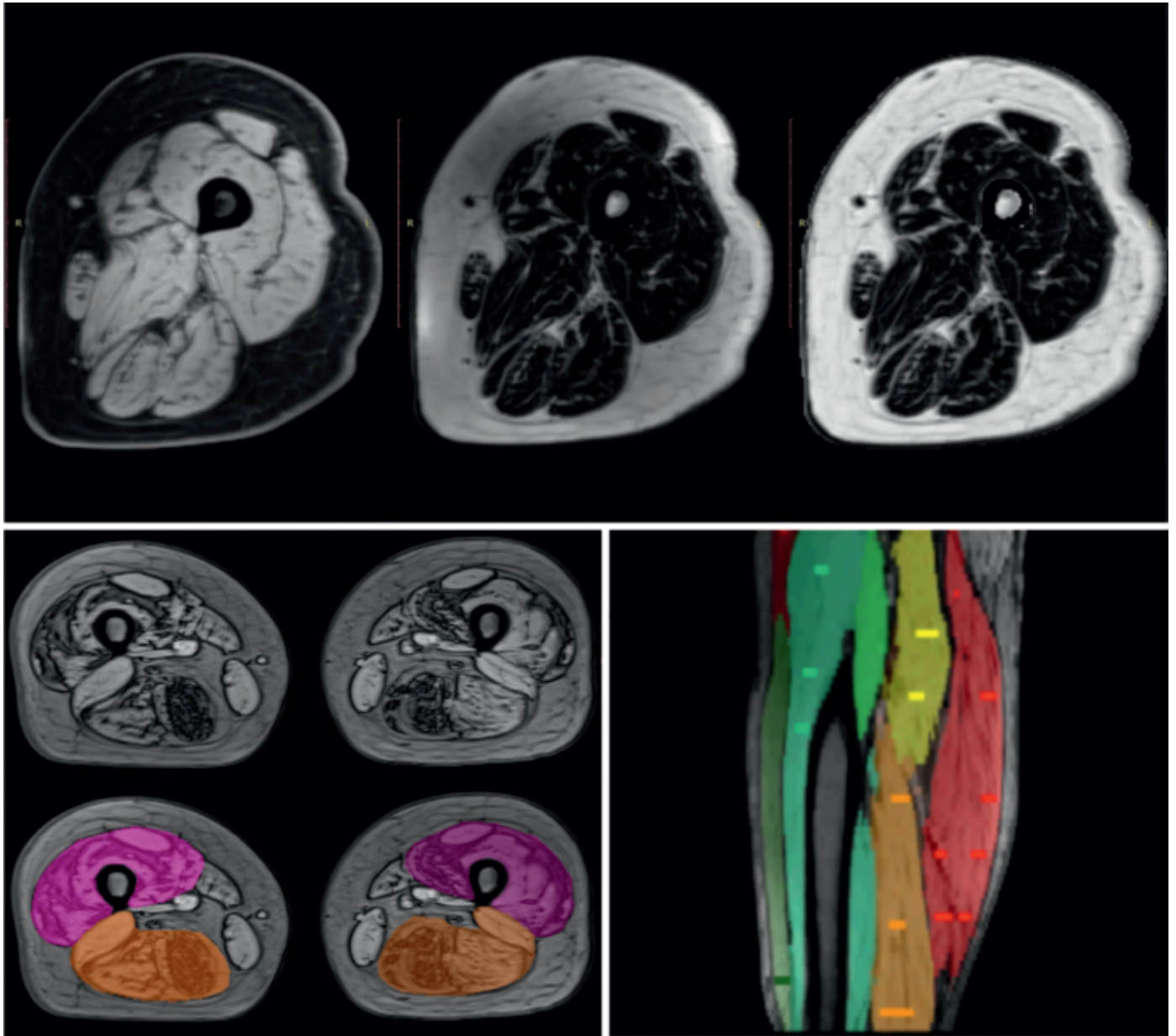


Les cahiers de **myologie**

Mise au point :
**Imagerie et
spectroscopie par
RMN du muscle
strié squelettique**



N° **13** - juin 2016



Les cahiers de myologie

N° 13 JUIN 2016

Rédaction

Directrices de la publication

Gisèle Bonne
Laurence Tiennot-Herment

Directeurs de la rédaction

Michel Fardeau
J. Andoni Urtizberea

Directeurs adjoints de la rédaction

Jean-Claude Kaplan
Guillaume Bassez
Valérie Allamand

Rédactrice en chef

Tuy Nga Brignol

Correspondance

SFM

g.bonne@institut-myologie.org

AFM-Téléthon

BP 59 - 91002 Évry cedex
cahiersdemyologie@afm-telethon.fr

Siège social

Institut de Myologie
75651 Paris cedex 13

Réalisation

EDP Sciences
109, avenue Aristide Briand
92541 Montrouge Cedex, France
17, avenue du Hoggar
PA de Courtabœuf
91944 Les Ulis, France
www.edpsciences.org

Mise en page

Corlet Imprimeur S.A.
ZI route de Vire
14110 Condé-sur-Noireau, France

Parution

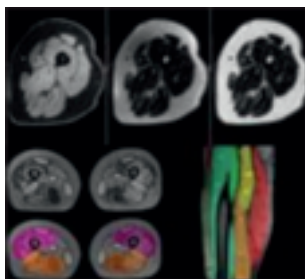
2 numéros/an
ISSN électronique en cours

Réseau des correspondants

Algérie : Meriem Tazir
Allemagne : Werner Stenzel
Argentine : Alberto L. Rosa
Belgique : Peter Van den Bergh
Bénin : Jules Alao
Brésil : Edmar Zanoteli
Canada : Jean-Pierre Bouchard
Chili : Jorge A. Bevilacqua
Chypre : Kyproula Christodoulou
Croatie : Nina Canki-Klein
Espagne : Carmen Navarro
États-Unis : Kevin Flanigan
Finlande : Bjarne Udd
Italie : Corrado Angelini
Japon : Keiko Ishigaki
Liban : André Mégarbané
Maroc : Ilham Slassi
Mexique : Rosa-Elena Escobar
Pérou : Ricardo Fujita
Royaume-Uni : Kate Bushby
Russie : Maria Kovalchuk
Suède : Anders Oldfors
Suisse : Thierry Kuntzer
Tunisie : Fayçal Hentati
Uruguay : Graciela Barros

COMITÉ ÉDITORIAL

Jean-Christophe Antoine
Serge Braun
Gillian Butler-Browne
Françoise Chapon
Bernard Clair
Jean-Marie Cuisset
Isabelle Desguerres
Claude Desnuelle
Christian Devaux
Denis Duboc
Bruno Eymard
Léonard Féasson
Xavier Ferrer
Luis Garcia
Marcela Gargiulo
Romain Gherardi
Frédéric Gottrand
Emmanuelle Guiraud
Jean-Yves Hogrel
Nathalie Koulmann
Martin Krahn
Leïla Lazaro
France Leturcq
Isabelle Marty
Judith Melki
Nadine Pellegrini
Isabelle Pénisson-Besnier †
Yann Péréon
Jean Pouget
Pascale Richard
François Rivier
Hélène Rivière
Norma Romero
Emmanuelle Uro-Coste
Jean-Thomas Vilquin
Louis Viollet
Karim Wahbi



Imagerie et spectroscopie par RMN du muscle strié squelettique

En haut : imagerie eau-graisse musculaire pour le suivi des changements dégénératifs chroniques musculaires. **De gauche à droite** : image de l'eau, de la graisse, et du pourcentage de graisse apparent d'un muscle sain.

En bas à gauche : segmentation manuelle du quadriceps et des ischio-jambiers pour étudier la trophicité musculaire.

En bas, à droite : accélération de la segmentation musculaire des muscles de la cuisse par l'utilisation d'un logiciel interactif qui ne requiert que quelques repères tracés par l'utilisateur (en surbrillance sur les images).

Les Cahiers de Myologie et les recommandations aux auteurs sont consultables sur le site
www.cahiers-myologie.org

La Myologie à l'Académie Nationale de Médecine

Comme annoncé dans le dernier numéro des *Cahiers de Myologie* de novembre dernier, voici le tout premier numéro en ligne de la nouvelle formule électronique des *Cahiers*.

Quel meilleur cadeau pouvait-on faire à la Myologie pour inaugurer ce nouveau format des *Cahiers de Myologie*, que celui de l'Académie Nationale de Médecine en décernant, le 17 décembre dernier, la Grande Médaille de l'Académie Nationale de Médecine au Professeur Michel Fardeau.

Cette grande et belle médaille vient mettre en pleine lumière, saluer, honorer l'immense apport à la Myologie de Michel Fardeau. Par sa contribution exceptionnelle, ou plus exactement son « combat », à l'émergence de notre discipline, notre maître, collègue et ami mérite amplement (plus que largement) cette distinction de cette noble institution.

Michel Fardeau a entièrement consacré son activité médicale et scientifique à la biologie du muscle normal et pathologique. Dans le discours aux membres de cette éminente et docte assemblée succédant à la remise de la médaille, Michel a rendu hommage « à ceux qui ont rendu un tel honneur possible » : En premier lieu, les Professeurs Raymond Garcin et René Cousteaux, chez qui Michel a été formé respectivement à la neurologie clinique et à la biologie cellulaire, et notamment à la structure de la jonction neuromusculaire. Mais aussi John Walton (*Lord Walton of Detchant malheureusement décédé le 21 avril 2016, voir l'article Hommage de M. Fardeau*) qui fut le premier en Europe à reconverter son service de neurologie en Centre d'Études des Maladies Neuromusculaires, ainsi que W. King Engel, chez qui et avec qui Michel a travaillé durant une année au NIH à Bethesda pour continuer par la suite un travail commun au service de la Myologie. Sans oublier tous ceux et celles qui

l'ont accompagné au cours des années dans cette aventure, que ce soit pour monter « le service de microscopie électronique dans le grenier de la vieille division Risler de La Salpêtrière » puis le laboratoire du Fer à Moulin, les membres de l'équipe CNRS, puis de l'Unité de Recherche Inserm dédiée à la pathologie musculaire, et enfin tous les personnels de l'Institut de Myologie. Sans surprise pour ceux qui le connaissent, Michel a également dédié cette grande médaille aux patients qui lui ont fait confiance tout au long des années, et a souligné le rôle déterminant de Bernard Barataud, alors président d'une association de patients qui devait devenir l'AFM, quand en 1978 ce dernier est venu le solliciter, lui et François Gros, pour des conseils sur l'orientation scientifique de l'association.

« Ce qui me réjouit sans doute le plus dans cette aventure, est d'avoir contribué à faire renaître dans ce pays la Myologie comme discipline médicale, dans l'endroit même où elle est née, au siècle précédent, à La Salpêtrière, avec Duchenne de Boulogne. Et de voir celle-ci aujourd'hui, grâce aux efforts de tous, être dans le peloton de tête des pays qui la font avancer » (extrait de la réponse de Michel Fardeau aux membres de l'Académie Nationale de Médecine).



À titre personnel, j'avoue être très fier d'avoir le bonheur de travailler aux côtés de Michel

Fardeau. C'est après avoir assisté à l'un de ses séminaires sur les myopathies en 1988 au Collège de France, que j'ai décidé d'orienter mon cursus vers la Myologie puis vers la « Cardio-Myologie ». Un grand merci à vous, Michel, mais aussi à Ketty Schwartz, qui comme vous l'avez rappelé dans votre discours a apporté la valence « cœur », myocardique dans votre groupe, pour m'avoir ouvert les portes de cette très belle discipline : La Myologie !!! Et nous sommes nombreux, ceux que Michel a conduits vers la Myologie !

Nous avons tous maintenant une énorme responsabilité, celle de continuer sur le chemin que Michel nous a ouvert et continuer à promouvoir auprès du plus grand nombre la Myologie afin que cette discipline soit pleinement reconnue.

C'est dans cet état d'esprit que le bureau de la Société française de Myologie a mis en place une politique scientifique tournée vers les plus jeunes avec depuis 2006, le Prix Master SFM et plus récemment en 2013, les Prix Communication de la SFM, décernés aux meilleures présentations orales et affichées de jeunes chercheurs en Myologie. Pour prolonger cette action et afin de valoriser ces différents Prix, le comité éditorial des Cahiers de Myologie a souhaité permettre aux récipiendaires de communiquer sur leurs travaux. Ainsi il a été proposé au lauréat du Prix Master 2014, David Arnoud du Laboratoire Interuniversitaire de la Biologie de la Motricité de Saint-Étienne, de rédiger un court article sur le sujet de ses travaux de thèse en cours et, aux récipiendaires des Prix communications SFM décernés lors des JSFM 2105 à Lyon, de rendre accessible leurs communications aux lecteurs des Cahiers de Myologie. Ainsi chers

lecteurs, vous trouverez dans la rubrique « Prix Master SFM », un article mettant en perspective les travaux de Master primés en 2014 et le projet doctoral qui en a découlé, et dans la rubrique « Prix Communication SFM », les textes des résumés des travaux des lauréats primés en novembre dernier accompagnés d'une illustration.

Enfin, toujours dans l'optique de promouvoir la Myologie, un autre événement marquant des derniers mois aura été le congrès international *Myology2016* organisé par l'AFM-Téléthon à Lyon en mars dernier. Vous trouverez dans la rubrique « Infos » un compte rendu détaillé des grands moments de cette très belle réunion qui aura fait la part belle aux tout derniers développements de la Myologie.

Toutes nos félicitations, cher Michel ! Et un immense MERCI pour la Myologie !

Myology at the National Academy of Medicine

Gisèle Bonne - Présidente de la Société Française de Myologie

LIENS D'INTÉRÊT

L'auteur déclare n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

ÉDITORIAL / EDITORIAL

- 3 **La Myologie à l'Académie Nationale de Médecine**
Myology at the National Academy of Medicine
Gisèle Bonne

HISTORIQUE / HISTORICAL NOTES

- 7 **Sur la technique des biopsies musculaires (II) Analyse de l'innervation motrice terminale et des plaques motrices en pathologie humaine Un survol historique**
On the technics of human muscle biopsies (II) Analysis of the terminal motor innervation and endplates in human pathology An historical overview
Michel Fardeau, Stéphanie Bauché, Daniel Hantaï
- 11 **Hommage à John Walton (Lord Walton of Detchant) - 1922-2016**
A Tribute to John Walton (Lord Walton of Detchant) 1922-2016
Michel Fardeau

CAS CLINIQUE / CASE REPORT

- 12 **Poïkilodermie héréditaire fibrosante, myopathie rétractile et fibrose pulmonaire (POIKTMP) : une pathologie multisystémique liée à des mutations dans le gène FAM111B**
Hereditary fibrosing poikiloderma with retractile myopathy, and pulmonary fibrosis: a multisystem disease associated with mutations in the FAM111B gene
Sandra Mercier, Sébastien Küry, Armelle Magot, Emmanuelle Salort-Campana, Florence Caillon, Emmanuelle Fleurence, Julie Perrier, Jean-Yves Mahé, Yann Péréon, Sébastien Barbarot, Stéphane Bézieau

PRISE EN CHARGE / MANAGEMENT

- 15 **eDystrophin : un nouvel outil dédié à une meilleure compréhension des dystrophinopathies**
eDystrophin: a new tool for better understanding dystrophinopathies
Rabah Ben Yaou, Aurélie Nicolas, France Leturcq, Élisabeth Le Rumeur
- 25 **Les troubles de l'oralité alimentaire dans les maladies neuromusculaires : analyse et prise en charge**
Feeding disorders in neuromuscular diseases: analysis and management
Danielle Ginisty, Hélène Rak-Merkin, Abdelkhaled Kaddour-Brahim
- 28 **Retentissement des troubles cognitifs sur la vie sociale, professionnelle et émotionnelle des patients dans la forme adulte de la dystrophie myotonique de type 1**
Impact of cognitive impairment on the social, professional and emotional life of adult patients with myotonic dystrophy type 1
Sabrina Sayah, Alexandre Morin

FICHE PRATIQUE / SHORT CLINICAL GUIDELINES

- 31 **Le séquençage de nouvelle génération (Next-Generation Sequencing ou NGS) appliqué au diagnostic de maladies monogéniques hétérogènes : notions essentielles pour le dialogue entre cliniciens et généticiens**
Next-generation sequencing (NGS) applied to diagnosis of heterogeneous genetic disorders: essential concepts for dialogue between clinicians and geneticists
Martin Krahn, Nicolas Lévy, Marc Bartoli

MISE AU POINT / REVIEW

- 34 **Imagerie et spectroscopie par résonance magnétique nucléaire du muscle strié squelettique : utilisation comme outil d'évaluation pour les essais cliniques**
Skeletal muscle quantitative nuclear magnetic resonance imaging and spectroscopy as an outcome measure for clinical trials
Pierre G. Carlier, Benjamin Marty, Olivier Scheidegger, Paulo Loureiro de Sousa, Pierre-Yves Baudin, Eduard Snezhko, Dmitry Vlodayets

LU POUR VOUS / LITERATURE REVIEW

- 68 **Génétique/Genetics**
Valérie Allamand
- 70 **Préclinique/Preclinical studies**
Dominique Mornet
- 74 **Clinique/Clinical research**
Christian Réveillère, Tuy Nga Brignol

MYOLOGIE DANS LE MONDE / MYOLOGY AROUND THE WORD

- 76 **Un nouvel Institut de Myologie en Floride**
A novel Myology Institute in Florida
Gillian Butler-Browne

PARTENARIATS / PARTNERSHIPS

- 78 **Partenariat France-Brésil**
France-Brazil partnership
Vincent Mouly

CLIN D'ŒIL / AT A GLANCE

- 80 **Le point de vue du « dinosaure émérite » Excitation et crispations autour de CRISPR : lorsque la réalité dépasse la science-fiction**
The Emeritus Dinosaur's viewpoint Elation and crispations about CRISPR: when truth is stranger than science-fiction
Jean-Claude Kaplan

INFOS / NEWS

- 87 **Symposium AFM-Téléthon/Filnemus**
Quels nouveaux outils pour réduire l'errance diagnostique en France ?
Symposium AFM-Telethon/Filnemus
Which new tools to reduce the time lapse for obtaining an accurate diagnosis in France?
Paloma Moreno-Elgard, Carole André
- 89 **Congrès Myology 2016 : cinq jours d'une rare intensité**
International Congress of Myology: five days of unusual excitement
Tuy Nga Brignol, Gaëlle Barrier, J. Andoni Urtizberea

JSFM 2015 /

THE 13th FRENCH SOCIETY OF MYOLOGY ANNUAL MEETING 2015

- 91 **Prix Master 2014 de la SFM**
La myostatine : une cible thérapeutique potentielle pour les myopathies centronucléaires
Master Award 2014
Myostatin: a potential therapeutic target in centronuclear myopathies
David Arnould, Anne-Cécile Durieux
- 94 **Prix Communications orales et affichées 2015 de la SFM**
Signaux moléculaires et mécaniques intervenant dans la différenciation des cellules tendineuses
Oral communications and Posters Awards 2015
Molecular and mechanical signals underlying tendon cell differentiation
Ludovic Gaut, Marie-Ange Bonnin, Nicolas Robert, Mathias Mericskay, Delphine Duprez

- 97 **Dynamique de l'organisation des triades**
Dynamics of triad organization
Muriel Sébastien, Éric Denarier, Julie Brocard, Oriana Sarrault, Didier Grunwald, Isabelle Marty, Julien Fauré
- 99 **Impact d'un traitement antioxydant sur le transfert de gène par un vecteur AAVr dans un modèle murin de la dystrophie musculaire de Duchenne**
Impact of an antioxidant treatment on recombinant adeno-associated virus (rAAV) vector-mediated gene transfer in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy
Jean-Baptiste Dupont, Benoît Tournaire, Romain Durand, Béatrice Marolleau, Émilie Bertil, Christophe Georger, Émilie Lecomte, Benjamin Cogné, Bernard Gjata, Laetitia van Wittenberghe, Alban Vignaud, Richard O. Snyder, Philippe Moullier, Adrien Léger
- 102 **Progrès dans la classification clinique de la dystrophie myotonique de type 1**
Refining myotonic dystrophy type 1 clinical classification
Céline Dogan, Marie De Antonio, Dalil Hamroun, Pascale Chevalier, Malya Mati, Bruno Eymard, Guillaume Bassez, Réseau clinique français des dystrophies myotoniques

105 AGENDA / FORTHCOMING MEETINGS

Sur la technique des biopsies musculaires (II)

Analyse de l'innervation motrice terminale et des plaques motrices en pathologie humaine

Un survol historique

Michel Fardeau, Stéphanie Bauché, Daniel Hantai

L'analyse de l'innervation motrice terminale (IMT) a marqué un premier virage majeur dans l'analyse des biopsies musculaires, jusque là examinées sur coupes en paraffine et colorations histologiques classiques. Ce fut dès 1952, essentiellement grâce aux travaux de Christian Coërs, bientôt suivi par A.L. Woolf [1] utilisant des colorations vitales au Bleu de Méthylène. Ces travaux, entrepris sous l'inspiration de J.G. Greenfield, avaient pour but de mieux différencier les atteintes neuropathiques des atrophies par non-utilisation, ou par cachexie, et des atteintes myopathiques. Ces travaux ont précédé de plusieurs années l'application aux biopsies humaines des techniques cytochimiques et cytoenzymologiques ainsi que les premières études en microscopie électronique.

L'innervation motrice des fibres musculaires avait fait l'objet de travaux classiques de très grande qualité, sur matériel normal ou expérimental, à l'aide des techniques d'imprégnation métallique, en particulier les techniques développées par Bielchowsky. Cela avait permis par exemple à Ranvier de décrire au contact des fibres musculaires une arborisation nerveuse terminale ; mais les aspects obtenus avaient fait aussitôt s'opposer les tenants d'une théorie « réticulariste » autour de Boëke, aux tenants de la théorie « neuroniste » soutenue par Ramon y Cajal : les premiers voyaient à l'extrémité nerveuse un « réseau périnerveux » anastomosant fibrilles nerveuses et musculaires, alors que, pour les seconds, les rameaux nerveux terminaux ne pénétraient pas sous le sarcolemme des fibres musculaires. La découverte, à l'aide de colorations vitales (au Vert Janus) d'un appareil sous-neural d'aspect lamellaire par René Couteaux fut un argument très fort en faveur de ces derniers. La visualisation d'une activité acétylcholinestérasique au niveau de l'appareil sous-neural par Koëlle et Friedenwald (1949), puis les premières images obtenues en microscopie électronique au début des années 1950 sur différents matériels devaient clore ce débat.

Les applications au matériel humain pathologique devenaient alors possibles, en particulier avec les modifications de la technique de Koëlle introduite

par Couteaux et Taxi [2]. Demeurait cependant un pré-requis pour l'application de ces techniques au muscle humain : le repérage de la zone d'innervation motrice au cours des prélèvements biopsiques musculaires.

