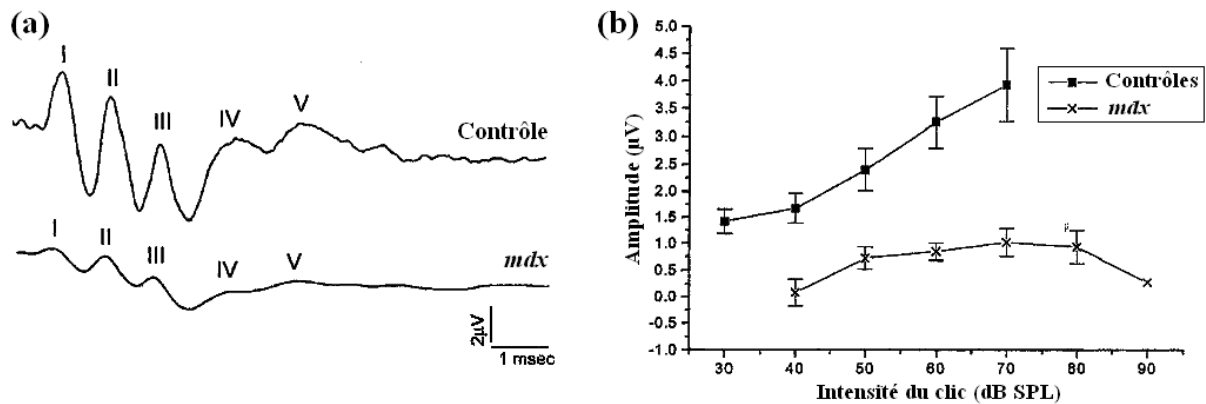
De même que pour les patients DMD présentant une perte de la Dp427 uniquement, le chien GRMD ne semble pas présenter de signes d'altération de la vision, que ce soit lors d'un parcours d'obstacle en conditions mésopiques (vision crépusculaire) ou photopiques (vision diurne). Par ailleurs il n'a pas été trouvé d'anomalie significative lors de leur d'examen oculaire (Beltran *et al.*, 2001).

2. Troubles de l'audition

Il a été mis en évidence que les isoformes Dp427 et Dp116 sont présentes au niveau du cytosquelette riche en actine des cellules ciliées internes et externes de l'appareil cochléaire. Ce cytosquelette permet leur motilité et la stabilité de leur membrane. La Dp427 serait également présente au niveau des synapses cochléaires. Le rôle de la dystrophine dans l'audition a été suspecté lors de l'étude de l'affection génétique DFN4 (aussi nommée DFNX3) causant une surdité. Son locus est entièrement inclus dans le gène *DMD*, suggérant que DFN4 soit un allèle de ce gène ou une mutation d'un gène imbriqué dans le gène *DMD* (Pfister *et al.*, 1998). Par ailleurs ces patients développent également des troubles de la vision – vérifiés par électrorétinogramme – mais ne présentent pas de troubles musculaires contrairement aux patients DMD (Pfister *et al.*, 1999).

Chez la souris *mdx*, l'absence d'expression de la Dp427 conduirait à des troubles de l'audition (Dodson *et al.*, 1995). Raynor et Mulroy (1997) ont montré par étude des potentiels évoqués auditifs une augmentation significative du seuil auditif (Figure 17.a) et une baisse significative de l'amplitude de l'onde I correspondant au nerf auditif (Figure 17.b) chez la souris *mdx* par rapport à des souris saines, suggérant une surdité sensorineuronale chez les souris *mdx*. Toutefois d'autres études réalisées chez la souris *mdx* et la souris *mdx*^{3cv} n'ont pas confirmé ces résultats, les potentiels évoqués auditifs et le réflexe de sursaut acoustique (réponse défensive aux stimuli sonores brusques) étant comparables à ceux observés chez des souris saines (Chausseot *et al.*, 2015 ; Pillers *et al.*, 1999).

Figure 17 - Potentiels évoqués auditifs chez la souris *mdx* (d'après Raynor et Mulroy, 1997). (a) Réponses aux potentiels évoqués auditifs à 60 dB de niveau de pression acoustique (Sound Pressure Level, SPL) chez les individus contrôles (en haut) et *mdx* (en bas) pour les ondes I à V. L'amplitude est indiquée sur l'axe des ordonnées et le temps de latence après le clic sur l'axe des abscisses. (b) Comparaison de l'amplitude de l'onde I pour des niveaux d'intensité croissants chez les individus contrôles et *mdx*.



3. Troubles de l'olfaction

Il a été montré que le gène *DMD* est exprimé dans les cellules olfactives engainantes, les astrocytes et les cellules granuleuses du bulbe olfactif (Blake *et al.*, 1999). L'expression du gène a également été mise en évidence au niveau des cellules mitrales du bulbe olfactif (Górecki et Barnard, 1995), mais ce résultat n'a pas pu être confirmé (Takatoh *et al.*, 2008). La Dp427 jouerait un rôle dans l'olfaction. Il a ainsi été montré qu'elle serait exprimée dans les PSD du bulbe olfactif chez le rat et que les souris *mdx* auraient des comportements olfactifs moins importants que des souris saines (Kim *et al.*, 1992 ; Yamamoto *et al.*, 2010). La Dp140 serait exprimée au niveau des PSD du bulbe olfactif chez le rat et dans les cellules olfactives engainantes (Kim *et al.*, 1992 ; Lidov *et al.*, 1995). Enfin la Dp71 serait exprimée dans les cellules olfactives engainantes, les astrocytes et les cellules granuleuses du bulbe olfactif. Elle participerait ainsi à la fasciculation du nerf voméronasal (Górecki et Barnard, 1995 ; Takatoh *et al.*, 2008).

D. Troubles de l'hémostase

Il a été rapporté des troubles de l'hémostase chez les patients DMD, se traduisant par une perte de sang significativement plus importante et plus longue que chez les patients non DMD lors de chirurgie, en particulier lors d'interventions sur le rachis. Initialement, il a été montré une baisse modérée de la réponse plaquettaire par induction avec la ristocétine (antibiotique induisant une agrégation plaquettaire en agissant sur le facteur de Willebrand) chez les patients DMD (Forst *et al.*, 1998). Néanmoins cette hypothèse est aujourd'hui remise en cause en raison de l'absence de saignement majeur lors d'administration d'anticoagulant, effet typique d'un trouble plaquettaire primaire ; et de l'expression uniquement de la Dp71 dans les plaquettes, au niveau de leur cytosquelette

(Cerecedo *et al.*, 2005). Aujourd'hui l'hypothèse dominante serait un trouble de la phase vasculaire lors de l'hémostase primaire. L'origine serait un défaut de la vasoconstriction périphérique par dysfonctionnement des cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins exprimant le gène de la dystrophine (Noordeen *et al.*, 1999 ; Turturro *et al.*, 2005).

E. Troubles de la reproduction

A l'heure actuelle, aucune étude n'a rapporté de troubles de la reproduction chez les patients DMD. Cela est à rattacher au contexte médico-social. Toutefois il a été montré que la Dp71 est présente dans les spermatozoïdes et que la perte de cette isoforme conduirait à une sévère altération de la morphologie des flagelles des spermatozoïdes à l'origine d'une perte de motilité (Hernández-González *et al.*, 2005).

Une étude menée chez des chiens GRMD montre que leurs paramètres séminaux sont similaires à ceux observés chez des chiens Golden Retriever sains, à l'exception d'un paramètre : les substances réagissant à l'acide thiobarbiturique (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*, TBARS). Les TBARS sont un marqueur de l'oxydation des lipides. Ce paramètre était significativement plus bas dans la semence des chiens GRMD. La diminution de l'activité oxydante pourrait être en lien avec un trouble de la réaction acrosomiale et la capacitation spermatique. Cependant les TBARS sont un marqueur peu spécifique du stress oxydant et l'absence de valeurs de référence chez le chien ne permet pas de conclure avec certitude à un trouble de la fonction séminale chez les chiens GRMD (Peres *et al.*, 2014).

IV. À la recherche de biomarqueurs d'atteinte neurocognitive

Un marqueur biologique, ou biomarqueur, peut être défini comme « une caractéristique mesurée de manière objective et évaluée comme indicateur de processus biologiques normaux, de processus pathologiques, ou de réponses pharmacologiques résultant d'une intervention thérapeutique » (Biomarkers Definitions Working Group, 2001).

Bien qu'il soit indispensable de tenter de caractériser d'éventuels troubles cognitifs chez ces chiens, la mesure de la cognition reste un véritable défi (Rowe et Healy, 2014). Le chien est la seule espèce – à l'exception des primates – capable de comprendre avec un haut degré de précision les signaux de communication de l'humain, tels que de subtils mouvements des yeux, pouvant rapidement conduire à l'existence de biais expérimentaux (Miklősi *et al.*, 1998). Il a ainsi été montré que la communication entre le chien et l'humain utiliserait les mêmes voies physiologiques que la communication entre la mère et son enfant. Ceci serait lié à la coévolution entre ces deux espèces (Nagasawa *et al.*, 2015).

Or le chien GRMD, par son expression clinique proche des DMD, occupe une place centrale dans les essais précliniques. Ainsi la recherche de biomarqueurs d'un processus pathologique neurologique, voire de troubles cognitifs s'ils existent, pourrait permettre de mieux comprendre la pathogenèse de la myopathie de Duchenne et d'aider les chercheurs à améliorer l'utilisation du chien GRMD en évitant la mesure directe de leurs capacités cognitives.

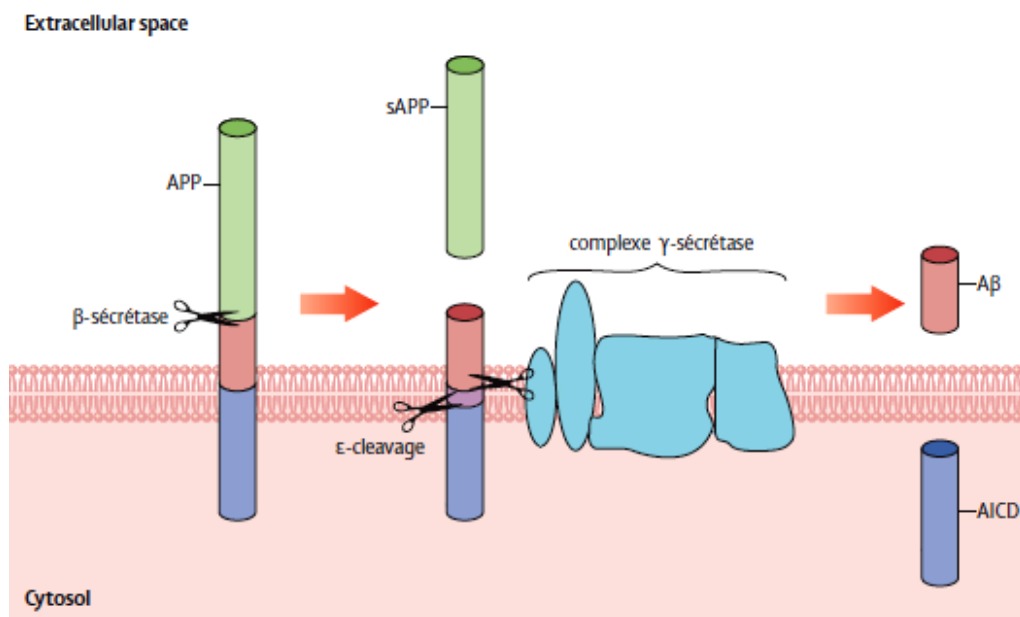
1. Le peptide β -amyloïde comme biomarqueur de troubles cognitifs

- a. *Origine*

Le peptide β -amyloïde, décrit initialement par Glenner et Wong (1984), est un fragment protéolytique de la protéine précurseur de l'amyloïde (*Amyloid Precursor Protein, APP*), codée sur le locus q21.2 du chromosome 21 chez l'humain. Cette protéine transmembranaire est présente physiologiquement dans le SNC au niveau des membranes présynaptiques. Elle est impliquée dans la formation des synapses, la croissance axonale et dendritique, et la survie neuronale (De Strooper et Annaert, 2000).

L'APP peut être clivée en deux sites permettant la libération du peptide β -amyloïde (Figure 18). La β -sécrétase coupe la chaîne d'acides aminés de l'APP sur sa partie extracellulaire, libérant une fraction soluble (*soluble Amyloid Precursor Protein, sAPP*). Le complexe γ -sécrétase hydrolyse ensuite la chaîne d'acides aminés de l'APP en partie transmembranaire libérant le peptide β -amyloïde et le domaine intracellulaire de l'APP. Principalement deux isoformes de peptides β -amyloïdes coexistent : un variant de 40 acides aminés ($A\beta_{40}$) et un variant de 42 acides aminés ($A\beta_{42}$). Le premier est le plus abondant, alors que le second est considéré comme pathologique car il a tendance à s'agréger (Bergmans et De Strooper, 2010 ; Masters et Selkoe, 2012). Les peptides β -amyloïdes sont sécrétés physiologiquement dans le compartiment extracellulaire et sont présents aussi bien dans le LCS que le plasma (Selkoe, 2008).

Figure 18 – Mécanisme de protéolyse de l’Amyloid Precursor Protein en peptide β -amyloïde (d’après Bergmans et De Strooper, 2010). (APP) protéine précurseur de l’amyloïde ; (sAPP) protéine précurseur de l’amyloïde soluble ; (AICD) domaine intracellulaire de la protéine précurseur de l’amyloïde ; ($A\beta$) peptide β -amyloïde.



b. Peptide β -amyloïde et troubles cognitifs

Il a été montré que sous certaines conditions de stress protéotoxique, de vieillissement cellulaire ou en présence de mutations pathologiques, les peptides β -amyloïdes, en particulier l’ $A\beta_{42}$, peuvent échapper aux systèmes de contrôle cellulaire (protéines chaperonnes, système protéasome-ubiquitine, *etc.*) et s’agréger de manière non physiologique. Ces agrégats peuvent être des oligomères ou des polymères. Ces derniers, en précipitant dans l’espace interstitiel cérébral, forment des assemblages amorphes ou des assemblages hautement organisés par conversion du peptide soluble en polymères riches en feuillets β (Sweeney *et al.*, 2017). Ceci conduit à l’accumulation de plaques amyloïdes dans le cerveau, aussi appelées plaques séniles. De manière similaire aux prions, il semblerait que les assemblages de feuillets β puissent induire la conversion d’hélices α en feuillets β , amplifiant l’agrégation des peptides β -amyloïdes, et même s’étendre de neurones en neurones ou à la glie adjacente (Brettschneider *et al.*, 2015 ; Eisele *et al.*, 2010).

L’accumulation de plaques séniles est un élément clé de la maladie d’Alzheimer et est associée à un processus neurodégénératif, bien qu’il soit peu associé à un déclin cognitif (Selkoe, 2008). En revanche, il a été montré que les oligomères solubles d’ $A\beta$ sont à l’origine d’une altération de la structure et de la fonction synaptique des neurones glutamatergiques dans l’hippocampe. Ceci a pour conséquence un trouble de la LTP. Ces oligomères sont ainsi à l’origine de troubles de la mémoire et de l’apprentissage tels

qu'observés chez les patients affectés par la maladie d'Alzheimer (Selkoe, 2008). Enfin, il a été montré que les oligomères et les agrégats insolubles d'A β se fixent aux cellules microgliales et aux astrocytes, et les activent. Ce phénomène est à l'origine d'un état neuro-inflammatoire chronique qui serait délétère au fonctionnement de ces cellules à long terme (Heppner *et al.*, 2015).

Chez les patients atteints par la maladie d'Alzheimer, une augmentation des taux circulants de peptides A β précède l'apparition de troubles cognitifs. De surcroît, on note une corrélation positive entre la concentration plasmatique de peptides A β et l'atteinte cognitive. Cependant les oligomères solubles d'A β ont tendance à se déposer autour des capillaires de la BHE. Ainsi dans les stades très avancés de la maladie, on peut observer une chute des taux plasmatiques de peptides A β car leur diffusion est sévèrement freinée par fermeture de la BHE (De Meyer *et al.*, 2010). Le peptide β -amyloïde est aujourd'hui considéré comme un marqueur prédictif d'apparition des troubles cognitifs liés à la maladie d'Alzheimer chez l'humain (De Meyer *et al.*, 2010). Il a également été mis en évidence que les taux plasmatiques d'A β_{42} sont significativement plus élevés chez les patients atteints du Syndrome de Down (trisomie 21). Ceci est expliqué par une surexpression de la protéine précurseur de l'amyloïde, codée par le chromosome 21. Or ces patients sont plus à risque de développer une démence clinique et des retards mentaux, tels que la maladie d'Alzheimer (Abdel-Meguid *et al.*, 2013 ; Masters et Selkoe, 2012 ; Tokuda *et al.*, 1997).

c. *Vers la validation d'un biomarqueur chez le patient atteint de la myopathie de Duchenne*

Il a été montré que la mutation du gène codant pour la dystrophine serait un facteur de risque de troubles cognitifs (Pane *et al.*, 2012 ; Taylor *et al.*, 2010). Or, comme évoqué précédemment, une augmentation du taux circulant d'A β_{42} est associée à des troubles cognitifs. Abdel-Salam *et al.* (2014) ont ainsi émis l'hypothèse que les patients DMD présenteraient un taux plasmatique d'A β_{42} significativement plus élevé que des individus sains. Cette hypothèse est renforcée par le fait qu'il existe une relation directe entre le dépôt de peptides A β_{42} insolubles après une lésion cérébrale conduisant à une altération de la BHE et des modifications des taux d'A β_{42} circulant dans le LCS. Or il a été rapporté des perturbations structurales et moléculaires des cellules gliales et endothéliales chez la souris *mdx* (Nico *et al.*, 2006). Ceci conduirait à l'altération structurelle et fonctionnelle de la BHE avec augmentation de la perméabilité vasculaire (Nico *et al.*, 2003). Ce phénomène serait renforcé dans les stades avancés de la maladie en raison d'une hypoxie secondaire au déclin progressif de la fonction respiratoire (Baydur *et al.*, 1990).

Les résultats de l'étude menée par Abdel-Salam *et al.* (2014) montrent que le taux plasmatique d'A β_{42} est significativement plus élevé de 80 % chez les patients DMD que

chez les individus témoins, validant de ce fait leur hypothèse. Ils ont également montré qu'il existe une corrélation négative entre le taux plasmatique d'A β ₄₂ et le QI chez ces mêmes patients.

d. *Et chez le chien GRMD ?*

En raison de l'existence de troubles cognitifs liés à l'âge (*Canine Cognitive Dysfunction Syndrome*, CCDS) et d'un environnement partagé avec l'humain, le chien est aujourd'hui devenu un modèle d'étude de la maladie d'Alzheimer (Adams *et al.*, 2000a). Par ailleurs il existe une importante homologie entre ces deux espèces pour le peptide β -amyloïde (100 % de similarité), la protéine précurseur de l'amyloïde (98 % de similarité) et les enzymes protéolytiques de l'APP (92 à 100 % de similarité) (Johnstone *et al.*, 1991). González-Martínez *et al.* (2011) ont mis en évidence une diminution significative du taux plasmatique d'A β (variants de 40 et 42 acides aminés) avec l'âge chez le chien sain. Ceci semble être la conséquence d'une augmentation des dépôts d'amyloïde dans le cerveau, sans qu'une baisse de la production du peptide ne puisse être exclue. Par ailleurs les auteurs ont observé une corrélation positive du taux plasmatique d'A β avec l'apparition de troubles cognitifs chez les chiens atteints. Dans les stades très avancés, les auteurs ont également observé une baisse du taux plasmatique d'A β . Une autre étude a montré une association entre la baisse du taux plasmatique d'A β , l'apparition de troubles cognitifs et l'apparition de plaques d'amyloïde dans le cerveau chez le chien (Rofina *et al.*, 2006). Ces résultats sont analogues à ceux chez l'humain : on observe une diminution du taux plasmatique d'A β avec l'âge chez les individus sains, mais une augmentation chez les individus atteints. Dans les stades très avancés, le taux plasmatique d'A β peut être élevé ou diminué comme conséquence de la formation de dépôts d'amyloïde.

Compte-tenu des résultats de l'étude menée par Abdel-Salam *et al.* (2014) chez le patient DMD et de l'identification du taux plasmatique de peptide β -amyloïde comme biomarqueur prédictif des troubles cognitifs et de lésions histologiques cérébrales chez les chiens atteints de CCDS (Schütt *et al.*, 2015, 2016), il semble tout à fait pertinent de mesurer le taux plasmatique d'A β ₄₂ chez le chien GRMD comme hypothétique biomarqueur de lésions cérébrales voire de troubles cognitifs. Par ailleurs la mesure du taux d'A β ₄₂ dans le liquide cébrospinal semble être également un marqueur pertinent des troubles cognitifs chez les chiens atteints de CCDS. Il permettrait une détection plus précoce mais la modalité de mesure est plus complexe (Borghys *et al.*, 2017).

2. Biomarqueurs de processus régénératifs des lésions cérébrales

a. *Préambule*

La recherche de biomarqueurs de processus régénératifs des lésions cérébrales est pertinente pour mieux comprendre la pathogenèse de la myopathie de Duchenne. Par ailleurs, il semblerait que ces processus régénératifs soient activés chez les patients DMD mais ne permettraient pas de contrebalancer les effets délétères secondaires à la mutation. En revanche, la littérature actuelle ne permet pas de trancher quant à l'identification de biomarqueurs spécifiques de la régénération cérébrale en raison de leur implication en parallèle dans la régénération musculaire. Nous allons cependant détailler quelques biomarqueurs potentiels.

b. *Nerve Growth Factor*

Le *Nerve Growth Factor* (NGF) est une neurotrophine impliquée dans la survie et la différenciation des neurones durant le développement de l'encéphale (Barde, 1994). Elle permettrait de réduire les processus de neurodégénérescence (Tuszynski et Blesch, 2004). Or il a été montré que le taux plasmatique de NGF est significativement plus élevé chez les patients DMD (Abdel-Salam *et al.*, 2014) et que son expression dans l'encéphale est significativement plus élevée chez la souris *mdx* (Nico *et al.*, 2009). Cependant il a également été montré que les fibres musculaires en cours de régénération chez le patient DMD expriment le NGF, contrairement aux individus sains (Toti *et al.*, 2003). Il devient alors difficile de savoir si l'augmentation significative du NGF plasmatique chez les DMD est associée au processus de régénération neuronale et/ou au processus de régénération musculaire, rendant ce marqueur non pertinent dans le suivi des troubles cognitifs.

Par ailleurs une étude menée chez des patients souffrant de la maladie d'Alzheimer a montré un taux de NGF dans le LCS significativement supérieur à celui d'individus non déments et du même âge. Il a été émise l'hypothèse que le taux de NGF dans le LCS reflèterait directement le taux de NGF dans l'encéphale (Hock *et al.*, 2000). En effet, la partie active du NGF étant large et polaire, il n'y aurait *a priori* pas de passage possible à travers la BHE (Tuszynski, 2002). La mesure du taux de NGF dans le LCS pourrait donc être un biomarqueur putatif plus pertinent que la mesure dans le sang chez le patient DMD.

c. *Cellules exprimant la protéine CD34*

Les cellules exprimant la protéine CD34 sont impliquées dans la régénération vasculaire et cérébrale. Issues de la moelle osseuse, ces cellules migrent *via* le sang jusqu'au SNC (Guo *et al.*, 2009). Or il a été montré que le taux plasmatique de cellules

exprimant la protéine CD34 est significativement plus élevé chez les patients DMD (Abdel-Salam *et al.*, 2014). En revanche Alfaro *et al.* (2011) ont montré chez la souris que la protéine CD34 est également impliquée dans la régénération musculaire, rendant ce marqueur également peu pertinent dans notre étude.

d. *Cellules exprimant la protéine CD45*

La disparition d'origine génétique des cellules exprimant la protéine CD45 chez la souris (modèle de la maladie d'Alzheimer) induit (1) une accélération du processus d'amyloïdose cérébrale, (2) l'accumulation cérébrale d'oligomères solubles d'A β et une réduction d'A β soluble dans le plasma, (3) une activation microgliale pro-inflammatoire et anti-phagocytose d'A β et (4) un dysfonctionnement mitochondrial accompagné d'une lyse neuronale (Zhu *et al.*, 2011). Or il a été montré que le taux plasmatique de cellules exprimant la protéine CD45 est significativement plus élevé chez les patients DMD, indiquant l'existence d'un processus de régénération cérébrale (Abdel-Salam *et al.*, 2014). Cependant il semblerait que ces cellules soient également impliquées dans la régénération musculaire et que leur taux soit significativement plus élevé en présence de lésions musculaires (Ojima *et al.*, 2004).

e. *Cellules exprimant la protéine Nestin*

Les souris mutées pour le gène codant la protéine Nestin présentent des troubles précoces de la migration neuronale et développent une hydrocéphalie (Satz *et al.*, 2010). Chez le rat, cette protéine joue un rôle important dans le remodelage et la réparation du SNC (Wei *et al.*, 2002). Cette protéine est également exprimée suite à des lésions induisant une perte neuronale (Yu *et al.*, 2008). Or il a été montré que le taux plasmatique de cellules exprimant la protéine Nestin est significativement plus élevé chez les patients DMD, indiquant l'existence d'un processus de régénération cérébrale (Abdel-Salam *et al.*, 2014). Néanmoins Nestin est un marqueur de cellules souches dans le SNC mais aussi dans le muscle (Zimmerman *et al.*, 1994). Ainsi on trouve ces cellules dans les muscles des patients DMD alors qu'elles en sont normalement absentes (Sjöberg *et al.*, 1994).

V. **Bilan**

La dystrophine est une protéine largement exprimée dans le SNC. Ses fonctions sont multiples, en lien avec le grand nombre d'isoformes exprimées dans des types cellulaires, des régions et des stades physiologiques différents. Un rôle majeur est de lier le cytosquelette d'une cellule au milieu extracellulaire. Elle intervient également dans la liaison entre les membranes neuronales pré- et postsynaptiques. Chez l'adulte, la Dp427 est exprimée dans les neurones pyramidaux de l'aire CA1 de l'hippocampe, les neurones

inhibiteurs amygdaliens, les neurones inhibiteurs corticaux et les cellules de Purkinje du cervelet. Cette isoforme y joue un rôle dans la plasticité synaptique en favorisant l'ancrage des récepteurs GABA_A et en limitant leur diffusion latérale extra-synaptique (Doorenweerd *et al.*, 2017 ; D'Souza *et al.*, 1995 ; Lumeng *et al.*, 1999 ; Mehler, 2000 ; Tadayoni *et al.*, 2012 ; Tinsley *et al.*, 1993 ; Tozawa *et al.*, 2012 ; Waite *et al.*, 2012 ; Wersinger *et al.*, 2011). Elle permettrait de réguler ou stabiliser l'efficacité des signaux inhibiteurs, et ainsi, indirectement, la plasticité synaptique. La dystrophine et les DGC ne semblent pas nécessaires à la synaptogenèse GABAergique et au regroupement initial des récepteurs GABA_A, suggérant qu'ils pourraient stabiliser les densités postsynaptiques GABAergiques après la formation des circuits neuronaux. Bien que de multiples mécanismes semblent prendre part à la plasticité et à la diffusion des récepteurs GABA_A à la surface des cellules, l'interaction de la dystrophine et des DGC avec le cytosquelette, la matrice extracellulaire et les protéines transsynaptiques suggère leur contribution aux mécanismes impliqués dans la régulation dynamique à court terme de la disponibilité des récepteurs GABA_A dans la transmission synaptique (Brünig *et al.*, 2002 ; Lévi *et al.*, 2002 ; Mehler, 2000 ; Vaillend *et al.*, 2008). La Dp427 est également exprimée au niveau de la glie et des cellules vasculaires endothéliales intervenant dans la BHE (Abbott *et al.*, 2010 ; Nico *et al.*, 2003, 2004 ; Vaillend *et al.*, 2008 ; Waite *et al.*, 2012). Par toutes ces actions, la dystrophine pourrait occuper une place centrale dans la consolidation des souvenirs, les apprentissages mais aussi la métaplasticité et donc dans la capacité d'incorporer des données supplémentaires dans un circuit déjà encodé (Anderson *et al.*, 1996 ; Grady *et al.*, 2006 ; Lévi *et al.*, 2002 ; Mehler, 2000 ; Muir et Kittler, 2014 ; Pilgram *et al.*, 2009 ; Vaillend *et al.*, 2008).

La perte de la Dp427 induit la réduction du nombre de récepteurs GABA_A présents dans les densités postsynaptiques et ainsi l'efficacité de la transmission synaptique des neurones inhibiteurs (Anderson *et al.*, 2003, 2004 ; Brünig *et al.*, 2002 ; Graciotti *et al.*, 2008 ; Knuesel *et al.*, 1999 ; Kueh *et al.*, 2008, 2011 ; Sekiguchi *et al.*, 2009 ; Suzuki *et al.*, 2017 ; Waite *et al.*, 2012 ; Xu *et al.*, 2015). En réponse, le seuil d'activation des récepteurs NMDA des synapses excitatrices est altéré avec facilitation des STD, STP et LTP (Knuesel *et al.*, 1999 ; Miranda *et al.*, 2011 ; Vaillend *et al.*, 1999, 2004 ; Vaillend et Billard, 2002). Un hypométabolisme du cervelet et du cortex cérébral ont été rapportés (Bresolin *et al.*, 1994 ; Lee *et al.*, 2002). Par ailleurs, il existe des troubles de l'homéostasie calcique par altération du regroupement de récepteurs présents à la surface des cellules gliales transsynaptiques, se traduisant notamment par une augmentation de la PTP et une sensibilité accrue à l'hypoxie (Haws et Lansman, 1991 ; Hopf et Steinhardt, 1992 ; Mehler *et al.*, 1992 ; Vaillend *et al.*, 1998). Enfin, la BHE est altérée (Nico *et al.*, 2003).

Chez l'humain, ces altérations structurelles et fonctionnelles s'expriment par une baisse générale du QI, corrélée au génotype et donc au nombre d'isoformes absentes, et des troubles de l'automatisation (Billard *et al.*, 1992 ; Cotton *et al.*, 2001, 2005 ; Moizard *et al.*, 2000 ; Poysky, 2007 ; Snow *et al.*, 2013a ; Taylor *et al.*, 2010 ; Wingeier *et al.*, 2011).

Il est rapporté des scores d'instabilité émotionnelle, correspondant au neuroticisme, plus importants dans la population DMD générale. Cette dernière semble présenter plus de troubles relationnels avec leurs pairs (Darke *et al.*, 2006 ; Fitzpatrick *et al.*, 1986 ; Jeronimus *et al.*, 2016 ; Snow *et al.*, 2013a). Il existe une comorbidité entre la DMD et les troubles du spectre autistique, les troubles du déficit de l'attention avec hyperactivité, les troubles anxieux (probablement liés à la condition chronique de la maladie), les troubles obsessionnels compulsifs et les crises convulsives (Banihani *et al.*, 2015 ; Goodwin *et al.*, 1997 ; Hinton *et al.*, 2009 ; Nakamura *et al.*, 2008 ; Pane *et al.*, 2012, 2013 ; Poysky, 2007 ; Snow *et al.*, 2013a ; Tsao et Mendel, 2006). Les études portant sur les capacités mnésiques de ces patients restent cependant non concluantes (Snow *et al.*, 2013a).

Chez la souris *mdx*, il est surtout noté une hyperréactivité à des contraintes physiques se traduisant par un *freezing* plus long et plus intense, sans augmentation anormale des hormones de stress (Goyenvalle *et al.*, 2015 ; Sekiguchi *et al.*, 2009 ; Vaillend et Chausseot, 2017 ; Yamamoto *et al.*, 2010). Il est rapporté des altérations de l'apprentissage associatif, qu'il soit classique ou opérant. Les études portant sur la mémoire spatiale suggèrent d'éventuels troubles (Chausseot *et al.*, 2015 ; Crestani *et al.*, 1999 ; Vaillend *et al.*, 1995, 1998, 2004 ; Vaillend et Chausseot, 2017). Enfin, la perte de Dp427 semble être associée à un risque épileptique (De Sarro *et al.*, 2004 ; Marchi *et al.*, 2007 ; Nico *et al.*, 2003, 2004, 2006).

Chez le chien GRMD, aucune étude n'a été réalisée des points de vue neurologique, cognitif et comportemental. Celles réalisées sur ce modèle ont surtout permis de caractériser les troubles musculaires de ces chiens. Malgré des altérations électrophysiologiques, la perte de la Dp427 ne semble pas induire de troubles cliniques de l'audition ou de la vision (Beltran *et al.*, 2001 ; Kornegay, 2017 ; McGreevy *et al.*, 2015 ; Valentine *et al.*, 1988, 1990, 1992). Enfin, cette isoforme n'étant pas exprimée dans les circuits de l'olfaction, au moins chez la souris, ce sens ne serait *a priori* pas altéré (Yamamoto *et al.*, 2010).

S'il est mis en évidence des troubles cognitifs chez le chien GRMD, le peptide A β ₄₂ plasmatique pourrait être un biomarqueur pertinent des troubles cognitifs liés à la perte de la Dp427. S'il est validé, ce biomarqueur permettrait de suivre l'évolution de l'atteinte neurocognitive chez le chien GRMD. Il serait alors particulièrement intéressant au cours des essais thérapeutiques pour s'affranchir de la mesure directe des capacités cognitives, ce qui reste un véritable défi chez cette espèce (Abdel-Salam *et al.*, 2014 ; Miklösi *et al.*, 1998 ; Nagasawa *et al.*, 2015 ; Rowe et Healy, 2014 ; Schütt *et al.*, 2015 ; Taylor *et al.*, 2010).

DEUXIÈME PARTIE : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

I. Objectifs de l'étude

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est la dystrophie musculaire la plus fréquente avec une incidence estimée à 1 cas pour 3500 naissances de garçons (Emery, 1991). Elle est très handicapante et réduit considérablement la durée de vie. Les progrès thérapeutiques ont permis de doubler l'espérance de vie pour atteindre 30 à 40 ans (Kieny *et al.*, 2013). Bien que les troubles les plus importants soient d'ordre musculaire, il est aujourd'hui admis qu'une mutation du gène codant la dystrophine induise des troubles cognitifs. À l'heure actuelle, le modèle murin présentant une dystrophie musculaire liée à l'X (*muscular dystrophy X-linked, mdx*) est le seul qui a été étudié sur le plan neurocognitif. Cependant les souris *mdx* présentent un phénotype musculaire éloigné de celui des patients DMD et des chiens Golden Retriever atteints de dystrophie musculaire (*Golden Retriever Muscular Dystrophy, GRMD*). Ainsi il n'existe aucune étude publiée sur l'atteinte neurocognitive des chiens GRMD.

S'intéresser aux fonctions neurologiques et cognitives des patients DMD et des chiens GRMD semble indispensable aujourd'hui. Cette dimension, essentielle à la guérison des patients DMD et à leur bien-être, pourrait alors être intégrée lors des essais thérapeutiques. Nous avons fixé trois buts à la partie expérimentale de cette thèse :

- **Objectif 1** : étudier la distribution des isoformes de dystrophine dans l'encéphale chez le chien ; notre hypothèse étant que seule la Dp427 n'y est pas exprimée chez le GRMD (mutation proximale au-niveau de l'intron 6). Les régions exprimant normalement cette isoforme chez l'humain et la souris sont le cortex cérébral, les cornes d'Ammon de l'hippocampe, l'amygdale cérébrale et le cervelet. Cette phase préliminaire permettra d'émettre des hypothèses sur les potentiels troubles cognitifs liés aux fonctions des régions atteintes ;
- **Objectif 2** : étudier la faisabilité de tests cognitifs chez les chiens GRMD, prenant en considération leurs déficits moteurs variables d'un chien à l'autre et leur environnement de laboratoire, pour rechercher si des altérations du fonctionnement cognitif existent et pouvoir suivre leur évolution. Chez les patients DMD et les souris *mdx*, les troubles cognitifs sont variés et souvent discrets. Pour cela, trois tests ont été mis en place : (1) un test d'*openfield* pour mesurer le comportement explorateur et l'activité, (2) un test de conditionnement opérant simple et compatible avec les capacités motrices des chiens GRMD pour évaluer les capacités d'apprentissage, et (3) un test de recherche de nourriture adapté du *holeboard* décrit chez plusieurs autres espèces pour mesurer la néophobie, l'anxiété, la mémoire spatiale et évaluer les capacités d'apprentissage ;
- **Objectif 3** : rechercher un biomarqueur de troubles neurocognitifs chez les chiens GRMD. Cela permettrait de confirmer une étude menée chez l'humain (Abdel-Salam *et al.*, 2014), et surtout d'obtenir un biomarqueur facilement mesurable. Il serait particulièrement utile lors des essais thérapeutiques de par sa mise en œuvre simple.

Nous émettons l’hypothèse que la concentration plasmatique de peptides β -amyloïde 42 ($A\beta_{42}$) soit un biomarqueur des troubles neurocognitifs chez le chien GRMD.

Les objectifs à terme sont d’une part inclure l’évaluation de l’atteinte neurocognitive dans les essais thérapeutiques menés sur le chien GRMD et d’autre part de prendre en compte le handicap neurocognitif de ce modèle pour optimiser son bien-être.

II. Objectif 1 – Étude de la répartition des isoformes de dystrophine dans le système nerveux central par western blot

A. Matériels et méthodes

1. Animaux

Trois chiens GRMD et deux chiens sains du laboratoire de neurobiologie de l’École nationale vétérinaire d’Alfort et âgés de six mois à 10 ans ont été inclus dans l’étude. Le détail des chiens est donné dans le tableau 2. Les encéphales des chiens ont été prélevés moins d’une heure après leur décès.

Il a été placé un hémicéphale (côté aléatoire) dans une solution de formaldéhyde à 10 % ; et il a été prélevé le cortex cérébral, l’hippocampe et le cervelet de l’autre hémicéphale pour congélation directe à -80 °C.

Tableau 2 - Détail des chiens prélevés.

| Nom | Statut | Race | Sexe | Date de naissance | Date du décès | Âge de décès (ans) | Cause de décès |
|-----------|--------|--------------------|------|-------------------|---------------|--------------------|---|
| Concombre | Sain | Beagle | Mâle | 30/06/2007 | 17/11/2017 | 10 | Euthanasie (œdème pulmonaire cardiogénique) |
| Bravo | Sain | Labrador Retriever | Mâle | 07/08/2006 | 26/06/2017 | 10 | Euthanasie (protocole de recherche) |
| Lyrik | GRMD | Golden Retriever | Mâle | 12/03/2015 | 18/10/2017 | 2 | Décès à l’induction d’une anesthésie |
| NRJ | GRMD | Golden Retriever | Mâle | 31/03/2017 | 24/10/2017 | 0,5 | Euthanasie (perte d’ambulation) |
| Jigoto | GRMD | Golden Retriever | Mâle | 26/01/2014 | 07/12/2016 | 3 | Euthanasie (cause digestive) |

2. Extraction et dosage des protéines

Les échantillons congelés de cortex cérébral, hippocampe et cervelet ont été broyés sous azote liquide. Les protéines totales ont été extraites grâce au tampon de lyse RIPA (150 mM de NaCl ; 5 mM d'EDTA pH 8,0 ; 50 mM de Tris-HCl pH 8.0 ; 1,0 % de NP-40 ; 0,5 % de désoxycholate de sodium ; 0,1 % de dodécylsulfate de sodium) supplémenté en inhibiteur des protéases (Sigma, Etats-Unis), puis une centrifugation à 13 000 x g pendant 15 minutes à 4 °C a été réalisée pour éliminer les débris cellulaires.

La concentration en protéines a été déterminée par dosage à l'acide bicinchonique (ThermoFisher Scientific, Etats-Unis ; Smith *et al.*, 1985).

L'extrait de protéines a été ensuite mis en suspension dans une solution tampon de dépôt (75 mM de Tris-HCl ; 576 mM de glycine ; 10 % de dodécylsulfate de sodium ; 50 % de glycérol ; 20 % de β -mercapto-éthanol ; 0,025 % de bleu de bromophénol).

3. Électrophorèse

La cuve d'électrophorèse a été remplie avec du tampon de migration (25 mM de Tris-HCl ; 192 mM de glycine ; 0,1 % de dodécylsulfate de sodium). Il a ensuite été déposé 5 μ l de marqueur de poids moléculaire (réf. 1610374, Bio-Rad, Etats-Unis) dans un premier puit et l'équivalent de 150 μ g de protéines dans les puits suivants sur un gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium à gradient de concentration 4-15 % (réf. 4561083, Bio-Rad, Etats-Unis). La migration a été lancée à 150 V pendant 45 minutes, à température ambiante. Chaque gel a été réalisé en duplicata.

4. Transfert en phase liquide

Les protéines ont été transférées sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (réf. 1620174, Bio-Rad, Etats-Unis) dans une solution tampon de transfert (25 mM de Tris ; 192 mM de glycine ; 0,01 % de dodécylsulfate de sodium) à 150 mA pendant 20 heures à 4 °C.

5. Immuno-blot

Les sites non-spécifiques ont été bloqués avec une solution de blocage (6 % de lait écrémé ; 0,1 % de tween ; Tris) pendant une heure à température ambiante sur un agitateur.

La partie supérieure (> 100 kDa) des membranes du premier duplicata a été incubée avec un anticorps primaire monoclonal anti-dystrophine spécifique du domaine ROD

(réf. NCL-DYS1, Leica Biosystems Newcastle Ltd, Royaume-Unis) et permettant de révéler la Dp427 mais pas la Dp71, dilué au 1/200^{ème} pendant 2h30 à température ambiante, puis a été rincée 3x5 minutes dans du TBS (50 mM de Tris-HCl ; 150 mM de NaCl). La partie inférieure (< 100 kDa) a été incubée avec un anticorps anti-GAPDH comme contrôle de charge (réf. ab9484, Abcam, Royaume-Unis) pendant 1h à température ambiante, puis a été rincée 3x5 minutes dans du TBS.

Les membranes du second duplicata ont été incubées avec un anticorps primaire monoclonal anti-dystrophine spécifique du domaine C-terminal (réf. NCL-DYS2, Leica Biosystems Newcastle Ltd, Royaume-Unis) et permettant donc théoriquement de révéler l'ensemble des isoformes à l'exception de la Dp40, dilué au 1/200^{ème} pendant 2h30 à température ambiante, puis ont été rincées 3x5 minutes dans du TBS (50 mM de Tris-HCl ; 150 mM de NaCl).

Les membranes ont ensuite été incubées avec un anticorps secondaire polyclonal de lapin anti-IgG anti-souris conjugué à la peroxydase (réf. P0260, Dako, Etats-Unis) dilué au 1/1000^{ème} pendant 30 minutes à température ambiante, puis ont été rincées 3x10 minutes dans du TBS.

Enfin elles ont été incubées avec une solution de chémoluminescence ECL SuperSignal (réf. 34095, ThermoFisher Scientific, Etats-Unis) pendant deux minutes à l'obscurité. Un film radiographique (Kodak, Etats-Unis) a été exposé au contact de chaque membrane durant une minute dans une chambre noire et a été développé.

B. Résultats

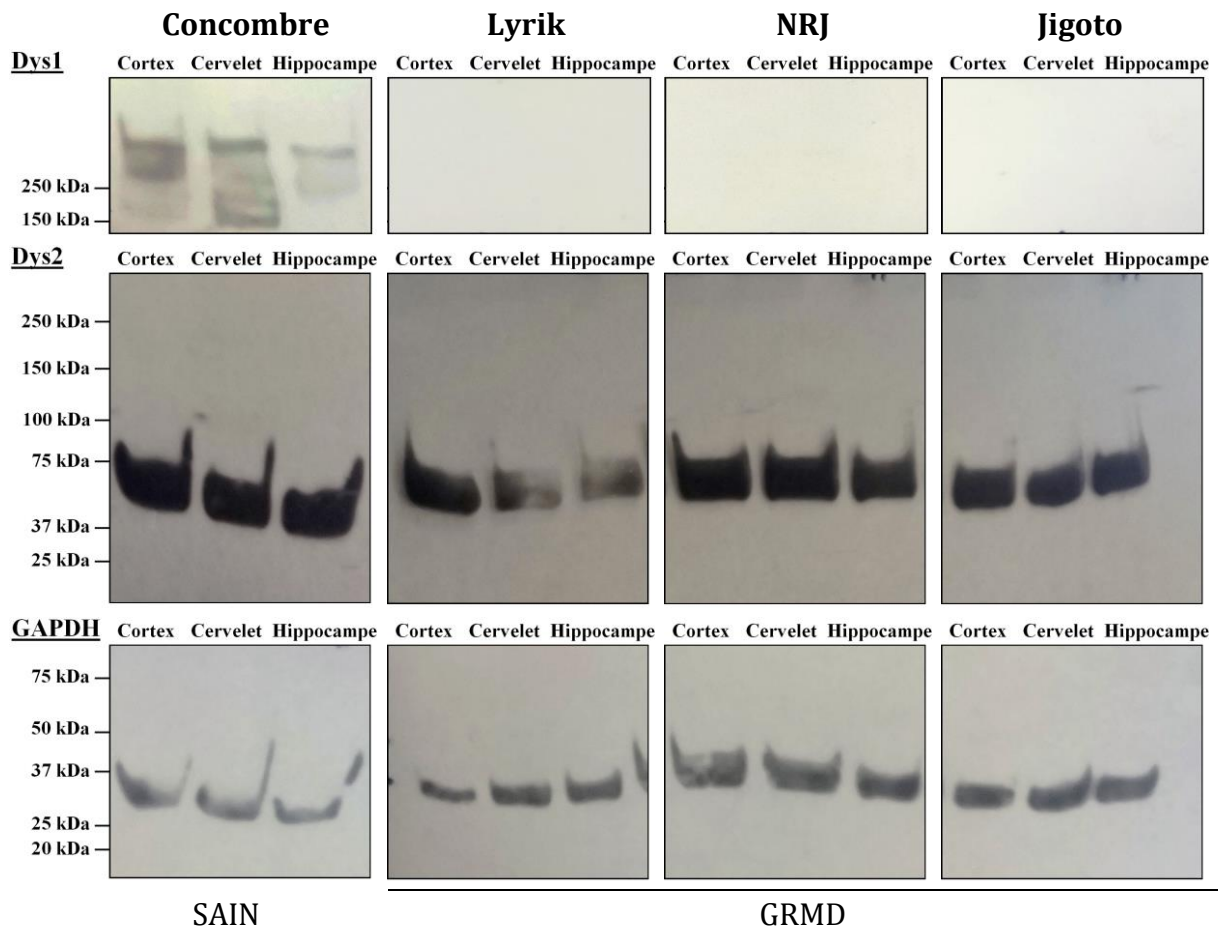
Nous avons rencontré des difficultés techniques avec les échantillons d'un chien sain (Bravo) ne nous permettant pas de les interpréter. Les résultats des différents essais étaient trop variables pour ce chien (perte de la Dp427 sur une partie des puits). Les gels originaux incluant Bravo sont présentés en Annexe 1.

Le marquage par l'anticorps Dys1 (domaine ROD) a montré la présence de Dp427 dans le cortex, le cervelet et l'hippocampe du chien contrôle (Concombre) et l'absence de Dp427 dans ces zones chez les chiens GRMD (Figure 19.Dys1).

Le marquage par l'anticorps Dys2 (domaine C-terminal) n'a pas permis de mettre en évidence la Dp427 pour l'ensemble des chiens testés. La Dp71 était présente chez l'ensemble des chiens testés pour le cortex, le cervelet et l'hippocampe (Figure 19.Dys2).

Enfin le contrôle de charge par la GPADH était positif sur l'ensemble des blots (Figure 19.GAPDH).

Figure 19 – Résultats du western blot avec marquage du domaine ROD et du domaine C-terminal de la dystrophine dans le cortex, le cervelet et l’hippocampe chez un chien sain et trois chiens GRMD. Le marquage de poids moléculaire est indiqué à gauche de la figure.

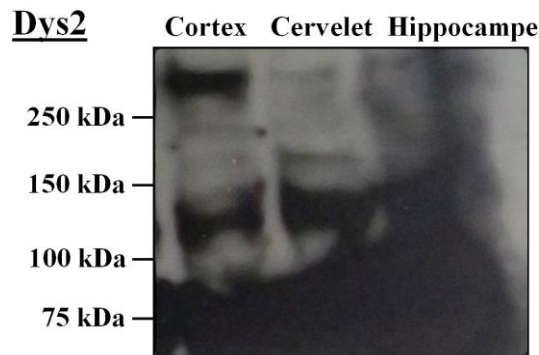


C. Discussion

Nous avons ainsi pu mettre en évidence que la Dp71 et la Dp427 étaient présentes dans le cortex, l’hippocampe et le cervelet chez le chien sain. Ce résultat, non montré à ce jour chez cette espèce, est similaire à ce qui a été montré chez l’humain et la souris sains. Par ailleurs nous avons bien observé la disparition de la Dp427 avec conservation de la Dp71 chez le chien GRMD, conformément à ce qui a été montré chez les patients DMD avec mutations proximales et la souris *mdx* (Mehler, 2000).

Il est étonnant que la Dp427 n’ait pas été visible lors du marquage par l’anticorps Dys2 qui se fixe sur le domaine C-terminal de la dystrophine. Nous émettons l’hypothèse que la Dp71 était en trop grande quantité par rapport à la Dp427 dans les zones étudiées. En effet nous avons probablement dû exposer les films photographiques durant un temps trop court pour observer la Dp427 mais allonger ce temps rendait le film non interprétable en raison du marquage trop important de la Dp71 (Figure 20).

Figure 20 – Exemple de western blot avec marquage du domaine C-terminal de la dystrophine et exposition photographique longue chez un chien sain.



En perspective, il serait intéressant (1) de réaliser une RT-qPCR afin de confirmer et étendre les résultats précédents ainsi que d'obtenir une quantification de l'expression des isoformes de dystrophine dans les différentes régions de l'encéphale, et (2) de réaliser des coupes d'encéphale avec immunomarquage afin d'étudier la répartition cellulaire et subcellulaire des isoformes de dystrophine chez le chien.

III. Objectif 2 – Étude de faisabilité de l'évaluation de l'atteinte cognitive

A. Matériels et méthodes

1. Animaux

Sept chiens GRMD et quatre chiens Golden Retriever sains du même laboratoire et âgés d'un à sept ans ont été inclus dans l'étude. Le détail des chiens est donné dans le Tableau 3. Aucun animal testé n'était soumis à un autre protocole expérimental au moment des expériences. Aucun animal n'a jamais subi d'entraînement cognitif ni de test éthologique auparavant.

Les chiens sains étaient logés dans un bâtiment différent de celui abritant les chiens GRMD et le dispositif expérimental. Ainsi, ils étaient transférés tous les matins d'un bâtiment à l'autre avant 8h00. Ils étaient ensuite logés dans les mêmes conditions que les chiens GRMD. Une fois les tests de la journée terminés, ils étaient transférés vers leur bâtiment d'origine. Toutefois tous ces chiens avaient auparavant déjà été hébergés sur le long terme dans le chenil où étaient hébergés les chiens GRMD et connaissaient donc les locaux.

Durant toute la durée de l'évaluation cognitive (environ quatre semaines), la quantité d'aliment distribué le matin a été divisée par deux afin d'augmenter la motivation lors des tests, en particulier le *holeboard* (Vawter et Van Ree, 1989), soit 25 % de la ration quotidienne entre 8h00 et 9h00 contre 50 % habituellement. Vers 13h00, le chien recevait les 25 % restants. Enfin les chiens recevaient comme habituellement 50 % de leur ration quotidienne entre 16h30 et 17h30. Ainsi les chiens recevaient une ration complète chaque jour.

Durant toute la durée des expériences, les chiens n'ont pas reçu leur sortie quotidienne dans une cour intérieure. Tous les chiens GRMD étaient portés de leur cage jusqu'au dispositif expérimental. Ceci avait pour objectif d'avoir des chiens au maximum de leur capacité physique lors des tests.