Le repérage de la zone d'innervation motrice

Dans les muscles squelettiques des mammifères, la zone dans laquelle se terminent les axones moteurs est en règle très étroite, de l'ordre du millimètre, et se situe à mi-distance des extrémités des fibres musculaires, marquées par leur insertion tendineuse ou aponévrotique. La longueur des fibres musculaires étant très variable, et pouvant dépasser plusieurs centimètres dans les muscles humains habituellement biopsiés, un prélèvement « au hasard » n'avait donc que très peu de chances de porter sur la zone d'innervation.

Il fallait donc choisir en premier lieu des muscles dans lesquels les fibres musculaires étaient relativement courtes et leurs extrémités tendineuses faciles à identifier dans le champ opératoire d'un prélèvement à ciel ouvert. Étaient plus particulièrement accessibles, aux membres supérieurs, le chef moyen du muscle deltoïde et le muscle grand palmaire, et, aux membres inférieurs, le muscle court péronier latéral (ont également été étudiés, à des fins

Michel Fardeau
Unité de Morphologie
Neuromusculaire (Division
Risler), Institut de
Myologie, Hôpital
de la Pitié-Salpêtrière,
75013 Paris, France
Stéphanie Bauché
Daniel Hantai
Institut du Cerveau
et de la Moelle Épineuse
(ICM) UMRS 1127,
Hôpital
de la Pitié-Salpêtrière,
75013 Paris, France

Contact
m.fardeau@institut-
myologie.org

particulières, le muscle anconé et les muscles intercostaux externes). Pour les autres muscles, et *a fortiori* pour des muscles souvent biopsiés comme le muscle biceps brachial ou le muscle vaste externe, dont les faisceaux étaient beaucoup plus longs et les extrémités tendineuses non accessibles par une incision cutanée limitée, il convenait donc de recourir à d'autres techniques pour la localisation de cette zone d'innervation.

La première technique utilisée a été *électrophysiologique*, avec repérage percutané du point moteur, pour les muscles dont les fibres étaient parallèles à la surface cutanée (ce fut en particulier la technique utilisée par C. Coërs). Ce repérage préopératoire peut être complété par une stimulation électrique per-opératoire effectuée dans des conditions compatibles avec l'asepsie chirurgicale ; ceci implique une installation particulière de la salle d'opération. Une autre technique, plus simple, et strictement *anatomique* est possible. En effet, lors de la dissection des faisceaux superficiels d'un muscle à l'aide d'un bistouri à lame pointue et très fine, lorsque l'on passe sur la zone d'innervation la section des filets nerveux moteurs les plus superficiels déclenche un « *twitch* » très bref, qui donne une localisation très précise de cette zone, au millimètre près ; il est recommandé, pour les médecins en charge de ce type de prélèvements biopsiques, d'avoir répété à l'avance cette manipulation sur les muscles d'un petit animal de laboratoire (rat ou souris). Un prélèvement musculaire de 8 à 12 millimètres de long peut alors être réalisé, centré sur la zone repérée.

La dissection des fascicules prélevés se poursuivra sous la loupe binoculaire au laboratoire, avec la confection de blocs « neuraux » contenant les plaques motrices : soit par repérage des filets nerveux terminaux avant ou après fixation par l'acide osmique (M. Fardeau) [3], soit par visualisation des plaques motrices par la technique de Koëlle sur l'un des faisceaux prélevés mis en parallèle des faisceaux sur lesquels seront effectués les prélèvements « neuraux » (A.G. Engel) [4]. La confirmation de la présence des plaques motrices sera apportée par l'examen des coupes semi-fines obtenues à partir de ces blocs « neuraux » (Figure 1).

Visualisation des plaques motrices et de l'innervation motrice terminale

1. La première méthode utilisée a donc été une coloration vitale par le Bleu de Méthylène. Elle consiste en l'injection du fascicule prélevé, de 2 à 3 millimètres de large, par une solution à 0,03 % de Bleu de



Figure 1
Muscle jumeau interne. Plaque motrice normale. Technique de Koëlle modifiée [2].

Méthylène dissous dans du sérum physiologique, jusqu'à ce que le fascicule devienne « aussi bleu que possible ». Il est ensuite placé sous flux d'oxygène, puis fixé dans une solution de molybdate d'ammonium pendant 24 heures à 4 °C. Il est ensuite fixé par le formol à 10 % pendant 24 heures avant d'être débité en série en coupes à congélation de 50 à 100 microns d'épaisseur. Cette technique n'est plus guère utilisée aujourd'hui que dans des conditions expérimentales.

2. La visualisation des plaques motrices s'effectue par la mise en évidence de l'activité acétylcholinestérasique (AChE) des appareils sous-neuraux selon la méthode de Koëlle, adaptée par Couteaux et Taxi [2].

Cette technique peut s'effectuer sur coupes congelées des prélèvements effectués, ou sur dilacérats de quelques fascicules musculaires après une courte fixation formolée (4 à 6 heures). Elle comporte deux temps, une préincubation dans une solution de Glycocolle de Cuivre en tampon acétate à pH5 et une incubation dans la même solution à laquelle a été ajouté l'Iodure d'Acétylthiocholine, pendant trente minutes, puis un virage dans une solution fraîche et diluée (1 %) de sulfure d'ammonium. À l'état normal, chez l'adulte, les appareils sous-neuraux sont formés de quatre à six cupules, ou gouttières, finement striées inscrites dans une zone ovale de trente ou quarante microns dans son plus grand diamètre, pour des fibres musculaires de 40 à 60 microns de diamètre (Figure 1). Il existe en fait une relation linéaire entre la taille et la surface des appareils sous-neuraux et le diamètre des fibres musculaires sous-jacentes.

3. La technique d'imprégnation métallique la plus communément utilisée reste celle de Bielchowsky-Gros, sur matériel fixé par le formaldéhyde et débité

en coupes de 50 à 100 microns incubées dans une solution à 10 % de Nitrate d'Argent ammoniacal. Cette technique permet de visualiser les neurites terminaux (un par plaque à l'état normal) et l'arborisation nerveuse terminale faite de deux à quatre neurites très fins, terminés parfois par un petit anneau. Une technique d'imprégnation à l'Argent selon Bodian peut être combinée à la mise en évidence de l'activité cholinestérasique des appareils sous-neuraux, selon une méthode initialement proposée par S. Manolov et adaptée par M. Fardeau (Figure 2) [5].

4. Aujourd'hui, cet ensemble de techniques classiques a été remplacé par l'analyse en microscopie confocale après marquage des éléments pré - et post-synaptiques par des anticorps ou toxines spécifiques [6] : α -bungarotoxine-tétrarhodamine pour

les sous-unités alpha du récepteur cholinergique ; anticorps anti-neurofilaments (68 kDa, 165 kDa et 200 kDa) pour le marquage de l'axone terminal et de ses ramifications ; fasciculine couplée à la fluorescéine, pour le marquage de l'acétylcholinestérase dans la fente synaptique. Un anticorps anti-S100 peut être utilisé pour marquer la cellule de Schwann qui coiffe l'arborisation nerveuse terminale. On met ainsi en évidence les différentes composantes de la jonction neuromusculaire (Figure 3).

Résultats en pathologie humaine

1. Dans les atteintes neuropathiques, la diminution et l'altération des axones terminaux vont de pair avec un processus plus ou moins intense de bourgeonnement (« *sprouting* ») collatéral. Il s'ensuit de grandes variations dans la visualisation des neurites terminaux, ainsi qu'une grande variabilité de taille des appareils sous-neuraux. Ceux-ci sont souvent réduits à une digitation, plus ou moins volumineuse, correspondant à des plaques motrices de réinnervation (Figure 2B). Sur les préparations au Bleu de Méthylène, il est possible d'établir un rapport d'innervation terminal - rapport entre le nombre d'axones terminaux visibles et le nombre de fibres musculaires innervées ; ce rapport est supérieur à 1 dans les atteintes neuropathiques.

2. Dans les atteintes dystrophiques musculaires, les axones terminaux sont aisément visualisés et le rapport d'innervation terminal au voisinage de 1 ; il existe une grande variabilité de taille des appareils sous-neuraux, dont la structure fine est conservée. Dans certaines dystrophies (dystrophie myotonique) il a été noté une modification de la corrélation existant normalement entre les dimensions des appareils sous-neuraux et le diamètre des fibres musculaires sous-jacentes [7].

3. Dans les syndromes myasthéniques congénitaux (SMC), l'analyse de l'IMT et des différents composants des plaques motrices est essentielle [8]. L'un de ces syndromes peut être caractérisé morphologiquement, l'absence d'acétylcholinestérase par déficience de la « queue » collagénique (Col Q) sur laquelle sont greffées normalement les tétramères d'AChE, alors que les neurites terminaux sont normalement présents ; ceci implique bien évidemment la normalité des contrôles effectués en parallèle (Figure 4). Ces syndromes de déficience en AChE sont aujourd'hui parfaitement caractérisés au niveau génétique moléculaire [9]. D'autres syndromes myasthéniques congénitaux comportent des anomalies du dispositif d'innervation terminale, en particulier les syndromes avec déficience en agrine [10],

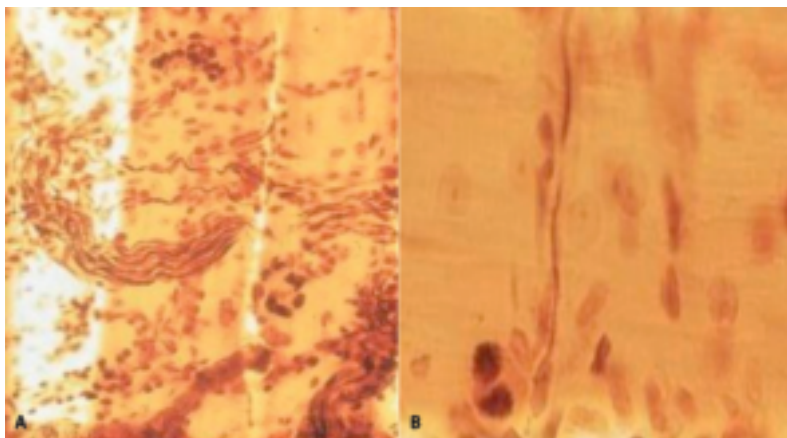


Figure 2
Technique de S. Manolov modifiée [5].
A. Muscle humain normal (muscle deltoïde). B. Plaque motrice de réinnervation (biopsie provenant d'un patient atteint de SLA).

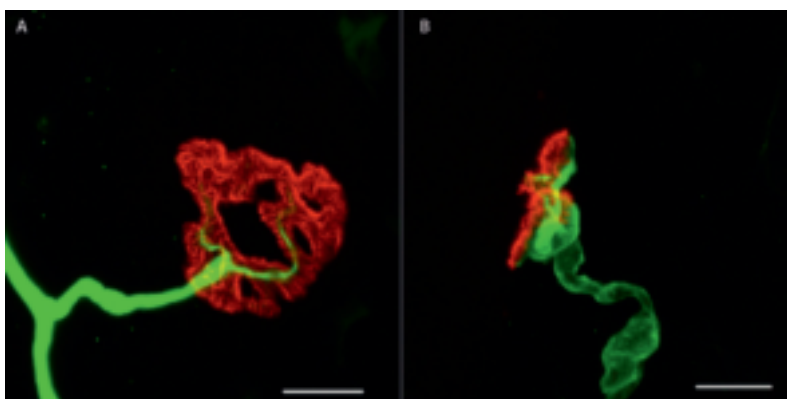


Figure 3
Jonction neuromusculaire humaine normale. (A) L'axone terminal s'enfonce dans la totalité des gouttières synaptiques (neurofilament en vert et Récepteur Cholinergique en rouge ; image de gauche) et (B) on observe une cellule de Schwann terminale par gouttières synaptique (protéine S100 en vert et RACH en rouge, image de droite). Échelle : 10 μ m.

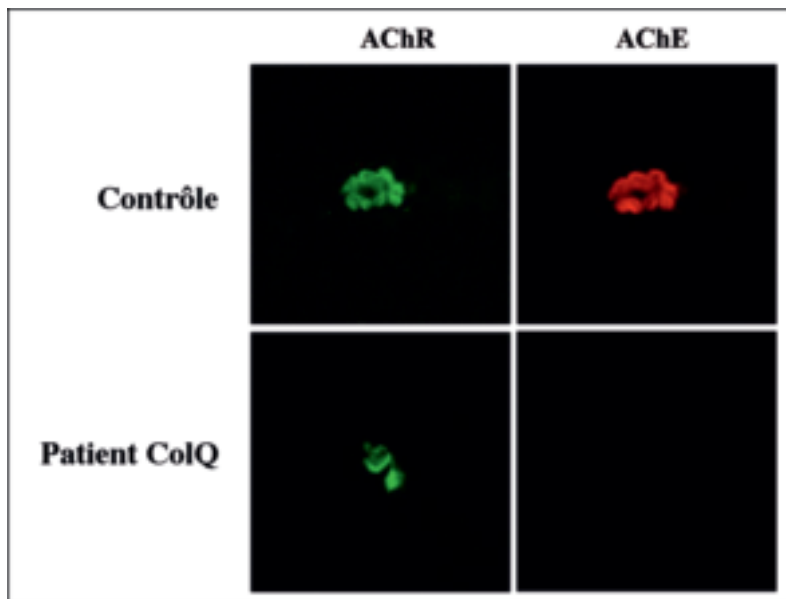


Figure 4
Jonction neuromusculaire d'un patient avec mutation dans le gène codant ColQ. Présence de co-marquage AChR (vert), AChE (rouge) chez un patient contrôle (images du haut). Chez un patient muté en ColQ, absence de marquage AChE (rouge) à la jonction neuromusculaire. Échelle : 10 μ m.

molécule sécrétée par les neurites terminaux et essentielle pour la formation ou le remodelage des jonctions neuromusculaires ; d'où la présence simultanée dans ce SMC de plaques dénervées et de plaques « remodelées », avec une diminution du nombre de récepteurs cholinergiques de l'ordre de 50 %. Enfin, dans les myasthénies auto-immunes, il a été montré depuis longtemps qu'il existait une simplification des appareils sous-neuraux avec diminution du nombre et de la profondeur des plis sous-neuraux, alors que le dispositif d'innervation terminale n'était, en règle, pas modifié [11].

On the technics of human muscle biopsies (II) Analysis of the terminal motor innervation and endplates in human pathology An historical overview

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Coërs C, Woolf AL. *The innervation of muscle: a biopsy study*. Oxford : Blackwell, 1959.
2. Couteaux R, Taxi J. Recherches histo-chimiques sur la distribution des activités cholinestérasiques au niveau de la synapse myoneurale. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* 1952 ; 41 : 352-92.
3. Fardeau M. Technics and results of the study of motor endplates in the pathology of skeletal muscle. *Rev Neurol (Paris)* 1960 ; 103 : 30-40.
4. Engel AG, Lambert EH, Gomez MR. A new myasthenic syndrome with end-plate acetylcholinesterase deficiency, small nerve terminals, and reduced acetylcholine release. *Arch Neurol* 1977 ; 1 : 315-30.
5. Fardeau M. Simultaneous staining of the terminal motor innervation and the subneural apparatus (S. Manolov's technic). Importance for diagnosis in neuro-muscular pathology. *Rev Neurol (Paris)* 1964 ; 111 : 501-6.
6. Sanes JR, Lichtman JW. Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu Rev Neurosci* 1999 ; 22 : 389-442.
7. Fardeau M, Tomé FMS. *Symposium Inserm n° 13*. In : Taxi J, ed. Paris : Éditions Inserm, 1980 : 287-97.
8. Chevesier F, Faraut B, Ravel-Chapuis A, et al. MUSK, a new target for mutations causing congenital myasthenic syndrome. *Hum Mol Genet* 2004 ; 13 : 3229-40.
9. Donger C, Krejci E, Serradell AP, et al. Mutation in the human acetylcholinesterase-associated collagen gene, COLQ, is responsible for congenital myasthenic syndrome with end-plate acetylcholinesterase deficiency (Type Ic). *Am J Hum Genet* 1998 ; 63 : 967-75.
10. Huzé C, Bauché S, Richard P, et al. Identification of an agrin mutation that causes congenital myasthenia and affects synapse function. *Am J Hum Genet* 2009 ; 85 : 155-167.
11. Fardeau M, Godet-Guillain J, Chevallay M. *Ultrastructural changes of the motor end-plates in myasthenia gravis and myasthenic syndrome*. Proceedings of the Xth International Congress of Neurology. Amsterdam : Excerpta Medica, 1972.

Hommage à John Walton (Lord Walton of Detchant), 1922-2016

Michel Fardeau



Le Professeur John Walton - Lord Walton of Detchant - est décédé le 21 avril dernier. Avec lui disparaît le fondateur de la myologie en Europe, et l'une des personnalités « premières » de la myologie dans le monde.

John Walton était né en 1922 dans un petit village minier du nord-est de l'Angleterre. Il restera

toujours très attaché à sa région natale. À 18 ans, en 1940, demandant à s'engager dans la *Royal Air Force*, il n'y sera pas admis, l'Angleterre ayant décidé de former en priorité de nouveaux médecins. Il fera donc des études de médecine « accélérées » à Newcastle-upon-Tyne. À la fin de ses études, il sera appelé à servir dans la « Navy » comme Commandant en second d'un navire-hôpital, et servira en particulier au Moyen Orient. De retour à la vie civile, en 1948, il sera orienté par deux de ses « mentors », le Professeur Nattrass, de Durham, et le Docteur Henry Miller, de Newcastle, vers la neurologie. C'est alors qu'il examinera tous les patients identifiés comme « dystrophie musculaire » dans le Comté du Northumberland, et qu'il en tirera une classification enfin claire de ces maladies, qui sera publiée, avec Fred Nattrass, en 1954, dans *Brain*. Clarté d'esprit, sens de l'organisation, rapidité de décision auront été parmi les plus éminentes qualités de « John » : c'est ainsi qu'il aimait qu'on l'appelât.

Décidé à continuer à travailler dans le domaine des maladies neuromusculaires, il obtint un « *fellowship* » de la *Nuffield Foundation*, pour aller passer une année à Boston, au « *Mass General Hospital* » auprès de Ray Adams. Il y approfondit ses connaissances cliniques et histopathologiques des affections neuromusculaires. Après avoir passé une année supplémentaire de formation auprès du Docteur Carmichael, à Queen Square (Londres), il revint à Newcastle, avec un « *grant* » de la « *Muscular Dystrophy Association of America* », qui lui permit de recruter ses premiers collaborateurs en clinique, électromyographie et biochimie. Nommé

Consultant en 1958, il obtint de pouvoir monter un premier laboratoire de recherche en myopathologie. L'attribution de nouveaux « *grants* » lui permit d'étoffer son équipe, et des « *fellows* » commencèrent à venir du monde entier : le premier centre européen de myologie était ainsi créé.

Ce n'est que plus tard, en 1983, qu'il quittera Newcastle pour Oxford, où il sera nommé au poste prestigieux de « *Warden of Green College* » avant de revenir, en 1989, à Newcastle. Entre temps, il aura été anobli par la Reine, et de « Sir John » il sera devenu « Lord Walton of Detchant ». Ses responsabilités dans le développement des différentes institutions britanniques et mondiales seront vite impressionnantes.

John aura eu une influence décisive dans le développement de la myologie dans nombre de pays dans le monde. Pour la France, il eut un rôle majeur dans le développement du laboratoire de la Salpêtrière. Ami, à travers Henri Miller et Ray Adams, du Professeur Raymond Garcin, il joua un rôle décisif lorsque ce laboratoire fut fragilisé par la disparition rapide de monsieur Garcin en 1971. Il vint alors lui-même de Newcastle plaider auprès du Doyen de la Pitié-Salpêtrière, le Professeur Paul Castaigne, pour le maintien de ce laboratoire : ce qui fut alors acquis. Dans ces années, les échanges et visites se multiplièrent entre Paris et Newcastle. John, et son épouse Lady Betty, aimaient beaucoup notre pays, dont ils pratiquaient « gentiment » la langue, y compris en chansons, surtout à la fin d'un bon repas. John aura été un garant très sûr du développement de la myologie dans notre pays. Sa disparition est pleurée par tous ses collaborateurs et amis, de Newcastle et du monde entier. Notre peine est égale à la leur, à la hauteur de l'admiration que nous avons pour cet homme et de ce que nous lui devons.

A Tribute to John Walton (Lord Walton of Detchant) 1922-2016

LIENS D'INTÉRÊT

L'auteur déclare n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

NOTE BIBLIOGRAPHIQUE

John Walton a conté toute sa histoire personnelle dans un livre « *The Spice of Life : from Northumberland to World Neurology* », London, Royal Society of Medicine, 1993.

Michel Fardeau
Professeur honoraire
au CNAM
Fondateur de la Société
Française de Myologie

Contact
m.fardeau@institut-
myologie.org

Poïkilodermie héréditaire fibrosante, myopathie rétractile et fibrose pulmonaire (POIKTMP)

Une pathologie multisystémique liée à des mutations dans le gène *FAM111B*

Sandra Mercier, Sébastien Küry, Armelle Magot, Emmanuelle Salort-Campana, Florence Caillon, Emmanuelle Fleurence, Julie Perrier, Jean-Yves Mahé, Yann Péréon, Sébastien Barbarot, Stéphane Bézieau

Le syndrome POIKTMP constitue une entité multisystémique caractérisée par une myopathie rétractile associée à des anomalies cutanées (poïkilodermie, hypotrichose), une atteinte respiratoire (syndrome restrictif, fibrose pulmonaire) et/ou des signes digestifs (insuffisance pancréatique exocrine, hépatite). Il est lié à des mutations hétérozygotes dans le gène *FAM111B* dont la fonction est peu connue à ce jour. Cette pathologie rare est probablement encore sous-diagnostiquée.

Observation

L'enfant R., né en 2004, est le second d'une fratrie de deux enfants issus de parents non apparentés, sans antécédent familial particulier. Il est né au terme d'une grossesse de déroulement normal avec des mensurations de naissance normales.

À l'âge d'un mois, une éruption cutanée faciale érythémateuse apparaît, déclenchée par une exposition solaire. Cette éruption évolue ensuite vers un aspect de poïkilodermie caractérisée par des lésions réticulées des joues associant des tégangiectasies et une atrophie cutanée (Figure 1). Il développe également des lésions eczématiformes au niveau des extrémités. On note une hypotrichose avec des cheveux fins et épars, des sourcils et cils quasi inex-

istants. En revanche, ses ongles et ses dents sont sans particularité. Les parents rapportent une hypohidrose avec une intolérance à la chaleur. À l'âge de 6 ans, il présente un lymphoœdème des quatre membres, prédominant aux membres inférieurs, qui s'est compliqué d'un érysipèle à deux reprises. Dans le même temps, il développe des ré-

tractions rapidement

progressives des triceps suraux conduisant à une déformation en *varus* des deux pieds. Il présente également un déficit musculaire distal puis proximo-distal des membres inférieurs d'aggravation rapide progressive. Il a recours au fauteuil roulant pour les déplacements extérieurs à partir de l'âge de 7 ans. Une ténotomie, effectuée à cet âge, permet à l'enfant R. de remarcher sans aide ce qui n'exclut pas un appareillage à visée orthopédique et fonctionnelle. Le déficit musculaire s'étend progressivement aux quatre membres de façon distale et proximale, sans sélectivité musculaire particulière.

L'exploration initiale, à 7 ans, met en évidence un taux de CPK normal et un tracé électromyographique myogène au niveau des membres inférieurs.



Figure 1
Aspect typique du visage associant poïkilodermie et hypotrichose (d'après [3]).

S. Mercier
CHU de Nantes, Service de Génétique Médicale, Centre de Référence Anomalies de Développement et Syndromes Malformatifs de l'inter-région Grand-Ouest, 9, quai Moncoussu, 44093 Nantes Cedex 1, France
Inserm UMR1089, Atlantic Gene Therapy Institute, University of Nantes, Nantes, France
Centre de Référence des Maladies Neuromusculaires Rares de l'Enfant et de l'Adulte Nantes-Angers, Nantes, F-44000, France

S. Küry
CHU de Nantes, Service de Génétique Médicale, Centre de Référence Anomalies de Développement et Syndromes Malformatifs de l'inter-région Grand-Ouest, 9, quai Moncoussu, 44093 Nantes Cedex 1, France

A. Magot
Y. Péréon
Centre de Référence des Maladies Neuromusculaires Rares de l'Enfant et de l'Adulte Nantes-Angers, Nantes, F-44000, France
CHU de Nantes, Laboratoire d'Explorations Fonctionnelles, Nantes, F-44000, France

E. Salort-Campana
Hôpital de la Timone, Service de Neurologie, Centre de Référence des maladies Neuromusculaires et Sclérose Latérale Amyotrophique, Marseille, France

F. Caillon
CHU de Nantes, Service de radiologie, Nantes, F-44000, France

E. Fleurence
J.Y. Mahé
Centre de Référence des Maladies Neuromusculaires Rares de l'Enfant et de l'Adulte Nantes-Angers, Nantes, F-44000, France
Établissement de Santé pour Enfants et Adolescents de la région Nantaise, Nantes, France

J. Perrier
Centre de Référence des Maladies Neuromusculaires Rares de l'Enfant et de l'Adulte Nantes-Angers, Nantes, F-44000, France

S. Barbarot
CHU de Nantes, Clinique dermatologique, Hôtel Dieu, Place Alexis Ricordeau, 44000 Nantes, France

S. Bézieau
CHU de Nantes, Service de Génétique Médicale, Centre de Référence Anomalies de Développement et Syndromes Malformatifs de l'inter-région Grand-Ouest, 9, quai Moncoussu, 44093 Nantes Cedex 1, France

L'IRM musculaire montre une infiltration adipeuse prédominante à la loge antérieure des cuisses avec épargne relative du droit fémoral et très diffuse aux jambes, épargnant relativement le tibial postérieur (Figure 2). L'électrocardiogramme est normal. Des explorations fonctionnelles respiratoires montrent un syndrome mixte restrictif et obstructif modéré chez un garçon suivi par ailleurs pour un asthme (CVF = 1,67 L (80 %), VEMS = 1,32 L (77 %), rapport de Tiffeneau = 79 %). À l'âge de 11 ans, un scanner thoracique ne retrouve pas de signe de fibrose pulmonaire, mais une parésie diaphragmatique gauche.

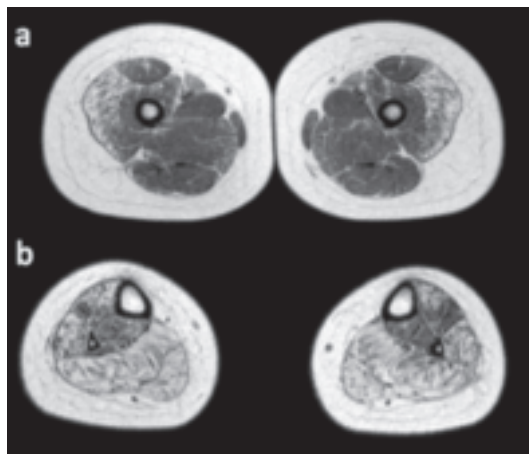


Figure 2
IRM musculaire des membres inférieurs à l'âge de 7 ans (coupes transversales : cuisses [a], jambes [b] ; séquence pondérée T1). Hyperintensités de la loge antérieure de cuisse, en particulier du muscle vaste externe, et de la loge postérieure de jambe (d'après [3]).

Une biopsie musculaire est effectuée dans le vaste externe et confirme l'infiltration adipeuse suspectée à l'imagerie (Figure 3a,b). Le tissu musculaire résiduel est composé à la fois de fibres totalement préservées et de fibres dystrophiques. Aucun foyer de nécrose/régénération, aucune anomalie neurogène ne sont mis en évidence. L'aspect histologique et immunohistochimique est aspécifique dans le tissu apparemment sain. La biopsie cutanée montre un aspect fibreux, sclérodermiforme, avec une altération du réseau d'élastine formant des petits globules dans le derme papillaire (Figure 3c,d).

Nous avons alors fait le lien entre cette observation et la publication sud-africaine de Khumalo [1] qui rapportait une famille multiplex avec cinq membres atteints sur deux générations présentant une poïkilodermie, des rétractions musculaires et une fibrose pulmonaire. Le mode de transmission était autosomique dominant au vu de l'arbre généalogique. Nous avons recherché une mutation survenue *de novo* chez l'enfant R. par une étude d'exome en trio (étude par séquençage haut-débit de l'ADN du cas

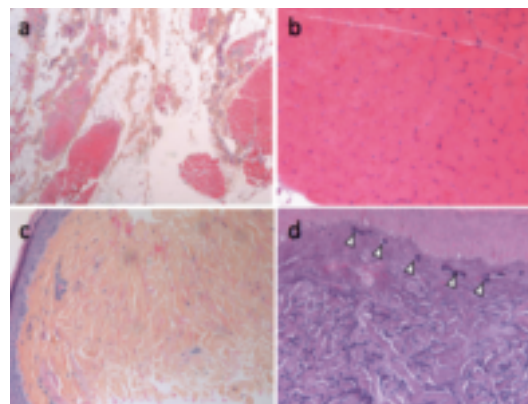


Figure 3
Biopsie musculaire (a, b) et cutanée (c, d). a : infiltration adipeuse diffuse (H&E x20) ; b : existence de fibres musculaires préservées (H&E x100) ; c : atrophie de l'épiderme avec aspect sclérodermiforme (H&E, x20) ; d : anomalies du réseau élastique avec formation de globules (flèches) (Weigert ; x150) (d'après [3]).

index et des deux parents asymptomatiques). Un seul variant, c.1879A>G (p.Arg627Gly), prédit pathogène a été mis en évidence dans le gène *FAM111B* (NM_198947.3) dont la fonction était alors totalement inconnue. Grâce à une collaboration avec l'équipe sud-africaine, nous avons pu confirmer l'implication de ce gène dans ce nouveau syndrome et établir le diagnostic chez l'enfant R.

Commentaire

Le syndrome POIKTMP lié au gène *FAM111B* a été décrit par notre équipe en 2013 [2]. Depuis, nous avons recensé une cohorte de 10 familles dont huit cas sporadiques [3]. L'atteinte cutanée de type poïkilodermie survient au cours des six premiers mois de vie de manière constante dans notre série. Le deuxième signe évocateur est l'apparition de la myopathie rétractile. Les rétractions musculaires concernent classiquement les triceps suraux, mais peuvent également concerner les membres supérieurs. L'âge d'apparition des rétractions est très variable : dès l'âge de 2 ans, mais généralement vers l'âge de 6-7 ans. La ténotomie des tendons d'Achille semble avoir de bons résultats sur l'ensemble des patients opérés. Le déficit musculaire est progressif touchant à la fois les membres inférieurs et supérieurs au niveau proximal et distal. Là encore, l'atteinte est variable allant de la perte de la marche à l'âge de 3 ans pour la patiente la plus sévère de la série jusqu'à un patient adulte asymptomatique sur le plan musculaire à l'âge de 38 ans. Le tonus axial est également concerné. Certains patients présentent une scoliose modérée. L'imagerie musculaire par IRM peut renseigner sur l'atteinte musculaire et son évolutivité. Une atteinte spécifique du muscle vaste latéral a été observée

chez le patient adulte asymptomatique. Le dosage des CPK peut être normal ou modérément élevé jusqu'à 500 UI/L. L'électromyogramme peut montrer un tracé myogène ou être normal. Une biopsie musculaire, effectuée chez six patients de la série, retrouve le même aspect histologique à savoir une infiltration adipeuse majeure avec du tissu musculaire résiduel d'aspect normal ou dystrophique. Il a également été décrit des infiltrats focaux lymphocytaires ou macrophagiques sans foyer de nécrose/régénération, ainsi qu'un aspect de fibres atrophiées avec centralisation nucléaire. Un *Western blot* effectué chez un patient a montré un déficit secondaire en calpaïne.

L'atteinte pulmonaire consiste généralement en un syndrome restrictif, mais certains patients ont développé, à l'âge adulte, une fibrose pulmonaire rapidement progressive en quelques années grevant le pronostic.

Le phénotype a été étendu à des atteintes digestives, en particulier à une insuffisance pancréatique exocrine. La stéatorrhée est retrouvée à l'interrogatoire. L'insuffisance pancréatique exocrine est confirmée par dosage de l'élastase fécale. Une atteinte hépatique peut également être présente avec une élévation chronique des transaminases (indépendante de l'élévation des CPK), une cholestase ou une hépatomégalie selon les patients. Une famille multiplex a été publiée par Seo *et al.* [4] rapportant, en plus de l'atteinte cutanée, une insuffisance pancréatique exocrine chez 5/9 apparentés, ainsi qu'une atteinte hématologique chez un patient (moelle osseuse hypocellulaire). Il n'y a pas d'atteinte musculaire décrite dans cette famille, mais le phénotype n'est pas très détaillé et aucune imagerie musculaire n'a été réalisée. Dans notre série, nous rapportons aussi une atteinte hématologique à type de thrombocytopénie et d'hyperéosinophilie.

Le spectre clinique de cette pathologie va s'affiner avec le suivi des patients et le diagnostic de nouveaux patients.

Sur le plan moléculaire, cinq mutations différentes ont été identifiées. Certaines sont présentes chez plusieurs patients sans lien de parenté entre eux.

Pour les cas sporadiques, nous avons pu montrer que les mutations étaient survenues *de novo* lorsque le prélèvement des parents était disponible. Il s'agit de mutations faux-sens prédites pour être localisées dans le domaine enzymatique de la protéine, un domaine trypsine-like sérine protéase. La fonction de FAM111B est encore très mal connue. Un rôle dans la réplication de l'ADN est suggéré [5], ce qui serait concordant avec le rôle de RECQL4, hélicase impliquée dans le principal diagnostic différentiel, le syndrome de Rothmund-Thomson. L'atteinte musculaire semble en revanche spécifique du syndrome POIKTMP.

Nous menons actuellement des études fonctionnelles dans le modèle poisson-zèbre, sur des fibroblastes myoinduits de patients et prochainement dans un modèle murin. Nous espérons que ces travaux conduiront vers une perspective thérapeutique pour cette pathologie multisystémique, encore aujourd'hui sous-diagnostiquée malgré un phénotype reconnaissable.

Hereditary fibrosing poikiloderma with retractile myopathy, and pulmonary fibrosis: a multi-system disease associated with mutations in the FAM111B gene

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Khumalo NP, Pillay K, Beighton P, *et al.* Poikiloderma, tendon contracture and pulmonary fibrosis: a new autosomal dominant syndrome? *Br J Dermatol* 2006 ; 155 : 1057-61.
2. Mercier S, Küry S, Shaboodien G, *et al.* Mutations in FAM111B cause hereditary fibrosing poikiloderma with tendon contracture, myopathy, and pulmonary fibrosis. *Am J Hum Genet* 2013 ; 93 : 1100-7.
3. Mercier S, Küry S, Salort-Campana E, *et al.* Expanding the clinical spectrum of hereditary fibrosing poikiloderma with tendon contractures, myopathy and pulmonary fibrosis due to FAM111B mutations. *Orphanet J Rare Dis* 2015 ; 10 : 135.
4. Seo A, Walsh T, Lee M, *et al.* FAM111B mutation is associated with inherited exocrine pancreatic dysfunction. *Pancreas* 2015 ; Oct 22. doi : 10.1097/MPA.0000000000000529.
5. Aviner R, Shenoy A, Elroy-Stein O, Geiger T. Uncovering hidden layers of cell cycle regulation through integrative multi-omic analysis. *PLoS Genet* 2015 ; 11 : e1005554.

eDystrophin : un nouvel outil dédié à une meilleure compréhension des dystrophinopathies

Rabah Ben Yaou, Aurélie Nicolas, France Leturcq, Élisabeth Le Rumeur

Rabah Ben Yaou

Centre de Recherche en Myologie ; Inserm UMR5 974 ; CNRS FRE 3617 ; Cellule bases de données ; Institut de Myologie, 75651 Paris, France
APHP, Groupe Hospitalier Universitaire la Pitié-Salpêtrière, Centre de Référence de Pathologie Neuromusculaire Paris-Est, Institut de Myologie, 75651 Paris, France

Aurélien Nicolas Élisabeth Le Rumeur

Université de Rennes 1, Avenue du Professeur Léon Bernard, 35043 Rennes, France, CNRS UMR 6290, Institut de Génétique et Développement de Rennes, 35043 Rennes, France

France Leturcq

Centre de Recherche en Myologie ; Inserm UMR5 974 ; Cellule bases de données ; Institut de Myologie, 75651 Paris, France
APHP, Hôpital Cochin, laboratoire de biochimie et génétique moléculaire, 75014 Paris, France

Contact

r.benyaou@institut-myologie.org

NOTE

¹ Notez que l'acronyme « DMD » est utilisé pour désigner la maladie (DMD pour l'appellation anglo-saxonne « Duchenne Muscular Dystrophy ») dont les initiales se trouvent correspondre à l'appellation française « Dystrophie Musculaire de Duchenne » et le gène *DMD* (qui comme tous les noms de gènes est conventionnellement écrit en italique).

Les dystrophies musculaires de Duchenne (DMD) et de Becker (BMD) sont deux formes phénotypiques sous-tendues par l'atteinte d'un même gène : le gène *DMD*. Classiquement, le phénotype sévère DMD résulte d'une mutation empêchant toute production de la protéine correspondante, la dystrophine, alors que le phénotype atténué BMD résulte de mutations compatibles avec la synthèse d'une dystrophine anormale en quantité et/ou en qualité.

La dystrophine principale du muscle (isoforme dp427m) est une protéine filamenteuse de type spectrine où l'on distingue quatre grands domaines de tailles différentes [14, 16] (Figure 1) (domaines N-terminal, central, riche en cystéine et C-terminal) (Figure 1). Chacun de ces domaines interagit avec plusieurs partenaires de la cellule musculaire dont le nombre va croissant et dont l'identification est loin d'être achevée. Leur connaissance est essentielle pour élucider la fonctionnalité de la dystrophine normale et de ses variants pathologiques. Le domaine central en particulier possède de multiples interactions avec les lipides membranaires qui maintiennent la dystrophine en contact avec le sarcolemme [17, 18], l'actine [2], la sérine/thréonine kinase Par-1b [39], les filaments intermédiaires de type synémines α et β [4], les microtubules [29] et une protéine enzymatique jouant un rôle clé dans l'activité musculaire, l'oxyde nitrique synthase neuronale ou nNOS [15, 20].

Les premières mutations du gène *DMD* ont été identifiées il y a 30 ans. La connaissance du spectre mutationnel de ce gène a progressivement permis de mieux cerner les corrélations entre le génotype *DMD* et le phénotype résultant. La grande majorité de ces mutations sont des délétions intragéniques entraînant la perte d'un ou plusieurs exons [1, 19, 34]. Les duplications exoniques et les mutations ponctuelles de divers types représentent aussi une part non négligeable des événements mutationnels du gène *DMD*. Comme le veut la règle de Monaco [21], lorsque le cadre de lecture résiduel est aboli, aucune protéine n'est produite et le phénotype est de type DMD, lorsqu'il est maintenu, une dystrophine tronquée est produite avec un phénotype BMD. Cette règle

permet d'expliquer la différence phénotypique entre les deux formes alléliques DMD et BMD. C'est sur ce principe que les stratégies thérapeutiques de saut d'exon au niveau transcriptionnel sont fondées [35]. Encore faut-il que la dystrophine tronquée ainsi produite après rétablissement du cadre de lecture ait une fonctionnalité suffisante permettant par exemple de « transformer » un malade DMD en un BMD. Or, comme l'indiquent les cas de phénotypes sévères, BMD sévères voire DMD, résultant de délétions théoriquement en phase, il est possible que la dystrophine tronquée résiduelle soit de qualité médiocre. Cela met en exergue non seulement l'importance de la production d'une dystrophine « viable » mais aussi de bonne qualité. Ainsi, toutes les dystrophines issues de mutations non-tronquantes (appelées aussi « quasi-dystrophines ») ne se valent pas [16]. Les travaux de Chamberlain sur les micro-dystrophines et mini-dystrophines ont permis de préciser les exons nécessaires et les exons indispensables permettant de maintenir une dystrophine fonctionnelle [12]. La perte d'interaction avec ses partenaires, l'effet « modificateur » de variants sur d'autres gènes et le retentissement sur la configuration secondaire et tertiaire de la quasi-dystrophine issues de mutations non-tronquantes sont autant de pistes prometteuses qui permettront non seulement de comprendre la variabilité phénotypique au sein des dystrophinopathies [11, 26] mais aussi de sélectionner les quasidystrophines les plus optimales dans le cadre du saut d'exon thérapeutique.

Dans cette optique, nous avons développé eDystrophin, une banque de données librement accessible sur internet et interactive permettant non seulement de prédire les conséquences structurales des mutations du gène *DMD* conservant le cadre de lecture mais aussi leurs conséquences phénotypiques et protéiques observées chez les patients qui en sont porteurs.

La dystrophine : le gène et la protéine

La dystrophine est une protéine encodée par un énorme gène, appelé *DMD*¹, situé sur le bras court du chromosome X en Xp21.2 [13, 22]. Il comporte 2,4 millions de paires de bases, ce qui en fait le plus

grand gène humain, et est composé de 79 exons. Les introns représentent 99 % de la taille du gène. Ce gène permet la synthèse de 7 isoformes principales de la dystrophine, de tailles différentes, grâce à la présence de 7 promoteurs tissu-spécifiques. Trois de ces promoteurs (appelés promoteurs M, B et P) sont situés en amont du premier exon et permettent la synthèse des dystrophines pleine longueur fonctionnellement équivalentes car ne diffèrent que par les quelques premiers acides aminés de leurs extrémités N-terminales (dp427m, dp427b et dp427p) alors que les 4 autres promoteurs sont intragéniques et permettent la synthèse d'isoformes de taille réduite (dp260, dp140, dp116, dp71). Nous ne nous étendons pas sur les nombreuses isoformes secondaires produites par épissages alternatifs internes au gène. La dystrophine pleine longueur est constituée de 3 685 acides aminés pour un poids moléculaire de 427 kDa. Elle est présente dans les tissus musculaires squelettique et cardiaque, le cerveau, la rétine, les cellules gliales et de Purkinje et en quantité très réduite dans les lymphocytes. Elle fait partie de la grande famille de protéines filamenteuses de type « spectrine », caractérisées par un domaine N-terminal se liant à l'actine ainsi que par la présence de motifs répétés homologues à ceux de la spectrine appelés « répétitions ».

La dystrophine est composée de quatre grands domaines [14, 16] (Figure 1) :

- Le domaine N-terminal ou domaine de liaison à l'actine (*Actin Binding Domain* ou ABD1), comprenant les premiers 246 acides aminés. Ce domaine est lui-même constitué de deux sous-domaines dits « homologues à la calponine » (CH1 et CH2) réunis par un fragment en hélice α . En plus de sa liaison à l'actine, ce domaine lie également les kératines 19 et 8.
- Le domaine central (ou *rod domain*) va de l'acide aminé 247 au 3045. Il représente ainsi 76 % de la protéine. Il est constitué de 24 répétitions homologues à la spectrine (ou *spectrine like*, R1 à R24) et de 4 charnières riches en proline (ou « hinges », H1

à H4) divisant le domaine central en 3 sous-domaines. Ce domaine central possède diverses interactions avec les lipides membranaires *via* 2 domaines de liaison aux lipides (*lipid binding domain* ou LBD) au niveau des répétitions R1-R3 (LBD1) et R4-R19 (LBD2) qui maintiennent la dystrophine en contact avec le sarcolemme [17, 18], l'actine (domaine ABD2, répétitions 11-17) [2], la sérine/thréonine kinase Par-1b (répétitions R8-R9) [39], les synémines α et β qui sont des protéines de la famille des filaments intermédiaires (répétitions R11-R14) [4] et l'oxyde nitrique synthétase neuronale ou nNOS (répétitions R16-R17) [15, 20] et enfin les microtubules (répétitions R20-24) [29] permettant de maintenir près du sarcolemme cette protéine enzymatique jouant un rôle clé dans l'activité musculaire.

- Le domaine riche en cystéine (*cysteine rich repeats* ou CRR) va de l'acide aminé 3080 à 3360. Il est composé de quatre sous-domaines : 1 domaine appelé « WW » (2 tryptophanes séparés par 21 acides aminés), 2 domaines en « main EF » (« EF hand », EFH1 et EFH2) organisés en hélice-boucle-hélice et d'un domaine en doigt de zinc (ZZ). Le domaine CRR se lie avec le β -dystroglycane (β -DG) qui, en interagissant avec l' α -dystroglycane et les sarcoglycane, forme le complexe dystrophine-glycoprotéines (DGC) [5, 9]. Il se lie aussi à la synémine α [4], la plectine [31], la myosprine (protéine kinase de type A) [29] et l'ankyrine [3].

- Le domaine C-terminal formé des 325 derniers résidus est composé de faisceaux d'hélices similaires à ceux présents dans le domaine central. Il interagit avec la dystrobrevine, les syntrophines et la myosprine [24, 30, 32, 33].

La dystrophine est localisée sous la face interne du sarcolemme en lien intime avec les glycoprotéines sarcolemmiques formant le complexe DGC. Elle joue un rôle essentiel durant le cycle contraction-relaxation musculaire. En formant un lien entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette d'actine, la dystrophine protège le sarcolemme de la rupture durant le stress induit par la contraction musculaire

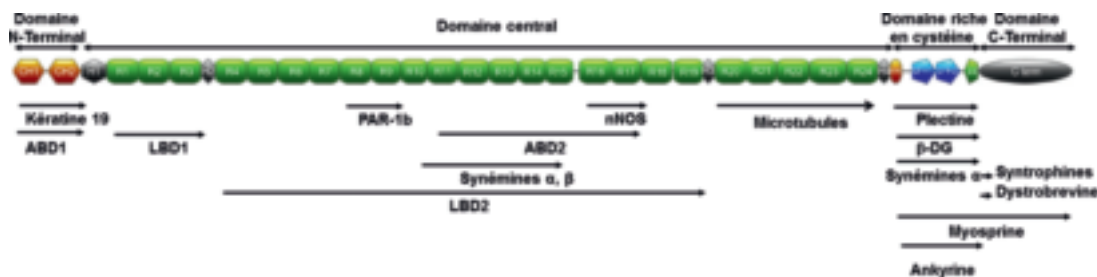


Figure 1

Les différents grands domaines de la dystrophine et les protéines interagissant avec elle. Voir texte pour les abréviations.