Tableau 3 – Détail des chiens évalués cognitivement. L'âge est celui au premier jour des quatre semaines d'expérience.

| Nom | Statut | Sexe | Stérilisation | Date de naissance | Âge (ans) |
|-----------|--------|------|---------------|-------------------|-----------|
| Fébrèze | Sain | Mâle | Oui | 29/03/2010 | 7,3 |
| Jpeg | Sain | Mâle | Non | 07/01/2014 | 3,5 |
| Jappy | Sain | Mâle | Non | 17/02/2014 | 3,4 |
| Messmer | Sain | Mâle | Non | 30/06/2016 | 1,1 |
| Guizmo | GRMD | Mâle | Non | 08/06/2011 | 6,1 |
| Goojah | GRMD | Mâle | Non | 29/04/2011 | 6,2 |
| Jintonic | GRMD | Mâle | Non | 26/01/2014 | 3,5 |
| Jybraltar | GRMD | Mâle | Non | 17/02/2014 | 3,4 |
| JT | GRMD | Mâle | Non | 13/03/2014 | 3,4 |
| Lyrik | GRMD | Mâle | Non | 12/03/2015 | 2,4 |
| Lper | GRMD | Mâle | Non | 01/03/2015 | 2,4 |

2. Examen clinique

Avant inclusion dans l'étude, tous les chiens ont subi un examen clinique et neurologique de routine. Il a en particulier été examiné la vision (dont les réflexes photomoteurs et réflexes de clignement à la menace), l'audition, la démarche, la déglutition et la préhension des aliments.

Les chiens présentant des troubles sévères, en particulier de la vision, de l'audition ou de la fonction respiratoire (par exemple une bronchopneumonie) ont été exclus de toutes les tâches. Les chiens présentant des troubles trop importants de la locomotion, de la préhension des aliments et de la déglutition ont été exclus des tâches de conditionnement opérant et de *holeboard*.

3. Dispositif expérimental

Le dispositif général consistait en une salle vide d'environ 4 x 4 mètres, maintenue à une température ambiante d'environ 23 °C et silencieuse. Trois murs étaient constitués de briques orange et le quatrième correspondait à un mur modulable en bois. Le sol était constitué de carreaux beiges réguliers. Les chiens entraient par une porte face au mur modulable. Avant la série d'essais, entre deux essais et à la fin de la série d'essais, le sol était lavé avec un agent nettoyant.

4. Test d'appétence

Un test d'appétence a été réalisé afin de vérifier que la récompense était adaptée à chaque individu. Trois essais ont été réalisés à la suite. Durant chaque essai, il a été proposé au chien de la nourriture à savoir une boulette d'aliment humide SPECIFIC Intensive Support F/C-IN-W. Chaque essai était noté de la manière suivante : (1) le chien mangeait directement la nourriture, (2) le chien reniflait puis mangeait la nourriture, (3) le chien reniflait et prenait la nourriture mais la recrachait, (4) le chien reniflait mais ne mangeait pas, (5) le chien ne bougeait pas. Si le chien ne mangeait pas (score de 3, 4 ou 5), le test était considéré comme non réussi et le chien était exclu des tests de conditionnement opérant et de *holeboard*.

5. *Openfield*

Tous les tests ont été réalisés entre 09h00 et 17h00. L'ordre de passage a été défini aléatoirement. Les chiens étaient laissés seuls pendant 10 minutes dans le dispositif (Figure 21). Après ce délai, l'expérimentateur venait récupérer l'animal et éteindre les caméras.

Une caméra vidéo (GoPro HERO4 12,0 MP) permettait d'enregistrer les chiens à tout moment. Elle a été placée à trois mètres de hauteur face au sol. Une autre caméra vidéo (Canon LEGRIA HF R306) permettait d'enregistrer les chiens à tout moment, en particulier leur comportement à l'entrée dans le dispositif. Elle a été placée à trois mètres de hauteur, sur un trépied, au-dessus du mur modulable et face à la porte. Les vidéos ont été stockées sur un disque dur externe et un ordinateur personnel. Elles ont ensuite été analysées avec les logiciels CowLog 3.0.2 (Hänninen et Pastell, 2009) et VLC Media Player 2.2.8, après entraînement de l'expérimentateur sur plusieurs vidéos.

Figure 21 - Photographie de Jappy dans l'openfield.



Les variables comportementales relevées étaient : le temps passé inactif (immobile en l'absence d'autres comportements) dont le temps passé assis ou couché, le temps passé dans le centre de la pièce (zone carrée de 2 x 2 mètres), le temps passé dans la périphérie de la pièce, le nombre de flairages, le nombre de mictions et le nombre de vocalisations.

6. Conditionnement opérant

Tous les tests ont été réalisés entre 09h00 et 16h00. Il a été réalisé entre deux et trois sessions d'entraînement par jour pendant trois jours consécutifs (J1 à J3), puis trois jours après la dernière session (J6), et enfin onze jours après la dernière session (J17) afin de tester la mémorisation à long terme. Chaque session comprenait 10 essais. Chaque essai se déroulait de la manière suivante : l'expérimentateur présente la récompense au chien, puis dit « [nom du chien], assis. Assis. » ; si le chien s'asseyait, l'expérimentateur lui donnait la nourriture ; sinon, l'expérimentateur répétait « assis », guidait le chien vers la position assise, puis lui donnait la nourriture en répétant toujours « assis » et en le félicitant (Figure 22). Si le chien s'asseyait avant que le mot « assis » ait été prononcé, l'expérimentateur reculait avec la récompense pour que le chien se lève. Si le chien perdait son attention avant la fin de l'essai, celui-ci était recommencé. L'ordre de passage a été défini de manière semi-aléatoire afin d'homogénéiser les heures auxquelles chaque individu a été testé.

Figure 22 - Photographie de Jt lors du conditionnement opérant.



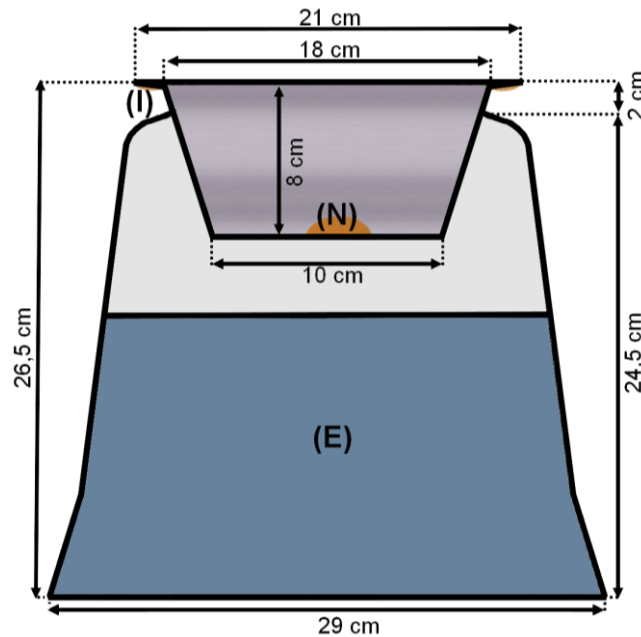
Une caméra vidéo (Canon LEGRIA HF R306) permettait d'enregistrer les chiens à tout moment. Elle a été placée sur un trépied à deux mètres du chien et de l'expérimentateur. Les vidéos ont été stockées sur un disque dur externe et un ordinateur personnel. Elles ont ensuite été analysées par visionnage.

Chaque essai était noté de la manière suivante : (+) si le chien s'asseyait et (-) si le chien ne s'asseyait pas. Le score de chaque essai a été inscrit dans un tableau. Si le chien connaissait déjà la commande « assis » à la première session, il a été exclu. Pour chaque chien, il a été évalué la faisabilité du test. Un chien refusant de réaliser les trois premières sessions a été exclu. Il a ainsi été calculé un indice de faisabilité comme le (nombre de chiens inclus après la troisième session) / (nombre de chiens initialement inclus dans la tâche de conditionnement).

7. *Holeboard*

Sur le sol du dispositif, 16 pots (Figure 23) ont été fixés en formant quatre rangées régulières de quatre pots. La distance entre deux pots était de 50 centimètres. Les chiens entraient par une porte face au mur modulable, puis étaient laissés seuls dans la pièce. L'essai était arrêté lorsque le chien avait exploré tous les pots contenant de la nourriture, ou lorsque 10 minutes s'étaient écoulées. Après ce délai, l'expérimentateur venait récupérer l'animal et éteindre la caméra. L'ordre de passage a été défini de manière semi-aléatoire afin d'homogénéiser les heures auxquelles chaque individu a été testé.

Figure 23 – Schéma d'un pot en coupe longitudinale. Un pot est constitué d'une gamelle en métal contenant ou non un morceau de nourriture (N) et incluse sur un socle en plastique. Chaque socle est lesté par 10 litres d'eau (E). Le dessous du bord de chaque gamelle a été imprégné de l'odeur de la récompense afin d'empêcher la discrimination des pots récompensés ou non par des indices olfactifs (I).



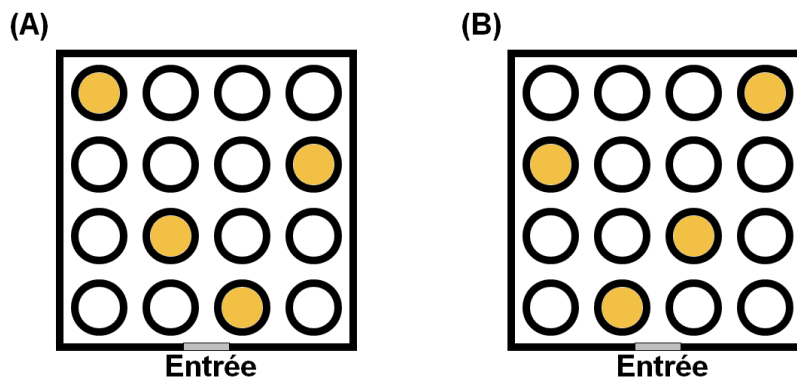
Durant la première semaine de test (phase d'habituation), chaque chien a été testé sur trois jours consécutifs avec un essai par jour entre 9h00 et 16h00. De la nourriture était placée dans tous les pots (Figure 24). Le premier jour se déroulait sans expérimentateur dans la salle. Le deuxième jour, un expérimentateur était placé à l'entrée du dispositif et restait immobile, debout, sans regarder les chiens afin d'éviter toute interaction et donc tout biais. Dans le cas où le chien n'explorait qu'en présence de l'expérimentateur, alors celui-ci restait pour tous les essais suivants. Sinon les chiens étaient seuls dans la salle afin d'empêcher les interactions avec l'humain. À la fin de la phase d'habituation, seuls les chiens ayant exploré plus de huit pots (50 % des pots) étaient inclus dans la seconde phase. Il a ainsi été calculé un indice de faisabilité comme le (nombre de chiens inclus après la phase d'habituation) / (nombre de chiens initialement inclus dans la tâche de *holeboard*).

Figure 24 - Photographie de Febreze lors du premier jour de la phase d'habituatation.



Durant la seconde semaine de test (phase d'entraînement), les chiens ont été entraînés à chercher de la nourriture sur cinq jours consécutifs avec un essai par jour entre 09h00 et 12h00 selon un motif défini de quatre pots récompensés et 12 pots non récompensés (Figure 25). Pour chaque chien, il a été attribué aléatoirement un motif parmi deux définis selon une règle générale (van der Staay *et al.*, 2012). Les deux motifs étaient symétriques afin de minimiser les différences de complexité (van der Staay, 1999), tout en évitant une influence de la latéralité sur les performances de chaque groupe.

Figure 25 - Schéma des deux motifs de pots récompensés. Les deux motifs sont symétriques entre eux et ne possèdent qu'un pot récompensé par ligne et par colonne.



Une caméra vidéo (GoPro HERO4 12,0 MP) permettait d'enregistrer les chiens à tout moment. Elle a été placée à trois mètres de hauteur, sur un trépied, au-dessus du mur modulable et face à la porte. Par ailleurs, l'expérimentateur observait directement le dispositif par le biais d'une fenêtre par laquelle les chiens ne pouvaient le voir. Les vidéos ont été stockées sur un disque dur externe et un ordinateur personnel. Elles ont ensuite été analysées avec le logiciel VLC Media Player 2.2.8.

Les variables comportementales relevées étaient : le nombre de visites dans chaque pot, le nombre de pots visités et le temps nécessaire pour terminer la session. Une visite était définie comme le passage de la truffe du chien dans un pot. Un ratio de mémoire de travail (*Working Memory Ratio*, WMR) a été défini comme le nombre de visites récompensées / le nombre de visites et revisites dans le motif récompensé. Il représente le pourcentage de visites dans le motif récompensé qui ont été renforcées par la nourriture. Un ratio de mémoire de référence (*Reference Memory Ratio*, RMR) a été défini comme le nombre de visites et revisites dans le motif récompensé / le nombre de visites et revisites dans tous les pots. Il représente le pourcentage de visites dans le motif récompensé par rapport aux visites dans l'ensemble des pots (van der Staay *et al.*, 2012).

8. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec R 3.4.3 pour Windows (*R Foundation for Statistical Computing*, Autriche). Pour l'*openfield*, les chiens GRMD et les chiens sains ont été comparés à l'aide du test non-paramétrique U de Mann-Whitney pour échantillons indépendants. Les résultats entre deux mesures pour un même groupe ont été comparés à l'aide du test non-paramétrique de Wilcoxon pour échantillons appariés. Pour le *holeboard*, les résultats entre les différentes sessions ont été comparés à l'aide du test non-paramétrique de Friedman. Dans le cas d'un résultat statistiquement significatif, il a été réalisé un test post-hoc de Nemenyi. Ces tests ont été effectués à l'aide du paquet « pmcmr » (Pohlert, 2014). Le seuil de significativité était considéré pour $p \leq 0,05$. Les variables sont présentées sous la forme moyenne \pm écart-type de la moyenne.

B. Résultats

1. Animaux

La liste des animaux inclus dans l'étude est présentée dans le Tableau 3. Au premier jour des tests cognitifs, les chiens GRMD avaient un âge et une température rectale comparable aux chiens sains ; mais un poids plus faible, une fréquence cardiaque plus élevée et une fréquence respiratoire plus faible (Tableau 4). Les examens cliniques sont détaillés en Annexe 1.

Tableau 4 – Comparaison des valeurs de l'examen clinique des chiens GRMD et des chiens sains. (°C) degrés Celsius ; (bpm) battements par minute ; (mpm) mouvements par minute.

| Groupe | Âge (ans) | Poids (kg) | Température rectale (°C) | Fréquence cardiaque (bpm) | Fréquence respiratoire (mpm) |
|---------------|-----------|------------|--------------------------|---------------------------|------------------------------|
| Sains (n = 4) | 3,9 ± 1,3 | 28,1 ± 0,7 | 39,3 ± 0,3 | 57 ± 9 | 137 ± 14 |
| GRMD (n = 7) | 4,0 ± 0,6 | 23,4 ± 1,7 | 38,7 ± 0,1 | 94 ± 5 | 70 ± 15 |

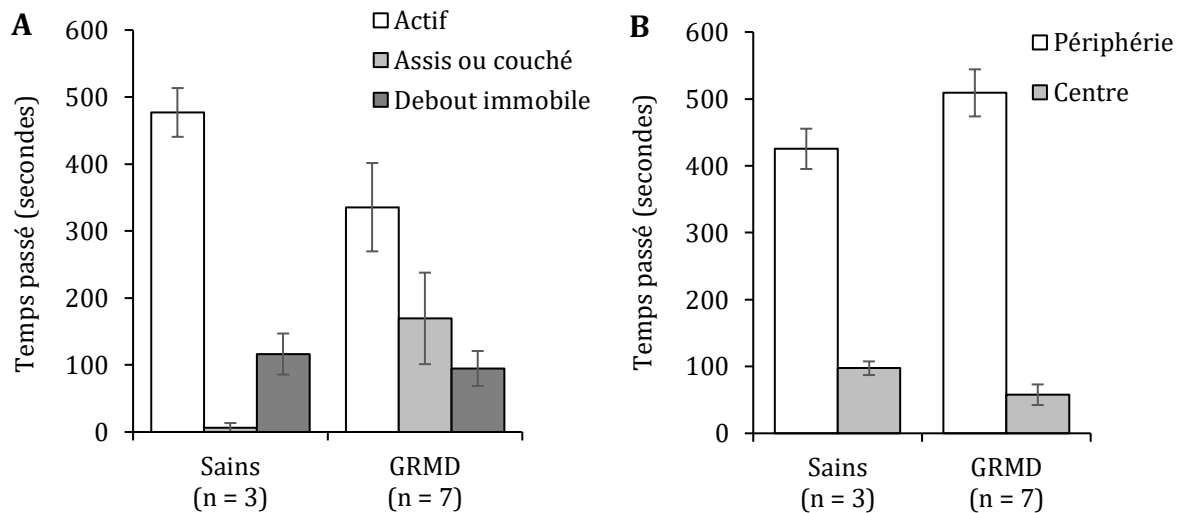
L'examen clinique et le test d'appétence ont permis d'exclure quatre chiens GRMD (Jintonic, Jybraltar, Lyrik, Lper) des tests de conditionnement opérant et du *holeboard* en raison de difficultés à la préhension des aliments et à la déglutition ou d'un refus de la nourriture.

2. *Openfield*

Quatre chiens sains et sept chiens GRMD ont été inclus. Un chien sain (Jappy) n'a pas accompli la tâche entièrement en raison d'une agitation trop importante le conduisant au bout de trois minutes à forcer le mur amovible pour tenter de sortir. En raison du stress induit, ce chien a été exclu de la suite de la tâche. L'ensemble des résultats est détaillé en Annexe 3.

Les chiens sains avaient tendance à être plus actifs que les chiens GRMD (sains : 477 ± 36 sec. ; GRMD : 336 ± 66 sec. ; U = 5 ; p = 0,27 ; Figure 26.A). Les chiens sains avaient tendance à être inactifs quasi-exclusivement debout (96 ± 4 %) contrairement aux chiens GRMD (temps inactif debout : 57 ± 16 %). Il est à noter que trois chiens GRMD (Guizmo, Jybraltar et Lyrik) sont restés inactifs plus de 70 % de la tâche (dont plus de 60 % du temps inactif assis ou couchés), alors qu'aucun autre chien n'a dépassé les 38 %. Dans l'ensemble, le temps passé en périphérie était significativement supérieur au temps passé au centre de la pièce (périphérie : 484 ± 28 sec. ; centre : 116 ± 28 sec. ; W = 55 ; p = 0,002 ; Figure 26.B), sans différence entre les deux groupes (sains : 425 ± 30 sec. ; GRMD : 509 ± 35 sec. ; U = 17 ; p = 0,18).

Figure 26 - Résultat de l'openfield. (A) répartition temporelle de l'activité physique ; (B) répartition temporelle du temps passé au centre ou en périphérie du dispositif. Les barres verticales correspondent à l'écart-type de la moyenne.



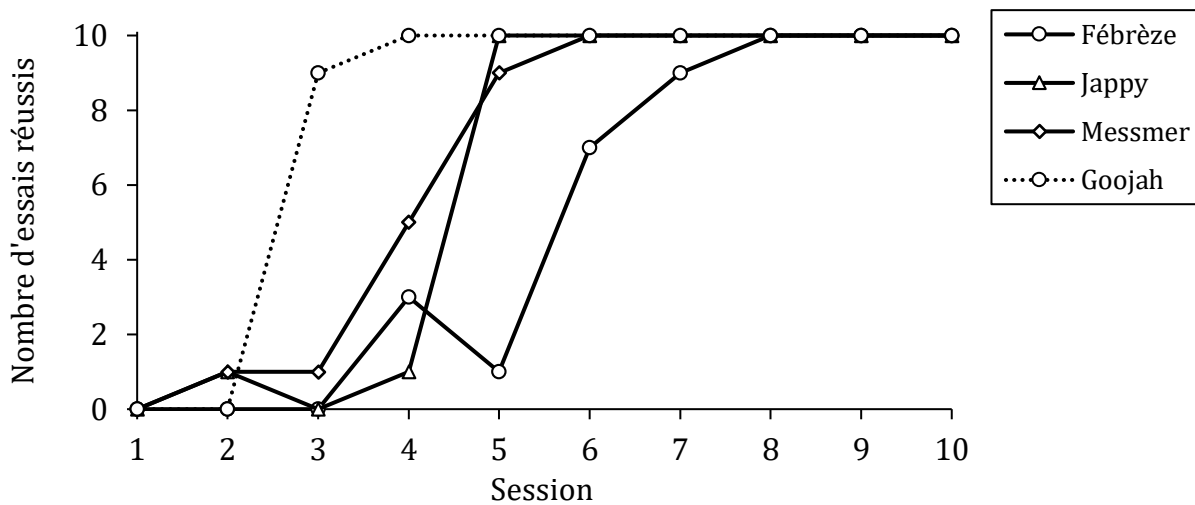
Les chiens sains avaient tendance à exprimer plus de comportements de flairage que les chiens GRMD (sains : 42 ± 12 occurrences ; GRMD : 32 ± 6 occurrences ; $U = 6$; $p = 0,38$). Quatre chiens GRMD (Goojah, Jybraltar, Jt, Lper) ont réalisé une miction alors qu'aucun chien sain ne l'a fait. Enfin aucun chien n'a vocalisé.

3. Conditionnement opérant

Quatre chiens sains sur cinq et trois chiens GRMD sur sept ont été inclus suite au test d'appétence. A la première session, aucun chien ne savait s'asseoir sur commande. Un chien sain (Jpeg) a été exclu en raison d'une peur de l'expérimentateur trop importante. Un chien GRMD (Guizmo) a été exclu en raison d'une difficulté à s'asseoir et d'un déficit de l'attention trop sévères. Un chien GRMD (JT) a été exclu en raison d'un refus d'effectuer la tâche. L'indice de faisabilité était donc de 0,57 (4/7). Au bilan, trois chiens sains et un chien GRMD ont été inclus à l'issue de la première session.

Les courbes d'apprentissages des chiens non exclus après la première session sont présentées en Figure 27. On note que les quatre chiens ont rapidement réussi la tâche jusqu'à atteindre un plateau avec 100 % de réussite à partir de la huitième session.

Figure 27 – Nombre d'essais réussis en fonction des sessions de conditionnement opérant. Seuls les chiens non exclus après la première session sont représentés. Les chiens sains sont en traits pleins et le chien GRMD en pointillés.



La tâche de conditionnement opérant a été retenue chez les trois chiens exclus après la première session :

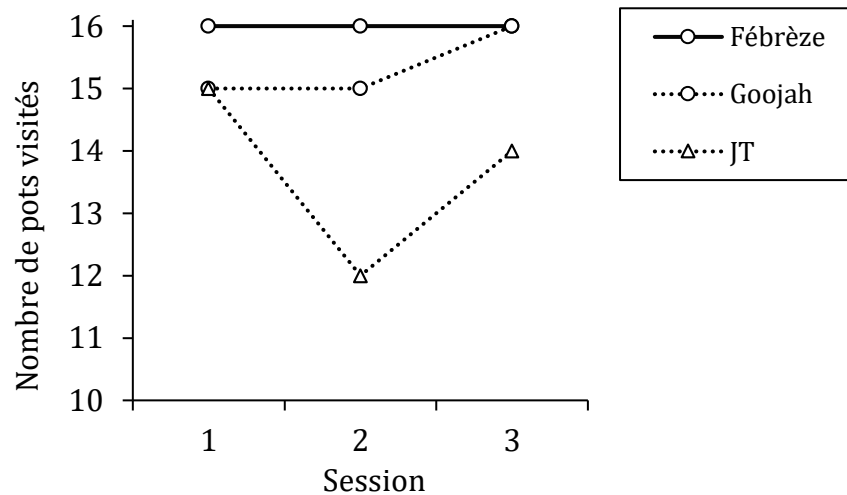
- Jpeg (sain) n'a jamais voulu réaliser la tâche et s'est toujours placé à distance de l'expérimentateur ;
- Guizmo (GRMD) a réussi entre un et trois essais par session mais fatiguait très rapidement ;
- Jt (GRMD) a appris à s'asseoir en deux sessions d'une même journée après habitude à l'expérimentateur durant plusieurs jours.

4. Holeboard

Quatre chiens sains et trois chiens GRMD ont été inclus. Tous les chiens avaient déjà visité la salle lors des tâches d'*openfield* et de conditionnement opérant. À la fin de la phase d'habitude, trois chiens sains (Jappy, Jpeg, Messmer) ont été exclus en raison d'un refus d'explorer les pots en présence ou non de l'expérimentateur. Ils cherchaient à s'échapper de la salle et fuyaient les pots, sans jamais aller au centre du dispositif. Un chien GRMD (Guizmo) a été exclu en raison d'un manque de motivation. Au premier essai, il a exploré six pots dans lesquels il a mangé la récompense. Aux essais suivants, il s'est couché et a refusé de réaliser la tâche. Un chien sain (Fébrèze) et deux chiens GRMD (Goojah et Jt) ont visité plus de la moitié des pots sur l'ensemble de la phase d'habitude. Ils ont ainsi été inclus sur la phase d'entraînement et l'indice de faisabilité était donc de 0,43 (3/7).

Sur les trois jours d'habitude au dispositif, Fébrèze et Goojah ont visité tous les pots. En revanche, Jt n'a jamais visité les 16 pots en 10 minutes (Figure 28). L'ensemble des résultats est détaillé en Annexe 3.

Figure 28 – Nombre de pots visités en fonction des sessions d’habituations du *holeboard*. Seuls les chiens non exclus après la phase d’habituations sont représentés. Les chiens sains sont en traits pleins et les chiens GRMD en pointillés.



Les trois chiens inclus ont ensuite été entraînés sans expérimentateur dans la salle. La durée moyenne nécessaire pour terminer la tâche diminuait globalement au cours des sessions mais de manière statistiquement non significative ($F(4) = 5,07$; $p = 0,28$; Figure 29.A). Le WMR moyen ne différait significativement pas entre les différentes sessions ($F(4) = 3,79$; $p = 0,43$; Figure 29.B). Le RMR moyen augmentait significativement au cours de l’entraînement ($F(4) = 10,64$; $p = 0,03$; Figure 29.C). Les comparaisons post-hoc utilisant le test de Nemenyi n’ont pas montré de différence significative entre les cinq sessions (Tableau 5). L’ensemble des résultats est détaillé en Annexe 5.

Figure 29 – Résultat des sessions d’entraînement du *holeboard*. (A) évolution de la durée moyenne pour terminer la tâche au cours des sessions ; (B) évolution du ratio de mémoire de travail au cours des sessions ; (C) évolution du ratio de mémoire de référence au cours des sessions. Les barres verticales correspondent à l’écart-type de la moyenne.

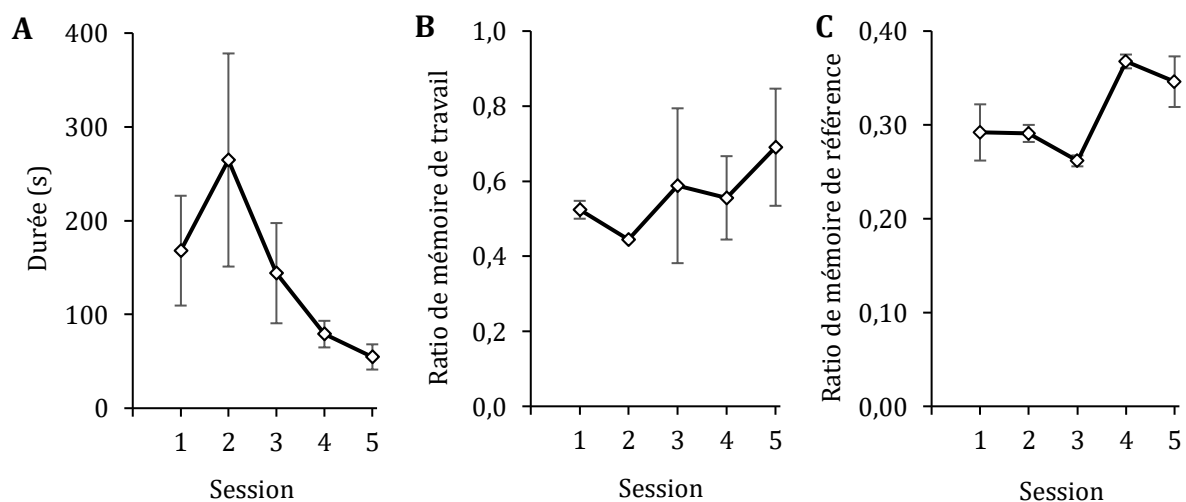


Tableau 5 – Comparaisons post-hoc du ratio de mémoire de référence au cours des cinq sessions d’entraînement du *holeboard*. (SEM) écart-type de la moyenne ; ^a comparaisons pour lesquelles on peut évoquer un manque de puissance statistique.

| Session | Moyenne | SEM | Comparaisons post-hoc par le test de Nemenyi | | | |
|---------|---------|------|--|-------|--------------------|-------|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1 | 0,29 | 0,03 | | | | |
| 2 | 0,29 | 0,01 | 0,995 | | | |
| 3 | 0,26 | 0,01 | 0,938 | 0,773 | | |
| 4 | 0,37 | 0,01 | 0,298 | 0,530 | 0,052 ^a | |
| 5 | 0,35 | 0,03 | 0,447 | 0,697 | 0,102 ^a | 0,999 |

C. Discussion

1. *Openfield*

a. *Faisabilité et anxiété*

À l’exception d’un chien sain (Jappy) pour lequel l’*openfield* était trop stressant, l’ensemble de notre cohorte a pu réaliser la tâche. L’ensemble des chiens a passé plus de temps dans la périphérie de la pièce que dans le centre. Ceci est expliqué par la taille quatre fois plus grande de la zone périphérique par rapport à la zone centrale. Les chiens GRMD avaient tendance à passer plus de temps en périphérie que les chiens sains. Chez la souris, il a été montré que les individus les plus anxieux passent plus de temps dans la zone périphérique (Seibenhener et Wooten, 2015). La transposition de l’interprétation de la souris vers le chien est délicate car la première espèce est une proie – et tend donc à chercher à se cacher avec la peur – alors que la seconde est prédatrice. Par ailleurs il est à noter qu’aucun chien de la cohorte n’a vocalisé. Or ces comportements auraient pu être informatifs sur le niveau d’anxiété des animaux. Il n’existe que très peu d’études utilisant l’*openfield* chez le chien et aucune ne fait référence au zonage centre/périphérie. Certaines études portant sur la peur liée au bruit ont utilisé le temps d’inactivité comme marqueur d’anxiété (Araujo *et al.*, 2013 ; Barnard *et al.*, 2017 ; Gruen *et al.*, 2015 ; Head *et al.*, 1997 ; Siwak *et al.*, 2001, 2002 ; Wormald *et al.*, 2016). Or nous avons vu que les chiens GRMD avaient tendance à être plus inactifs que les chiens sains, ce qui peut être expliqué en première hypothèse par les déficits moteurs des chiens GRMD.

L’ensemble de ces résultats ne nous permet pas de conclure avec certitude sur des différences du niveau d’anxiété entre les chiens sains et les chiens GRMD et il ne semble pas exister de différence sur leur niveau d’exploration.

b. Activité

Dans notre étude les chiens sains avaient tendance à être plus actifs que les chiens GRMD. Ces derniers avaient ainsi tendance à plus se coucher ou s'asseoir. Nous avons pris le temps passé actif ou inactif plutôt que la distance parcourue comme indicateur d'activité en raison des difficultés locomotrices des chiens GRMD. Enfin la majorité des chiens GRMD ont réalisé des mictions alors qu'aucun chien sain ne l'a fait. Les chiens GRMD présentaient une fatigabilité notable et des difficultés locomotrices à des niveaux variables.

L'ensemble de ces résultats ne nous permet pas de conclure avec certitude sur des différences du tempérament exploratoire entre les chiens sains et les chiens GRMD.

c. Intérêts et limites de la tâche

Dans le cadre de notre étude, *l'openfield* n'a finalement trouvé qu'un intérêt limité. Il n'a pas permis de caractériser avec certitude le tempérament exploratoire ni le niveau d'anxiété de notre cohorte. Cependant les trois chiens GRMD ayant été inactifs la majeure partie de la tâche ont par la suite été exclus des tâches suivantes soit en raison de leur examen clinique (Jybraltar et Lyrik) soit en raison d'un refus d'effectuer la tâche (Guizmo). *L'openfield* pourrait ainsi compléter l'examen clinique pour confirmer l'exclusion des chiens particulièrement inactifs.

Par ailleurs nous avons pu objectiver un stress important chez Jappy lorsqu'il était placé seul dans une salle inconnue. Cette information serait pertinente dans le cadre de réhabilitation des chiens sains de laboratoire (nécessité d'un apprentissage renforcé de la solitude). Nous proposons ainsi ce test dans ce cadre.

d. Pistes d'amélioration

Le mur amovible a été un point problématique car Jappy a tenté de le forcer. Il a dû entrevoir une sortie ou au moins une faiblesse en ce point ce qui a attiré son attention. Idéalement il faudrait quatre murs en dur.

2. Conditionnement opérant

a. Faisabilité

Quatre chiens GRMD n'ont pas pu être inclus en raison de leur examen clinique ou de leur résultat au test d'appétence (difficultés de locomotion, à la préhension des aliments et à la déglutition ou refus de la nourriture). Ceci est une limite importante liée à la myopathie.

À la suite de la première session, nous avons dû exclure un chien sain (Jpeg) qui n'a jamais voulu réaliser la tâche et s'est toujours placé à distance de l'expérimentateur (il est rapporté une peur des inconnus par le personnel technique), un chien GRMD (Guizmo) en raison d'une fatigabilité trop importante malgré une relative motivation et un chien GRMD (Jt) en raison d'un refus total à réaliser la tâche. Cependant à la suite de la tâche de *holeboard*, Jt a été retesté et a montré qu'il était très motivé et capable de réaliser la tâche de conditionnement opérant au bout de deux sessions sur une même journée. Ceci peut être expliqué par une habitude à l'expérimentateur entre temps.

b. Courbe d'apprentissage

Cette tâche a permis d'obtenir une courbe d'apprentissage avec atteinte d'un plateau à 100 % de réussite pour l'ensemble des chiens en moins de 10 sessions. Le nombre de sessions était donc suffisant.

La très faible taille de notre échantillon ne nous a cependant pas permis d'explorer d'éventuelles différences entre les chiens sains et les chiens GRMD.

c. Intérêts et limites de la tâche

Ce test de conditionnement opérant est un test facile à mettre en place, ne nécessitant que peu de matériel et rapide à effectuer (atteinte du plateau en deux à trois jours). Il permet d'obtenir des courbes d'apprentissages aisément comparables. Cependant les résultats obtenus montrent que cette tâche simple en apparence – à savoir apprendre à un chien à s'asseoir en le récompensant avec de la nourriture humide appétente – est complexe dans le cas de chiens présentant des difficultés locomotrices et non habitués à interagir avec une personne inconnue. Nous avons ainsi dû ne pas inclure ou exclure un trop grand nombre de chiens.

d. Pistes d'amélioration

Le premier axe à améliorer concerne la récompense utilisée. La nourriture était la même que celle utilisée par les animaliers pour la prise de médicaments. Or il est rapporté que les chiens ont tendance à préférer un aliment nouveau à un aliment habituel. On parle de néophilie alimentaire (Serpell, 1995). De plus le personnel technique a rapporté qu'au moins un chien GRMD (Lyrik) a associé cette alimentation avec une expérience négative, pouvant être à l'origine d'une aversion alimentaire (Serpell, 1995). Tout d'abord nous proposons donc d'utiliser une récompense alimentaire jamais utilisée jusque-là (par exemple des dés de jambon, morceaux de saucisse, autre alimentation humide). Ensuite il peut exister des préférences alimentaires individuelles et certains animaux ont présenté des difficultés à la préhension et la déglutition du pâté lors du test d'appétence. Ainsi,

plutôt qu'une standardisation de la récompense, nous estimons qu'il faut individualiser les récompenses en réalisant un test d'appétence couplé à un test de préférence alimentaire (Hall *et al.*, 2017). Rappelons que le but de cette récompense est d'être le plus appétent et la plus aisée à manger possible pour chaque individu afin d'augmenter sa motivation et donc de jouer un rôle de renforçateur positif puissant. Ainsi individualiser le type de récompense alimentaire permettrait d'effacer, au moins partiellement, ces différences inter-individuelles.

Le second axe concerne le stress et la peur des animaux. Tout d'abord certains chiens étaient familiarisés à peu d'humains. Par exemple Jpeg a toujours été très distant avec les inconnus. De manière générale, ceci semblait être plus marqué chez les chiens sains (Jappy, Jpeg et Messmer). Cette différence peut s'expliquer par un nombre d'interactions plus important des chiens GRMD avec le personnel soignant. Ensuite nous avons vu que Jt a initialement refusé d'accomplir la tâche. Il l'a accepté après avoir accompli la tâche de *holeboard*. Ceci peut s'expliquer par une habitude à l'expérimentateur et à la salle. Nous proposons donc une phase d'habitation préalable à la phase d'entraînement où l'expérimentateur passerait du temps avec les chiens individuellement et/ou collectivement dans la salle d'expérimentation en maximisant les interactions positives.

Enfin nous pourrions compléter ce test en testant les chiens au moins trois semaines après leur dernière session afin d'apporter une information supplémentaire sur la capacité de rétention de l'apprentissage à long terme (Vaillend *et al.*, 1995).

3. *Holeboard*

a. *Faisabilité*

Comme pour la tâche de conditionnement opérant, quatre chiens GRMD n'ont pas pu être inclus en raison de leur examen clinique ou de leur résultat au test d'appétence. À la suite de la phase d'habitation, nous avons dû exclure trois chiens sains (Jappy, Jpeg et Messmer) en raison d'un stress trop important et un chien GRMD (Guizmo) en raison d'une fatigabilité trop importante et d'une motivation trop faible. La salle était déjà connue lors de la première session et l'habitation a été réalisée en l'absence et en présence de l'expérimentateur. De plus deux des chiens sains exclus de la tâche de *holeboard* (Jappy et Messmer) ont réalisé et réussi la tâche de conditionnement opérant. Ainsi le stress des chiens sains semble donc être secondaire au dispositif lui-même. Ceci s'est traduit par un refus de s'approcher des pots. On pourrait l'expliquer par une néophobie vis-à-vis des objets.

Parmi les chiens inclus dans la phase d'entraînement, Jt a été le seul à ne pas avoir visité tous les pots lors de la phase d'habituation. Cependant c'est celui qui a obtenu les meilleures performances lors de cette seconde phase. Il semble donc que la phase d'habituation ait été suffisamment longue pour les trois chiens inclus en phase d'entraînement.

b. *Courbes d'apprentissages*

Les trois chiens testés ont réussi à apprendre les motifs proposés. Ceci s'est traduit par un temps pour réaliser la tâche (visiter les quatre pots récompensés) de plus en plus court et avec de moins en moins de visites dans les pots non récompensés (objectivé par le RMR) entre les sessions. En outre les chiens avaient tendance à revisiter les pots récompensés déjà visités au sein d'une même session (objectivé par le WMR). Ces résultats montrent que le chien est capable de comprendre et réaliser la tâche de *holeboard*. Ce test avait déjà été réalisé chez l'abeille, la souris, le rat, la poule et le porc mais jamais chez le chien à ce jour (Arts *et al.*, 2009 ; Demas et Brown, 1995 ; Nordquist *et al.*, 2011 ; Oades, 1981 ; Van der Zee *et al.*, 1992). Un paradigme expérimental a été proposé chez le chat mais celui-ci semble difficilement comparable au *holeboard* classiquement décrit car les trous permettant l'accès à la nourriture étaient placés sur un mur vertical (McCune *et al.*, 2008).

De très nombreuses variantes de cette tâche ont été décrites (van der Staay *et al.*, 2012). Dans notre cas, le nombre de pots et la durée de chaque session semblaient suffisants. Cependant il serait nécessaire d'augmenter significativement le nombre de sessions d'entraînement pour obtenir une évolution plus franche des performances des chiens.

La très faible taille de notre échantillon ne nous a pas permis d'explorer d'éventuelles différences entre les chiens sains et les chiens GRMD.

c. *Intérêts et limites de la tâche*

Ce test permet d'obtenir de très nombreuses informations sur les individus. Par exemple il nous a permis d'établir des courbes d'apprentissages et de performances aisément comparables. Il nous a également informé sur le niveau de stress, la néophobie, la motivation et la fatigabilité des chiens testés.

Cependant il nécessite de construire un dispositif important, bien que peu onéreux (< 100 €), dans une pièce assez grande (au moins 4 x 4 mètres). Il nécessite également beaucoup de temps puisque d'une part il faudrait idéalement prévoir plusieurs semaines d'habituation (*cf. infra*) et plusieurs semaines d'entraînement (*cf. supra*), et d'autre part

chaque session de 10 minutes prenait en réalité 30 minutes en incluant le nettoyage du dispositif en raison des traces de nourriture restant dans les gamelles et la tendance de certains chiens à uriner sur les pots laissant des marques olfactives.

d. Pistes d'amélioration

Le point fondamental à améliorer est l'habituation des chiens. Nous proposons plusieurs pistes : (1) réaliser une habituation plus longue, avec objectivation du niveau d'habituation, et ainsi arrêt de cette phase à partir d'un certain seuil uniquement (par exemple après exploration de 80 % des pots), (2) introduire les pots progressivement (par exemple la salle vide, puis un pot, puis quatre pots, puis huit, puis la totalité) toujours en les récompensant, (3) laisser explorer dans un premier temps avec des congénères pour favoriser les interactions avec les pots par facilitation sociale, puis sans congénère (Miller *et al.*, 2009).

Le deuxième axe concerne la fatigabilité. Diminuer le nombre de pots aurait pour effet de diminuer l'effort à fournir pour les chiens et donc de potentiellement intégrer des chiens GRMD en moins bonne condition physique (par exemple Guizmo), mais augmenterait l'effet plafond² rendant la tâche moins discriminante.

Le troisième axe concerne la récompense utilisée. Les pistes proposées sont sensiblement les mêmes que celles décrites pour la tâche de conditionnement opérant (*cf. supra*). Cependant il faudrait idéalement utiliser une nourriture sèche ne laissant pas de trace au fond des pots car certains chiens ont eu tendance à lécher des pots déjà visités. Cette condition peut être problématique en cas de déglutition difficile.

Le quatrième axe concerne les indices olfactifs. Nous avons imprégné le dessous du bord de chaque gamelle avec l'odeur de la récompense afin d'empêcher la discrimination des pots récompensés ou non par des indices olfactifs (Figure 23). Cet emplacement était directement accessible par les chiens et aurait pu avoir un rôle non désiré de renforçateur en cas de léchage. Nous suggérons d'inclure les indices dans un récipient sous la gamelle et de percer le fond de la gamelle avec des trous suffisamment larges et nombreux pour diffuser les odeurs mais suffisamment petits pour rester inaccessible au chien.

² On peut ne pas trouver de différences entre deux groupes testés pour un caractère alors qu'en vrai cette différence existe si pour un test donné, la majorité voire la totalité des sujets produisent un score très faible (effet plancher) ou très élevé (effet plafond). Un exemple caricatural d'effet plafond serait de comparer les performances mathématiques de deux groupes d'individus adultes sans atteinte neurocognitive en demandant de réaliser des multiplications de la table de deux. La quasi-totalité des sujets répondront correctement en dépit de profondes différences de performance dans la matière (Martin et Bateson, 2007).

Le cinquième axe concerne la nécessité de réaliser cette tâche sur un échantillon plus important de chiens sains (provenant de laboratoires ou de propriétaires) afin de valider son utilisation chez cette espèce, ce qui n'a pas encore été décrit à ce jour.

Enfin nous pourrions réaliser une seconde phase d'entraînement avec un nouveau motif une fois la première phase acquise. Ceci permettrait de tester la capacité des chiens à s'adapter et à modifier leur apprentissage (Arts *et al.*, 2009).

4. Effets d'une tâche cognitive sur la facilitation d'apprentissage

Nous avons observé au cours des expériences que les chiens étaient de plus en plus motivés et excités à la vue de l'expérimentateur. Ce fut par exemple le cas de Jt qui a accepté de réaliser la tâche de conditionnement opérant seulement après avoir réalisé la tâche de *holeboard*. Ceci est à mettre en lien avec le fait que ces chiens aient rarement l'occasion d'interagir avec des personnes inconnues. Cet effet, bien qu'*a priori* délétère sur l'interprétation des tâches selon leur ordre, pourrait être utilisé pour augmenter la motivation globale des chiens. Comme précédemment suggéré, l'habituation à l'expérimentateur trouve une place fondamentale pour la faisabilité de l'évaluation cognitive de ces chiens d'une part en diminuant l'anxiété face à l'expérimentateur et d'autre part en augmentant la motivation des chiens pour les expériences à suivre. Par ailleurs il est intéressant de noter que les chiens sains étaient moins stimulés que les chiens GRMD qui bénéficiaient de plus de soins quotidiens. Ainsi les chiens GRMD étaient plus familiers de l'humain mais pouvaient aussi avoir tendance à développer une aversion en cas d'expérience négative, comme ce fut le cas de Lyrik pour les récompenses alimentaires associées à la prise de médicament.

Au-delà de l'effet motivationnel, l'étude du *holeboard* sur le porc a montré que les individus testés avaient « appris à apprendre ». Leurs performances étaient significativement meilleures s'ils avaient déjà accompli la tâche avec un motif différent que s'ils n'avaient jamais accompli la tâche. Il a été suggéré que les animaux ont appris les « règles » de la tâche à savoir que seule une partie des pots sont récompensés (mémoire de référence) et que les trous ne sont récompensés qu'une fois par session (mémoire de travail) (Arts *et al.*, 2009). La réalisation d'une tâche cognitive nécessitant un apprentissage pourrait donc avoir un impact non négligeable sur les tâches suivantes.

Une application, hors évaluation cognitive, serait le *medical training*. Outre le fait de rendre la manipulation des chiens plus aisée, cet entraînement permettrait d'améliorer le bien-être des chiens en augmentant les interactions positives entre le personnel et les animaux, et de faciliter la mise en place de tâches cognitives (Hall *et al.*, 2015 ; Meunier et Beaver, 2014).

5. Application aux essais thérapeutiques

Le principal défi à relever lors du suivi des capacités cognitives au cours d'un essai thérapeutique est de n'avoir pour variable que le traitement. Or ceci est illusoire. Au-delà des différences innées exprimées notamment par le tempérament, chaque expérience façonne l'individu et modifie ses circuits neuronaux. Il apparaîtra donc forcément des différences interindividuelles au cours du temps. Il sera alors fondamental de traiter les chiens de manière comparable tout au long de l'essai thérapeutique afin de ne pas entraîner inconsciemment certains chiens à des paradigmes cognitifs ni créer de peur face à une situation. Le *medical training* pourrait être bénéfique en standardisant un maximum les procédures de soins (par exemple la prise de médicament).

Par ailleurs, comme discuté précédemment, l'étude du *holeboard* chez le porc a présenté l'impact bénéfique d'une tâche cognitive sur l'apprentissage de la suivante (Arts *et al.*, 2009). Cet effet devra nécessairement être pris en compte en cas de répétition d'une tâche cognitive à plusieurs moments-clés d'un essai thérapeutique (par exemple avant prise du traitement, après un mois de traitement, puis après six mois de traitement). En outre il peut aussi être intéressant de comparer la capacité de rétention d'un apprentissage à long terme entre le groupe traité et le groupe témoin par cette répétition de l'apprentissage.

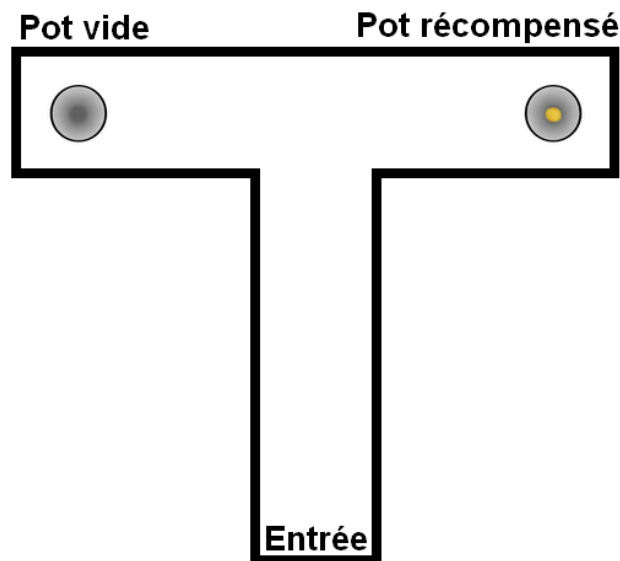
6. Proposition d'autres tâches d'évaluation cognitive pour des études futures

De très nombreuses tâches cognitives ont été décrites à ce jour chez de nombreuses espèces. Nous ne décrivons que les paradigmes expérimentaux (1) ayant été validés chez le chien, (2) réalisables par le chien GRMD c'est-à-dire ne nécessitant pas un effort physique trop important, ne faisant pas appel à la vitesse de réalisation, *etc.* et (3) ayant montré une capacité à discriminer correctement des chiens présentant des troubles cognitifs (par exemple des chiens atteints du syndrome de dysfonctionnement cognitif canin).

a. Labyrinthe en T

Le labyrinthe en T (Figure 30) est un test d'apprentissage spatial plus simple que la tâche de *holeboard*. Le principe est de ne récompenser qu'un seul des deux bras (gauche ou droite). Le sujet apprend ainsi à toujours emprunter le même bras (défini à l'avance). À la suite de cet entraînement, il est possible de réaliser une inversion de l'apprentissage en modifiant le bras récompensé. Ceci permet de tester la capacité de l'animal à s'adapter et à modifier son apprentissage. Initialement développé chez les rongeurs, ce test a par la suite été proposé chez le chien (Mongillo *et al.*, 2013 ; Sanders *et al.*, 2011).

Figure 30 - Schéma du labyrinthe en T.

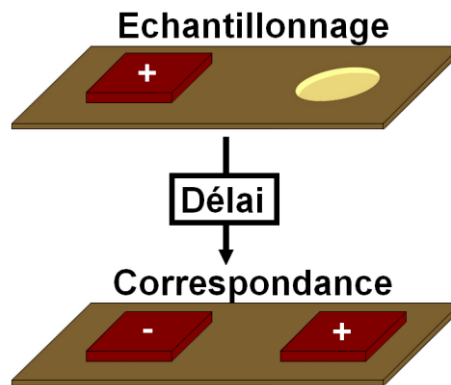


b. *Tâche de non-appariement différé à une position*

i. *Paradigme expérimental*

La tâche de non-appariement différé à une position (*Delayed Non-Matching to Position task*, DNMTPT) consiste à présenter une planche avec deux trous au chien. La première phase, dite d'échantillonnage, consiste à placer une récompense dans l'un des trous et à le recouvrir avec un objet. Le chien doit pousser l'objet pour obtenir la récompense. Une fois la récompense obtenue, l'expérimentateur retire la planche pendant un délai préalablement défini (par exemple 10 sec.). Pendant ce temps, il place une récompense dans l'autre trou et recouvre les deux trous avec deux objets identiques à celui initialement présenté. Une fois le délai passé, il est réalisé la seconde phase, dite de correspondance, où l'expérimentateur présente de nouveau la planche au chien. Le chien doit alors pousser l'objet au-dessus du trou qui n'avait pas été récompensé lors de la première présentation pour obtenir la nouvelle récompense (Figure 31). Dans un second temps, il peut être réalisé un test de délai progressif. Celui-ci consiste à répéter la tâche en augmentant progressivement le délai entre la phase d'échantillonnage et la phase de correspondance (Adams *et al.*, 2000b ; Head *et al.*, 1995).

Figure 31 - Schéma du paradigme expérimental de la tâche de *delayed non-matching to position* (DNMP). (+) trou récompensé ; (-) trou non récompensé.



La DNMTTP est une tâche simple, rapide et peu onéreuse à mettre en place. Elle permet de tester la mémoire spatiale du chien ainsi que sa capacité de rétention des apprentissages.

ii. Variantes

Il est possible de jouer sur le nombre de trous présentés à l'animal pour modifier la difficulté de la tâche. Ainsi il a été décrit une variante utilisant trois trous chez le chien et neuf trous chez les primates (Borghys *et al.*, 2017 ; Studzinski *et al.*, 2005 ; Yhnell *et al.*, 2016).

La tâche d'appariement différé à une position (*Delayed Matching to Position task*, DMTP) est identique à la DNMTTP à l'exception que la récompense durant la phase de correspondance est placée du même côté que durant la phase d'échantillonnage (Squire, 2009).

La tâche de non-appariement différé à un modèle (*Delayed Non-Matching to Sample task*, DNMTS) fait appel à la capacité à discriminer des objets et non des emplacements. Il est nécessaire d'utiliser une planche à trois trous. Durant la phase d'échantillonnage, il est présenté un objet de référence (par exemple une pyramide) cachant le trou central contenant une récompense. Une fois la récompense trouvée, la planche est retirée durant un délai défini. Il est alors réalisé la phase de correspondance où un objet identique à celui de la phase d'échantillonnage est placé au-dessus d'un trou latéral non récompensé et un objet différent (par exemple un cube) est placé au-dessus de l'autre trou latéral qui lui est récompensé. L'animal doit alors apprendre à interagir avec l'objet qui ne lui a pas été présenté initialement (Squire, 2009).