[27]. Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer les mécanismes moléculaires mis en jeu. Ces hypothèses font référence à sa structure filamenteuse et à ses nombreux domaines de liaison.

Les dystrophinopathies : spectre clinique et mutationnel

Les dystrophinopathies sont l'ensemble des affections causées par des mutations du gène codant la dystrophine [6, 19, 23, 34]. Elles sont transmises selon le mode récessif lié à l'X. Nous ne nous étendons pas ici sur les aspects cliniques détaillés. Les dystrophinopathies sont essentiellement représentées par :

- La DMD, dystrophie musculaire sévère de l'enfant, affectant 1 sur 3 500 à 6 000 garçons naissant par an, débutant classiquement vers 3-4 ans par des difficultés motrices aux membres inférieurs avec pseudohypertrophie des mollets, s'accroissant progressivement jusqu'à la perte de la marche autour de l'âge de 10 ans, avant 13 ans dans la grande majorité des cas. Apparaissent ensuite des atteintes musculaire axiale (cyspho-scoliose), respiratoire (insuffisance respiratoire restrictive) et cardiaque (cardiomyopathie dilatée) évolutives qui font toute la gravité de la maladie et sont souvent responsables du décès en général au cours de la 3^e décennie.

La BMD est une dystrophie musculaire moins sévère que la DMD, de début plus tardif à l'adolescence ou l'âge adulte, avec difficultés motrices et hypertrophie musculaire, mais moins évolutive avec quand même impotence fonctionnelle pouvant être majeure et aller jusqu'à la perte de la marche, entre 40 et 60 ans. En revanche une atteinte cardiaque est constante chez les BMD, devenant patente à partir de la 4^e décennie de vie, de sévérité variable pouvant nécessiter parfois une transplantation cardiaque. L'atteinte respiratoire est aussi présente mais beaucoup moins sévère et plus tardive que dans la DMD. Une atteinte cognitive de sévérité variable est plus fréquemment observée dans les DMD que dans les BMD, essentiellement retrouvée chez les patients porteurs de mutation en aval de l'exon 51.

La DMD et la BMD apparaissent ainsi comme les deux extrêmes du spectre phénotypique des dystrophinopathies. Entre ces deux entités, se retrouvent un certain nombre de patients dits « intermédiaires », perdant souvent la marche après 13 ans et avant 16 ans [8]. Exceptionnellement, certains patients, porteurs de certaines mutations, développent une cardiomyopathie dilatée sans atteinte musculaire squelettique associée avec cependant une élévation des CPK. À l'extrême bout du spectre clinique des dystrophinopathies, un certain nombre de patients a été rapporté

sous l'étiquette de dystrophinopathies « pseudométaboliques » avec intolérance à l'effort, rhabdomyolyse et hypertrophie musculaire ou élévation isolée des CPK. Beaucoup de ces patients développent par la suite une symptomatologie musculaire déficitaire et une atteinte cardiorespiratoire rejoignant ainsi le phénotype BMD. Enfin, bien qu'affectant théoriquement les garçons, certaines femmes porteuses hétérozygotes pour la mutation DMD peuvent manifester des symptômes en cas de translocation équilibrée impliquant le chromosome X ou d'inactivation réciproque non équilibrée des chromosomes X. Dans ces cas, peut être observée une atteinte cardiaque isolée ou musculo-cardiaque ressemblant souvent à celle observée dans la BMD et plus rarement de la DMD (on parle alors de « Duchenne féminin »).

Les mutations du gène DMD responsables des dystrophinopathies sont représentées par des grandes délétions d'un ou plusieurs exons (60 à 70 % des cas), des mutations ponctuelles (*i.e.* petites insertions ou délétions d'un ou plusieurs nucléotides, non-sens (stops directs), introniques et faux-sens (15 à 20 %) et des grandes duplications d'un ou plusieurs exons (10 à 15 %) [1, 19, 34]. La région centrale du gène s'étendant entre les exons 45 et 55 est la plus pourvoyeuse de délétions exoniques avec très souvent des délétions débutant à l'exon 45 (point de cassure proximal dans l'intron 44).

Les corrélations phénotype/génotype au sein des dystrophinopathies

La variabilité phénotypique inter- et intrafamiliale des affections génétiques est largement connue. Comment expliquer que des mutations dans un même gène puissent être responsables d'expressions phénotypiques aussi différentes allant des patients pauci-symptomatiques à des affections aussi sévères que la DMD ?

1. La règle de Monaco et ses exceptions

La référence pour expliquer la différence phénotypique entre les deux formes alléliques DMD et BMD est la règle proposée par Tony Monaco [21] sur la conservation ou non d'un cadre de lecture ouvert du transcrit (l'ARN) muté de la dystrophine. Si la mutation a pour conséquence d'entraîner un codon stop prématuré dans le transcrit mature, celui-ci sera dégradé par le système de surveillance des ARN dans la cellule (*nonsense mediated mRNA decay* ou NMD) et la conséquence sera une absence de production de dystrophine dans le muscle des patients conduisant à un phénotype sévère de DMD. En revanche, si cette mutation permet de maintenir un cadre de lecture ouvert dans le transcrit muté, la synthèse d'une dystrophine tronquée en quantité

normale ou réduite assurera un phénotype moins sévère de type BMD. Dans la majorité des cas de mutations ponctuelles et de délétions, cette règle s'applique, alors que la prédiction des conséquences des duplications est plus difficile.

Cette règle souffre cependant d'exceptions nombreuses mettant en exergue non seulement l'importance de la production d'une dystrophine « viable » mais aussi son caractère fonctionnel et la préservation de ses capacités à se lier avec ses principaux partenaires.

Les mutations prédites hors phase mais associées à un phénotype atténué

L'analyse des transcrits à partir de la biopsie musculaire permet d'expliquer comment des délétions mono-exoniques, comme par exemple celle de l'exon 45, prédites hors phase, ont été élargies en délétion en phase par un épissage alternatif de l'exon adjacent (ici l'exon 44) : la conséquence est la production minimale d'une dystrophine suffisamment exprimée pour entraîner un phénotype plus modéré [7]. Dans la partie N-terminale du gène, la réactivation d'un promoteur alternatif situé dans l'exon 8 pourrait permettre de rendre « silencieuses » certaines des délétions situées en amont (ex : délétion des exons 3 à 7), permettant la synthèse d'une protéine tronquée mais fonctionnelle. Si un épissage alternatif affecte un exon porteur d'une mutation « non-sens » dans le domaine répété de la dystrophine (exons 23 à 42), une délétion en phase est alors générée et une dystrophine active produite. Une mutation non-sens très distale dans le gène (après l'exon 70) pourrait ne pas être reconnue par le système NMD, permettant la synthèse d'une protéine déléetée de sa partie C-terminale mais toujours ancrée à la membrane par son site de liaison à la β -dystroglycane (exons 63-69).

Les mutations prédites en phase mais associées à un phénotype sévère

Lorsqu'une délétion exonique en phase touche un domaine fonctionnel essentiel comme celui du domaine de liaison à l'actine ou ABD1 au début du gène, le site d'ancrage de la protéine générée est alors aboli et le phénotype associé plus sévère. De la même façon, si l'étendue d'une délétion en phase débutant autour des exons 3 et 4 est trop large, on remarque souvent que le phénotype des patients qui en sont porteurs se rapproche davantage de celui d'une DMD que de celle d'une BMD. Un épissage alternatif aux bornes d'une délétion exonique en phase peut expliquer un phénotype sévère. La zone de liaison d'un des partenaires de la dystrophine, la nNOS, est codée par la partie du gène *DMD* située entre les exons 42 et 45. Elle se trouve abolie chez les patients porteurs d'une délétion en phase

emportant les exons 45 à 55, théoriquement tous exprimant un phénotype BMD. L'étude d'une grande série de tels patients montre une hétérogénéité clinique corrélée à l'expression et à la localisation perturbée de cette nNOS [11] sans que l'on connaisse encore les mécanismes expliquant ces différences.

2. Les autres facteurs modificateurs

Certaines exceptions ne sont pas explicables en tenant compte uniquement des différents éléments cités plus haut reflétant ainsi la nécessité de mieux disséquer les mécanismes moléculaires liant le génotype au phénotype. Cela permettra peut-être d'aboutir à une règle plus universelle que la règle de Monaco. Durant ces dernières années, d'autres facteurs ont été identifiés comme pouvant influencer sur la sévérité du phénotype au sein des dystrophinopathies.

- **Les gènes modificateurs** : L'étude parallèle du transcriptome et du génome a permis d'impliquer plusieurs gènes dont des polymorphismes pourraient avoir un rôle dans la modulation du phénotype chez les patients souffrant de DMD [37]. Ainsi l'expression de l'ostéopontine, codée par le gène *SPP1* dont le promoteur est activé par des protéines membres de la famille du TGF- β a pu être corrélée aux âges de perte de la marche variables chez les patients [28]. De même le rôle du TGF- β via la protéine LTBP4 (*Latent TGF- β binding protein 4*) est souligné dans des études de cohortes de patients dont la marche est perdue à des âges différents [10]. D'autres gènes modificateurs comme *ANXA6* codant l'annexine A6, protéine liant le calcium et jouant un rôle dans la réparation musculaire a été impliqué chez les modèles animaux type *Zebrafish* mais pas encore chez l'homme. Chez les chiens *GRMD* (*Golden Retriever muscular dystrophy*), modèle canin de la DMD, comportant pourtant une absence complète de dystrophine, l'atteinte musculaire modérée et la longévité quasi normale peuvent être expliquées par une surexpression du gène *Jagged1* codant une protéine régulatrice de la voie Notch [36].

- **La structure de la dystrophine** : À l'état normal, le domaine central de la dystrophine comporte 24 répétitions, constituées d'environ 109 acides aminés chacune. Ces répétitions sont très peu identiques entre elles mais sont toutes caractérisées par la succession de motifs en heptades le long de la séquence. Une heptade est définie par sept acides aminés successifs numérotés de « a » à « g » où les résidus en position « a » et « d » sont hydrophobes. Les répétitions d'heptades sont la base de la

structure en faisceau de trois hélices des répétitions de la dystrophine [16, 38]. Ainsi, chaque répétition est composée de trois hélices α reliées par deux boucles, le tout organisé en faisceau de trois hélices (*coiled-coil*) (Figure 2). Ces répétitions s'enchaînent

et sont liées par une hélice commune formée par la troisième hélice de la première répétition et la première hélice de la suivante et dont la partie centrale est appelée *linker* (Figure 2).

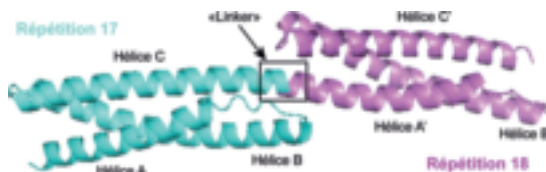


Figure 2

Structure en faisceau de trois hélices de deux répétitions successives de la dystrophine. La répétition 17 comporte trois hélices α (A, B et C) reliées par deux boucles. Elle s'enchaîne directement avec la répétition 18 (composée de trois hélices A', B' et C') par son hélice C via un « linker ».

La règle de Monaco a permis de comprendre la base des différences entre mutations qui décalent le cadre de lecture pour lesquelles il n'y a en général pas de dystrophine exprimée et un phénotype DMD associé, et celles conservant le cadre de lecture qui permettent l'expression de dystrophines tronquées, associées à un phénotype BMD réputé peu sévère. Le terme « partiellement fonctionnel » associé aux dystrophines tronquées est ainsi apparu comme le corollaire de l'adjectif « peu sévère » des phénotypes BMD. Cependant, même si cela reste une base importante, il convient de tempérer la règle de Monaco en examinant attentivement les cas de BMD avec diverses délétions exoniques. En effet, il y a des BMD sévères avec un âge de perte de marche et d'apparition d'une atteinte cardiaque relativement précoces. Nous avons fait l'hypothèse que les structures des différentes dystrophines

tronquées ne sont peut-être pas similaires et pourraient en partie expliquer ces variations de sévérité. Nous avons ainsi récemment montré que la structure de la dystrophine résultant de délétions exoniques en phase dans le domaine central était corrélée à la sévérité des patients qui en sont porteurs (Figure 3) [26]. En effet, les délétions des exons 45 à 48 et 45 à 51, observées chez des patients BMD, entraînent la formation d'une nouvelle répétition (dite répétition hybride) ressemblant aux répétitions sauvages et sont responsables d'un phénotype moins sévère (en terme d'âge de perte de la marche et d'âge d'apparition d'une cardiomyopathie) que les délétions des exons 45 à 47 et 45 à 49 qui aboutissent à la formation d'une nouvelle structure ayant des caractéristiques éloignées de celle des répétitions sauvages (appelées répétition fractionnée) [26].

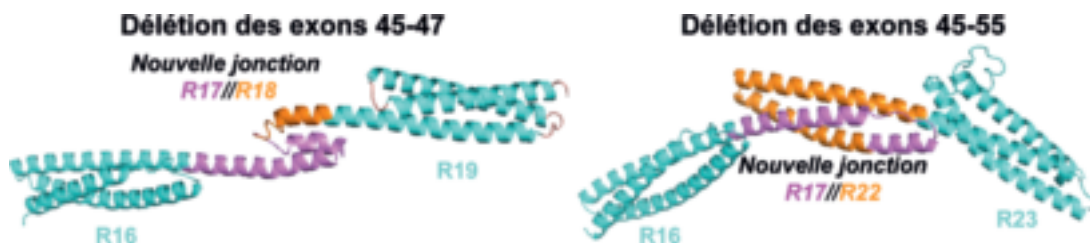


Figure 3

Exemples des délétions des exons 45-47 et 45-55. La délétion 45-47 enlève la moitié de la répétition 17 et les 4/5^{es} de la répétition 18 créant une nouvelle jonction (indiquée R17//R18) entre les séquences conservées de R17 et de R18. Cependant, cette séquence ne conserve pas la structure en *coiled-coil* de la région R17//R18. La délétion des exons 45-55 enlève la moitié de la répétition 17 et la moitié de la répétition R22 créant une nouvelle jonction entre les séquences conservées de ces deux répétitions. Cette séquence permet la reconstitution d'une structure en *coiled-coil* typique de la dystrophine.

Rappel bref sur les banques de données dédiées aux dystrophinopathies et mise en place d'eDystrophin

Une banque de données est une collection de données organisées (génétiques et cliniques...) gérées par un système de gestion de banque de données (Excel, Access, UMD, LOVD...). Il existe actuelle-

ment des centaines de banques de données dédiées aux pathologies humaines et quelques dizaines consacrées aux affections neuromusculaires, ces dernières compilant en général les données génétiques et cliniques de patients, soit publiées dans la littérature, soit identifiées dans des laboratoires de diagnostic génétique de ces affections. Concernant les

dystrophinopathies, la banque de données de Leiden (http://www.dmd.nl/nmdb/home.php?select_db=DMD_d) compile les mutations du gène *DMD* rapportées dans la littérature mais aussi celles soumises directement par les généticiens moléculaires qui le souhaitent. Depuis quelques années, de nombreux pays ont développé des banques de données dédiées à diverses affections neuromusculaires et plus particulièrement aux dystrophinopathies (voir liste exhaustive sur www.treat-nmd.eu/resources/patient-registries/list/). L'inclusion dans ces banques de données se fait soit par le professionnel de santé suivant le patient et/ou soit par un auto-enregistrement des patients via une interface internet. La banque de données UMD-DMD France (voir <http://umd.be/DMD/>), utilisant l'outil UMD comme système de gestion de banque de données, a été développée dans l'esprit de rassembler dans un lieu unique l'ensemble des données moléculaires et cliniques des patients dystrophinopathes analysés dans les 14 laboratoires de diagnostic des dystrophinopathies en France. L'accumulation de données concernant des milliers de patients permettrait non seulement d'établir des corrélations phénotype/génotype plus précises au sein des dystrophinopathies mais aussi de préparer l'arrivée des futurs traitements basés sur le gène. En effet, ces derniers s'appliquant sur des sous-groupes de patients porteurs de mutations spécifiques (délétions particulières, mutations non-sens), il était souhaitable que l'ensemble des patients français soient regroupés dans une banque de données unique.

Afin d'intégrer les conséquences structurales des mutations maintenant le cadre de lecture de la dystrophine, nous avons mis en place depuis 2012 une nouvelle banque de données appelée eDystrophin [25]. eDystrophin comporte un répertoire : (1) de toutes les mutations ne décalant pas la cadre de lecture, identifiées dans nos laboratoires ou rapportées dans la littérature, des phénotypes correspondants mais aussi des résultats de l'étude de la dystrophine en immunofluorescence et en *Western-blot* (WB) quand cette étude a été réalisée. Les délétions exoniques sont les plus fréquentes avec 61 % de toutes les mutations incluses dans eDystrophin, les duplications représentent 50 %, les mutations faux-sens 11 % et les petites délétions en phase 4 % et (2) des structures obtenues par modélisation par homologie des protéines résultant de ces délétions.

Cette banque de données pourrait permettre d'approfondir les corrélations phénotype/génotype en y associant un phénotype « structure protéique » apportant ainsi une meilleure connaissance des zones d'interaction de la dystrophine, plus proche de la réalité de la dystrophine dans le muscle. À terme, cela devrait donner des indications importantes pour

les thérapies de la DMD par saut d'exon. Ce type de thérapies a pour but de transformer un patient DMD en patient BMD. Les conséquences structurales prédites dans eDystrophin pourraient permettre un meilleur choix des délétions cibles à obtenir avec le saut d'exon où il s'agit d'obtenir un phénotype BMD le moins sévère possible.

eDystrophin

1. Mise en place

eDystrophin, librement accessible via l'adresse <http://edydrophin.genouest.org/>, est une banque de données interactive développée avec MySQL 5.1.37 dans la suite logiciel MAMP (<http://www.mamp.info/en/index.html>). Le site web est construit avec XHTML, PHP 5 et JavaScript. La banque et le site sont hébergés par la plate-forme BioGenouest (<http://www.genouest.org>) et fonctionne avec le serveur Apache 2.2.3. My Domains (<http://prosite.expasy.org/mydomains/>) est utilisé pour représenter les protéines mutées et l'application Jmol (<http://jmol.sourceforge.net/index.fr.html>) est implémentée dans la banque pour la visualisation des structures tridimensionnelles des protéines.

En plus des données structurales concernant les différentes dystrophines issues de mutations non-tronquantes générées à l'Institut de Génétique et Développement de Rennes, eDystrophin contient des données cliniques et protéiques globales observées chez les patients porteurs de ces mêmes mutations rapportés dans la littérature ou identifiés dans le laboratoire de biochimie et génétique moléculaire de l'hôpital Cochin. eDystrophin permet ainsi de confronter en un seul lieu les données structurales avec leurs conséquences cliniques et protéiques (Figure 4).

2. Rubriques

La banque eDystrophin est organisée en quatre sections : « Knowledge », « Explore database », « Statistics » et « Links » (Figure 5).

- La rubrique « Knowledge » : Rassemble des connaissances de base sur le gène *DMD*, en donnant à l'aide d'un schéma les bornes des 79 exons, la position des 7 promoteurs internes et la position des différents domaines protéiques codés par les exons. Un schéma indique également les différents exons codant les différentes isoformes de la dystrophine. Deux sous-rubriques sont consacrées aux différentes isoformes protéiques en termes de domaine structuraux et aux différents domaines de liaison aux protéines et lipides partenaires.
- La rubrique « Explore database » : Cette rubrique est essentiellement une rubrique de téléchargement de séquences ou d'informations concernant :

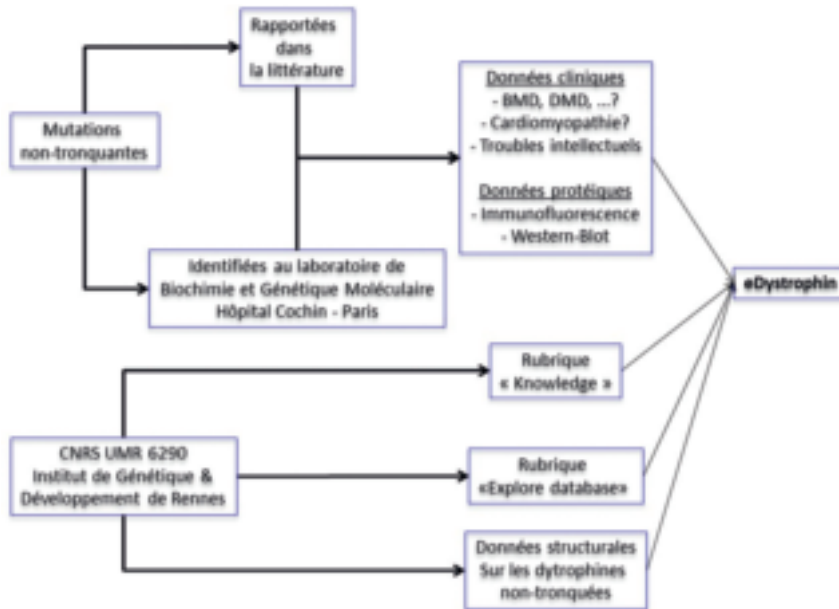


Figure 4
Sources du contenu actuel de la banque eDystrophin.

A

B

C

D

Figure 5
Accueil de la banque de données eDystrophin. (A) Bandeau d'accueil, (B) bandeau présentant les boutons interactifs permettant d'explorer la banque de données, (C) Présentation de la section « knowledge » montrant la sous-section « Dystrophin isoforms », (D) le bouton « Wild-type dystrophin » permet d'accéder à cinq sous-sections dans lesquelles le chercheur peut importer des données sur les isoformes de la dystrophine, les séquences des 79 exons, des domaines structuraux et des domaines d'interaction et enfin importer les structures ou les modèles tri-dimensionnels des différents domaines de la dystrophine.

- **La dystrophine sauvage** : isoformes, séquence exonique, domaines structuraux, domaines d'interactions, structure 3D de la dystrophine. Cette rubrique permet de télécharger toutes les données de base de séquences géniques ou protéiques, des domaines structuraux ou des domaines d'interaction avec les partenaires ainsi que les structures tridimensionnelles des domaines, obtenues soit par cristallographie soit par modélisation par homologie.

- **La dystrophine mutée** (mutations en phase) (Figures 6 et 7)

Cette partie est le cœur et l'une des plus riches de la banque eDystrophin. Elle fait le répertoire de toutes les mutations en phase connues du gène *DMD* avec des indications sur le nombre de patients répertoriés et les origines des données (données issues du laboratoire de biochimie et génétique moléculaire [hôpital Cochin, Paris] ou données publiées), les résultats de l'étude de la dystrophine en WB ainsi que le modèle par homologie de toutes les délétions exoniques ne décalant pas le cadre de lecture.

Les requêtes se font soit par types mutationnels (délétions, duplications, mutations faux sens), soit par protéines résultant de tel ou tel saut d'exon, soit par phénotype (DMD, BMD, IMD, cardiomyopathie, asymptomatique ou inconnu) ou soit par domaine impliqué dans la mutation.

- La Rubrique « Statistics » : comporte quelques statistiques générales sur les données figurant dans eDystrophin.

- La Rubrique « Links » : comporte des liens sur des sites utiles ainsi que la liste des références dont est extraite une partie des mutations incluses dans eDystrophin.

3. Utilisation

Nous présentons ci-dessous un exemple des données obtenues pour une délétion en phase très fréquente : la délétion des exons 45 à 47 (Figure 7).

Conclusion

Les dystrophinopathies représentent l'une des affections musculaires génétiques les plus fréquentes. La multiplicité de leurs expressions phénotypiques est sous-tendue non seulement par la diversité des mécanismes mutationnels mis en jeu dans le gène *DMD* mais aussi par les conséquences de ces mutations sur le transcrit et surtout sur la quantité et la qualité de la dystrophine finalement produite. Les modifications de la structure de la dystrophine résultant des mutations ne décalant pas le cadre de lecture interviennent dans la modulation fine du phénotype. La banque eDystrophin permet, par des requêtes simples, d'étudier les conséquences structurales des mutations *DMD* ne décalant pas le cadre de lecture. Nous encourageons la communauté médicale et scientifique à la consulter et l'utiliser pour mieux appréhender la variabilité des phénotypes observés mais aussi de mieux cibler les délétions d'intérêt dans le cadre de la thérapie basée sur le saut d'exon.

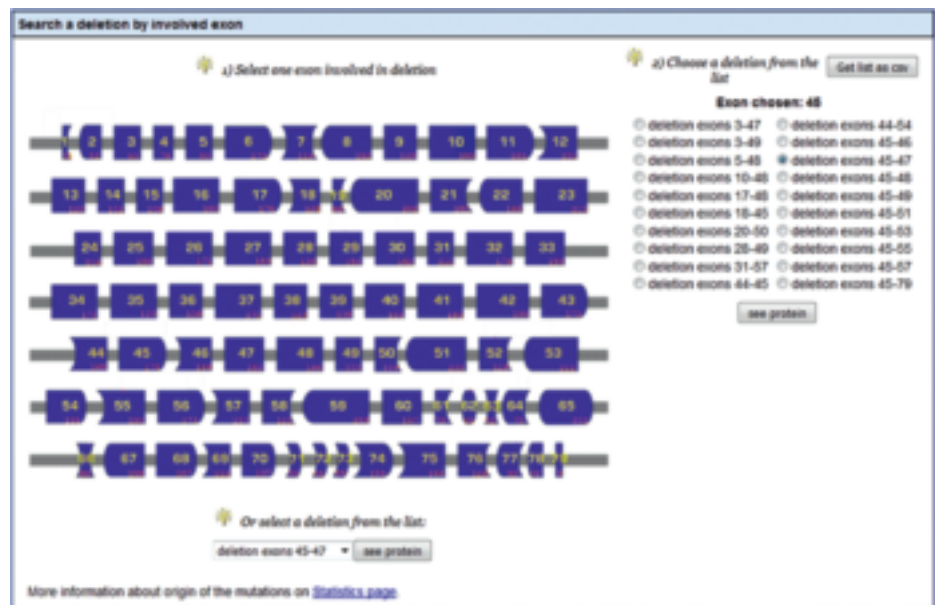


Figure 6

Exploration de la section « dystrophines mutées » de la banque de données. Après avoir activé le bouton délétions, le chercheur pointe sur ce schéma des exons du gène un exon impliqué dans la délétion d'intérêt. Apparaît le panneau à droite répertoriant les délétions impliquant cet exon. Le chercheur pointe alors la délétion d'intérêt. Activant le bouton « see protein » une sous-section s'ouvre (voir Figure 7).

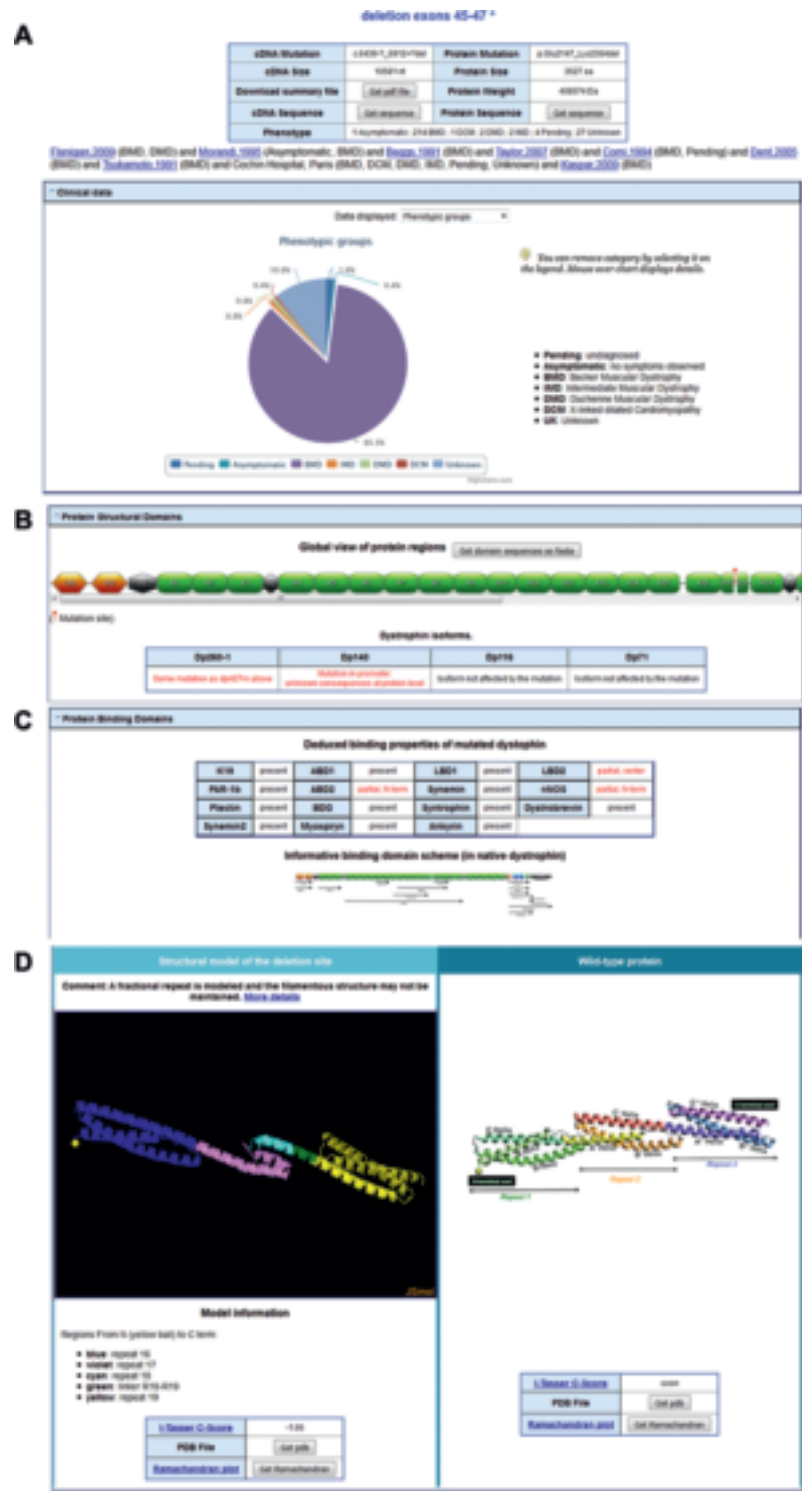


Figure 7
Exemple de résultat de la requête pour la délétion des exons 45-47. La partie A renseigne sur la distribution phénotypique des patients porteurs de cette délétion inclus dans eDystrophin avec la liste de références bibliographiques des patients publiés. La liste de choix « Data displayed » permet d'afficher plusieurs paramètres phénotypiques ou les résultats de l'étude de la dystrophine en *western blot*. La partie B permet d'afficher le ou les domaines altérés par la mutation. La partie C permet d'afficher l'état altéré ou conservé des domaines d'interactions de la dystrophine. La partie D permet d'afficher entre autres une représentation de la structure tridimensionnelle obtenue par modélisation de la nouvelle jonction entre la répétition proximale et distale bordant la délétion. eDystrophin précise entre autres si une répétition « hybride » ou « fractionnée » est reconstituée.

eDystrophin: a new tool for better understanding dystrophinopathies

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Aartsma-Rus A, Van Deutekom JC, Fokkema IF, *et al.* Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. *Muscle Nerve* 2006 ; 34 : 135-44.
2. Amann KJ, Renley BA, Ervasti JM. A Cluster of basic repeats in the dystrophin rod domain binds F-actin through an electrostatic interaction. *J Biol Chem* 1998 ; 273 : 28419-23.
3. Ayalon G, Davis JQ, Scotland PB, *et al.* An ankyrin-based mechanism for functional organization of dystrophin and dystroglycan. *Cell* 2008 ; 135 : 1189-200.
4. Bhosle RC, Michele DE, Campbell KP, *et al.* Interactions of intermediate filament protein synemin with dystrophin and utrophin. *Biochem Biophys Res Commun* 2006 ; 346 : 768-77.
5. Campbell K, Kahl S. Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature* 1989 ; 338 : 259-62.
6. Desguerre I, Laugel V. Diagnosis and natural history of Duchenne muscular dystrophy. *Arch Pediatr* 2015 ; 22 : 12S24-30.
7. Dwianingsih EK, Maluoka RG, Nishida A, *et al.* A novel splicing silencer generated by DMD exon 45 deletion junction could explain upstream exon 44 skipping that modifies dystrophinopathy. *J Hum Genet* 2014 ; 59 : 423-9.
8. Emery AE (ed). *Diagnostic criteria for neuromuscular disorders baarn*. The Netherlands: ENMC, 1994.
9. Ervasti J, Campbell K. Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell* 1991 ; 66 : 1121-31.
10. Flanigan KM, Ceco E, Lamar KM, *et al.* LTBP4 genotype predicts age of ambulatory loss in Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* 2013 ; 73 : 481-8.
11. Gentil C, Leturcq F, Ben Yaou R, *et al.* Variable phenotype of del45-55 Becker patients correlated with nNOSmu mislocalization and YR1R1 hypernitrosylation. *Hum Mol Genet* 2012 ; 21 : 3449-60.
12. Harper SQ, Hauser MA, DelloRusso C, *et al.* Modular flexibility of dystrophin: implications for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Nat Med* 2002 ; 8 : 253-61.
13. Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, *et al.* Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 1987 ; 50 : 509-17.
14. Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 1988 ; 53 : 219-26.
15. Lai Y, Zhao J, Yue Y, *et al.* Alpha2 and alpha3 helices of dystrophin R16 and R17 frame a microdomain in the alpha1 helix of dystrophin R17 for neuronal NOS binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013 ; 110 : 525-30.
16. Le Rumeur E, Winder SJ, Hubert JF. Dystrophin: more than just the sum of its parts. *Biochim Biophys Acta* 2010 ; 1804 : 1713-22.
17. Legardinier S, Hubert JF, Le Bihan O, *et al.* Sub-domains of the dystrophin rod domain display contrasting lipid-binding and stability properties. *Biochim Biophys Acta* 2008 ; 1784 : 672-82.
18. Legardinier S, Raguénès-Nicol C, Tascon C, *et al.* Mapping of the lipid-binding and stability properties of the central rod domain of human dystrophin. *J Mol Biol* 2009 ; 389 : 546-58.
19. Leturcq F, Tuffery-Giraud S. Genetics and molecular aspects of dystrophinopathies. *Arch Pediatr* 2015 ; 22 : 12S3-1.
20. Molza AE, Mangat K, Le Rumeur E, *et al.* Structural basis of neuronal nitric-oxide synthase interaction with dystrophin repeats 16 and 17. *J Biol Chem* 2015 ; 290 : 29531-41.
21. Monaco A, Bertelson C, Liechti-Gallati S, *et al.* An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics* 1988 ; 2 : 90-5.
22. Monaco AP, Neve RL, Colletti-Feener C, *et al.* Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature* 1986 ; 323 : 646-50.
23. Muntoni F, Torelli S, Ferlini A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol* 2003 ; 2 : 731-40.
24. Newey SE, Benson MA, Ponting CP, *et al.* Alternative splicing of dystrobrevin regulates the stoichiometry of syntrophin binding to the dystrophin protein complex. *Curr Biol* 2000 ; 10 : 1295-8.
25. Nicolas A, Lucchetti-Miganeh C, Ben Yaou R, *et al.* Assessment of the structural and functional impact of in-frame mutations of the DMD gene, using the tools included in the eDystrophin online database. *Orphanet J Rare Dis* 2012 ; 7 : 45.
26. Nicolas A, Raguénès-Nicol C, Ben Yaou R, *et al.* Becker muscular dystrophy severity is linked to the structure of dystrophin. *Hum Mol Genet* 2015 ; 24 : 1267-79.
27. Petrof BJ, Shrager JB, Stedman HH, *et al.* Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90 : 3710-4.
28. Piva L, Gavassini BF, Bello L, *et al.* TGFB2 but not SPP1 genotype modulates osteopontin expression in Duchenne muscular dystrophy muscle. *J Pathol* 2012 ; 228 : 251-9.
29. Prins KW, Humston JL, Mehta A, *et al.* Dystrophin is a microtubule-associated protein. *J Cell Biol* 2009 ; 186 : 363-9.
30. Reynolds JG, McCalmon SA, Donaghey JA, *et al.* Deregulated protein kinase A signaling and myospryn expression in muscular dystrophy. *J Biol Chem* 2008 ; 283 : 8070-4.
31. Rezniczek GA, Konieczny P, Nikolic B, *et al.* Plectin 1f scaffolding at the sarcolemma of dystrophic (mdx) muscle fibers through multiple interactions with beta-dystroglycan. *J Cell Biol* 2007 ; 176 : 965-77.
32. Sadoulet-Puccio H, Rajala M, Kunkel L. Dystrobrevin and dystrophin : an interaction through coiled-coil motifs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 ; 94 : 12413-8.
33. Sadoulet-Puccio HM, Khurana TS, Cohen JB, *et al.* Cloning and characterization of the human homologue of a dystrophin related phosphoprotein found at the Torpedo electric organ postsynaptic membrane. *Hum Mol Genet* 1996 ; 5 : 489-96.
34. Tuffery-Giraud S, Beroud C, Leturcq F, *et al.* Genotype-phenotype analysis in 2,405 patients with a dystrophinopathy using the UMD-DMD database : a model of nationwide knowledgebase. *Hum Mutat* 2009 ; 30 : 934-45.
35. Van Deutekom JC, Bremmer-Bout M, Janson AA, *et al.* Antisense-induced exon skipping restores dystrophin expression in DMD patient derived muscle cells. *Hum Mol Genet* 2001 ; 10 : 1547-54.
36. Vieira NM, Elvers I, Alexander MS, *et al.* Jagged 1 rescues the Duchenne muscular dystrophy phenotype. *Cell* 2015 ; 163 : 1204-13.
37. Vo AH, McNally EM. Modifier genes and their effect on Duchenne muscular dystrophy. *Curr Opin Neurol* 28 : 528-34.
38. Winder SJ, Gibson TJ, Kendrick-Jones J. Dystrophin and utrophin: the missing links! *FEBS Lett* 1995 ; 369 : 27-33.
39. Yamashita K, Suzuki A, Satoh Y, *et al.* The 8th and 9th tandem spectrin-like repeats of utrophin cooperatively form a functional unit to interact with polarity-regulating kinase PAR-1b. *Biochem Biophys Res Commun* 2010 ; 391 : 812-7.

Les troubles de l'oralité alimentaire dans les maladies neuromusculaires

Analyse et prise en charge

Danielle Ginisty, Hélène Rak-Merkin, Abdelkhaled Kaddour-Brahim

Les difficultés de passage à une alimentation en morceaux sont d'une extrême fréquence chez les enfants atteints de pathologies neuromusculaires, en rapport direct avec le déficit moteur dans son expression bucco-faciale.

L'oralité alimentaire de l'enfant évolue avec les deux dentitions, de la tétée quand le bébé n'a pas encore de dents vers l'alimentation à la cuillère puis, avec l'éruption des dents lactéales, l'alimentation en morceaux débute.

Les difficultés de passage de l'alimentation liquide à une alimentation plus épaisse puis solide sont d'une extrême fréquence chez les enfants atteints de pathologies neuromusculaires [1, 2]).

Premier temps de la déglutition

Le premier temps de la déglutition correspond au conditionnement dans la cavité buccale du bol alimentaire avant la déglutition proprement dite qui est un temps réflexe.

Ce temps réflexe postérieur intervient dès que le bol alimentaire passe de la cavité buccale vers le pharynx au niveau du rideau vélaire.

Passer de la tétée du lait à la mastication d'aliments solides, en morceaux, se fait sur une période longue fonction de l'éruption des molaires et surtout des dernières qui sont indispensables (de 18 à 30 mois) avec un nouveau geste mandibulaire de mastication.

- Lors de la tétée, la mandibule suit des mouvements de bielle avant-arrière avec une excursion sensiblement parallèle de la mandibule et de la langue qui vient au contact des lèvres et de la tétine ou du sein (déglutition de type I).

- Mastiquer demande de connaître le croquer puis de pouvoir triturer les morceaux avec une excursion latérale de la mandibule permettant l'écrasement des morceaux entre les molaires [3]. La déglutition se fait avec la langue en position de recul au palais (déglutition adulte).

Éléments pouvant perturber cette évolution praxique

Quels sont les éléments à prendre en compte pouvant perturber cette évolution praxique en cas de pathologies neuromusculaires ?

- **Bien manger, c'est d'abord manger sans douleurs**

Des dents saines c'est bien le premier objectif préalable à toute amélioration de la qualité de l'alimentation [4].

En l'absence d'hygiène buccale régulière, les gingivites sont d'une extrême fréquence, majorées par la respiration buccale *a fortiori* en cas de ventilation sous pression positive ; les gingivites sont douloureuses, s'accompagnent de saignements des gencives au brossage ; si le brossage n'est pas fait, les saignements comme le risque de caries augmentent. Les caries sont douloureuses à l'alimentation et sont à l'origine de foyers infectieux. Les cellulites et les phlegmons en sont la complication locorégionale la plus redoutable. Elles surviennent le plus souvent après des abcès dentaires à répétition.

La destruction des couronnes dentaires entraîne une réduction des possibilités masticatrices et peut majorer les difficultés alimentaires avec une stagnation pondérale.

Les soins dentaires sont donc le premier geste salvateur, si possible à l'état vigile, d'où l'importance du premier contact avec un praticien formé à l'abord de l'enfant, si possible au sein d'une équipe pluridisciplinaire, avec possibilité de relaxation psychomotrice ou équivalent.

L'anesthésie générale en cas de caries multiples ou compliquées d'abcès est souvent inévitable ; elle permet des soins efficaces puisque tous les soins conservateurs et les extractions sont réalisés dans le même temps après radiographies si besoin.

Insistons sur le nécessaire travail préventif relayé en milieu éducatif.

La limitation du grignotage, l'arrêt du biberon lacté ou sucré et la réalisation d'un brossage efficace le soir au coucher en sont les principaux éléments.

Leur application dès l'éruption des dents lactéales est la première mesure à prendre.

Danielle Ginisty

Professeur des Universités, Paris Descartes, ancien Chef de Service chirurgie maxillo-faciale et Stomatologie, CHU Necker-Enfants Malades

Hélène Rak-Merkin

Ancien Praticien Attaché Consultante, CHU Necker-Enfants Malades

Abdelkhaled Kaddour-Brahim

Praticien Hospitalier, CHU Necker-Enfants Malades

Contact

danielle.ginisty@aphp.fr

• Les contacts dentaires insuffisants

Meilleurs sont les contacts entre les arcades, meilleure est la mastication.

Les anomalies de croissance des maxillaires et particulièrement les béances (absence de contact entre les arcades dentaires) réduisent les contacts et l'efficacité de mastication (Figure 1).



Figure 1
Béance antérieure.

En cas de MNM, plusieurs facteurs expliquent les difficultés de prise en charge, fonction de la gravité de la pathologie :

Les traitements orthopédiques et particulièrement les corsets avec appui mentonnier

Ces traitements réalisent un traitement orthopédique *a contrario* sur la mandibule avec limitation de l'ouverture buccale (même si on enlève la mentonnière aux repas), et posture de défense de l'enfant menton en retrait ou évitement vers l'avant selon ses possibilités posturales.

D'où une mandibule en rétroposition dans le premier cas ou en proglissement parfois asymétrique dans le second (Figure 2).

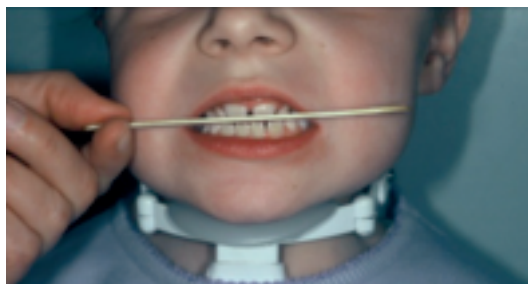


Figure 2
Promandibulie secondaire au port de la mentonnière d'un corset.

Aucun traitement orthodontique ne peut être efficace tant que le corset est en place.

Nous sommes donc très favorables aux nouvelles thérapies orthopédiques micro-invasives qui limitent ce conflit corset-mandibule.

Les difficultés ventilatoires

Ces difficultés expliquent la position bouche ouverte avec une position basse de la langue et une promandibulie avec béance.

Les masques du commerce utilisés classiquement pour la VNI sont des forces extra-orales comparables à celles utilisées en orthopédie dento-faciale mais d'action opposée à la bonne croissance du massif facial (Figure 2).

L'utilisation d'un masque sur mesure limite ces effets. En cas d'indication de ventilation sur trachéotomie, la prise en charge orthodontique peut être plus aisée.

Le déséquilibre musculaire entre langue, muscles masticateurs et mimique faciale

Le déficit moteur des muscles masticateurs entraîne à la fois faiblesse de mastication, limitation de l'ouverture buccale et inoclusion labiale, ce qui majore l'impact prédominant de la langue sur le développement de la mandibule [5].

Son interposition entre les arcades est à l'origine des béances (Figure 1) et de l'excès de croissance de la mandibule avec un maxillaire supérieur trop étroit d'où des contacts molaires peu performants. L'examen complet de la cavité buccale permet de différencier les anomalies accessibles à des traitements courants (troubles d'articulation phonétique ou des praxies de déglutition) des macroglossies (Figure 3) liées le plus souvent dans les maladies neuromusculaires à une infiltration graisseuse des fibres musculaires.



Figure 3
Macroglossie avec interposition permanente de la langue.

Les traitements orthodontiques après le début d'éruption des dents définitives permettent de favoriser la croissance du maxillaire supérieur à la condition d'une hygiène dentaire parfaite.