La tâche d'appariement différé à un modèle (*Delayed Matching to Sample task*, DMTS) est identique à la DNMTS à l'exception que la récompense durant la phase de correspondance est placée sous le même objet que celui présenté durant la phase d'échantillonnage (Squire, 2009).

c. *Tâche de discrimination d'objet et d'apprentissage inversé*

La tâche de discrimination d'objet et d'apprentissage inversé est réalisée en trois étapes. Tout d'abord il est réalisé un test de préférence entre deux objets pour chaque chien. Chaque objet est placé aléatoirement au-dessus d'un trou contenant chacun une récompense alimentaire. Il est réalisé 10 essais et l'objet le plus fréquemment choisi est considéré comme le « préféré ». Dans un second temps, il est réalisé 20 essais d'apprentissage de discrimination de l'objet. À chaque essai, les objets sont placés au-dessus d'un trou (position aléatoire entre les deux trous) et une récompense est placée dans le trou sous l'objet « préféré ». Le but est d'apprendre au chien à toujours visiter le trou recouvert par son objet « préféré », permettant de tester la capacité du chien à discriminer deux objets. Enfin il est réalisé une phase d'apprentissage inversé sur le même principe mais la récompense est placée sous l'objet qui n'a pas été désigné comme « préféré », permettant de tester la capacité du chien à modifier son apprentissage (Borghys *et al.*, 2017).

IV. Objectif 3 – Recherche d'un biomarqueur par mesure plasmatique de peptide β -amyloïde 42 par ELISA

A. Matériels et méthodes

1. Animaux

Onze chiens GRMD et 10 chiens Golden Retriever sains du même laboratoire, tous âgés de deux à trois ans et demi ont été inclus dans l'étude. Le détail des chiens est donné dans le Tableau 6. Aucun animal n'a jamais subi d'entraînement cognitif ni de test éthologique auparavant.

Tableau 6 - Détail des chiens prélevés.

| Nom | Statut | Date de naissance | Âge (ans) | Date de prélèvement | Durée de conservation de l'échantillon (ans) |
|-----------|--------|-------------------|-----------|---------------------|--|
| Dingo | Sain | 01/08/2008 | 3,3 | 16/11/2011 | 5,8 |
| Dzer | Sain | 18/11/2008 | 2,1 | 08/12/2010 | 6,7 |
| Fébrèze | Sain | 29/03/2010 | 2,7 | 19/12/2012 | 4,7 |
| Haribo | Sain | 05/03/2012 | 2,6 | 29/09/2014 | 2,9 |
| Hawaiï | Sain | 05/03/2012 | 2,1 | 02/04/2014 | 3,4 |
| Hello | Sain | 04/03/2012 | 2,7 | 29/10/2014 | 2,9 |
| Jackpot | Sain | 17/02/2014 | 2,0 | 17/02/2016 | 1,6 |
| Jappy | Sain | 17/02/2014 | 3,5 | 08/08/2017 | 0,1 |
| Jedi | Sain | 10/01/2014 | 2,5 | 06/07/2016 | 1,2 |
| Jpeg | Sain | 07/01/2014 | 3,6 | 08/08/2017 | 0,1 |
| Goojah | GRMD | 29/04/2011 | 2,5 | 13/11/2013 | 3,8 |
| Guignol | GRMD | 08/06/2011 | 2,6 | 13/01/2014 | 3,6 |
| Guizmo | GRMD | 08/06/2011 | 2,3 | 12/09/2013 | 4,0 |
| J.O. | GRMD | 25/01/2014 | 2,8 | 25/10/2016 | 0,9 |
| Jigoto | GRMD | 26/01/2014 | 2,8 | 03/11/2016 | 0,8 |
| Jintonic | GRMD | 26/01/2014 | 3,5 | 08/08/2017 | 0,1 |
| JT | GRMD | 13/03/2014 | 3,4 | 08/08/2017 | 0,1 |
| Jvago | GRMD | 10/03/2014 | 2,1 | 30/03/2016 | 1,4 |
| Jybraltar | GRMD | 17/02/2014 | 3,5 | 08/08/2017 | 0,1 |
| Lper | GRMD | 01/03/2015 | 2,4 | 08/08/2017 | 0,1 |
| Lyrik | GRMD | 12/03/2015 | 2,4 | 08/08/2017 | 0,1 |

2. Procédure

Des échantillons de sang (6 ml) ont été prélevés au niveau d'une des veines jugulaires de chaque chien entre 2010 et 2017. Les échantillons ont immédiatement été transvasés individuellement dans un tube sec gélosé. Chaque tube a été centrifugé (3000 g ; 4 °C ; 10 minutes). Le sérum obtenu a été transvasé dans un tube sec étiqueté et immédiatement congelé à - 80 °C.

Le taux sérique d'Aβ₄₂ a été mesuré avec un kit ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) compétitif (réf. MBS742661, MyBioSource Incorporation, Etats-Unis). Les échantillons ont été analysés en duplicata, d'une part sans dilution et d'autre part avec une dilution à 1:2. Les échantillons ont été analysés par méthode colorimétrique

à l'aide d'un photomètre pour microplaques avec un filtre à 450 nm (Multiskan EX Microplate Reader, ThermoFisher Scientific, États-Unis).

Une modélisation par régression logistique à quatre paramètres linéaire basée sur les mesures de densité optique des échantillons standards a été effectuée pour calculer les concentrations au sein de notre échantillon.

Il a été exclu les valeurs aberrantes (concentration calculée trop éloignée des autres répliques techniques du même animal). Si les deux valeurs d'une même dilution étaient aberrantes, alors toute la dilution était exclue. Si l'ensemble des répliques d'un même animal restait non interprétable, alors l'animal était exclu. Il en était de même si l'animal présentait des valeurs hors gamme.

3. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec R 3.4.3 pour Windows (*R Foundation for Statistical Computing*, Autriche). La courbe standard de l'analyse ELISA a été obtenue par régression logistique à quatre paramètres à l'aide du paquet « drc » (Ritz *et al.*, 2015). La comparaison du taux plasmatique d'Aβ₄₂ chez les chiens sains et GRMD a été réalisée par un modèle linéaire à effets mixtes avec réplication des mesures de chaque échantillon sanguin comme effets aléatoires à l'aide du paquet « nlme » (Pinheiro *et al.*, 2017). Le seuil de significativité était considéré pour $p \leq 0,05$. Les variables sont présentées sous la forme moyenne ± écart-type de la moyenne.

B. Résultats

1. Animaux

La liste des animaux inclus dans l'étude est présentée dans le Tableau 6. L'âge des chiens dans les deux groupes était comparable (sains : $2,7 \pm 0,2$ ans ; GRMD : $2,8 \pm 0,2$ ans). L'âge des sérums était plus élevé dans le groupe sain que dans le groupe GRMD (sains : $2,9 \pm 0,7$ ans ; GRMD : $1,4 \pm 0,5$ ans).

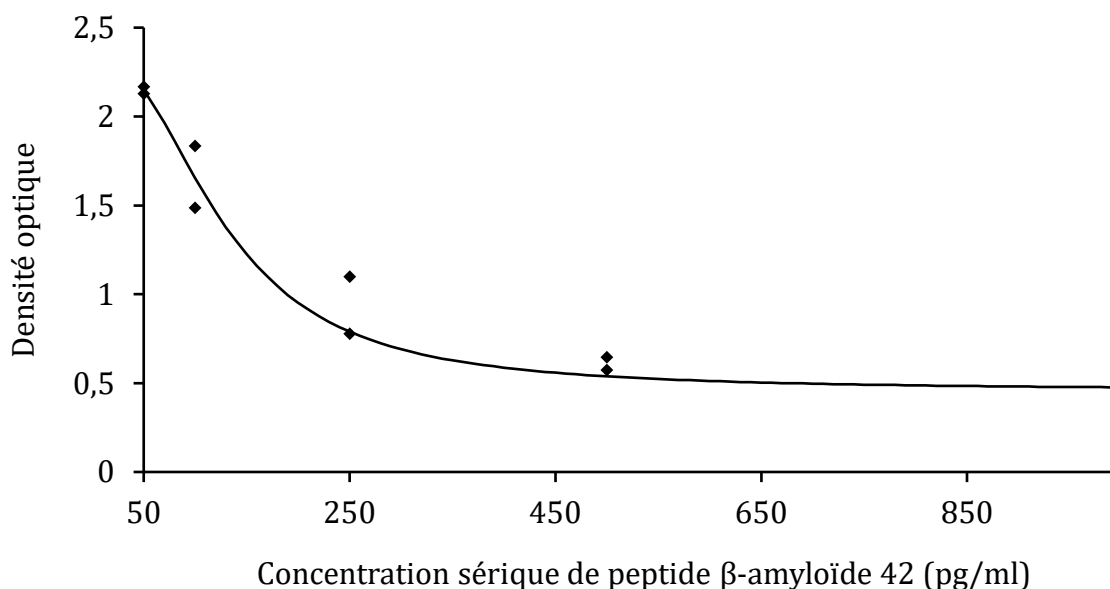
2. Courbe standard

La courbe standard générée correspond à un modèle logistique à quatre paramètres ($R^2 = 0,972$; Figure 32) dont l'équation est la suivante :

$$\text{Densité optique} = \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} + A_2$$

avec $A_1 = 2,3533002$; $A_2 = 0,4595953$; $x_0 = 126,4905128$; $p = 2,2833017$; et x la concentration sérique en $A\beta_{42}$.

Figure 32 - Courbe standard de la densité optique en fonction de la concentration sérique de peptide β -amyloïde 42.



3. Mesure plasmatique de peptide β -amyloïde 42 dans l'échantillon

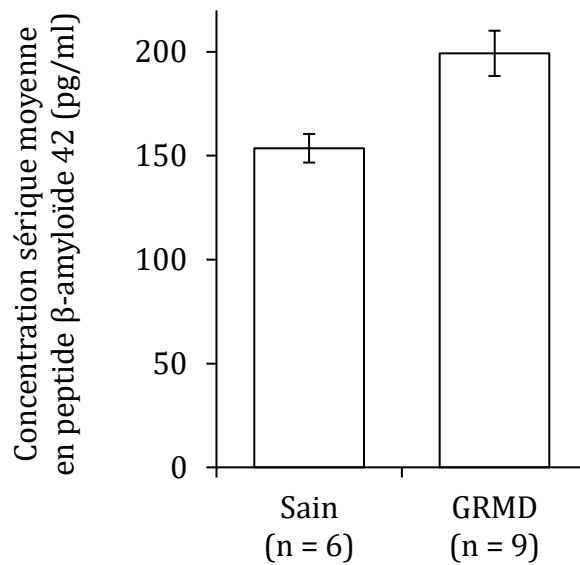
Après analyse de l'échantillon, il a été exclu quatre chiens sains, deux chiens GRMD, quatre dilutions de chiens sains et deux réplicas de chiens GRMD conformément aux critères d'exclusion listés ci-dessus. Les causes d'exclusion sont détaillées en Annexe 6. L'âge des chiens dans les deux groupes restait comparable (sains : $3,0 \pm 0,2$ ans ; GRMD : $2,7 \pm 0,2$ ans) et l'âge des sérums restait plus élevé dans le groupe sain que dans le groupe GRMD (sains : $2,8 \pm 1,0$ ans ; GRMD : $1,3 \pm 1,5$ ans). L'analyse des résidus du modèle linéaire permet de conclure à une homoscédasticité et à une normalité des résidus.

L'analyse par le modèle linéaire à effets mixtes (Figure 33 ; Tableau 7) montre une différence statistiquement non significative de la concentration sérique en $A\beta_{42}$ entre les chiens sains ($153,6 \pm 6,9$ pg/ml) et les chiens GRMD ($199,3 \pm 10,9$ pg/ml).

Tableau 7 - Résultats de l'analyse du modèle linéaire à effets mixtes.

| Effet fixe | Estimation | Écart-type | Degrés de liberté | Valeur t | Pr (> t) |
|----------------------|------------|------------|-------------------|----------|-----------|
| Ordonnée à l'origine | 201,26 | 18,18 | 35 | 11,24 | < 0,0001 |
| Maladie | -51,19 | 29,92 | 13 | -1,77 | 0,100 |

Figure 33 – Comparaison de la concentration sérique en peptide β -amyloïde 42 entre les chiens sains et les chiens GRMD. Les barres verticales correspondent à l'écart-type de la moyenne.



C. Discussion

Dans notre échantillon, le taux d'A β_{42} sérique était plus élevé chez les chiens GRMD que chez les chiens sains. La différence observée n'était statistiquement pas significative. Cependant on peut évoquer un manque de puissance statistique secondairement à la faible taille de notre échantillon et à une imprécision de notre mesure conduisant à plusieurs valeurs aberrantes. Nous avons dû exclure un certain nombre de prélèvements ou de mesures en raison d'écarts trop importants pour un même prélèvement.

Le taux d'A β_{42} sérique chez les chiens sains était plus élevé que ceux trouvés dans la bibliographie. Ainsi une étude chez des chiens de propriétaires en bonne santé apparente a montré un taux d'A β_{42} sérique moyen de $59,2 \pm 58,6$ pg/ml chez neuf individus d'environ trois ans et un taux d'A β_{42} sérique moyen de $23,3 \pm 12,0$ pg/ml chez 31 individus d'environ 12 ans (González-Martínez *et al.*, 2011). Une autre étude menée chez 21 chiens de propriétaires en bonne santé apparente d'environ 12 ans a montré un taux d'A β_{42} sérique moyen de $74,9 \pm 10,0$ pg/ml (Schütt *et al.*, 2015). On peut suspecter que ces différences observées soient liées à l'utilisation de kits ELISA différents. Par ailleurs nous ne pouvons exclure un problème d'ordre technique à l'origine d'un tel écart avec les données bibliographiques.

Ces résultats, bien que statistiquement non significatifs, montrent une augmentation du taux d'A β_{42} sérique chez le chien GRMD par rapport au chien sain de laboratoire. Ceci est comparable à la seule étude menée ce jour chez le jeune patient DMD (Abdel-Salam *et al.*, 2014). Au vu de la difficulté à mesurer et suivre la cognition chez le

chien, il paraît intéressant de poursuivre ces tests chez le chien GRMD avec un échantillon plus grand et une mesure plus fiable pour confirmer ou infirmer l'hypothèse d'une telle association. Par la suite, il sera pertinent de comparer le taux d'A β ₄₂ sérique avec les résultats des tests cognitifs afin de confirmer ou infirmer l'hypothèse d'un tel biomarqueur.

En perspective il serait intéressant de réaliser d'une part des coupes d'encéphale avec marquage au ronge congo pour vérifier la présence, étudier la répartition et quantifier les plaques d'amyloïde dans l'encéphale des chiens GRMD, et d'autre part de réaliser une ponction de liquide cérébro-spinal pour réaliser une mesure du quotient d'albumine comme indicateur de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique.

CONCLUSION

Le gène *DMD*, codant pour la dystrophine, est exprimé dans l'ensemble du corps. Lorsqu'une mutation de ce gène conduit à la production d'une protéine tronquée non fonctionnelle survient la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD). Cette maladie est à l'origine d'une dégénérescence musculaire progressive réduisant considérablement la durée de vie des patients atteints. Les progrès thérapeutiques ont permis de doubler l'espérance de vie pour atteindre 30 à 40 ans. Dans la dystrophie musculaire du Golden Retriever (*Golden Retriever Muscular Dystrophy*, GRMD), aujourd'hui le modèle canin le plus utilisé pour la DMD, seule l'isoforme de 427 kilodaltons (Dp427) est absente. Les études menées chez l'humain et la souris ont montré que la Dp427 joue un rôle structurel et fonctionnel au niveau du cortex cérébral, de l'hippocampe, de l'amygdale cérébrale et du cervelet, en permettant notamment l'ancrage et le regroupement des récepteurs GABA_A dans les membranes post-synaptiques. Elle occupe ainsi une place centrale dans la consolidation des souvenirs, les apprentissages mais aussi la métaplasticité et donc dans la capacité d'incorporer des données supplémentaires dans un circuit déjà encodé. Chez le patient DMD et le modèle murin *mdx*, la perte de cette isoforme conduit à une altération de la plasticité synaptique neuronale, des modifications du métabolisme de l'encéphale et des troubles de l'homéostasie calcique. Cela se traduit chez le patient DMD par une baisse générale du quotient intellectuel, des troubles de l'automatisation, des troubles relationnels ainsi que de nombreuses comorbidités neuropsychiatriques, et chez la souris *mdx* par une hyperréactivité à des contraintes physiques, des troubles de l'apprentissage associatif et un risque épileptique accru.

Notre étude a été conduite chez le chien GRMD, modèle qui n'avait à ce jour jamais été caractérisé du point de vue neurocognitif. Elle a permis de confirmer l'expression des isoformes de 427 et 71 kilodaltons dans le cortex cérébral, l'hippocampe et le cervelet chez le chien sain. De plus nous avons montré la perte de l'isoforme de 427 kilodaltons chez le chien GRMD dans les trois zones étudiées. Ces résultats contribuent à la validation du chien GRMD comme modèle animal de la DMD.

Nous avons ensuite réalisé une étude de faisabilité pour l'évaluation des capacités cognitives du chien GRMD par rapport au chien sain de laboratoire. Dans un premier temps, nous avons réalisé un test d'*openfield*. Cette tâche avait pour but de comparer le niveau d'anxiété et le tempérament exploratoire des chiens de notre cohorte. Nous avons observé qu'une partie des chiens GRMD était particulièrement peu active, ce qui s'est traduit par une fatigabilité notable voire un refus d'effectuer les tâches suivantes. Cependant nous n'avons pas trouvé de différence pertinente entre nos deux groupes en raison du peu de comportements exprimés par l'ensemble des chiens au cours de la tâche et de l'échantillon de petite taille. Dans un second temps, nous avons réalisé une tâche de

conditionnement opérant pour une consigne simple. Bien qu'en apparence simple, ce test a permis de mettre en évidence une réelle difficulté à tester les individus de notre cohorte. Dans un troisième temps, nous avons réalisé une tâche de *holeboard*. À ce jour, ce paradigme expérimental n'avait jamais été décrit chez le chien. Malgré le peu d'individus ayant suivi intégralement la tâche, nous avons pu montrer que cette espèce est capable de comprendre les règles imposées et de se montrer de plus en plus performante au cours des essais. Ce paradigme permet d'obtenir de précieuses informations sur les capacités d'apprentissage spatial, le niveau d'anxiété, les comportements exploratoires et la néophobie des individus. Nous encourageons à réaliser de nouveau ce test sur une cohorte plus large afin de valider son utilisation chez le chien. L'ensemble de ce travail nous a permis de décrire les points critiques à l'évaluation cognitive de ces chiens atteints d'une myopathie qui les limite dans leur motricité et qui vivent dans des conditions environnementales différentes, plus standardisées et avec moins de nouveautés que la plupart des chiens de compagnie. Cependant la faible taille de notre échantillon ne nous a pas permis de comparer les deux groupes en termes de performance cognitive. Nous suggérons de travailler prioritairement sur la récompense utilisée en l'individualisant pour augmenter la motivation, ainsi que sur le niveau d'anxiété et la néophobie des animaux en réalisant une habitude longue à l'expérimentateur et aux dispositifs expérimentaux basée sur des interactions positives. Il a par ailleurs été discuté de l'intégration des tests cognitifs dans les essais thérapeutiques et proposé une série d'autres paradigmes expérimentaux applicables au chien GRMD.

Enfin, la cognition étant particulièrement difficile à tester chez cette espèce, nous avons recherché un biomarqueur putatif de troubles cognitifs et de lésions neurologiques. Nous avons émis l'hypothèse d'une différence du taux sérique de peptide β -amyloïde 42 entre les chiens GRMD et les chiens sains de laboratoire. Nous avons montré une augmentation statistiquement non significative de ce taux chez le chien GRMD par rapport au chien sain. Nous avons évoqué un manque de puissance statistique en raison d'un échantillon trop petit et d'une variabilité technique trop importante. Nous suggérons de réaliser de nouvelles mesures sur un échantillon plus grand, puis d'étudier le lien entre le taux sérique de peptide β -amyloïde 42, les résultats aux tests cognitifs et la présence de lésions histologiques dans l'encéphale, notamment par marquage au rouge congo afin de rechercher des plaques amyloïdes.

L'ensemble de ce travail a permis de proposer une première approche à l'étude des affections neurocognitives liées à la perte de la Dp427 chez le chien. Nous espérons qu'il pourra trouver écho dans des travaux futurs.

BIBLIOGRAPHIE

- AARTSMA-RUS A., GINJAAR I.B., BUSHBY K. (2016) The importance of genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy. *J. Med. Genet.* 53(3), 145-151
- ABBOTT N.J., PATABENDIGE A.A.K., DOLMAN D.E.M., YUSOF S.R., BEGLEY D.J. (2010) Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiol. Dis., Special Issue: Blood Brain Barrier* 37(1), 13-25
- ABDEL-MEGUID I.E., ABDEL-SALAM E., LATIF D.M.A., KORRAA S., ISMAIEL A. (2013) Markers of neural degeneration and regeneration in Down syndrome patients. *Egypt. J. Med. Hum. Genet.* 14(1), 49-53
- ABDEL-SALAM E., ABDEL-MEGUID I.E., SHATLA R., KORRAA S. (2014) Evaluation of neural damage in Duchenne muscular dystrophy patients. *Acta Myol. Myopathies Cardiomyopathies Off. J. Mediterr. Soc. Myol. Ed. Gaetano Conte Acad. Study Striated Muscle Dis.* 33(1), 13-18
- ADAMS B., CHAN A., CALLAHAN H., MILGRAM N.W. (2000a) The canine as a model of human cognitive aging: Recent developments. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 24(5), 675-692
- ADAMS B., CHAN A., CALLAHAN H., *et al.* (2000b) Use of a delayed non-matching to position task to model age-dependent cognitive decline in the dog. *Behav. Brain Res.* 108(1), 47-56
- AHN A.H., KUNKEL L.M. (1993) The structural and functional diversity of dystrophin. *Nat. Genet.* 3(4), 283-291
- AL-QUDAH A.A., KOBAYASHI J., CHUANG S., DENNIS M., RAY P. (1990) Etiology of intellectual impairment in Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr. Neurol.* 6(1), 57-59
- ALFARO L.A.S., DICK S.A., SIEGEL A.L., *et al.* (2011) CD34 Promotes Satellite Cell Motility and Entry into Proliferation to Facilitate Efficient Skeletal Muscle Regeneration. *Stem Cells Dayt. Ohio* 29(12), 2030-2041
- ALLEN N.J., BARRES B.A. (2009) Neuroscience: Glia — more than just brain glue. *Nature* 457(7230), 675-677
- ANDERSON J.T., ROGERS R.P., JARRETT H.W. (1996) Ca-Calmodulin Binds to the Carboxyl-terminal Domain of Dystrophin. *J. Biol. Chem.* 271(12), 6605-6610
- ANDERSON J.L., HEAD S.I., RAE C., MORLEY J.W. (2002) Brain function in Duchenne muscular dystrophy. *Brain* 125(1), 4-13
- ANDERSON J.L., HEAD S.I., MORLEY J.W. (2003) Altered inhibitory input to Purkinje cells of dystrophin-deficient mice. *Brain Res.* 982(2), 280-283
- ANDERSON J.L., HEAD S.I., MORLEY J.W. (2004) Long-term depression is reduced in cerebellar Purkinje cells of dystrophin-deficient mdx mice. *Brain Res.* 1019(1), 289-292

- ANDERSON J.L., MORLEY J.W., HEAD S.I. (2010) Enhanced homosynaptic LTD in cerebellar Purkinje cells of the dystrophic MDX mouse. *Muscle Nerve* 41(3), 329-334
- ARAUJO J.A., RIVERA C. de, LANDSBERG G.M., ADAMS P.E., MILGRAM N.W. (2013) Development and validation of a novel laboratory model of sound-induced fear and anxiety in Beagle dogs. *J. Vet. Behav. Clin. Appl. Res.* 8(4), 204-212
- ARTS J.W.M., VAN DER STAAY F.J., EKKEL E.D. (2009) Working and reference memory of pigs in the spatial holeboard discrimination task. *Behav. Brain Res.* 205(1), 303-306
- AUSTIN R.C., HOWARD P.L., D'SOUZA V.N., KLAMUT H.J., RAY P.N. (1995) Cloning and characterization of alternatively spliced isoforms of Dp71. *Hum. Mol. Genet.* 4(9), 1475-1483
- BALTZER W.I., CALISE D.V., LEVINE J.M., *et al.* (2007) Dystrophin-Deficient Muscular Dystrophy in a Weimaraner. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 43(4), 227-232
- BANDELOW B., MICHAELIS S. (2015) Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century. *Dialogues Clin. Neurosci.* 17(3), 327-335
- BANIHANI R., SMILE S., YOON G., *et al.* (2015) Cognitive and Neurobehavioral Profile in Boys With Duchenne Muscular Dystrophy. *J. Child Neurol.* 30(11), 1472-1482
- BAR S., BARNEA E., LEVY Z., *et al.* (1990) A novel product of the Duchenne muscular dystrophy gene which greatly differs from the known isoforms in its structure and tissue distribution. *Biochem. J.* 272(2), 557-560
- BARDE Y.A. (1994) Neurotrophins: a family of proteins supporting the survival of neurons. *Prog. Clin. Biol. Res.* 390, 45-56
- BARNARD S., MARSHALL-PESCINI S., PELOSI A., *et al.* (2017) Breed, sex, and litter effects in 2-month old puppies' behaviour in a standardised open-field test. *Sci. Rep.* 7
- BAYDUR A., GILGOFF I., PRENTICE W., CARLSON M., FISCHER D.A. (1990) Decline in respiratory function and experience with long-term assisted ventilation in advanced Duchenne's muscular dystrophy. *Chest* 97(4), 884-889
- BELTRAN W.A., CHAHORY S., GNIRS K., *et al.* (2001) The electroretinographic phenotype of dogs with Golden Retriever muscular dystrophy. *Vet. Ophthalmol.* 4(4), 277-282
- BERGLES D.E., DIAMOND J.S., JAHR C.E. (1999) Clearance of glutamate inside the synapse and beyond. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9(3), 293-298
- BERGMANS B.A., DE STROOPER B. (2010) γ -secretases: from cell biology to therapeutic strategies. *Lancet Neurol.* 9(2), 215-226
- BICKART K.C., DICKERSON B.C., BARRETT L.F. (2014) The amygdala as a hub in brain networks that support social life. *Neuropsychologia* 63, 235-248
- BILLARD C., GILLET P., SIGNORET J.L., *et al.* (1992) Cognitive functions in Duchenne muscular dystrophy: a reappraisal and comparison with spinal muscular atrophy. *Neuromuscul. Disord. NMD* 2(5-6), 371-378
- BINDER D.K., NAGELHUS E.A., OTTERSEN O.P. (2012) Aquaporin-4 and epilepsy. *Glia* 60(8), 1203-1214

- Biomarkers Definitions Working Group (2001) Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.* 69(3), 89-95
- BLADEN C.L., SALGADO D., MONGES S., *et al.* (2015) The TREAT-NMD DMD Global Database: Analysis of More than 7,000 Duchenne Muscular Dystrophy Mutations. *Hum. Mutat.* 36(4), 395-402
- BLAKE D.J., HAWKES R., BENSON M.A., BEESLEY P.W. (1999) Different Dystrophin-like Complexes Are Expressed in Neurons and Glia. *J. Cell Biol.* 147(3), 645-658
- BLAKE D.J., WEIR A., NEWHEY S.E., DAVIES K.E. (2002) Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol. Rev.* 82(2), 291-329
- BONET-KERRACHE A., FABBRIZIO E., MORNET D. (1994) N-terminal domain of dystrophin. *FEBS Lett.* 355(1), 49-53
- BORGHYS H., VAN BROECK B., DHUYVETTER D., *et al.* (2017) Young to Middle-Aged Dogs with High Amyloid- β Levels in Cerebrospinal Fluid are Impaired on Learning in Standard Cognition tests. *J. Alzheimers Dis.* 56(2), 763-774
- BRESOLIN N., CASTELLI E., COMI G.P., *et al.* (1994) Cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord., Selected Papers from The Proceedings of the Muscular Dystrophy Research Symposium @'Molecular defects and clinical diagnosis in dystrophinopathies@' 4(4)*, 359-369
- BRETTSCHNEIDER J., DEL TREDICI K., LEE V.M.-Y., TROJANOWSKI J.Q. (2015) Spreading of pathology in neurodegenerative diseases: a focus on human studies. *Nat. Rev. Neurosci.* 16(2), 109-120
- BRINKMEYER-LANGFORD C., KORNEGAY J.N. (2013) Comparative Genomics of X-linked Muscular Dystrophies: The Golden Retriever Model. *Curr. Genomics* 14(5), 330-342
- BRÜNIG I., SUTER A., KNUESSEL I., LÜSCHER B., FRITSCHY J.-M. (2002) GABAergic Terminals Are Required for Postsynaptic Clustering of Dystrophin But Not of GABAA Receptors and Gephyrin. *J. Neurosci.* 22(12), 4805-4813
- BULFIELD G., SILLER W.G., WIGHT P.A., MOORE K.J. (1984) X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81(4), 1189-1192
- BYERS T.J., LIDOV H.G.W., KUNKEL L.M. (1993) An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve. *Nat. Genet.* 4(1), 77-81
- CAMPAN R., SCAPINI F. (2002) Ethologie. Approche systémique du comportement. Bruxelles, De Boeck
- CERECEDO D., MARTÍNEZ-ROJAS D., CHÁVEZ O., *et al.* (2005) Platelet adhesion: structural and functional diversity of short dystrophin and utrophins in the formation of dystrophin-associated-protein complexes related to actin dynamics. *Thromb. Haemost.* 94(6), 1203-1212
- CHAMBERLAIN J.S., METZGER J., REYES M., TOWNSEND D., FAULKNER J.A. (2007) Dystrophin-deficient mdx mice display a reduced life span and are susceptible to spontaneous rhabdomyosarcoma. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 21(9), 2195-2204

- CHAUSSENOT R., EDELINE J.-M., LE BEC B., *et al.* (2015) Cognitive dysfunction in the dystrophin-deficient mouse model of Duchenne muscular dystrophy: A reappraisal from sensory to executive processes. *Neurobiol. Learn. Mem., MCCS 2015* 124, 111-122
- CHRISTENSEN D.L. (2016) Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2012. *MMWR Surveill. Summ.* 65
- CITRI A., MALENKA R.C. (2007) Synaptic Plasticity: Multiple Forms, Functions, and Mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33(1), 18-41
- CLÉMENT Y., LE GUIQUET A.-M., VENAULT P., CHAPOUTHIER G., BELZUNG C. (2009) Pharmacological Alterations of Anxious Behaviour in Mice Depending on Both Strain and the Behavioural Situation. *PLoS ONE* 4(11)
- COLOMBO P., NOBILE M., TESEI A., *et al.* (2017) Assessing mental health in boys with Duchenne muscular dystrophy: Emotional, behavioural and neurodevelopmental profile in an Italian clinical sample. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 21(4), 639-647
- COOPER B.J., WINAND N.J., STEDMAN H., *et al.* (1988) The homologue of the Duchenne locus is defective in X-linked muscular dystrophy of dogs. *Nature* 334(6178), 154-156
- COSTA M.F., OLIVEIRA A.G.F., FEITOSA-SANTANA C., ZATZ M., VENTURA D.F. (2007) Red-Green Color Vision Impairment in Duchenne Muscular Dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* 80(6), 1064-1075
- COTTON S., VOUDOURIS N.J., GREENWOOD K.M. (2001) Intelligence and Duchenne muscular dystrophy: Full-Scale, Verbal, and Performance intelligence quotients. *Dev. Med. Child Neurol.* 43(7), 497-501
- COTTON S.M., VOUDOURIS N.J., GREENWOOD K.M. (2005) Association between intellectual functioning and age in children and young adults with Duchenne muscular dystrophy: further results from a meta-analysis. *Dev. Med. Child Neurol.* 47(4), 257-265
- CRESTANI F., LOREZ M., BAER K., *et al.* (1999) Decreased GABAA-receptor clustering results in enhanced anxiety and a bias for threat cues. *Nat. Neurosci.* 2(9), 833-839
- CYRULNIK S.E., HINTON V.J. (2008) Duchenne muscular dystrophy: A cerebellar disorder? *Neurosci. Biobehav. Rev., Special section: Neurobiology of Deep Brain Stimulation: Innovations in Treatment and Basal Ganglia Function* 32(3), 486-496
- DARKE J., BUSHBY K., COUTEUR A.L., MCCONACHIE H. (2006) Survey of behaviour problems in children with neuromuscular diseases. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 10(3), 129-134
- DE BECKER I., RIDDELL D.C., DOOLEY J.M., TREMBLAY F. (1994) Correlation between electroretinogram findings and molecular analysis in the Duchenne muscular dystrophy phenotype. *Br. J. Ophthalmol.* 78(9), 719-722
- DE MEYER G., SHAPIRO F., Vanderstichele H, *et al* (2010) Diagnosis-independent alzheimer disease biomarker signature in cognitively normal elderly people. *Arch. Neurol.* 67(8), 949-956

- DE SARRO G., IBBADU G.F., MARRA R., *et al.* (2004) Seizure susceptibility to various convulsant stimuli in dystrophin-deficient mdx mice. *Neurosci. Res.* 50(1), 37-44
- DE STROOPER B., ANNAERT W. (2000) Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J Cell Sci* 113(11), 1857-1870
- DELAHUNTA A., GLASS E., KENT M. (2015) *Veterinary Neuroanatomy and Clinical Neurology*. Saunders
- DEMAS G.E., BROWN M.F. (1995) Honey bees are predisposed to win-shift but can learn to win-stay. *Anim. Behav.* 50(4), 1041-1045
- DESGUERRE I., CHRISTOV C., MAYER M., *et al.* (2009) Clinical Heterogeneity of Duchenne Muscular Dystrophy (DMD): Definition of Sub-Phenotypes and Predictive Criteria by Long-Term Follow-Up. *PLoS ONE* 4(2)
- DODSON H.C., PIPER T.A., CLARKE J.D., QUINLIVAN R.M., DICKSON G. (1995) Dystrophin expression in the hair cells of the cochlea. *J. Neurocytol.* 24(8), 625-632
- DOORENWEERD N., STRAATHOF C.S., DUMAS E.M., *et al.* (2014) Reduced cerebral gray matter and altered white matter in boys with Duchenne muscular dystrophy. *Ann. Neurol.* 76(3), 403-411
- DOORENWEERD N., MAHFOUZ A., VAN PUTTEN M., *et al.* (2017) Timing and localization of human dystrophin isoform expression provide insights into the cognitive phenotype of Duchenne muscular dystrophy. *Sci. Rep.* 7
- D'SOUZA V.N., MAN N. thi, MORRIS G.E., *et al.* (1995) A novel dystrophin isoform is required for normal retinal electrophysiology. *Hum. Mol. Genet.* 4(5), 837-842
- DUCHENNE G. (1868) *De la paralysie musculaire pseudo-hypertrophique ou paralysie myo-sclérosique*. Paris : P. Asselin
- EISELE Y.S., OBERMÜLLER U., HEILBRONNER G., *et al.* (2010) Peripherally Applied A β -Containing Inoculates Induce Cerebral β -Amyloidosis. *Science* 330(6006), 980-982
- EMERY A.E.H. (1991) Population frequencies of inherited neuromuscular diseases—A world survey. *Neuromuscul. Disord.* 1(1), 19-29
- FAYYAD J., GRAAF R.D., KESSLER R., *et al.* (2007) Cross-national prevalence and correlates of adult attention-deficit hyperactivity disorder. *Br. J. Psychiatry* 190(5), 402-409
- FEENER C.A., KOENIG M., KUNKEL L.M. (1989) Alternative splicing of human dystrophin mRNA generates isoforms at the carboxy terminus. *Nature* 338(6215), 509-511
- FIEST K.M., SAURO K.M., WIEBE S., *et al.* (2017) Prevalence and incidence of epilepsy. *Neurology* 88(3), 296-303
- FITZPATRICK C., BARRY C., GARVEY C. (1986) Psychiatric Disorder Among Boys with Duchenne Muscular Dystrophy. *Dev. Med. Child Neurol.* 28(5), 589-595
- FORST J., FORST R., LEITHE H., MAURIN N. (1998) Platelet function deficiency in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* 8(1), 46-49
- FRÉSAARD L., LEROUX S., DEHAIS P., *et al.* (2012) Fine mapping of complex traits in non-model species: using next generation sequencing and advanced intercross lines in Japanese quail. *BMC Genomics* 13, 551

- GIANNASI C., TAPPIN S.W., GUO L.T., SHELTON G.D., PALUS V. (2015) Dystrophin-deficient muscular dystrophy in two lurcher siblings. *J. Small Anim. Pract.* 56(9), 577-580
- GLENNER G.G., WONG C.W. (1984) Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120(3), 885-890
- GONZÁLEZ-MARTÍNEZ Á., ROSADO B., PESINI P., *et al.* (2011) Plasma β -amyloid peptides in canine aging and cognitive dysfunction as a model of Alzheimer's disease. *Exp. Gerontol.* 46(7), 590-596
- GOODWIN F., MUNTONI F., DUBOWITZ V. (1997) Epilepsy in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Eur. J. Paediatr. Neurol. EJPN Off. J. Eur. Paediatr. Neurol. Soc.* 1(4), 115-119
- GÓRECKI D.C., BARNARD E.A. (1995) Specific expression of G-dystrophin (Dp71) in the brain. *Neuroreport* 6(6), 893-896
- GOYENVALLE A., GRIFFITH G., BABBS A., *et al.* (2015) Functional correction in mouse models of muscular dystrophy using exon-skipping tricyclo-DNA oligomers. *Nat. Med.* 21(3), 270-275
- GRACIOTTI L., MINELLI A., MINCIACCHI D., PROCOPIO A., FULGENZI G. (2008) GABAergic miniature spontaneous activity is increased in the CA1 hippocampal region of dystrophic mdx mice. *Neuromuscul. Disord.* 18(3), 220-226
- GRADY R.M., WOZNAK D.F., OHLEMILLER K.K., SANES J.R. (2006) Cerebellar Synaptic Defects and Abnormal Motor Behavior in Mice Lacking α - and β -Dystrobrevin. *J. Neurosci.* 26(11), 2841-2851
- GRUEN M.E., CASE B.C., FOSTER M.L., *et al.* (2015) The Use of an Open Field Model to Assess Sound-Induced Fear and Anxiety Associated Behaviors in Labrador Retrievers. *J. Vet. Behav. Clin. Appl. Res. Off. J. Aust. Vet. Behav. Interest Group Int. Work. Dog Breed. Assoc.* 10(4), 338-345
- GUO X., LIU L., ZHANG M., *et al.* (2009) Correlation of CD34+ Cells with Tissue Angiogenesis after Traumatic Brain Injury in a Rat Model. *J. Neurotrauma* 26(8), 1337-1344
- HAENGGI T., FRITSCHY J.-M. (2006) Role of dystrophin and utrophin for assembly and function of the dystrophin glycoprotein complex in non-muscle tissue. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 63(14), 1614-1631
- HALL L.E., ROBINSON S., BUCHANAN-SMITH H.M. (2015) Refining dosing by oral gavage in the dog: A protocol to harmonise welfare. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 72, 35-46
- HALL N.J., PÉRON F., CAMBOU S., CALLEJON L., WYNNE C.D.L. (2017) Food and Food-Odor Preferences in Dogs: A Pilot Study. *Chem. Senses* 42(4), 361-370
- HÄNNINEN L., PASTELL M. (2009) CowLog: open-source software for coding behaviors from digital video. *Behav. Res. Methods* 41(2), 472-476
- HAWS C.M., LANSMAN J.B. (1991) Calcium-Permeable Ion Channels in Cerebellar Neurons from mdx Mice. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 244(1311), 185-189

- HEAD E., MEHTA R., HARTLEY J., *et al.* (1995) Spatial learning and memory as a function of age in the dog. *Behav. Neurosci.* 109(5), 851-858
- HEAD E., CALLAHAN H., CUMMINGS B.J., *et al.* (1997) Open field activity and human interaction as a function of age and breed in dogs. *Physiol. Behav.* 62(5), 963-971
- HENDRIKSEN R.G.F., SCHIPPER S., HOOGLAND G., *et al.* (2016) Dystrophin Distribution and Expression in Human and Experimental Temporal Lobe Epilepsy. *Front. Cell. Neurosci.* 10
- HEPPNER F.L., RANSOHOFF R.M., BECHER B. (2015) Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 16(6), 358-372
- HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ E.O., MORNET D., RENDON A., MARTÍNEZ-ROJAS D. (2005) Absence of Dp71 in mdx3cv mouse spermatozoa alters flagellar morphology and the distribution of ion channels and nNOS. *J. Cell Sci.* 118(Pt 1), 137-145
- HINES R.M., HINES D.J., HOUSTON C.M., *et al.* (2013) Disrupting the clustering of GABA_A receptor $\alpha 2$ subunits in the frontal cortex leads to reduced γ -power and cognitive deficits. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110(41), 16628-16633
- HINTON V.J., CYRULNIK S.E., FEE R.J., *et al.* (2009) Association of Autistic Spectrum Disorders With Dystrophinopathies. *Pediatr. Neurol.* 41(5), 339-346
- HOCK C., HEESE K., MÜLLER-SPAHN F., *et al.* (2000) Increased CSF levels of nerve growth factor in patients with Alzheimer's disease. *Neurology* 54(10), 2009-2011
- HOPF F.W., STEINHARDT R.A. (1992) Regulation of intracellular free calcium in normal and dystrophic mouse cerebellar neurons. *Brain Res.* 578(1), 49-54
- HOWARD P.L., KLAMUT H.J., RAY P.N. (1998) Identification of a novel actin binding site within the Dp71 dystrophin isoform. *FEBS Lett.* 441(2), 337-341
- IM W.B., PHELPS S.F., COPEN E.H., *et al.* (1996) Differential expression of dystrophin isoforms in strains of mdx mice with different mutations. *Hum. Mol. Genet.* 5(8), 1149-1153
- ISHIKAWA Yuka, MIURA T., ISHIKAWA Yukitoshi, *et al.* (2011) Duchenne muscular dystrophy: Survival by cardio-respiratory interventions. *Neuromuscul. Disord.* 21(1), 47-51
- ITO D., KITAGAWA M., JEFFERY N., *et al.* (2011) Dystrophin-deficient muscular dystrophy in an Alaskan malamute. *Vet. Rec.* 169(5), 127-127
- JAGADHA V., BECKER L.E. (1988) Brain morphology in Duchenne muscular dystrophy: A Golgi study. *Pediatr. Neurol.* 4(2), 87-92
- JANZER R.C., RAFF M.C. (1987) Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* 325(6101), 253-257
- JARRETT H.W., FOSTER J.L. (1995) Alternate binding of actin and calmodulin to multiple sites on dystrophin. *J. Biol. Chem.* 270(10), 5578-5586
- JERONIMUS B.F., KOTOV R., RIESE H., ORMEL J. (2016) Neuroticism's prospective association with mental disorders halves after adjustment for baseline symptoms and psychiatric history, but the adjusted association hardly decays with time: a meta-

- analysis on 59 longitudinal/prospective studies with 443 313 participants. *Psychol. Med.* 46(14), 2883-2906
- JOHANSON C., STOPA E., MCMILLAN P. (2011) The Blood–Cerebrospinal Fluid Barrier: Structure and Functional Significance. *In The Blood-Brain and Other Neural Barriers, Methods in Molecular Biology.* Humana Press, pp 101-131
- JOHNSTONE E.M., CHANEY M.O., NORRIS F.H., PASCUAL R., LITTLE S.P. (1991) Conservation of the sequence of the Alzheimer’s disease amyloid peptide in dog, polar bear and five other mammals by cross-species polymerase chain reaction analysis. *Mol. Brain Res.* 10(4), 299-305
- KAUFMAN A.S., FLANAGAN D.P., ALFONSO V.C., MASCOLO J.T. (2006) Test Review: Wechsler Intelligence Scale for Children, Fourth Edition (WISC-IV). *J. Psychoeduc. Assess.* 24(3), 278-295
- KIENY P., CHOLLET S., DELALANDE P., *et al.* (2013) Evolution of life expectancy of patients with Duchenne muscular dystrophy at AFM Yolaine de Kepper centre between 1981 and 2011. *Ann. Phys. Rehabil. Med.* 56(6), 443-454
- KIM T.W., WU K., XU J.L., BLACK I.B. (1992) Detection of dystrophin in the postsynaptic density of rat brain and deficiency in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89(23), 11642-11644
- KIM T.W., WU K., BLACK I.B. (1995) Deficiency of brain synaptic dystrophin in human Duchenne muscular dystrophy. *Ann. Neurol.* 38(3), 446-449
- KNUESEL I., MASTROCOLA M., ZUELLIG R.A., *et al.* (1999) Altered synaptic clustering of GABAA receptors in mice lacking dystrophin (mdx mice). *Eur. J. Neurosci.* 11(12), 4457-4462
- KNUESEL I., ZUELLIG R.A., SCHAUB M.C., FRITSCHY J.-M. (2001) Alterations in dystrophin and utrophin expression parallel the reorganization of GABAergic synapses in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Eur. J. Neurosci.* 13(6), 1113-1124
- KOENIG M., MONACO A.P., KUNKEL L.M. (1988) The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 53(2), 219-228
- KOENIG M., KUNKEL L.M. (1990) Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility. *J. Biol. Chem.* 265(8), 4560-4566
- KORNEGAY J.N., BOGAN J.R., BOGAN D.J., *et al.* (2012) Canine Models of Duchenne Muscular Dystrophy and Their Use in Therapeutic Strategies. *Mamm. Genome Off. J. Int. Mamm. Genome Soc.* 23(0), 85-108
- KORNEGAY J.N. (2017) The golden retriever model of Duchenne muscular dystrophy. *Skelet. Muscle* 7, 9
- KUEH S., HEAD S., MORLEY J. (2008) GABAA receptor expression and inhibitory post-synaptic currents in cerebellar Purkinje cells in dystrophin-deficient mdx mice. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 35(2), 207-210

- KUEH S.L.L., DEMPSTER J., HEAD S.I., MORLEY J.W. (2011) Reduced postsynaptic GABAA receptor number and enhanced gaboxadol induced change in holding currents in Purkinje cells of the dystrophin-deficient mdx mouse. *Neurobiol. Dis.* 43(3), 558-564
- LAFONTAINE M.P., LIPPÉ S. (2011) Le cortex préfrontal et le processus d'apprentissage : caractérisation d'un rôle critique, The prefrontal cortex and learning: characterization of a critical role. *Rev. Neuropsychol.* 3(4), 267-271
- LEE J.S., PFUND Z., JUHÁSZ C., *et al.* (2002) Altered regional brain glucose metabolism in Duchenne muscular dystrophy: a pet study. *Muscle Nerve* 26(4), 506-512
- LEMAIRE C., HEILIG R., MANDEL J.L. (1988) The chicken dystrophin cDNA: striking conservation of the C-terminal coding and 3' untranslated regions between man and chicken. *EMBO J.* 7(13), 4157-4162
- LEUNER B., GOULD E. (2010) Structural Plasticity and Hippocampal Function. *Annu. Rev. Psychol.* 61, 111-C3
- LÉVI S., GRADY R.M., HENRY M.D., *et al.* (2002) Dystroglycan Is Selectively Associated with Inhibitory GABAergic Synapses But Is Dispensable for Their Differentiation. *J. Neurosci.* 22(11), 4274-4285
- LÉVI S., LOGAN S.M., TOVAR K.R., CRAIG A.M. (2004) Gephyrin is critical for glycine receptor clustering but not for the formation of functional GABAergic synapses in hippocampal neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24(1), 207-217
- LI D., LONG C., YUE Y., DUAN D. (2009) Sub-physiological sarcoglycan expression contributes to compensatory muscle protection in mdx mice. *Hum. Mol. Genet.* 18(7), 1209-1220
- LIDOV H.G., SELIG S., KUNKEL L.M. (1995) Dp140: a novel 140 kDa CNS transcript from the dystrophin locus. *Hum. Mol. Genet.* 4(3), 329-335
- LOPEZ J.R., KOLSTER J., URYASH A., *et al.* (2016) Dysregulation of Intracellular Ca²⁺ in Dystrophic Cortical and Hippocampal Neurons. *Mol. Neurobiol.* 55(1), 603-618
- LUMENG C.N., HAUSER M., BROWN V., CHAMBERLAIN J.S. (1999) Expression of the 71 kDa dystrophin isoform (Dp71) evaluated by gene targeting. *Brain Res.* 830(1), 174-178
- LV S.-Y., ZOU Q.-H., CUI J.-L., *et al.* (2011) Decreased Gray Matter Concentration and Local Synchronization of Spontaneous Activity in the Motor Cortex in Duchenne Muscular Dystrophy. *Am. J. Neuroradiol.* 32(11), 2196-2200
- MARCHI N., ANGELOV L., MASARYK T., *et al.* (2007) Seizure-Promoting Effect of Blood-Brain Barrier Disruption. *Epilepsia* 48(4), 732-742
- MARQUEZ F.G., CISNEROS B., GARCIA F., *et al.* (2003) Differential expression and subcellular distribution of dystrophin Dp71 isoforms during differentiation process. *Neuroscience* 118(4), 957-966
- MARTIN P., BATESON P. (2007) *Measuring Behaviour: An Introductory Guide.* Cambridge University Press
- MASTERS C.L., SELKOE D.J. (2012) Biochemistry of Amyloid β -Protein and Amyloid Deposits in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2(6)

- MCCUNE S., STEVENSON J., FRETWELL L., THOMPSON A., MILLS D.S. (2008) Ageing does not significantly affect performance in a spatial learning task in the domestic cat (*Felis silvestris catus*). *Appl. Anim. Behav. Sci.* 112(3), 345-356
- MCGREEVY J.W., HAKIM C.H., MCINTOSH M.A., DUAN D. (2015) Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy. *Dis. Model. Mech.* 8(3), 195-213
- MEHLER M.F., HAAS K.Z., KESSLER J.A., STANTON P.K. (1992) Enhanced sensitivity of hippocampal pyramidal neurons from mdx mice to hypoxia-induced loss of synaptic transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89(6), 2461-2465
- MEHLER M.F. (2000) Brain dystrophin, neurogenetics and mental retardation. *Brain Res. Rev.* 32(1), 277-307
- MEUNIER L.D., BEAVER B.V. (2014) Chapter 14 - Dog and Cat Welfare in a Research Environment. *In Laboratory Animal Welfare, American College of Laboratory Animal Medicine.* Boston, Academic Press, pp 213-231
- MIKLÖSI A., POLGÁRDI R., TOPÁL J., CSÁNYI V. (1998) Use of experimenter-given cues in dogs. *Anim. Cogn.* 1(2), 113-121
- MILLER H.C., RAYBURN-REEVES R., ZENTALL T.R. (2009) Imitation and emulation by dogs using a bidirectional control procedure. *Behav. Processes* 80(2), 109-114
- MIRANDA R., SÉBRIÉ C., DEGROUARD J., *et al.* (2009) Reorganization of Inhibitory Synapses and Increased PSD Length of Perforated Excitatory Synapses in Hippocampal Area CA1 of Dystrophin-Deficient mdx Mice. *Cereb. Cortex* 19(4), 876-888
- MIRANDA R., NUDEL U., LAROCHE S., VAILLEND C. (2011) Altered presynaptic ultrastructure in excitatory hippocampal synapses of mice lacking dystrophins Dp427 or Dp71. *Neurobiol. Dis., Autophagy and protein degradation in neurological diseases* 43(1), 134-141
- MIRANDA R., LAROCHE S., VAILLEND C. (2016) Reduced neuronal density in the CA1 anterodorsal hippocampus of the mdx mouse. *Neuromuscul. Disord.* 26(11), 775-781
- MIYAZATO L.G., MORAES J.R.E., BERETTA D.C., KORNEGAY J.N. (2011) Muscular dystrophy in dogs: does the crossing of breeds influence disease phenotype? *Vet. Pathol.* 48(3), 655-662
- MOIZARD M.P., TOUTAIN A., FOURNIER D., *et al.* (2000) Severe cognitive impairment in DMD: obvious clinical indication for Dp71 isoform point mutation screening. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 8(7), 552-556
- MONGILLO P., ARAUJO J.A., PITTERI E., *et al.* (2013) Spatial reversal learning is impaired by age in pet dogs. *AGE* 35(6), 2273-2282
- MORI T., YANAGISAWA Y., KITANI Y., *et al.* (2015) Gene expression profiles in *Rana pirica* tadpoles following exposure to a predation threat. *BMC Genomics* 16, 258
- MUIR J., KITTLER J.T. (2014) Plasticity of GABAA receptor diffusion dynamics at the axon initial segment. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 151