Mais ce traitement reste souvent insuffisant à long terme du fait de la macroglossie souvent d'apparition secondaire à l'adolescence. C'est pourquoi les glossoplasties sont dans notre expérience

d'indication tardive, le plus souvent à la demande de l'adolescent, pour améliorer l'alimentation, l'articulation phonétique, tenter de limiter l'incontinence salivaire. Elles restent exceptionnelles dans notre expérience comme les ostéotomies correctrices car un tel programme orthodontico-chirurgical est lourd à mettre en place [6, 7].

Les dysfonctionnements des loges masticatrices

Ces dysfonctionnements sont causés ou majorés par des contacts occlusaux anormaux sur des dents saines ou traitées. Il s'agit d'anomalies fonctionnelles qui s'ajoutent aux troubles moteurs liés aux maladies neuromusculaires.

Outre les difficultés alimentaires, les signes d'appel sont un bruxisme (grincements dentaires), des crampes douloureuses des muscles masticateurs ou un trismus (limitation d'ouverture buccale) au réveil, aux repas, ou encore des morsures parfois répétées de la langue des lèvres ou de la muqueuse des joues. La méthode choisie d'occlusodontie appliquée à l'enfant consiste en des meulages sélectifs [8, 9] ; elle est indolore, respecte la hauteur des dents naturelles et nécessite une simple consultation, chaque séance étant réalisée à 3-5 semaines d'intervalle.

Les conditions pour réaliser ce traitement sont une denture stable, et précisément l'absence de traitement orthodontique. Elle procure une détente immédiate des muscles masticateurs et un engrènement dentaire instantané optimal.

Cette méthode a été évaluée chez 75 enfants (38 de sexe féminin) présentant une pathologie handicapante sans troubles du temps réflexe postérieur de la déglutition, dont neuf atteints de maladie neuromusculaire.

Le premier impact concerne le changement de texture alimentaire pour ceux qui mangeaient mixé (31 enfants), la durée et la fatigabilité lors des repas pour les autres.

L'amélioration a été constatée chez 64 enfants (85 %) après trois séances en moyenne (1 à 6).

- 21 enfants sur le groupe de 31 (68 %) ont acquis la mastication avec le passage à une alimentation en morceaux.

- Le gain de force de mastication est patent pour la quasi-totalité des enfants mangeant des morceaux avant l'occlusodontie (43 enfants sur 44) avec une diminution de la durée du repas pour trois, une normalisation des repas pour 11, une fatigabilité moindre pour 18, une diversification alimentaire en particulier pour la viande (morceaux coupés moins finement) pour 10 enfants.

L'amélioration de la mastication n'a pas toujours été immédiate, le gain de force étant progressif jusqu'à 2 ans après le traitement (en denture stable et sans autre thérapeutique).

Le deuxième impact concerne la fréquence des fausses routes chez 12 enfants.

Les fausses routes occasionnelles en rapport avec la déglutition de morceaux non mastiqués ont totalement disparu dans sept cas et celles aux liquides dans neuf cas.

Enfin, un plus grand confort buccal a été obtenu - à défaut d'un changement alimentaire - chez onze enfants avec un impact positif sur bruxisme, trismus, morsures et fausses routes. Deux enfants de ce groupe présentaient une MNM (amyotrophie spinale de type II, et neuropathie sensitive sévère).

L'occlusodontie prend en compte des troubles fonctionnels d'origine occlusale favorisant un gain d'efficacité de mastication, de déglutition et un plus grand confort buccal.

Conclusion

L'examen stomatologique concerne l'ensemble des effecteurs du temps buccal avec un impact sur les praxies alimentaires, phonétiques ainsi que sur la croissance faciale.

L'analyse des anomalies permet de définir un plan de traitement spécifique tenant compte de la pathologie de chaque enfant et intégré au plan de traitement pédiatrique.

Feeding disorders in neuromuscular diseases: analysis and management

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Philpot J, Bagnall A, King C, *et al.* Feeding problems in merosin deficient congenital muscular dystrophy. *Arch Dis Child* 1999 ; 80 : 542-7.
2. Sparks S, Quijano-Roy S, Harper A, *et al.* Congenital muscular dystrophy overview. In : Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, *et al.*, eds. *GeneReviews*®. Seattle (WA) University of Washington, 1993-2016.
3. Gola R, Chossegros C, Orthlieb JD. *Syndrome algo-dysfonctionnel de l'appareil manducateur*. Paris : Masson, 1992.
4. Law CS, Sheehan M, Needleman HL. Centronuclear myopathy and nursing pattern caries: management of a 1 year old. *J Clin Pediatr Dent* 1995 ; 20 : 69-72.
5. Barker JH, David DJ Management of facial dysmorphogenesis in nemaline myopathy: a case report. *World J Orthod* 2005 ; 6 : 156-60.
6. Miller JR. Orthodontic treatment of a patient with Duchenne muscular dystrophy and macroglossia: how informed consent was critical to success. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2013 ; 144 : 890-8.
7. Bezak BJ, Arce KA, Jacob A, Van Ess J. Orthognathic surgery in patients with congenital myopathies and congenital muscular dystrophies: case series and review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg* 2016 ; 74 : 601-9.
8. Rigolet DA. Signes et diagnostic des troubles de l'occlusion. *Acta Odonto-Stomatol* 1976 ; 114 : 253-8.
9. Rak-Merkin H, Ginisty D. Le bruxisme ou la partie émergée de l'iceberg : comment l'éliminer. *Pediatr Prat* 2007 ; 185 : 10-2.

Retentissement des troubles cognitifs sur la vie sociale, professionnelle et émotionnelle des patients dans la forme adulte de la dystrophie myotonique de type I

Sabrina Sayah, Alexandre Morin

La forme adulte de la dystrophie myotonique de type I (DM1) est une maladie neuromusculaire qui, au-delà des symptômes somatiques, peut impacter les fonctions cognitives et plus spécifiquement les fonctions exécutives et la cognition sociale. Ces perturbations sont variables d'un individu à l'autre. Lorsqu'il existe une atteinte de la sphère exécutive et socio-émotionnelle, même discrète, elle peut avoir un retentissement important sur la vie sociale, professionnelle et émotionnelle des patients.

La dystrophie myotonique de type I (DM1) est une pathologie neuromusculaire définie sur le plan génétique par une expansion de triplets dans le gène *DMPK*. En plus des symptômes musculaires, le phénotype comporte des atteintes multisystémiques liées à une expression génétique très variable selon les tissus. Dans la forme adulte, l'atteinte cérébrale est de découverte récente et serait à l'origine de troubles cognitifs chez certains patients [1, 2]. Il est fréquemment décrit des hypersignaux de la substance blanche dont les plus typiques sont au niveau des pôles temporaux (*Figure 1*). L'étude de *Caso et al.* recense des anomalies de la substance blanche significatives chez 95 % des patients [3]. Des *patterns* diffus d'atrophie cérébrale de la substance grise au niveau des régions frontales, mais aussi temporales et pariétales, sont également mis en évidence (*Figure 2*) [4] en comparant les patients DM1 à des sujets contrôles à l'aide de la technique *voxel base morphometry*, permettant de comparer la densité de substance grise, voxel par voxel, dans les différentes régions cérébrales.

Au niveau moléculaire, l'expansion de triplet du gène *DMPK* est responsable de l'épissage anormal de certains gènes et donc de la production d'isoformes protéiques anormales. Il est ainsi retrouvé au niveau cérébral la présence d'une isoforme de Tau (protéines en lien avec certaines maladies neurodégénératives) spécifique à cette pathologie. Néanmoins, la corrélation entre les atteintes radiologiques et les atteintes cognitives n'a pas été démontrée. Un complément par imagerie de type *tracking de fibres* est prévu à l'Institut de la Mémoire et de la maladie d'Alzheimer (IM2A) et à

l'Institut de Myologie afin d'apporter de nouveaux éléments de réponse sur les mécanismes cérébraux sous-jacents à ces troubles. Les atteintes cognitivo-comportementales décrites dans cette pathologie peuvent avoir un retentissement conséquent sur la qualité de vie et sur l'insertion socio-professionnelle des patients [5]. Il paraît donc important, à la lumière de la littérature actuelle et des nouvelles données collectées dans le cadre du suivi habituel des patients à l'Institut de Myologie et lors d'une recherche effectuée à l'IM2A [6], de détailler les fonctions atteintes et les moyens de les prendre en charge.

Les fonctions exécutives

Les troubles cognitifs observés dans la DM1 concernent principalement les fonctions frontales et sont caractérisés par des difficultés exécutives et des troubles de la cognition sociale [2]. Les fonctions exécutives interviennent lorsque l'individu doit s'adapter à une situation nouvelle et que les schémas automatiques et routiniers ne sont plus suffisants. Elles permettent également d'adapter et de contrôler son discours, ses pensées et sa manière de répondre à une situation donnée. Les atteintes exécutives les plus fréquemment décrites chez les patients atteints de DM1 concernent la flexibilité mentale, l'inhibition et l'initiation. La planification, l'élaboration de stratégies et les capacités de mémoire de travail apparaissent quant à elle préservées [6].

L'inhibition permet de mettre de côté le schéma habituel afin de s'adapter à une situation nouvelle tandis que la flexibilité permet de passer d'une tâche à l'autre en fonction du but à atteindre. Des

Sabrina Sayah
Psychologue,
Neuropsychologue.
Institut de Myologie,
Centre de Référence
de pathologies
Neuromusculaires
(Pr Bruno Eymard),
Groupe Hospitalier
Pitié-Salpêtrière, Paris,
France.
Alexandre Morin
Interne en DES
de Neurologie.
Institut de Myologie,
Centre de Référence
de pathologies
Neuromusculaires
(Pr Bruno Eymard),
Groupe Hospitalier
Pitié-Salpêtrière, Paris,
France.

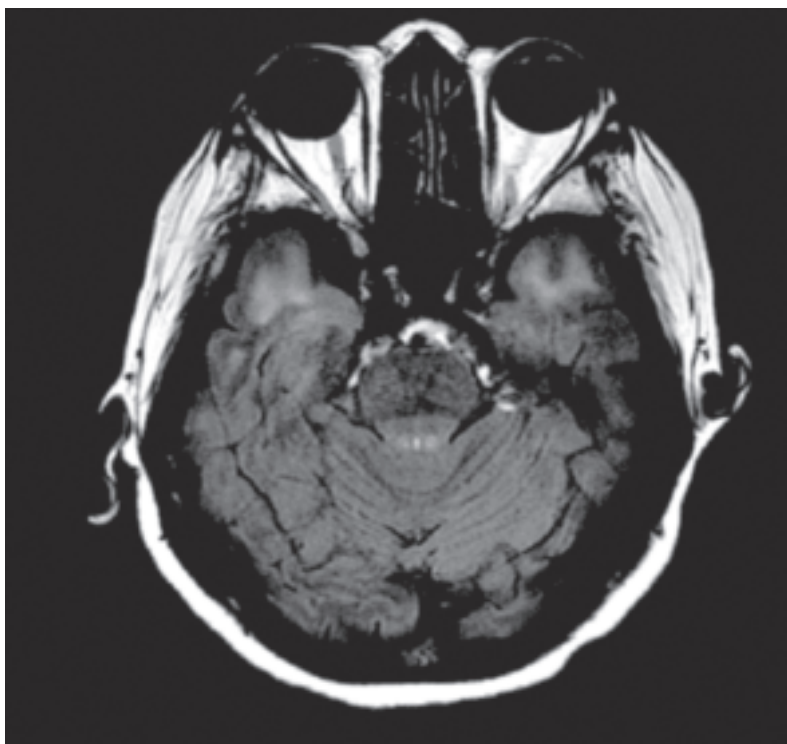


Figure 1
IRM cérébrale en T2 FLAIR : hypersignaux de substance blanche confluents des deux pôles temporaux.

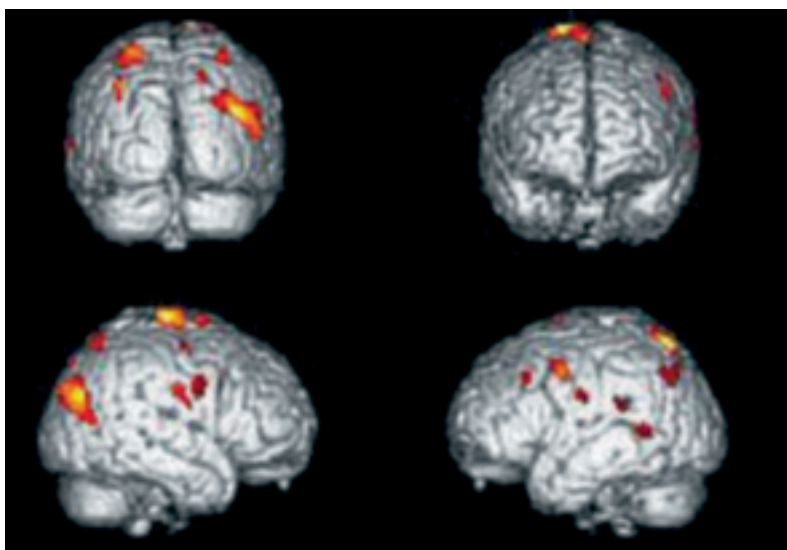


Figure 2
Patterns d'atrophie de substance grise en Voxel Base Morphometry chez les sujets DM1 adultes comparés à une population contrôle [4] (avec l'aimable autorisation de Antonini G *et al.*, 2004, NESMOS Department, University of Rome Sapienza).

difficultés d'inhibition et de flexibilité peuvent entraîner des conduites dites « persévératives » : le patient peut ainsi rester focalisé sur une seule et même idée pendant un long moment, reflétant non pas une personnalité rigide mais un défaut de

flexibilité et d'inhibition. Il est également fréquent d'observer des conduites impulsives et une tendance à interrompre l'interlocuteur pendant son discours. Ces difficultés peuvent pénaliser le patient dans sa vie professionnelle et sociale et entraîner des situations de rejet ou d'incompréhension de la part des autres. Certains patients peuvent présenter une réduction des comportements volontaires dirigés vers un but. Cette apathie est caractérisée par une difficulté à initier, planifier et maintenir un comportement moteur, une idée ou une stratégie. L'entourage perçoit souvent ce manque d'initiative comme un trait de caractère et il leur arrive de qualifier à tort leur proche de « paresseux », alors que ce comportement est le reflet d'une atteinte cognitive.

La cognition sociale

En ce qui concerne la cognition sociale, définissant l'ensemble des aptitudes et expériences émotionnelles et sociales régulant les relations entre les individus et permettant d'expliquer et prédire les comportements humains individuels ou en groupe [7], celle-ci peut être altérée notamment dans le champ de la théorie de l'esprit. La théorie de l'esprit fait référence à la capacité de se représenter et d'attribuer des états mentaux, des émotions et des intentions à soi-même et à autrui. Elle permet à l'individu de se décentrer de ses propres états mentaux afin de se mettre à la place de l'autre et de comprendre que certaines croyances ou désirs puissent différer d'une personne à l'autre. Des troubles de la théorie de l'esprit provoquent des situations sociales embarrassantes, des quiproquos ou des difficultés à comprendre l'ironie et le second degré. Les patients atteints de DM1 peuvent être gênés dans l'élaboration d'un sens sous-jacent à une situation sociale, un discours, une blague et par conséquent rencontrer des difficultés relationnelles importantes. Dans le milieu professionnel cette difficulté peut constituer un véritable obstacle par exemple lorsque le patient ne perçoit pas le mécontentement de son supérieur hiérarchique et persiste dans des comportements inadaptés à la situation créant ainsi un malaise dans la communication.

Il semble essentiel de noter que tous les patients ne présentent pas ces difficultés cognitives et qu'elles sont très variables d'un individu à l'autre en termes d'intensité et de répercussions dans la vie quotidienne. Quand ces troubles sont présents, ils peuvent amener à penser que les patients atteints de cette pathologie présentent une personnalité type. Il a d'ailleurs été montré que les patients atteints de DM1 présentent un profil de personnalité spécifique caractérisé par une baisse de l'expressivité émotionnelle. Ce déficit émotionnel peut être consécutif à une

réaction d'adaptation à la maladie et/ou au retentissement de l'atteinte des fonctions cognitives [8].

L'apport du bilan neuropsychologique

Compte tenu de l'impact de ces troubles sur la vie sociale, professionnelle et émotionnelle des patients, un bilan neuropsychologique centré sur les fonctions frontales peut être demandé dans le but d'investiguer la présence de ces troubles et d'en informer le patient et son entourage familial. La restitution du bilan peut alors permettre de débloquent de nombreuses situations d'incompréhension pouvant exister dans certaines familles. Une restitution psychoéducative constituerait également un moyen d'encourager l'entourage à attribuer certains comportements spécifiques à ces troubles cognitifs et non à un aspect négatif de la personnalité du patient. À terme, une prise en charge cognitive adaptée pourra être proposée.

Une recherche multicentrique est réalisée dans différents services hospitaliers prenant en charge des patients atteints de DM1. Cette étude, appelée OPTIMISTIC, se base sur une approche psychothérapeutique cognitivo-comportementale (TCC) [9] centrée sur les difficultés rencontrées dans la vie quotidienne dans le but de limiter les comportements, les pensées et les représentations qui en sont à l'origine. L'objectif est d'améliorer la qualité de vie des patients en se basant sur trois difficultés majeures retrouvées dans cette pathologie : la fatigue intense, la réduction d'initiative et les difficultés relationnelles. Ce protocole en cours a pour visée de prendre en compte ces difficultés d'ordre cognitif afin de les inclure dans une approche thérapeutique plus globale. Enfin, il est important de rappeler que le patient a une histoire de vie avec des problématiques propres ; les prises en charge se doivent alors d'être adaptées à chaque patient en fonction de ses besoins et demandes.

En conclusion

Il semble nécessaire, au vu des connaissances actuelles, d'intégrer l'évaluation et la prise en charge

des troubles cognitifs au parcours de soin des patients atteints de DM1. La mise en place d'un protocole d'imagerie avec *tracking de fibres* permettra à l'avenir d'apporter de nouveaux éléments de réponse sur les liens entre les mécanismes cérébraux et les troubles cognitifs dans cette pathologie. Cette technique utilisant l'IRM de diffusion permet d'analyser la densité des faisceaux de substance blanche selon leur localisation et d'évaluer leur intégrité. Une meilleure compréhension des manifestations cérébrales amènera certainement à une meilleure gestion de ces troubles.

Impact of cognitive impairment on the social, professional and emotional life of adult patients with myotonic dystrophy type 1

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Meola G, Sansone V, Perani D, Scarone S, Cappa S, Dragoni C, Cattaneo E, Cotelli M, Gobbo C, Fazio F, Siciliano G, Mancuso M, Vitelli E, Zhang S, Krahe R, Moxley RT. Executive dysfunction and avoidant personality trait in myotonic dystrophy type 1 (DM-1) and in proximal myotonic myopathy (PROMM/DM-2). *Neuromuscul Disord* 2003 ; 13 : 813-21.
2. Meola G, Sansone V. Cerebral involvement in myotonic dystrophies. *Muscle Nerve* 2007 ; 36 : 294-306.
3. Caso F, Agosta F, Peric S, Rakočević-Stojanović V, Copetti M, Kostic VS, Filippi M. Cognitive impairment in myotonic dystrophy type 1 is associated with white matter damage. *PLoS One* 2014 ; 9 : e104697.
4. Antonini G. Cerebral atrophy in myotonic dystrophy: a voxel based morphometric study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004 ; 75 : 1611-3.
5. Antonini G, Soscia F, Giubilei F, De Carolis A, Gragnani F, Morino S, Ruberto A, Tatarelli R. Health-related quality of life in myotonic dystrophy type 1 and its relationship with cognitive and emotional functioning. *J Rehabil Med* 2006 ; 38 : 181-5.
6. Morin A. *Étude des troubles cognitifs et comportementaux de la dystrophie myotonique de type 1*. Thèse de médecine, Université Paris Descartes, 2015.
7. Allain P, Aubin G, Gall DL. *Cognition sociale et neuropsychologie*. Bruxelles : De Boeck, 2012 : 400 p.
8. Bungener C, Jouvent R, Delaporte C. Psychopathological and emotional deficits in myotonic dystrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998 ; 65 : 353-6.
9. Van Engelen B. Cognitive behaviour therapy plus aerobic exercise training to increase activity in patients with myotonic dystrophy type 1 (DM1) compared to usual care (OPTIMISTIC): study protocol for randomised controlled trial. *Trials* 2015 ; 16 : 224.

Le séquençage de nouvelle génération (*Next-Generation Sequencing*, ou NGS) appliqué au diagnostic de maladies monogéniques hétérogènes

Notions essentielles pour le dialogue entre cliniciens et généticiens

Martin Krahn, Nicolas Lévy, Marc Bartoli

Le dialogue entre généticiens et cliniciens est devenu plus que jamais nécessaire avec l'implémentation du NGS pour le diagnostic génétique de pathologies hétérogènes. Une interaction étroite permet d'optimiser les possibilités d'un diagnostic précis, en retenant l'implication d'un gène dans la pathologie que présente le patient, par l'interprétation des mutations souvent nombreuses mises en évidence par les analyses de NGS dans une diversité importante de gènes. Pour cela, une connaissance synthétique du processus de NGS est dorénavant nécessaire en pratique clinique. Ce processus comporte de multiples étapes de génération et d'analyse des données, associées à un vocabulaire spécifique, dont nous souhaitons présenter les notions essentielles dans cette Fiche Pratique.

La commercialisation depuis 2005 des technologies de NGS a révolutionné au cours de ces dernières années la dimension des analyses génétiques par un changement majeur d'échelle des capacités de séquençage.

Ayant trouvé rapidement de nombreuses applications dans le domaine de la recherche, en particulier pour l'identification de nouveaux gènes impliqués dans des maladies monogéniques, le NGS a progressivement été validé pour des applications en diagnostic génétique.

Le NGS repose sur la génération massive de données de séquences obtenues par des cycles successifs d'incorporation de nucléotides, et ainsi l'émission de signaux qui sont ensuite convertis en information de séquence. Différentes technologies existent actuellement, notamment basées sur un séquençage en parallèle de millions de molécules d'ADN, avec une augmentation toujours croissante des capacités de séquençage associée à une diminution progressive des coûts, et de nouvelles approches sont en développement (en particulier le séquençage direct de molécules d'ADN uniques).

De manière schématique, le processus de NGS est constitué de *multiples étapes de génération et d'analyse des données*, avec la prise en compte de critères de qualité de séquençage (en particulier

l'analyse de la « *couverture* » et de la « *profondeur de lecture* » de la séquence d'intérêt), qui sont présentées de manière synthétique dans la *figure* en association avec des termes d'usage courant associés.

Le NGS permet dorénavant d'effectuer l'analyse de régions d'intérêt de grande taille, ce qui n'était pas possible avec le séquençage « classique » (méthode de Sanger) utilisé depuis les années 1980, en raison de limitations de coûts et de débit de quantités de séquences pouvant être générées, ce qui restreignait son application à des approches de séquençage « gène après gène », responsable dans de nombreux cas d'une longue errance diagnostique.