- MUKOYAMA M., KONDO K., HIZAWA K., NISHITANI H. (1987) Life spans of Duchenne muscular dystrophy patients in the hospital care program in Japan. *J. Neurol. Sci.* 81(2-3), 155-158
- MUNTONI F., TORELLI S., FERLINI A. (2003) Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol.* 2(12), 731-740
- NAGASAWA M., MITSUI S., EN S., *et al.* (2015) Oxytocin-gaze positive loop and the coevolution of human-dog bonds. *Science* 348(6232), 333-336
- NAGELHUS E.A., MATHIISEN T.M., OTTERSEN O.P. (2004) Aquaporin-4 in the central nervous system: Cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1. *Neuroscience, Brain Water Homeostasis* 129(4), 905-913
- NAKAMURA A., MIYAZAKI Y., KUMAGAI T., SUZUKI Y., MIURA K. (2008) Various central nervous system involvements in dystrophinopathy: clinical and genetic considerations. *No Hattatsu Brain Dev.* 40(1), 10-14
- NG R., BANKS G.B., HALL J.K., *et al.* (2012) Animal Models of Muscular Dystrophy. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 105, 83-111
- NICO B., FRIGERI A., NICCHIA G.P., *et al.* (2003) Severe alterations of endothelial and glial cells in the blood-brain barrier of dystrophic mdx mice. *Glia* 42(3), 235-251
- NICO B., PAOLA NICCHIA G., FRIGERI A., *et al.* (2004) Altered blood-brain barrier development in dystrophic MDX mice. *Neuroscience* 125(4), 921-935
- NICO B., CORSI P., RIA R., *et al.* (2006) Increased matrix-metalloproteinase-2 and matrix-metalloproteinase-9 expression in the brain of dystrophic mdx mouse. *Neuroscience* 140(3), 835-848
- NICO B., MANGIERI D., DE LUCA A., *et al.* (2009) Nerve growth factor and its receptors TrkA and p75 are upregulated in the brain of mdx dystrophic mouse. *Neuroscience* 161(4), 1057-1066
- NONNEMAN D.J., BROWN-BRANDL T., JONES S.A., WIEDMANN R.T., ROHRER G.A. (2012) A defect in dystrophin causes a novel porcine stress syndrome. *BMC Genomics* 13, 233
- NOORDEEN M.H., HADDAD F.S., MUNTONI F., *et al.* (1999) Blood loss in Duchenne muscular dystrophy: vascular smooth muscle dysfunction? *J. Pediatr. Orthop. Part B* 8(3), 212-215
- NORDQUIST R.E., HEERKENS J.L.T., RODENBURG T.B., *et al.* (2011) Laying hens selected for low mortality: Behaviour in tests of fearfulness, anxiety and cognition. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 131(3), 110-122
- OADES R.D. (1981) Type of memory or attention? Impairments after lesions of the hippocampus and limbic ventral tegmentum. *Brain Res. Bull.* 7(2), 221-226
- OJIMA K., UEZUMI A., MIYOSHI H., *et al.* (2004) Mac-1low early myeloid cells in the bone marrow-derived SP fraction migrate into injured skeletal muscle and participate in muscle regeneration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321(4), 1050-1061
- ORMEL J., RIESE H., ROSMALEN J.G.M. (2012) Interpreting neuroticism scores across the adult life course: immutable or experience-dependent set points of negative affect? *Clin. Psychol. Rev.* 32(1), 71-79

- PALESI F., RINALDIS A., CASTELLAZZI G., *et al.* (2017) Contralateral cortico-ponto-cerebellar pathways reconstruction in humans in vivo : implications for reciprocal cerebro-cerebellar structural connectivity in motor and non-motor areas. *Sci. Rep.* 7(1), 12841
- PANE M., LOMBARDO M.E., ALFIERI P., *et al.* (2012) Attention Deficit Hyperactivity Disorder and Cognitive Function in Duchenne Muscular Dystrophy: Phenotype-Genotype Correlation. *J. Pediatr.* 161(4), 705-709.e1
- PANE M., MESSINA S., BRUNO C., *et al.* (2013) Duchenne muscular dystrophy and epilepsy. *Neuromuscul. Disord.* 23(4), 313-315
- PARKER A.E., ROBB S.A., CHAMBERS J., *et al.* (2005) Analysis of an adult Duchenne muscular dystrophy population. *QJM Int. J. Med.* 98(10), 729-736
- PARTRIDGE T. (1993) Pathophysiology of muscular dystrophy. *Br. J. Hosp. Med.* 49(1), 26-36
- PERES M.A., DA ROCHA A.M., VANNUCCHI C.I., *et al.* (2014) Semen analysis of Golden Retriever healthy dogs and those affected by muscular dystrophy. *Andrologia* 46(3), 277-282
- PFISTER M.H.F., APAYDIN F., TURAN O., *et al.* (1998) A Second Family with Nonsyndromic Sensorineural Hearing Loss Linked to Xp21.2: Refinement of the DFN4 Locus within DMD. *Genomics* 53(3), 377-382
- PFISTER M.H.F., APAYDIN F., TURAN O., *et al.* (1999) Clinical evidence for dystrophin dysfunction as a cause of hearing loss in locus DFN4. *The Laryngoscope* 109(5), 730-735
- PILGRAM G.S.K., POTIKANOND S., BAINES R.A., FRADKIN L.G., NOORDERMEER J.N. (2009) The Roles of the Dystrophin-Associated Glycoprotein Complex at the Synapse. *Mol. Neurobiol.* 41(1), 1-21
- PILLERS D.A., DUNCAN N.M., DWINNELL S.J., *et al.* (1999) Normal cochlear function in mdx and mdx(Cv3) Duchenne muscular dystrophy mouse models. *The Laryngoscope* 109(8), 1310-1312
- PILUSO G., MIRABELLA M., RICCI E., *et al.* (2000) γ 1- and γ 2-Syntrophins, Two Novel Dystrophin-binding Proteins Localized in Neuronal Cells. *J. Biol. Chem.* 275(21), 15851-15860
- PINHEIRO J., BATES D., DEBROY S., SARKAR D., R Core Team (2017) nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models
- POHLERT T. (2014) The Pairwise Multiple Comparison of Mean Ranks Package (PMCMR)
- PONTING C.P., BLAKE D.J., DAVIES K.E., KENDRICK-JONES J., WINDER S.J. (1996) ZZ and TAZ: new putative zinc fingers in dystrophin and other proteins. *Trends Biochem. Sci.* 21(1), 11-13
- POYSKY J. (2007) Behavior patterns in Duchenne muscular dystrophy: Report on the Parent Project Muscular Dystrophy behavior workshop 8–9 of December 2006, Philadelphia, USA. *Neuromuscul. Disord.* 17(11), 986-994

- RAYNOR E.M., MULROY M.J. (1997) Sensorineural Hearing Loss in the mdx Mouse: A Model of Duchenne Muscular Dystrophy. *The Laryngoscope* 107(8), 1053-1056
- RICOTTI V., JÄGLE H., THEODOROU M., *et al.* (2016) Ocular and neurodevelopmental features of Duchenne muscular dystrophy: a signature of dystrophin function in the central nervous system. *Eur. J. Hum. Genet.* 24(4), 562-568
- RITZ C., BATY F., STREIBIG J.C., GERHARD D. (2015) Dose-Response Analysis Using R. *PLoS ONE* 10(12)
- ROFINA J.E., VAN EDEREN A.M., TOUSSAINT M.J.M., *et al.* (2006) Cognitive disturbances in old dogs suffering from the canine counterpart of Alzheimer's disease. *Brain Res.* 1069(1), 216-226
- ROWE C., HEALY S.D. (2014) Measuring variation in cognition. *Behav. Ecol.* 25(6), 1287-1292
- RUDOLPH U., MÖHLER H. (2014) GABAA Receptor Subtypes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 54, 483-507
- RUSCIO A.M., STEIN D.J., CHIU W.T., KESSLER R.C. (2010) The Epidemiology of Obsessive-Compulsive Disorder in the National Comorbidity Survey Replication. *Mol. Psychiatry* 15(1), 53-63
- RYBAKOVA I.N., AMANN K.J., ERVASTI J.M. (1996) A new model for the interaction of dystrophin with F-actin. *J. Cell Biol.* 135(3), 661-672
- SADOULET-PUCCIO H.M., RAJALA M., KUNKEL L.M. (1997) Dystrobrevin and dystrophin: An interaction through coiled-coil motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94(23), 12413-12418
- SANDERS D.N., KANAZONO S., WININGER F.A., *et al.* (2011) A reversal learning task detects cognitive deficits in a Dachshund model of late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Genes Brain Behav.* 10(7), 798-804
- SARRAZIN E., VON DER HAGEN M., SCHARA U., VON AU K., KAINDL A.M. (2014) Growth and psychomotor development of patients with Duchenne muscular dystrophy. *Eur. J. Paediatr. Neurol. EJPN Off. J. Eur. Paediatr. Neurol. Soc.* 18(1), 38-44
- SATZ J.S., OSTENDORF A.P., HOU S., *et al.* (2010) Distinct Functions of Glial and Neuronal Dystroglycan in the Developing and Adult Mouse Brain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30(43), 14560-14572
- SBRICCOLI A., SANTARELLI M., CARRETTA D., *et al.* (1995) Architectural changes of the cortico-spinal system in the dystrophin defective mdx mouse. *Neurosci. Lett.* 200(1), 53-56
- SCHARA U., BUSSE M., TIMMANN D., GERWIG M. (2015) Cerebellar-Dependent Associative Learning Is Preserved in Duchenne Muscular Dystrophy: A Study Using Delay Eyeblink Conditioning. *PLoS ONE* 10(5)
- SCHATZBERG S.J., OLBY N.J., BREEN M., *et al.* (1999) Molecular analysis of a spontaneous dystrophin « knockout » dog. *Neuromuscul. Disord. NMD* 9(5), 289-295
- SCHÜTT T., TOFT N., BERENDT M. (2015) Cognitive Function, Progression of Age-related Behavioral Changes, Biomarkers, and Survival in Dogs More Than 8 Years Old. *J. Vet. Intern. Med. Am. Coll. Vet. Intern. Med.* 29(6), 1569-1577

- SCHÜTT T., HELBOE L., PEDERSEN L.Ø., *et al.* (2016) Dogs with Cognitive Dysfunction as a Spontaneous Model for Early Alzheimer's Disease: A Translational Study of Neuropathological and Inflammatory Markers. *J. Alzheimers Dis. JAD* 52(2), 433-449
- SEIBENHENER M.L., WOOTEN M.C. (2015) Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice. *J. Vis. Exp. JoVE* n°96
- SEKIGUCHI M., ZUSHIDA K., YOSHIDA Mikiharu, *et al.* (2009) A deficit of brain dystrophin impairs specific amygdala GABAergic transmission and enhances defensive behaviour in mice. *Brain* 132(1), 124-135
- SELKOE D.J. (2008) Soluble Oligomers of the Amyloid β -Protein Impair Synaptic Plasticity and Behavior. *Behav. Brain Res.* 192(1), 106-113
- SERPELL J. (1995) *The Domestic Dog: Its Evolution, Behaviour and Interactions with People.* Cambridge University Press
- SHENG M., KIM E. (2011) The Postsynaptic Organization of Synapses. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3(12), a005678
- SHIMATSU Y., YOSHIMURA M., YUASA K., *et al.* (2005) Major clinical and histopathological characteristics of canine X-linked muscular dystrophy in Japan, CXMDJ. *Acta Myol. Myopathies Cardiomyopathies Off. J. Mediterr. Soc. Myol.* 24(2), 145-154
- SHINNAR S. (2003) Febrile Seizures and Mesial Temporal Sclerosis. *Epilepsy Curr.* 3(4), 115-118
- SIGEL E., STEINMANN M.E. (2012) Structure, Function, and Modulation of GABAA Receptors. *J. Biol. Chem.* 287(48), 40224-40231
- SIGESMUND D.A., WELEBER R.G., PILLERS D.-A.M., *et al.* (1994) Characterization of the Ocular Phenotype of Duchenne and Becker Muscular Dystrophy. *Ophthalmology* 101(5), 856-865
- SIWAK C.T., TAPP P.D., MILGRAM N.W. (2001) Effect of age and level of cognitive function on spontaneous and exploratory behaviors in the beagle dog. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 8(6), 317-325
- SIWAK C.T., MURPHEY H.L., MUGGENBURG B.A., MILGRAM N.W. (2002) Age-dependent decline in locomotor activity in dogs is environment specific. *Physiol. Behav.* 75(1-2), 65-70
- SJÖBERG G., EDSTRÖM L., LENDAHL U., SEJERSEN T. (1994) Myofibers from Duchenne/Becker Muscular Dystrophy and Myositis Express the Intermediate Filament Nestin. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 53(4), 416-423
- SMITH P.K., KROHN R.I., HERMANSON G.T., *et al.* (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150(1), 76-85
- SMITH B.F., YUE Y., WOODS P.R., *et al.* (2011) An intronic LINE-1 element insertion in the dystrophin gene aborts dystrophin expression and results in Duchenne-like muscular dystrophy in the corgi breed. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 91(2), 216-231
- SNOW W.M., ANDERSON J.E., JAKOBSON L.S. (2013a) Neuropsychological and neurobehavioral functioning in Duchenne muscular dystrophy: A review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 37(5), 743-752

- SNOW W.M., FRY M., ANDERSON J.E. (2013b) Increased Density of Dystrophin Protein in the Lateral Versus the Vermal Mouse Cerebellum. *Cell. Mol. Neurobiol.* 33(4), 513-520
- SQUIRE L.R. (2009) Encyclopedia of Neuroscience: Volume One. Academic Press
- STEDMAN H.H., SWEENEY H.L., SHRAGER J.B., *et al.* (1991) The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 352(6335), 536-539
- STUDZINSKI C.M., ARAUJO J.A., MILGRAM N.W. (2005) The canine model of human cognitive aging and dementia: Pharmacological validity of the model for assessment of human cognitive-enhancing drugs. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 29(3), 489-498
- SUZUKI Y., HIGUCHI S., AIDA I., NAKAJIMA T., NAKADA T. (2017) Abnormal distribution of GABAA receptors in brain of duchenne muscular dystrophy patients. *Muscle Nerve* 55(4), 591-595
- SWEENEY P., PARK H., BAUMANN M., *et al.* (2017) Protein misfolding in neurodegenerative diseases: implications and strategies. *Transl. Neurodegener.* 6
- TADAYONI R., RENDON A., SORIA-JASSO L.E., CISNEROS B. (2012) Dystrophin Dp71: The Smallest but Multifunctional Product of the Duchenne Muscular Dystrophy Gene. *Mol. Neurobiol.* 45(1), 43-60
- TAKATOH J., KUDOH H., KONDO S., HANAOKA K. (2008) Loss of short dystrophin isoform Dp71 in olfactory ensheathing cells causes vomeronasal nerve defasciculation in mouse olfactory system. *Exp. Neurol.* 213(1), 36-47
- TAYLOR P.J., BETTS G.A., MAROULIS S., *et al.* (2010) Dystrophin Gene Mutation Location and the Risk of Cognitive Impairment in Duchenne Muscular Dystrophy. *PLoS ONE* 5(1), e8803
- TIAN M., JACOBSON C., GEE S.H., *et al.* (1996) Dystroglycan in the Cerebellum is a Laminin $\alpha 2$ -chain Binding Protein at the Glial-Vascular Interface and is Expressed in Purkinje cells. *Eur. J. Neurosci.* 8(12), 2739-2747
- TINSLEY J.M., BLAKE D.J., DAVIES K.E. (1993) Apo-dystrophin-3: a 2.2kb transcript from the DMD locus encoding the dystrophin glycoprotein binding site. *Hum. Mol. Genet.* 2(5), 521-524
- TOKUDA T., FUKUSHIMA T., IKEDA S.-I., *et al.* (1997) Plasma Levels of amyloid β proteins A β 1-40 and A β 1-42(43) are elevated in Down's syndrome. *Ann. Neurol.* 41(2), 271-273
- TOTI P., VILLANOVA M., VATTI R., *et al.* (2003) Nerve growth factor expression in human dystrophic muscles. *Muscle Nerve* 27(3), 370-373
- TOZAWA T., ITOH K., YAOI T., *et al.* (2012) The Shortest Isoform of Dystrophin (Dp40) Interacts with a Group of Presynaptic Proteins to Form a Presumptive Novel Complex in the Mouse Brain. *Mol. Neurobiol.* 45(2), 287-297
- TRACEY I., THOMPSON C.H., DUNN J.F., *et al.* (1995) Brain abnormalities in Duchenne muscular dystrophy: phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy and neuropsychological study. *The Lancet* 345(8960), 1260-1264

- TRAYNELIS S.F., WOLLMUTH L.P., MCBAIN C.J., *et al.* (2010) Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacol. Rev.* 62(3), 405-496
- TSAO C.-Y., MENDEL J.R. (2006) Coexisting Muscular Dystrophies and Epilepsy in Children. *J. Child Neurol.* 21(2), 148-150
- TURTURRO F., ROCCA B., GUMINA S., *et al.* (2005) Impaired primary hemostasis with normal platelet function in Duchenne muscular dystrophy during highly-invasive spinal surgery. *Neuromuscul. Disord.* 15(8), 532-540
- TUSZYNSKI M.H. (2002) Growth-factor gene therapy for neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol.* 1(1), 51-57
- TUSZYNSKI M.H., BLESCH A. (2004) Nerve growth factor: from animal models of cholinergic neuronal degeneration to gene therapy in Alzheimer's disease. *Prog. Brain Res.* 146, 441-449
- UEMURA E.E. (2015) Fundamentals of Canine Neuroanatomy and Neurophysiology. John Wiley & Sons
- VAILLEN C., RENDON A., MISLIN R., UNGERER A. (1995) Influence of dystrophin-gene mutation on mdx Mouse Behavior. I. Retention Deficits at Long Delays in Spontaneous Alternation and Bar-Pressing Tasks. *Behav. Genet.* 25(6), 569-579
- VAILLEN C., BILLARD J.-M., CLAUDEPIERRE T., *et al.* (1998) Spatial discrimination learning and CA1 hippocampal synaptic plasticity in mdx and mdx3cv mice lacking dystrophin gene products. *Neuroscience* 86(1), 53-66
- VAILLEN C., UNGERER A., BILLARD J.-M. (1999) Facilitated NMDA receptor-mediated synaptic plasticity in the hippocampal CA1 area of dystrophin-deficient mice. *Synapse* 33(1), 59-70
- VAILLEN C., BILLARD J.-M., LAROCHE S. (2004) Impaired long-term spatial and recognition memory and enhanced CA1 hippocampal LTP in the dystrophin-deficient Dmdmdx mouse. *Neurobiol. Dis.* 17(1), 10-20
- VAILLEN C., POIRIER R., LAROCHE S. (2008) Genes, plasticity and mental retardation. *Behav. Brain Res., Biobehavioural Plasticity* 192(1), 88-105
- VAILLEN C., BILLARD J.-M. (2002) Facilitated CA1 hippocampal synaptic plasticity in dystrophin-deficient mice: Role for GABAA receptors? *Hippocampus* 12(6), 713-717
- VAILLEN C., CHAUSSENOT R. (2017) Relationships linking emotional, motor, cognitive and GABAergic dysfunctions in dystrophin-deficient mdx mice. *Hum. Mol. Genet.*
- VALENTINE B.A., COOPER B.J., DE LAHUNTA A., O'QUINN R., BLUE J.T. (1988) Canine X-linked muscular dystrophy: An animal model of Duchenne muscular dystrophy: Clinical studies. *J. Neurol. Sci.* 88(1-3), 69-81
- VALENTINE B.A., COOPER B.J., CUMMINGS J.F., DE LAHUNTA A. (1990) Canine X-linked muscular dystrophy: Morphologic lesions. *J. Neurol. Sci.* 97(1), 1-23
- VALENTINE B.A., WINAND N.J., PRADHAN D., *et al.* (1992) Canine X-linked muscular dystrophy as an animal model of Duchenne muscular dystrophy: A review. *Am. J. Med. Genet.* 42(3), 352-356

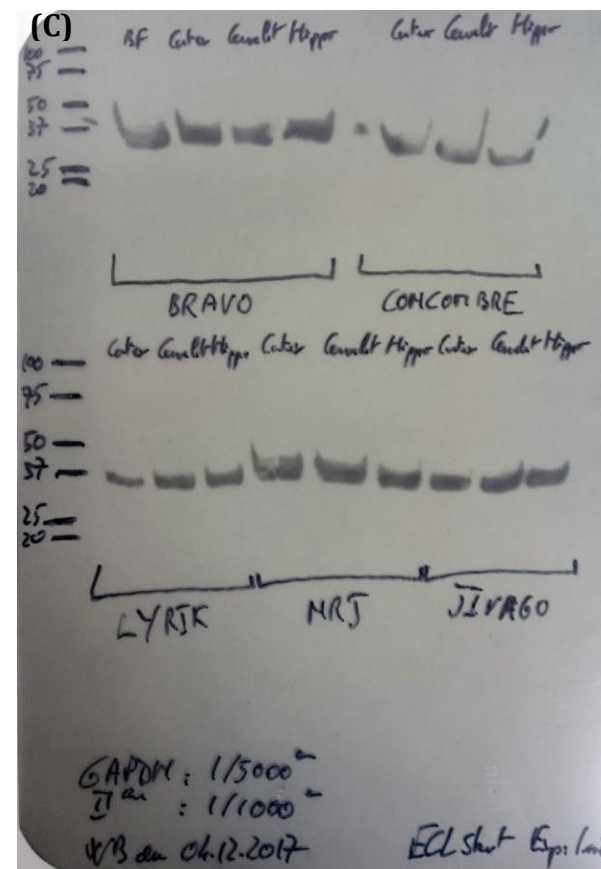
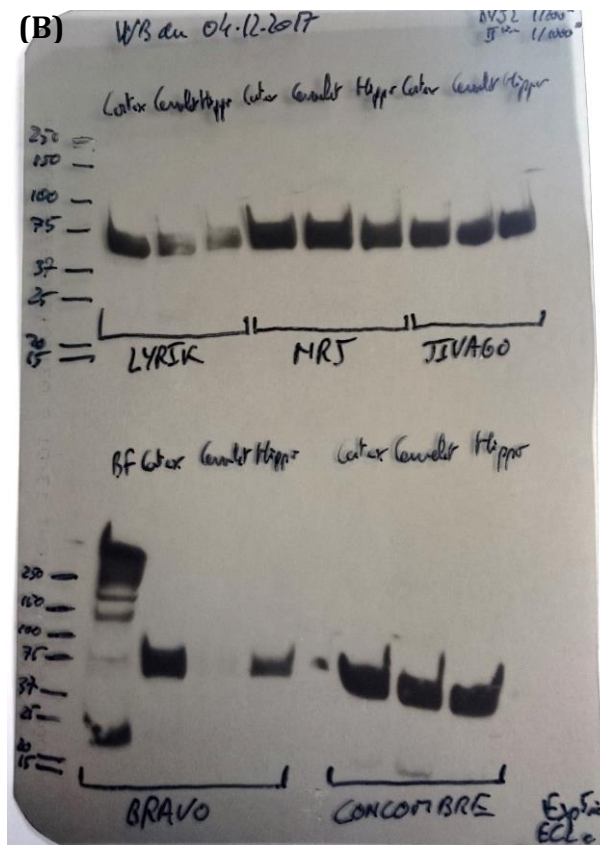
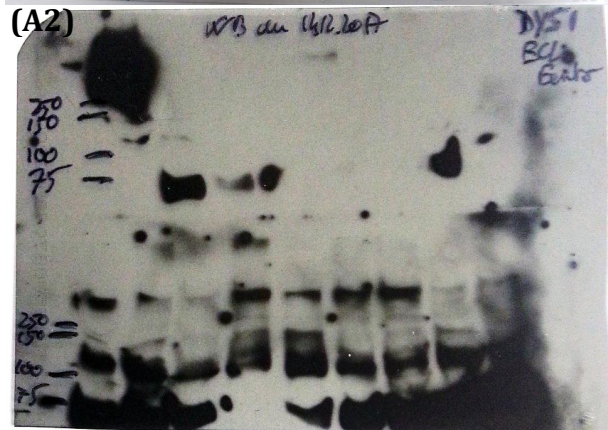
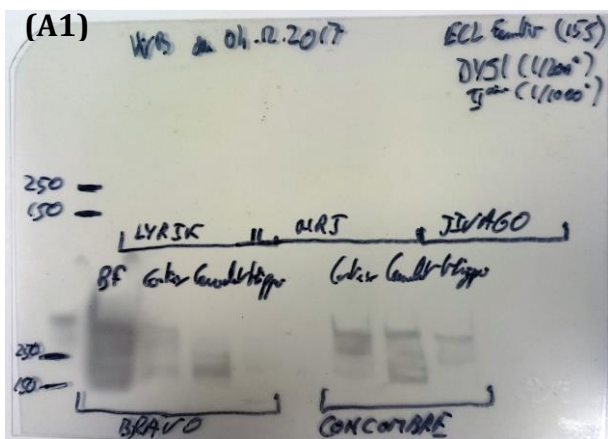
- VAN DER STAAY F.J. (1999) Spatial working memory and reference memory of Brown Norway and WAG rats in a holeboard discrimination task. *Neurobiol. Learn. Mem.* 71(1), 113-125
- VAN DER STAAY F.J., GIELING E.T., PINZÓN N.E., NORDQUIST R.E., OHL F. (2012) The appetitively motivated «cognitive» holeboard: a family of complex spatial discrimination tasks for assessing learning and memory. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 36(1), 379-403
- VAN DER ZEE E.A., COMPAAN J.C., DE BOER M., LUITEN P.G. (1992) Changes in PKC gamma immunoreactivity in mouse hippocampus induced by spatial discrimination learning. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 12(12), 4808-4815
- VAWTER M.P., VAN REE J.M. (1989) Hole board food search task in rats: Effects of hole depths and food deprivation. *Physiol. Behav.* 45(5), 891-895
- VICARI S., PICCINI G., MERCURI E., *et al.* (2018) Implicit learning deficit in children with Duchenne muscular dystrophy: Evidence for a cerebellar cognitive impairment? *PLoS ONE* 13(1)
- WAITE A., BROWN S.C., BLAKE D.J. (2012) The dystrophin-glycoprotein complex in brain development and disease. *Trends Neurosci.* 35(8), 487-496
- WALMSLEY G.L., ARECHAVALA-GOMEZA V., FERNANDEZ-FUENTE M., *et al.* (2010) A Duchenne Muscular Dystrophy Gene Hot Spot Mutation in Dystrophin-Deficient Cavalier King Charles Spaniels Is Amenable to Exon 51 Skipping. *PLoS ONE* 5(1)
- WECHSLER D. (1944) The measurement of adult intelligence. The Williams & Wilkins Company
- WEI L.-C., SHI M., CHEN L.-W., *et al.* (2002) Nestin-containing cells express glial fibrillary acidic protein in the proliferative regions of central nervous system of postnatal developing and adult mice. *Dev. Brain Res.* 139(1), 9-17
- WEISS L.G., SAKLOFSKE D.H., HOLDNACK J.A., PRIFITERA A. (2016) Chapter 1 - WISC-V: Advances in the Assessment of Intelligence. In *WISC-V Assessment and Interpretation, Practical Resources for the Mental Health Professional*. San Diego, Academic Press, pp 3-23
- WERSINGER E., BORDAIS A., SCHWAB Y., *et al.* (2011) Reevaluation of Dystrophin Localization in the Mouse Retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52(11), 7901-7908
- WIECZOREK L.A., GAROSI L.S., SHELTON G.D. (2006) Dystrophin-deficient muscular dystrophy in an old English sheepdog. *Vet. Rec.* 158(8), 270-273
- WINGEIER K., GIGER E., STROZZI S., *et al.* (2011) Neuropsychological impairments and the impact of dystrophin mutations on general cognitive functioning of patients with Duchenne muscular dystrophy. *J. Clin. Neurosci. Off. J. Neurosurg. Soc. Australas.* 18(1), 90-95
- WORMALD D., LAWRENCE A.J., CARTER G., FISHER A.D. (2016) Validation of modified open field behaviour as a measure of trait anxiety in the dog. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 179(Supplement C), 95-102