Avec une multiplication des capacités de séquençage dans un rapport de plusieurs dizaines voire centaines de milliers de fois par rapport au séquençage Sanger, le NGS a permis le développement de nouvelles stratégies d'analyses mutationnelles, dont trois principales sont actuellement utilisées :

- **Analyse de « listes de gènes » ou « panel de gènes »** : il s'agit de l'analyse simultanée de la séquence d'un certain nombre de gènes d'intérêt (habituellement une ou plusieurs dizaines). Comme pour le séquençage Sanger, l'analyse est habituellement centrée sur les régions codantes des gènes et les bornes introniques flanquantes, où est localisée

Martin Krahn
Nicolas Lévy
Marc Bartoli
Aix-Marseille Université,
Inserm UMR_S 910,
GMGF, 13385 Marseille,
France.
APHM, Département
de Génétique Médicale,
Hôpital Timone Enfants,
13385, Marseille, France.

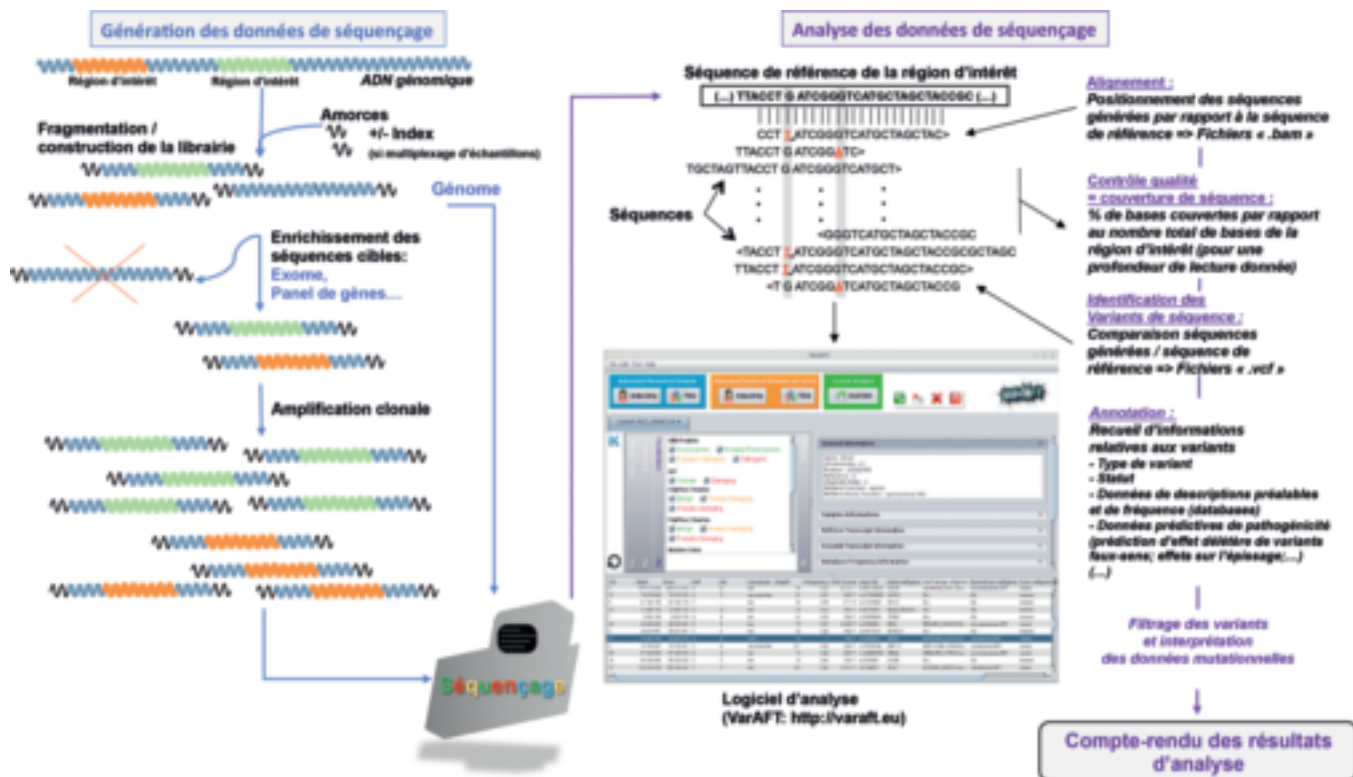


Figure 1

Principales étapes de génération et d'analyse de données de NGS. Les principales étapes de génération et d'analyse de données de NGS sont schématisées dans le cadre des techniques actuelles de séquençage parallèle à haut débit, avec une définition des principaux termes d'usage courant associés.

la majorité des mutations délétères. L'approche « panel de gènes » est actuellement la plus utilisée en diagnostic génétique, notamment pour analyser des listes de gènes connus comme étant impliqués dans un groupe de pathologies (par exemples les dystrophies musculaires, ou encore les myopathies ou les neuropathies périphériques au sens large). Certains « panels de gènes » très larges sont commercialisés et comportent la majorité des gènes répertoriés comme étant impliqués en pathologie humaine (plus de 4 000), dans la base de données OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*, www.omim.org). Ces « super-panels » sont également appelés « exomes cliniques ».

- **Analyse « d'exome »** (« *Whole Exome Analysis* / *WES* ») : cette approche consiste en l'analyse simultanée de la totalité des séquences codantes (et bornes introniques flanquantes) de tous les gènes du génome (environ 20 000), correspondant à environ 1 % du génome, soit environ 180 000 exons et 30 millions de paires de bases.

- **Analyse du génome** dans son intégralité (« *Whole Genome Analysis* » / *WGS*) soit 3 milliards de bases, comprenant les séquences codantes et non codantes.

Il est à noter que certains laboratoires ont choisi de mettre en place des stratégies de séquençage « large » (panel OMIM, exome, voire génome pour certains laboratoires pionniers anglo-saxons), puis d'effectuer un filtrage restreint sur liste de gènes d'intérêt, ce qui permet une « ouverture » du filtre d'analyse informatique à une liste plus grande en cas de résultat initial non concluant. Le choix de la stratégie prend actuellement en compte notamment les capacités des séquenceurs dont disposent les laboratoires, et en lien avec ceci les coûts de l'analyse.

La conséquence directe de l'augmentation des capacités de séquençage a été l'augmentation considérable des données mutationnelles à interpréter. À titre d'exemple, l'analyse de l'exome d'un individu génère en moyenne 25 000 variants par rapport à la séquence de référence du génome humain. L'objectif étant d'identifier la ou les mutation(s) délétères responsable(s) de la pathologie que présente le patient, le défi consiste à recueillir un maximum d'informations disponibles pour chacun des variants de séquence identifiés, et effectuer une interprétation à deux niveaux : juger du caractère pathogène ou non des variants, puis de leur lien avec la

pathologie concernée. Cette étape essentielle de l'analyse, appelée « *annotation* », permet grâce à des logiciels spécifiques de compiler des informations très diverses (type de variant, statut hétérozygote/homozygote/hémizyote, données de description et de fréquence de bases de données mutationnelles, données bioinformatiques prédictives de pathogénicité, données de ségrégation familiale, etc.), qui permettront d'appliquer des filtres de tri. Malgré l'utilisation de filtres, la conclusion n'est pas toujours évidente, et la validation de l'implication d'une/de mutation(s) d'un gène dans la pathologie que présente le patient est largement optimisée par une discussion conjointe des résultats entre généticiens et cliniciens. Néanmoins, le taux de diagnostic positif obtenu pour des analyses en NGS de cas index sporadiques reste limité à 25-50 %, selon les pathologies, avec des résultats équivalents pour les approches « *panel* » ou « *exome* ». Selon des études récentes, une relative amélioration est obtenue par le séquençage de génome dans sa totalité, sachant qu'une proportion probablement importante d'événements mutationnels délétères reste pour l'instant « *difficilement accessible* » en raison d'éléments insuffisants pour l'interprétation, en particulier pour des variants en régions non-codantes.

Avec le changement d'échelle associé aux analyses NGS, les comptes rendus d'analyse, et l'information à apporter aux patients se sont également complexifiés. À l'initiative de la Fondation Maladies Rares, un groupe d'experts a élaboré une notice d'information et un modèle de consentement à vocation nationale (disponibles en téléchargement : <http://fondation-maladiesrares.org/actualite/consentement-a-letude-des-caracteristiques-genetiques>), prenant en compte le contexte du NGS. Ces documents abordent en particulier la problématique des identifications « *fortuites/accidentelles* » (variants « *supplémentaires* » dans des gènes analysés en lien avec la pathologie que présente le patient, appelées identifications « *non-sollicitées* » ; ou sans lien, appelées « *identifications secondaires* »).

Afin de clarifier l'offre diagnostique par NGS, des réflexions ont été engagées dans le cadre des différentes filières nationales de maladies rares, et notamment FILNEMUS. L'objectif est de proposer sur le plan national une démarche homogène consistant en l'analyse de listes de gènes par groupe de pathologies, établies de manière conjointe entre généticiens et cliniciens, et utilisées de manière consensuelle par les laboratoires diagnostiques. Dans le cadre d'une démarche séquentielle, l'analyse peut notamment être réalisée dans un premier temps sur une liste restreinte de gènes, puis élargie en cas de résultat négatif ou non concluant à une liste plus importante, et finalement une analyse de l'exome (voire génome). De la même manière, un enjeu majeur réside en l'homogénéisation des démarches d'interprétation du caractère pathogène ou non des variants identifiés.

Le NGS est maintenant implanté dans les laboratoires diagnostiques. L'instauration récente du Référentiel des actes Innovants Hors Nomenclature (RIHN) déterminant la tarification des analyses de NGS, et la réflexion actuelle sur la mise en place de plateformes nationales de séquençage à très haut débit permettront de systématiser à l'avenir l'accès à ces technologies pour la prise en charge des patients.

Next-generation sequencing (NGS) applied to diagnosis of heterogeneous genetic disorders: essential concepts for dialogue between clinicians and geneticists

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Krahn M, Arveiler B. Le séquençage de nouvelle génération : principe, applications en diagnostic et perspectives. In : *Livre national d'enseignement - Génétique Médicale - DFGSM2/3*. Issy-les-Moulineaux : Elsevier-Masson, 2016.
2. Gorokhova S, Biancalana V, Lévy N, Laporte J, Bartoli M, Krahn M. Clinical massively parallel sequencing for the diagnosis of myopathies. *Revue Neurologique (Paris)* 2015 ; 171 : 558-71.

Imagerie et spectroscopie par résonance magnétique nucléaire du muscle strié squelettique

Utilisation comme outil d'évaluation pour les essais cliniques

Pierre G. Carlier, Benjamin Marty, Olivier Scheidegger, Paulo Loureiro de Sousa, Pierre-Yves Baudin, Eduard Snezhko, Dmitry Vlodayets

Au cours des dernières années, les traitements de nombreuses maladies neuromusculaires, jusqu'ici incurables, ont bénéficié d'importants progrès. Ce bouleversement contextuel a eu pour conséquence de stimuler le développement de nouveaux outils d'évaluation atraumatiques. Ceux-ci peuvent être classés en trois grandes catégories : les explorations fonctionnelles musculaires, les marqueurs des fluides biologiques et l'imagerie musculaire. Au sein de cette dernière, l'imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRMN) offre un très large éventail de possibilités pour caractériser la composition, la fonction et le métabolisme du muscle strié squelettique. Aujourd'hui, trois indicateurs RMN sont couramment intégrés dans les protocoles de recherche clinique : 1) le volume musculaire ou l'aire d'une section musculaire transversale ciblée, 2) le pourcentage de graisse intramusculaire et 3) le T2 de l'eau musculaire. Ils permettent de quantifier respectivement la trophicité du muscle, les dégénérescences graisseuses chroniques et l'œdème tissulaire (ou plus généralement « l'activité de la maladie »). Un quatrième indicateur, le volume de tissu contractile est facilement dérivable des deux premiers. Les cartographies de fraction graisseuse, souvent issues de séquences Dixon, ont fait la preuve de leur utilité pour détecter de subtils changements de composition musculaire et se sont, à plusieurs reprises, révélées plus sensibles que les évaluations fonctionnelles standards. Cet indicateur sera probablement le premier parmi ceux proposés à être validé comme paramètre principal par les organismes de régulation. La diversité des contrastes obtenus par RMN permet d'explorer de nombreuses autres pistes de caractérisation du muscle squelettique et de nouveaux biomarqueurs RMN sont à attendre dans un avenir plus ou moins proche. Des séquences à TE ultra-courts (UTE), le rehaussement tardif post-injection de gadolinium et l'élastographie par RMN sont en cours d'étude pour l'évaluation de la fibrose interstitielle du muscle squelettique. De nombreuses options existent pour mesurer la perfusion et l'oxygénation du muscle par RMN. La RMN de diffusion ainsi que l'utilisation d'algorithmes d'analyse de texture pourraient apporter des informations supplémentaires sur l'organisation musculaire aux échelles respectivement microscopiques et mésoscopiques. La spectroscopie RMN du phosphore ^{31}P est la technique de référence pour l'évaluation atraumatique de l'énergétique musculaire pendant et après exercice. Le spectre ^{31}P du muscle dystrophique au repos est notablement altéré, et plusieurs de ses résonances informent sur l'intégrité de la membrane cellulaire. D'importants efforts sont consacrés à l'accélération de l'acquisition des images au travers plusieurs approches, allant de l'extraction du contenu en graisse et des cartographies T2 au départ d'une unique séquence, jusqu'à l'utilisation de scénarios d'acquisition partielle des matrices. Dans un avenir proche, une diminution spectaculaire du temps d'acquisition est attendue. Cela renforcera l'attractivité des indicateurs RMN et facilitera leur intégration aux essais de recherche clinique.

Pierre G. Carlier^{1,2,3},
Benjamin Marty^{1,2},
Olivier Scheidegger^{1,4},
Paulo Loureiro de Sousa⁵,
Pierre-Yves Baudin⁶,
Eduard Snezhko⁵,
Dmitry Vlodayets⁷

¹ Institute of Myology,
Pitié-Salpêtrière
University Hospital, Paris,
France

² CEA, DSV, I²BM,
MIRcen, NMR
Laboratory, Paris, France

³ National Academy
of Sciences, United
Institute for Informatics
Problems, Minsk, Belarus

⁴ Bern University,
Inselspital, Department
of Clinical Research, Bern,
Switzerland

⁵ Strasbourg University,
CNRS, ICube, Strasbourg,
France

⁶ Consultants
for Research in Imaging
and Spectroscopy,
Tourmai, Belgium

⁷ N.I. Prirogov Russian
National Medical Research
University, Clinical
Research Institute
of Pediatrics, Moscow,
Russian Federation

P.G. Carlier
(corresponding
author)

Institut de Myologie
and CEA, DSV, I²BM,
MIRcen, Laboratoire
de RMN,
Pitié-Salpêtrière
University Hospital,
Bd de l'Hôpital, 75651
Paris Cedex 13, France

Contact
p.carlier@institut-
myologie.org

Motivations à l'utilisation de la RMN comme outil de mesure pour les maladies neuro-musculaires

La vision du corps médical sur les maladies neuro-musculaires s'est radicalement transformée au cours des deux dernières décennies. La majorité de ces pathologies est d'origine génétique et elles étaient jusqu'à présent peu curables. Les traitements disponibles étaient essentiellement de soutien ou palliatifs. Appartenant toutes à la catégorie des maladies rares, elles sont longtemps restées hors du champ de la recherche menée par l'industrie pharmaceutique. Aujourd'hui, les maladies rares ont été repositionnées au cœur des préoccupations, avec d'importants programmes de recherche initiés et financés par des institutions publiques au niveau transnational. Plus déterminant encore, les progrès de la thérapie génique et de la pharmacogénétique sont sur le point, si ce n'est déjà fait, de révolutionner l'impact de ces maladies sur la vie des patients (Muntoni et Wood 2011 ; Cirak *et al.* 2011 ; Arechavala-Gomez *et al.* 2012 ; Erriquez *et al.* 2013 ; Scotter et Shaw 2013 ; Douglas et Wood 2013 ; Mercuri et Muntoni 2013 ; Touznik *et al.* 2014 ; Bushby *et al.* 2014 ; Voit *et al.* 2014 ; Buyse *et al.* 2015 ; Blat et Blat 2015).

Suite à ces innovations thérapeutiques, de nouveaux besoins ont rapidement émergé, dont la nécessité de contrôler l'effet des traitements sur les muscles au cours du temps. Pour ce faire, de nouveaux outils de mesure étaient devenus nécessaires, et qui seraient, idéalement, atraumatiques, peu coûteux et fournissant des résultats faciles à interpréter. On peut en distinguer trois catégories : les outils fonctionnels, les biomarqueurs de fluides biologiques et l'imagerie. Les études fonctionnelles sont au premier plan, avec une variété de dispositifs et de protocoles, dont beaucoup sont optimisés pour la mesure de mouvements spécifiques, et d'autres visant plutôt à une évaluation de l'activité globale du patient (Scott *et al.* 2012 ; Mazzone *et al.* 2012 ; Servais *et al.* 2013 ; McDonald *et al.* 2013 ; Mayhew *et al.* 2013 ; Pane *et al.* 2014 ; Mazzone *et al.* 2014 ; Hogrel *et al.* 2014 ; Decostre *et al.* 2015 ; Lynn *et al.* 2015 ; Seferian *et al.* 2015a ; Seferian *et al.* 2015b). Ces derniers outils font partie d'une nouvelle discipline en pleine expansion, l'actimétrie, et offrent un accès inédit à une évaluation du patient dans son environnement personnel sur de longues périodes de temps. Autre innovation parmi ces outils, les marqueurs des fluides biologiques ont commencé à faire preuve de leur utilité, en particulier depuis la découverte et l'exploitation des μ RNA. Enfin, troisième

grande classe d'outils de mesure, l'imagerie est de plus en plus utilisée, bien qu'elle requière d'importants investissements en équipements (les appareils à ultra-sons les plus performants ne faisant pas exception). En outre, les méthodes tomographiques, la tomodensitométrie (CT) et la résonance magnétique nucléaire (RMN), sont pénalisées par leur absence de portabilité. Néanmoins, la RMN est la seule technique qui permet d'évaluer l'anatomie, la composition et la fonction du muscle au cours d'un même examen. Ces facultés de la RMN sont aujourd'hui de mieux en mieux comprises et appréciées, comme en témoignent les recommandations en matière d'imagerie émises par les instances régulatrices, EMA et FDA, pour l'homologation de nouveaux médicaments (voir *Figure 1*).

Dans cette revue, les auteurs essaient de donner une vue d'ensemble complète des études où le rôle d'outil d'évaluation de la RMN est évalué dans les faits ou discuté comme perspective d'avenir. Plutôt que de proposer un catalogue objectif mais impersonnel, ils ont choisi délibérément de faire part de leur commentaires et opinions en vue de guider le lecteur intéressé par une mise en pratique de l'imagerie quantitative. La part subjective de ce travail est pleinement assumée.

La quantification comme prérequis à l'utilisation de la RMN comme biomarqueur

Un indicateur de substitution (*surrogate marker*), d'une maladie ou d'une condition quelle qu'elle soit doit pouvoir, afin d'être utilisé comme biomarqueur (Vasan 2006 ; Strimbu et Tavel 2010) être exprimé comme une mesure quantifiée et faire la preuve de sa capacité à refléter des événements pathologiques spécifiques avec exactitude et précision. Pour y satisfaire, l'imagerie médicale a dû suivre un long processus d'évolution pour adjoindre une dimension quantitative aux habituelles descriptions qualitatives des maladies. Cela a été possible grâce à un apport constant d'innovations technologiques qui a donné lieu à de spectaculaires améliorations des appareils en termes de stabilité et versatilité, ainsi qu'au méticuleux développement de protocoles dédiés (Tofts 2003). Cette évolution a profité à tous les systèmes et les organes, y compris le muscle. Pour les pathologies musculaires, comme pour les autres maladies, les bénéfices sont multiples : une meilleure estimation de la sévérité de l'atteinte, la possibilité de surveiller la progression des altérations au cours du temps et, plus important encore, d'évaluer la réponse du muscle à une intervention thérapeutique (voir *Figure 2*).

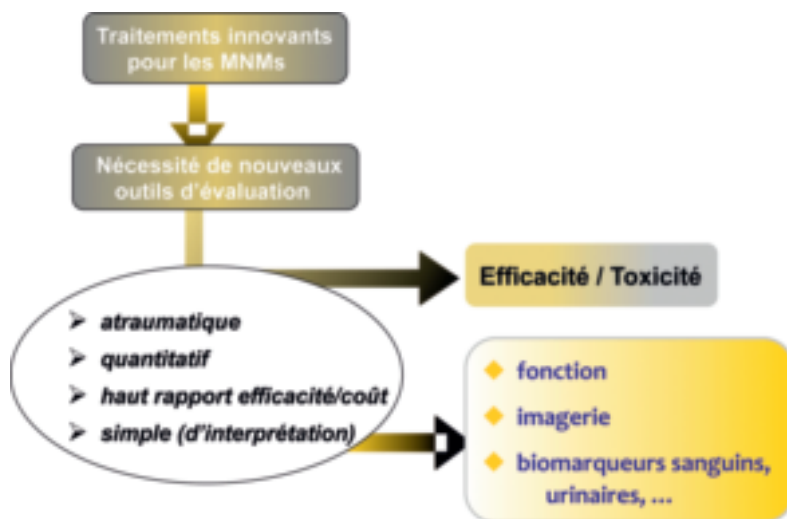


Figure 1

La découverte et l'introduction de traitements causaux pour un nombre croissant de maladies neuro-musculaires a généré des besoins nouveaux en matière d'outils d'évaluation pour s'assurer tant de l'efficacité que de l'innocuité de ces nouvelles options thérapeutiques. Au rang de ceux-ci, l'imagerie musculaire, en particulier par RMN, occupe une place de choix.

Les outils de mesure par RMN actuellement disponibles

L'imagerie et la spectroscopie par RMN peuvent générer quantité d'informations pertinentes sur l'anatomie du muscle, sa structure ou sa composition, sa physiologie et sa biochimie. Bien qu'un nombre important de variables RMN soient en cours de test et que leur place comme biomarqueur soit à l'étude, seules trois d'entre elles sont communément acceptées, sinon totalement validées, pour le suivi longitudinal du muscle squelettique. Elles sont quasi-systématiquement intégrées à la préparation des nouveaux essais thérapeutiques. Elles visent à évaluer :

- la trophicité du muscle, *via* des mesures de surface et de volume,
- le degré de dégénérescence musculaire *via* la fraction de graisse du signal RMN dans le muscle,
- l'activité de la maladie dans les pathologies évolutives, *via* le temps de relaxation T2 de l'eau musculaire (voir Figure 2).