- XU S., SHI D., PRATT S.J.P., *et al.* (2015) Abnormalities in brain structure and biochemistry associated with mdx mice measured by in vivo MRI and high resolution localized 1H MRS. *Neuromuscul. Disord. NMD* 25(10), 764-772
- YAMAMOTO K., YAMADA D., KABUTA T., *et al.* (2010) Reduction of abnormal behavioral response to brief restraint by information from other mice in dystrophin-deficient mdx mice. *Neuromuscul. Disord.* 20(8), 505-511
- YHNELL E., DUNNETT S.B., BROOKS S.P. (2016) The utilisation of operant delayed matching and non-matching to position for probing cognitive flexibility and working memory in mouse models of Huntington's disease. *J. Neurosci. Methods, Current Methods in Huntington's Disease Research* 265, 72-80
- YU T.-S., ZHANG G., LIEBL D.J., KERNIE S.G. (2008) Traumatic brain injury-induced hippocampal neurogenesis requires activation of early nestin-expressing progenitors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28(48), 12901-12912
- ZHAO J., KODIPPILI K., YUE Y., *et al.* (2016) Dystrophin contains multiple independent membrane-binding domains. *Hum. Mol. Genet.* 25(17), 3647-3653
- ZHU Y., HOU H., REZAI-ZADEH K., *et al.* (2011) CD45 Deficiency Drives Amyloid- β Peptide Oligomers and Neuronal Loss in Alzheimer's Disease Mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31(4), 1355-1365
- ZIMMERMAN L., LENDAHL U., CUNNINGHAM M., *et al.* (1994) Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors. *Neuron* 12(1), 11-24

ANNEXES

Annexe 1. Films photographiques originaux des western blots.

(A1) Marquage par l'anticorps Dys1 (domaine ROD) avec exposition photographique courte ; (A2) marquage par l'anticorps Dys1 avec exposition photographique longue ; (B) marquage par l'anticorps Dys2 (domaine C-terminal) ; (C) marquage par l'anticorps anti-GAPDH



Annexe 2. Détail des examens cliniques des animaux inclus dans l'évaluation cognitive.

(TRC) Temps de recoloration capillaire ; (RH) Roses et humides ; (bpm) battements par minute ; (mpm) mouvements par minute.

| Nom | Poids (kg) | Vigilance | Température rectale (°C) | TRC (secondes) | Muqueuses | Fréquence cardiaque (bpm) | Anomalie à l'auscultation cardiaque | Fréquence respiratoire (mpm) | Anomalie à l'auscultation respiratoire | Présence de signes radiographiques de bronchopneumonie | Anomalie à l'examen neurologique | Difficulté à la locomotion | Difficulté à la déglutition | Difficulté à la préhension des aliments | Présence d'une hernie hiatale | Présence d'un mégacæsoophage | Sonde de gastrotomie | Tempérament craintif |
|-----------|------------|-----------|--------------------------|----------------|-----------|---------------------------|-------------------------------------|------------------------------|---|--|----------------------------------|----------------------------|-----------------------------|---|-------------------------------|------------------------------|----------------------|----------------------|
| Fébrèze | 26,6 | Vif | 39,1 | <2 | RH | 80 | Non | 160 | Non | Non | Non | Non | Non | Non | Non | Non | Non | Non |
| Jpeg | 28,8 | Vif | 38,8 | <2 | RH | 40 | Non | 120 | Non | Non | Non | Non | Non | Non | Non | Non | Non | Oui |
| Jappy | 29,5 | Vif | 40,0 | <2 | RH | 60 | Non | 160 | Non | Non | Non | Non | Non | Non | Non | Non | Non | Non |
| Messmer | 27,3 | Vif | 39,2 | <2 | RH | 48 | Non | 108 | Non | Non | Non | Non | Non | Non | Non | Non | Non | Non |
| Guizmo | 29,9 | Vif | 38,3 | <2 | RH | 120 | Non | 30 | Non | Non | Non | Légère | Légère | Légère | Oui | Modéré | Non | Non |
| Goojah | 25,9 | Vif | 38,3 | <2 | RH | 100 | Non | 108 | Non | Non | Non | Légère | Légère | Légère | Non | Modéré | Oui | Non |
| Jintonic | 16,4 | Vif | 38,8 | <2 | RH | 80 | Non | 40 | Bruits expiratoires | Non | Non | Patente | Légère | Légère | Non | Non | Non | Non |
| Jybraltar | 25,2 | Vif | 39,1 | <2 | RH | 80 | Non | 80 | Non | Non | Non | Patente | Légère | Légère | Oui | Modéré | Non | Non |
| JT | 23,3 | Vif | 38,7 | <2 | RH | 90 | Non | 70 | Non | Non | Non | Légère | Légère | Légère | Non | Non | Non | Non |
| Lyrik | 19,7 | Vif | 39,2 | <2 | RH | 88 | Non | 30 | Bruits expiratoires, tirage costal, orthopnée | Discrets | Non | Patente | Patente | Patente | Oui | Non | Non | Oui |
| Lper | 23,0 | Vif | 38,7 | <2 | RH | 100 | Non | 130 | Bruits expiratoires | Discrets | Non | Patente | Patente | Patente | Non | Patente | Oui | Non |

Annexe 3. Détail des résultats au cours de la tâche d'*openfield*.

| Animal | Type | Exclusion | Durée (secondes) | | | | | | | | | | |
|-----------|------|-----------|----------------------|-----------------|-------|------------------------|-------|--------------------|-------|----|-----------|----------|---------------|
| | | | Ensemble de la pièce | | | Périphérie de la pièce | | Centre de la pièce | | | Flairages | Mictions | Vocalisations |
| | | | Inactif | Assis ou couché | Actif | Total | Actif | Total | Actif | | | | |
| Fébrèze | Sain | Non | 187 | 20 | 413 | 369 | 332 | 231 | 81 | 42 | 0 | 0 | |
| Jpeg | Sain | Non | 121 | 0 | 479 | 435 | 363 | 165 | 116 | 30 | 0 | 0 | |
| Messmer | Sain | Non | 61 | 0 | 539 | 472 | 444 | 128 | 95 | 71 | 0 | 0 | |
| Jappy | Sain | Oui | | | | | | | | | | | |
| Guizmo | GRMD | Non | 432 | 416 | 168 | 578 | 148 | 22 | 20 | 19 | 0 | 0 | |
| Goojah | GRMD | Non | 36 | 0 | 564 | 542 | 514 | 58 | 50 | 57 | 2 | 0 | |
| Jintonic | GRMD | Non | 212 | 0 | 388 | 314 | 283 | 286 | 105 | 32 | 0 | 0 | |
| Jybraltar | GRMD | Non | 430 | 354 | 170 | 569 | 143 | 31 | 27 | 17 | 2 | 0 | |
| JT | GRMD | Non | 224 | 131 | 376 | 526 | 317 | 74 | 59 | 44 | 1 | 0 | |
| Lyrik | GRMD | Non | 446 | 286 | 154 | 563 | 132 | 37 | 22 | 15 | 0 | 0 | |
| Lper | GRMD | Non | 71 | 0 | 529 | 471 | 408 | 129 | 121 | 41 | 2 | 0 | |

Annexe 4. Détail des résultats au cours des différentes sessions d'habituations de la tâche de *holeboard*.

| | Session | Fébrèze | Goojah | JT | Jpeg | Jappy | Messmer | Guizmo | Moyenne | Écart-type de la moyenne |
|------------------------------------|---------|---------|--------|------|------|-------|---------|--------|---------|--------------------------|
| Nombre de visites | 1 | 33 | 72 | 27 | 0 | 0 | 0 | 6 | 20 | 10 |
| | 2 | 53 | 45 | 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 16 | 9 |
| | 3 | 47 | 42 | 24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 16 | 8 |
| Nombre de pots visités | 1 | 16 | 15 | 15 | 0 | 0 | 0 | 6 | 7 | 3 |
| | 2 | 16 | 15 | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 3 |
| | 3 | 16 | 16 | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | 3 |
| Durée (secondes) | 1 | 105 | 600 | 600 | 600 | 600 | 600 | 600 | 529 | 71 |
| | 2 | 161 | 600 | 600 | 600 | 600 | 600 | 600 | 537 | 63 |
| | 3 | 197 | 454 | 600 | 600 | 600 | 600 | 600 | 522 | 58 |
| Ratio de mémoire de travail | 1 | 0,48 | 0,21 | 0,56 | 0 | 0 | 0 | 1,00 | 0,32 | 0,14 |
| | 2 | 0,30 | 0,33 | 0,71 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,19 | 0,10 |
| | 3 | 0,34 | 0,38 | 0,58 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,19 | 0,09 |

Annexe 5. Détail des résultats au cours des différentes sessions d'entraînement de la tâche de *holeboard*.

| Variable | Session | Fébrèze | Goojah | Jt | Moyenne | Écart-type de la moyenne |
|--------------------------------------|----------------|----------------|---------------|-----------|----------------|---------------------------------|
| Nombre de visites | 1 | 32 | 29 | 20 | 27 | 4 |
| | 2 | 33 | 30 | 30 | 31 | 1 |
| | 3 | 40 | 41 | 15 | 32 | 9 |
| | 4 | 32 | 17 | 16 | 22 | 5 |
| | 5 | 25 | 22 | 10 | 19 | 5 |
| Nombre de pots visités | 1 | 15 | 15 | 12 | 14 | 1 |
| | 2 | 16 | 14 | 16 | 15 | 1 |
| | 3 | 16 | 14 | 13 | 14 | 1 |
| | 4 | 15 | 13 | 13 | 14 | 1 |
| | 5 | 15 | 14 | 11 | 13 | 1 |
| Durée (secondes) | 1 | 96 | 124 | 284 | 168 | 59 |
| | 2 | 79 | 471 | 244 | 265 | 114 |
| | 3 | 141 | 238 | 53 | 144 | 53 |
| | 4 | 106 | 58 | 73 | 79 | 14 |
| | 5 | 65 | 71 | 28 | 55 | 13 |
| Ratio de mémoire de travail | 1 | 0,50 | 0,50 | 0,57 | 0,52 | 0,02 |
| | 2 | 0,44 | 0,44 | 0,44 | 0,44 | 0 |
| | 3 | 0,40 | 0,36 | 1,00 | 0,59 | 0,21 |
| | 4 | 0,33 | 0,67 | 0,67 | 0,56 | 0,11 |
| | 5 | 0,50 | 0,57 | 1,00 | 0,69 | 0,16 |
| Ratio de mémoire de référence | 1 | 0,25 | 0,28 | 0,35 | 0,29 | 0,03 |
| | 2 | 0,27 | 0,30 | 0,30 | 0,29 | 0,01 |
| | 3 | 0,25 | 0,27 | 0,27 | 0,26 | 0,01 |
| | 4 | 0,38 | 0,35 | 0,38 | 0,37 | 0,01 |
| | 5 | 0,32 | 0,32 | 0,40 | 0,35 | 0,03 |

Annexe 6. Détail des concentrations de peptides B-amyloïde 42 mesurées dans le sérum des chiens.

| Animal | Type | Âge du chien (ans) | Âge du prélèvement (ans) | Dilution | Densité optique | Concentration brute (pg/ml) | Concentration corrigée (pg/ml) | Inclusion | Cause d'exclusion |
|---------|------|--------------------|--------------------------|----------|-----------------|-----------------------------|--------------------------------|-----------|--|
| Dingo | Sain | 3,29 | 5,80 | 0,5 | 2,092 | 56,70 | 113,40 | Oui | |
| | | | | 0,5 | 2,088 | 57,14 | 114,28 | Oui | |
| | | | | 1 | 1,271 | 143,50 | 143,50 | Oui | |
| | | | | 1 | 1,234 | 148,64 | 148,64 | Oui | |
| Dzer | Sain | 2,06 | 6,74 | 0,5 | 0,574 | 420,75 | 841,50 | Non | Prélèvement trop âgé (valeurs aberrantes) |
| | | | | 0,5 | 0,521 | 559,71 | 1119,42 | Non | |
| | | | | 1 | 0,293 | NA | NA | Non | |
| | | | | 1 | 0,307 | NA | NA | Non | |
| Fébrèze | Sain | 2,72 | 4,71 | 0,5 | 2,115 | 54,12 | 108,25 | Non | Duplicata non interprétable |
| | | | | 0,5 | 1,917 | 74,59 | 149,17 | Non | |
| | | | | 1 | 1,385 | 129,03 | 129,03 | Oui | |
| | | | | 1 | 1,3 | 139,64 | 139,64 | Oui | |
| Haribo | Sain | 2,57 | 2,93 | 0,5 | 1,912 | 75,07 | 150,14 | Non | Duplicata non interprétable |
| | | | | 0,5 | 1,705 | 95,03 | 190,07 | Non | |
| | | | | 1 | 1,37 | 130,83 | 130,83 | Oui | |
| | | | | 1 | 1,347 | 133,65 | 133,65 | Oui | |
| Hawai | Sain | 2,08 | 3,43 | 0,5 | 1,714 | 94,16 | 188,31 | Non | Duplicata non interprétable |
| | | | | 0,5 | 1,535 | 112,23 | 224,45 | Non | |
| | | | | 1 | 1,157 | 160,21 | 160,21 | Oui | |
| | | | | 1 | 1,033 | 182,26 | 182,26 | Oui | |
| Hello | Sain | 2,65 | 2,85 | 0,5 | 1,856 | 80,48 | 160,96 | Non | Quadruplicata non interprétable |
| | | | | 0,5 | 1,819 | 84,03 | 168,06 | Non | |
| | | | | 1 | 0,854 | 227,01 | 227,01 | Non | |
| | | | | 1 | 0,802 | 245,15 | 245,15 | Non | |
| Jackpot | Sain | 2,00 | 1,55 | 0,5 | 0,975 | 194,60 | 389,21 | Non | Valeurs hors gamme |
| | | | | 0,5 | 0,868 | 222,66 | 445,31 | Non | |
| | | | | 1 | 0,385 | NA | NA | Non | |
| | | | | 1 | 0,371 | NA | NA | Non | |
| Jappy | Sain | 3,48 | 0,08 | 0,5 | 1,726 | 92,99 | 185,98 | Non | Duplicata non interprétable |
| | | | | 0,5 | 1,34 | 134,52 | 269,05 | Non | |
| | | | | 1 | 1,11 | 168,00 | 168,00 | Oui | |
| | | | | 1 | 1,086 | 172,22 | 172,22 | Oui | |
| Jedi | Sain | 2,49 | 1,16 | 0,5 | 1,487 | 117,39 | 234,77 | Non | Quadruplicata non interprétable |
| | | | | 0,5 | 1,275 | 142,96 | 285,92 | Non | |
| | | | | 1 | 0,539 | 497,95 | 497,95 | Non | |
| | | | | 1 | 0,505 | 641,26 | 641,26 | Non | |
| Jpeg | Sain | 3,59 | 0,08 | 0,5 | 1,709 | 94,64 | 189,29 | Oui | |
| | | | | 0,5 | 1,603 | 105,18 | 210,36 | Oui | |
| | | | | 1 | 1,236 | 148,35 | 148,35 | Oui | |
| | | | | 1 | 1,078 | 173,67 | 173,67 | Oui | |

| Animal | Type | Âge du chien (ans) | Âge du prélèvement (ans) | Dilution | Densité optique | Concentration brute (pg/ml) | Concentration corrigée (pg/ml) | Inclusion | Cause d'exclusion |
|-----------|------|--------------------|--------------------------|----------|-----------------|-----------------------------|--------------------------------|-----------|------------------------------|
| Goojah | GRMD | 2,54 | 3,81 | 0,5 | 1,799 | 85,95 | 171,90 | Oui | |
| | | | | 0,5 | 1,669 | 98,57 | 197,14 | Oui | |
| | | | | 1 | 1,347 | 133,65 | 133,65 | Oui | |
| | | | | 1 | 1,216 | 151,23 | 151,23 | Oui | |
| Guignol | GRMD | 2,60 | 3,64 | 0,5 | 2,245 | 37,07 | 74,14 | Non | Triplacata non interprétable |
| | | | | 1 | 1,428 | 123,99 | 123,99 | Non | |
| | | | | 1 | 1,294 | 140,43 | 140,43 | Non | |
| | | | | 0,5 | 1,454 | 121,04 | 242,08 | Oui | |
| Guizmo | GRMD | 2,26 | 3,98 | 0,5 | 1,369 | 130,95 | 261,90 | Oui | Valeur aberrante |
| | | | | 1 | 1,089 | 171,68 | 171,68 | Non | |
| | | | | 1 | 0,896 | 214,49 | 214,49 | Oui | |
| | | | | 0,5 | 1,992 | 67,18 | 134,36 | Oui | |
| J.O. | GRMD | 2,75 | 0,86 | 0,5 | 1,991 | 67,28 | 134,56 | Oui | |
| | | | | 1 | 1,383 | 129,26 | 129,26 | Oui | |
| | | | | 1 | 1,285 | 141,62 | 141,62 | Oui | |
| | | | | 0,5 | 1,133 | 164,11 | 328,22 | Oui | |
| Jigoto | GRMD | 3,53 | 0,08 | 0,5 | 1,082 | 172,94 | 345,89 | Oui | |
| | | | | 1 | 0,614 | 365,32 | 365,32 | Oui | |
| | | | | 1 | 0,566 | 435,18 | 435,18 | Non | |
| | | | | 0,5 | 0,211 | NA | NA | Non | |
| Jintonic | GRMD | 2,77 | 0,84 | 0,5 | 0,212 | NA | NA | Non | Valeurs hors gamme |
| | | | | 1 | 0,127 | NA | NA | Non | |
| | | | | 1 | 0,127 | NA | NA | Non | |
| | | | | 0,5 | 1,72 | 93,57 | 187,15 | Oui | |
| JT | GRMD | 3,40 | 0,08 | 0,5 | 1,585 | 107,02 | 214,03 | Oui | |
| | | | | 1 | 1,242 | 147,50 | 147,50 | Oui | |
| | | | | 1 | 1,096 | 170,44 | 170,44 | Oui | |
| | | | | 0,5 | 2,073 | 58,77 | 117,54 | Oui | |
| Jvago | GRMD | 2,06 | 1,43 | 0,5 | 2,002 | 66,17 | 132,34 | Oui | |
| | | | | 1 | 1,438 | 122,85 | 122,85 | Oui | |
| | | | | 1 | 1,4 | 127,25 | 127,25 | Oui | |
| | | | | 0,5 | 1,565 | 109,08 | 218,16 | Oui | |
| Jybraltar | GRMD | 3,48 | 0,08 | 0,5 | 1,539 | 111,80 | 223,60 | Oui | |
| | | | | 1 | 1,075 | 174,22 | 174,22 | Oui | |
| | | | | 1 | 1,007 | 187,60 | 187,60 | Oui | |
| | | | | 0,5 | 1,534 | 112,33 | 224,66 | Oui | |
| Lper | GRMD | 2,44 | 0,08 | 0,5 | 1,466 | 119,70 | 239,40 | Oui | |
| | | | | 1 | 1,035 | 181,86 | 181,86 | Oui | |
| | | | | 1 | 0,946 | 201,43 | 201,43 | Oui | |
| | | | | 0,5 | 1,538 | 111,91 | 223,82 | Oui | |
| Lyrik | GRMD | 2,41 | 0,08 | 0,5 | 1,475 | 118,70 | 237,41 | Oui | |
| | | | | 1 | 0,853 | 227,33 | 227,33 | Oui | |
| | | | | 1 | 0,754 | 265,43 | 265,43 | Oui | |
| | | | | 0,5 | 1,538 | 111,91 | 223,82 | Oui | |

COMORBIDITÉ NEUROCOGNITIVE CHEZ LE CHIEN GRMD

Nom : Nicolas, Franck VAN CAENEGEM

Résumé :

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie génétique humaine due à la perte de fonction de la dystrophine. Ceci est à l'origine d'une dégénérescence musculaire progressive réduisant considérablement la qualité et la durée de vie des patients atteints. En parallèle des symptômes liés à l'atteinte musculaire, les patients DMD montrent une atteinte cognitive caractérisée par une baisse générale du quotient intellectuel, des troubles de l'automatisation, des troubles relationnels ainsi que de nombreuses comorbidités neuropsychiatriques. Chez la souris *mdx*, modèle murin de DMD, ont été observés une hyperréactivité à des contraintes physiques, des troubles de l'apprentissage associatif et un risque épileptique accru. La dystrophie musculaire du Golden Retriever (*Golden Retriever Muscular Dystrophy*, GRMD) est une maladie apparue spontanément dans cette race et présentant de très fortes similitudes sur le plan phénotypique avec les patients DMD. Notre étude a été conduite chez le chien GRMD qui n'a à ce jour jamais été caractérisé du point de vue neurocognitif. Dans un premier temps, nous avons étudié l'expression de deux isoformes de dystrophine dans l'encéphale de chiens GRMD et sains, nous permettant de valider ce modèle sur le plan neurologique. Dans un second temps, nous avons réalisé une étude de faisabilité de l'évaluation des capacités cognitives de chiens GRMD dans des conditions de laboratoire et dans le contexte d'un handicap moteur, ce qui nous a amené à discuter de pistes d'amélioration et de l'utilisation de paradigmes expérimentaux plus adaptés. Enfin nous avons émis l'hypothèse que le taux sérique de peptide β -amyloïde 42 puisse être un biomarqueur de troubles cognitifs et de lésions neurologiques. Les résultats dans notre cohorte ont montré une augmentation de ce taux chez les chiens GRMD par rapport aux chiens contrôles. Une étude ultérieure est cependant nécessaire pour confirmer ces résultats. L'ensemble de ce travail a permis de proposer une première approche à l'étude des affections neurocognitives chez le chien GRMD.

Mots-clés :

DYSTROPHIE MUSCULAIRE / MALADIE DE DUCHENNE / MYOPATHIE / NEUROLOGIE / COGNITION / CHIEN GRMD / CARNIVORES DOMESTIQUES

Jury :

Président : Pr François LEMAIRE

Directeurs : Pr Caroline GILBERT, Pr Stéphane BLOT

Assesseur : Pr Loïc DESQUILBET

Invitées : Dr Inès BARTHELEMY, Pr Fanny STORCK

NEUROCOGNITIVE COMORBIDITY IN GRMD DOGS

Name: Nicolas, Franck VAN CAENEGEM

Summary:

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a genetic disorder in humans caused by the loss of dystrophin function and characterized by a progressive muscular degeneration considerably reducing lifespan and quality of life. Along with muscular disorders, DMD patients show cognitive disorders expressed by intellectual quotient decrease, automatization disorders, peer relationship disorders and numerous neuropsychiatric comorbidities. In *mdx* mice, murine model of DMD, an hyperreactivity to scruff-restraint, associative learning disorders and epileptic risk increase were described. Golden Retriever muscular dystrophy (GRMD) is a condition spontaneously appeared in this race and showing strong similarities with DMD phenotype. Our study has been conducted in GRMD dogs. This model had never been studied from a neurocognitive view. Firstly, we studied the expression for two dystrophin isoforms in GRMD and laboratory healthy brain dogs. This experiment validated this model for neurological study. Secondly, we studied the feasibility of a cognitive evaluation in GRMD dogs in laboratory conditions and in the context of motor disabilities. We proposed improvements and use of more adapted experimental paradigms. Thirdly, we hypothesized that the serum level of β -amyloid 42 peptide could be a biomarker of cognitive disorders and neurological lesions. Results showed increased levels in GRMD dogs compared to control dogs. However further studies are necessary to confirm these findings. This work allowed to propose a first approach to the study of neurocognitive disorders in GRMD dog.

Keywords:

MUSCULAR DYSTROPHY / DUCHENNE DISEASE / MYOPATHY / NEUROLOGY / COGNITION / GRMD DOG / DOMESTIC CARNIVORES

Jury:

President: Prof. François LEMAIRE

Directors: Prof. Caroline GILBERT, Prof. Stéphane BLOT

Assessor: Prof. Loïc DESQUILBET

Guests: Dr. Inès BARTHELEMY, Prof. Fanny STORCK