La trophicité du muscle squelettique

Combinant une haute résolution spatiale, une dynamique de signal élevée, la possibilité d'acquérir en 3D, et des algorithmes efficaces de correction de distorsions (surtout dues à une non-linéarité des gradients), l'imagerie par RMN est de facto devenue la méthode anatomique de référence pour mesurer volumes et dimensions d'organes (Hunter *et al.* 2011 ; Jovicich *et al.* 2013 ; Mills et Tamnes 2014 ; Xi *et al.* 2014). Ce constat vaut au moins autant pour les muscles striés squelettiques que pour les autres organes. Même si l'exactitude des mesures est rarement évaluée, car nécessitant des autopsies, d'excellents résultats furent rapportés dans les cas où elle put être déterminée (Mitsiopoulos *et al.* 1998). En outre, il a été systématiquement montré que la reproductibilité et le pouvoir discriminant de l'imagerie par RMN sont très élevés (Wagner *et al.* 2008 ; Fischmann *et al.* 2013 ; Barnouin *et al.* 2014 ; Thomas *et al.* 2014), au moins autant qu'avec les ultrasons (Lima *et al.* 2012) ou la tomodensitométrie aux rayons X (Strandberg *et al.* 2010), et avec l'avantage d'une caractérisation tissulaire (voir paragraphe ci-dessous) très supérieure. Les exemples suivants illustrent la capacité de la RMN à identifier de subtils changements de trophicité du muscle. Suite à une injection de toxine botulique dans le gastrocnémien d'enfants infirmes moteurs cérébraux, une diminution de la masse de ce muscle de 4 % fut mesurée, compensée par une augmentation de 4 % de la masse du soléaire (Williams *et al.* 2013). Le coefficient de variation de l'estimation du volume des muscles des avant-bras oscille entre 0,8 et 5,7 %, suivant le muscle

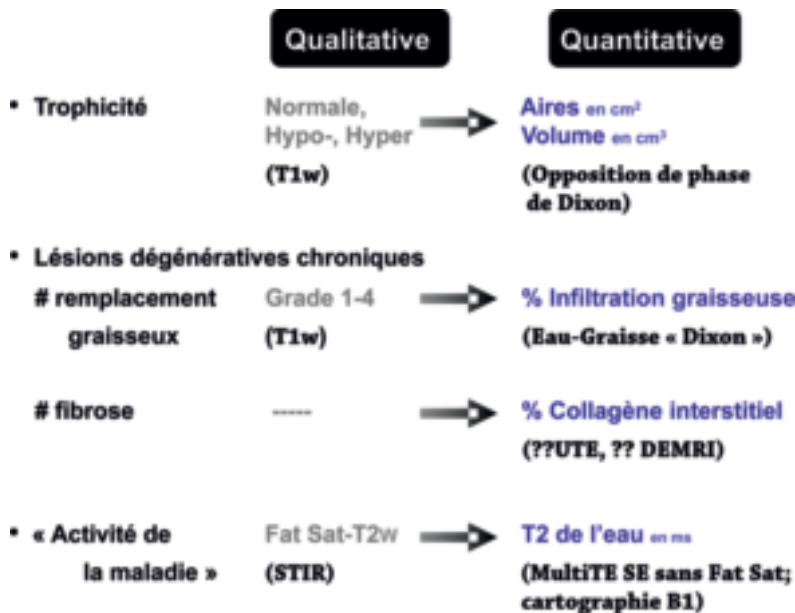


Figure 2

Comparaison des approches qualitatives et quantitatives de l'imagerie musculaire par résonance magnétique nucléaire.

Par un parcours fort similaire à ce qui s'est passé pour la plupart des organes, la RMN est devenue un acteur pivot dans l'imagerie quantitative des muscles squelettiques (Hollingsworth *et al.* 2012). Les variables et indices quantitatifs obtenus par imagerie et spectroscopie RMN sont les meilleurs candidats de l'imagerie médicale en vue d'une utilisation comme bio-marqueur ou outils d'évaluation dans les essais cliniques dédiés aux pathologies musculaires.

considéré (Smeulders *et al.* 2010). Les effets d'un « désentraînement » faisant suite à des semaines de protocoles d'exercices concentriques et excentriques combinés à des restrictions de perfusion ont été évalués et ont montré une dépendance de la perte de trophicité au protocole d'entraînement (Yasuda *et al.* 2015).

Dans la plupart des cas, la variable retenue est la trophicité du muscle plutôt que son volume. Une fois mesuré, le volume d'un muscle est normalisé par sa longueur, ou plus souvent par la longueur de l'os adjacent, afin d'obtenir un indice de trophicité.

Pour un muscle pathologique, il est préférable de baser l'indice de trophicité sur la masse vraie de tissu contractile plutôt que sur le volume global du muscle. L'indice de masse contractile est calculé avec la formule suivante : volume du muscle (ou aire de la section transversale) x (1 - fraction grasseuse), cette dernière provenant de l'analyse de l'imagerie eau-graisse (voir paragraphe suivant) (Wokke *et al.* 2014b).

Chez les garçons atteints de la maladie de Duchenne, le volume contractile des différents muscles mesurés séparément, a montré une relation complexe avec la diminution de la force du muscle correspondant. Cette dernière était proportionnelle à la perte musculaire au niveau du quadriceps, mais beaucoup plus importante qu'attendu par la seule

perte de tissu contractile dans les ischio-jambiers et le tibial antérieur (Wokke *et al.* 2014b).

Dans le muscle normal, ou quand la pathologie affecte le muscle de façon homogène, les aires de sections transversales mesurées à des hauteurs bien définies, par ex. à la moitié de la cuisse, fourniront des indices de trophicité pertinents (Morse *et al.* 2007 ; Tanaka et Kanehisa 2014 ; Hogrel *et al.* 2015) tout en réduisant considérablement les durées d'acquisition et surtout de post-traitement.

Toutefois, cette approche implique un positionnement rigoureux fondé sur des repères anatomiques. Ces repères peuvent être identifiés extérieurement, tels l'épine iliaque antéro-supérieure ou le bord supérieur de la rotule, ou partant d'images de repérage acquises au préalable (Fischmann *et al.* 2014). Les repères externes ont en général la préférence, pour pallier l'éventuelle difficulté à connaître la position de la table de la machine lorsque l'on passe d'une configuration d'antennes à une autre. Quoiqu'il en soit, il est bien plus aisé de compenser les variations longitudinales de positionnement entre examens successifs lorsque les structures osseuses sont entièrement présentes dans l'image. Il a été montré que la reproductibilité inter-examen de la mesure de l'aire de la section transversale est meilleure si l'on utilise des images de repérage plutôt que des repères anatomiques externes (Fischmann *et al.* 2014). Lorsque le processus de dégénérescence musculaire dû à la pathologie est particulier, par ex. progressant de distal en proximal, ou lorsque qu'il est inconnu, il est hautement préférable d'acquérir des volumes, ou d'assez grandes séries de coupes, couvrant la majeure partie du muscle.

Des problèmes supplémentaires surviennent avec la population pédiatrique, liés au processus de croissance. Lorsque l'intervalle de temps entre les examens est suffisant pour que la croissance montre ses effets, la mise en relation des coupes d'imagerie d'un examen à l'autre n'est pas simple à décider. Faute d'une meilleure solution, l'espacement entre les coupes est ajusté proportionnellement à l'allongement osseux. Avec des acquisitions 3D, cet ajustement peut être réalisé en post-traitement. S'il s'agit de séries de coupes 2D, l'écartement entre les coupes doit être augmenté en proportion de la croissance mesurée ; une action rarement entreprise étant donné qu'elle requiert une intervention au moment de l'acquisition elle-même.

En pratique, excepté pour certaines études spécifiques, une évaluation approfondie de la trophicité musculaire n'a, à ce jour, été que très rarement entreprise. Cela exige la patience de délimiter chaque muscle individuellement sur l'image, ce qui aujourd'hui doit être effectué à la main (voir

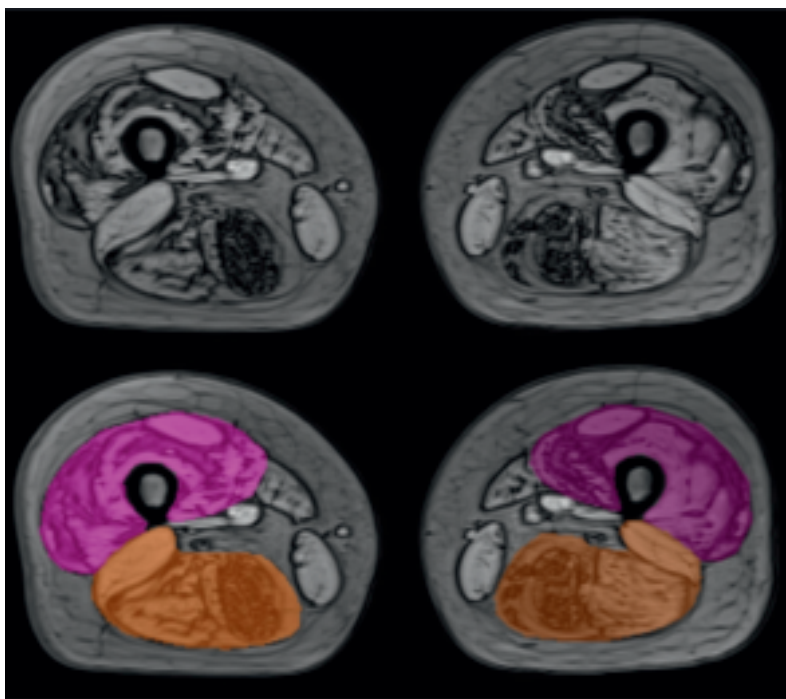


Figure 3
Exemple de segmentation manuelle du quadriceps et des ischio-jambiers, réalisée sur des images en opposition de phase d'une acquisition de type Dixon.

Figure 3). C'est une tâche longue, fastidieuse et peu gratifiante, ce qui explique pourquoi l'étude de la trophicité musculaire est le plus souvent laissée de côté. Très peu d'études longitudinales de la trophicité du muscle ont été réalisées sur des patients atteints de maladies neuro-musculaires. Un effet positif de l'enzymothérapie de substitution sur le volume musculaire des membres inférieurs a été observé chez des patients Pompe après seulement 6 mois de traitement (Ravaglia *et al.* 2010). Suite à une période d'observation de 6 mois, l'aire de la section transversale du mollet de patients atteints de myosite à inclusions a perdu 6,5 %, alors qu'aucun changement n'a été observé chez des patients Charcot-Marie-Tooth 1A (Morrow *et al.* 2015). Sur une cohorte réduite, et avec une méthodologie discutable, aucun changement de trophicité musculaire n'a été détecté dans les membres inférieurs de patients atteints d'une amyotrophie spinale (Sproule *et al.* 2011).

Des essais de développement d'outils de segmentation automatique ont été entrepris, mais très peu d'entre eux sont parvenus à générer des résultats fiables, et aucun n'a encore permis d'analyser des images de muscles pathologiques présentant des infiltrations graisseuses. Très récemment, il a été rapporté qu'un logiciel de segmentation automatique s'appuyant sur un modèle générique des résultats très proches d'une segmentation manuelle (Karlsson *et al.* 2015). Une approche naïve a également été proposée, où une estimation de la masse musculaire globale est calculée à partir de l'histogramme d'intensité de segments entiers de membres (Mattei *et al.* 2006). Cela n'offrirait que peu d'avantages par comparaison à de simples mesures

externes, et ignorerait le fait que les muscles ne sont habituellement pas atteints de façon homogène par la maladie. Dans la cuisse de chien GRMD, suivant le muscle considéré, il a été montré que la trophicité déduite du volume de muscle rapporté à la masse totale pouvait augmenter, rester stable ou diminuer avec l'âge (Kornegay *et al.* 2012). Si l'on se concentre sur les muscles modérément ou sévèrement atteints mais non entièrement détruits, la capacité à détecter une inflexion dans la progression de maladie s'en trouvera renforcée ; à l'inverse, par un effet de dilution avec les muscles peu atteints, une mesure globale voit sa sensibilité aux changements décroître. Une approche plus réaliste consisterait à se tourner vers des logiciels de segmentation interactive. Ici, l'implication d'un opérateur reste obligatoire mais, en pratique, c'est également le cas avec une méthode tout automatique, où il est nécessaire de parcourir le volume segmenté pour repérer les erreurs. Au moins un logiciel fonctionnant selon ce principe est en cours de développement, s'appuyant sur l'algorithme dit des marches aléatoires (Carlier *et al.* 2014). Ici, il suffit à l'utilisateur de marquer grossièrement chaque muscle, toutes les cinq ou dix coupes. Si les contours sont incorrectement détectés par l'algorithme, l'utilisateur n'a qu'à ajouter un coup de pinceau supplémentaire dans la région mal étiquetée. Des tests effectués sur les muscles de la cuisse ont montré que cette approche est comparable à une segmentation manuelle, que ce soit en termes de volume musculaire ou de variabilité inter-opérateur, tout en réduisant d'au moins un facteur dix le temps de travail (voir Figure 4). Une plus grande efficacité pourrait encore être atteinte en améliorant la réactivité du logiciel aux interactions, voire en introduisant une connaissance a priori de la forme des muscles ou de leur position relative.

La source de la difficulté à segmenter des images de muscles, ainsi que la principale cause de l'échec des méthodes automatiques, est l'absence fréquente de contours visibles séparant les muscles. Ceci est particulièrement vrai avec des images pondérées T1 standards ou pondérées T2 en écho de spin. Effectuer la segmentation sur des images possédant un bon contraste entre le tissu musculaire et les fascias est une manière d'améliorer la situation ; c'est par exemple le cas avec des images en écho de gradient acquises à certains temps d'écho spécifiques de telle sorte que les signaux de l'eau et de la graisse se retrouvent en opposition de phase (voir ci-dessous). Dans notre laboratoire, les mesures de trophicité sont systématiquement réalisées sur ce type d'images (voir Figure 3). Les tentatives d'utilisation

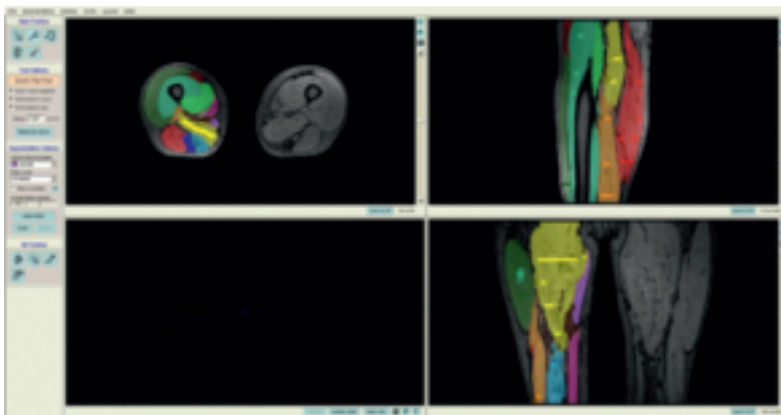


Figure 4
Accélération considérable de la segmentation musculaire par l'utilisation d'un logiciel interactif qui détecte les contours des muscles, assisté par quelques repères tracés par l'utilisateur. Les quelques traits tracés par l'utilisateur apparaissent en surbrillance sur les images. Le temps nécessaire pour la segmentation des muscles de la cuisse passe de plusieurs dizaines de minutes à quelques minutes.

de séquences d'imagerie de susceptibilité dédiées pour renforcer davantage le contraste entre les fascias et les aponévroses ont pour le moment échoué. L'absence fréquente de lésions dégénératives dans la population pédiatrique aux premiers temps de la maladie constitue une motivation supplémentaire pour disposer de mesures fines de la trophicité musculaire. Des neuro-pédiatres ont émis l'hypothèse que des altérations relativement légères de la trophicité pourraient être un indicateur précoce de l'atteinte musculaire (Robert Carlier et Susana Quijano-Roy, communication personnelle). La preuve doit en être apportée et l'accès à des méthodes de segmentation rapides et simples permettra d'en vérifier le bien-fondé.

Les altérations dégénératives chroniques

Les dommages chroniques aux myocytes mais aussi les anomalies structurelles des fibres ont pour résultat à long terme le remplacement du tissu contractile par de la graisse et/ou du tissu conjonctif. L'imagerie de la fibrose reste une question épineuse, qui sera traitée dans un autre paragraphe. À l'opposé, les changements dégénératifs graisseux sont facilement détectés et quantifiés, en tirant parti des différences entre les fréquences de résonance (déplacement chimique) ou encore entre les taux de relaxation T2, voire même T1 des noyaux d'hydrogène de l'eau et des lipides. Pour une revue technique exhaustive, voir Bley *et al.* ou Hu et Kan (Bley *et al.* 2010 ; Hu et Kan 2013).

Une classification visuelle de l'infiltration graisseuse sur des images pondérées en T1, par exemple à l'aide de l'échelle de Lamminen-Mercuri (Lamminen 1990), est suffisante à des fins diagnostiques mais est totalement inappropriée pour monitorer la progression des lésions dégénératives, qui est considérablement plus subtile à apprécier. À supposer que l'œil humain puisse classer les lésions dégénératives graisseuses entre 1 et 4 sans jamais se tromper, ce qui n'est certainement pas le cas, un changement de grade surviendrait en moyenne pour une augmentation de 17.6 % de la fraction graisseuse. Même les formes les plus sévères de dystrophie ne s'accompagnent pas d'un tel taux annuel de destruction musculaire. L'étude récemment réalisée par Willis *et al.* (Willis *et al.* 2013) a démontré sans ambiguïté l'impossibilité d'évaluer au moyen de la classification de Lamminen-Mercuri la progression de la dystrophie musculaire des ceintures chez des patients adultes atteints de la forme I. Il est parfois proposé comme solution d'afficher sur le même écran des images T1w acquises à différents moments durant le suivi du patient et de les confronter une à une, muscle par muscle. Procéder

de la sorte permet probablement de détecter des changements mais demeure hautement dépendant de l'observateur, avec un seuil de sensibilité inconnu et sans quantification, indispensable pour pouvoir comparer ou patients ou interventions. Des tentatives ont été faites il y a un certain temps (Leroy-Willig *et al.* 1997) mais aussi plus récemment (Pichiecchio *et al.* 2002 ; Mattei *et al.* 2006) pour séparer l'eau et la graisse par un seuillage appliqué à des images de routine pondérées en T1, en essayant de tirer avantage de l'apparente simplicité de cette approche. Certains travaux ont tenté de prendre en compte la possible co-existence de graisse et d'eau dans le même voxel et ont calculé la fraction graisseuse en utilisant une combinaison linéaire de signaux de graisse pure et de muscle pur (Leroy-Willig *et al.* 1997). Les études plus récentes ont juste opéré un classement binaire des voxels de la graisse et du muscle, ce qui est totalement inadapté à l'évaluation de l'infiltration graisseuse dans un contexte de maladie musculaire chronique (Pichiecchio *et al.* 2002 ; Mattei *et al.* 2006). Toutes ces approches basées sur l'utilisation d'images standards T1w supposent un émetteur radio-fréquence ainsi qu'une réception parfaitement ou quasi-parfaitement homogènes, ce qui n'est jamais le cas. C'était un postulat à peu près acceptable par le passé lorsqu'il était habituel de travailler sur des imageurs à faible à champ magnétique faible, 0.5T. Ce n'est plus le cas, pour les imageurs à haut champ, 3T ou plus, ou quand la réception du signal s'effectue via plusieurs rangées de bobines de surfaces. Il faut espérer qu'un jour des solutions techniques seront mises en œuvre et garantiront une très grande homogénéité d'émission et de réception et/ou des corrections parfaites de leurs imperfections en post-traitement. En attendant, nous déconseillons fortement le recours à une technique de séparation de la graisse et de l'eau musculaire basée sur des profils d'intensité de l'image. Cette approche est particulièrement trompeuse pour les non-experts qui pourraient être abusés par l'apparente simplicité de la méthode.

Pour le suivi des changements dégénératifs chroniques musculaires, on préfère aujourd'hui les séquences d'imagerie eau-graisse, le plus souvent appelées séquences Dixon (Ma 2008) (voir Figure 5). Elles mettent à profit le glissement de phase qui se développe progressivement entre le signal de l'eau et celui de la graisse au cours du temps d'évolution d'une séquence en écho de gradient. Le principal avantage de cette approche est que la séparation de l'eau et des graisses est, au premier ordre, indépendante de l'homogénéité du champ magnétique. Une conséquence importante

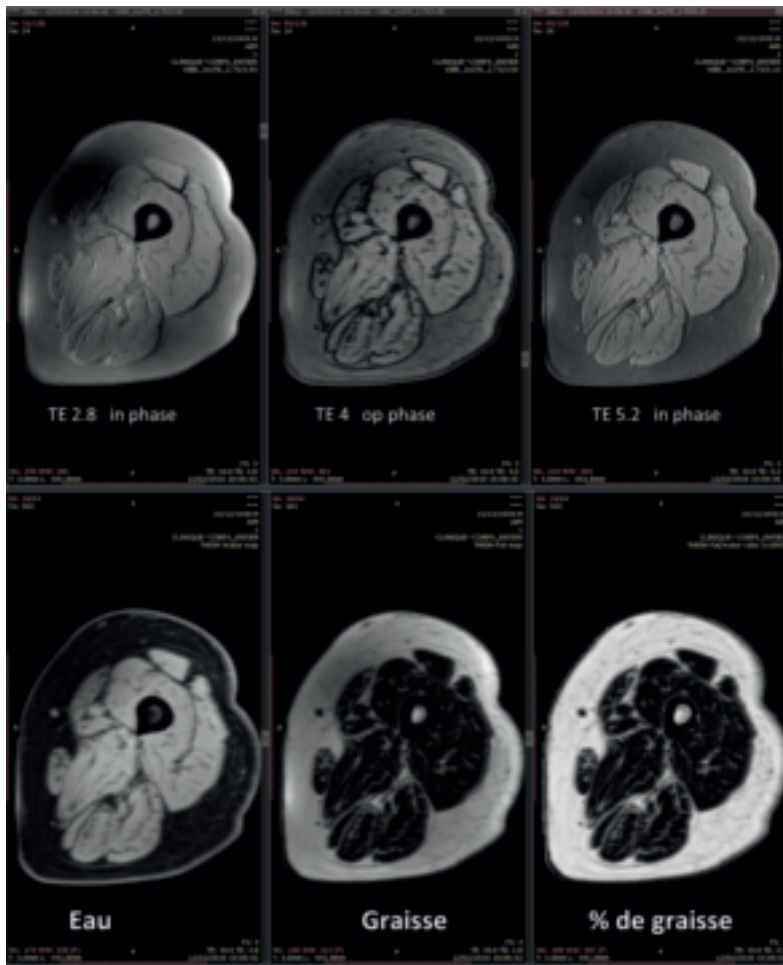


Figure 5
Exemple d'imagerie eau-graisse musculaire. Sur le panneau supérieur, les 3 images acquises par la séquence Dixon standard, avec l'eau et la graisse successivement en phase, en opposition de phase et à nouveau en phase. Sur le panneau inférieur, les 3 images calculées à partir des images natives, l'image de l'eau, celle de la graisse, et à droite, celle du pourcentage de graisse apparent.

est, qu'avec cette technique, il est possible d'explorer sans difficulté de grands champs de vue qui couvrent de grands volumes.

Dans la version standard du Dixon, seulement la résonance des méthylènes des lipides est prise en compte. Deux, ou mieux, trois images avec la graisse et l'eau successivement en phase et en opposition sont acquises et permettent l'extraction des composantes aqueuses et lipidiques. L'imagerie Dixon à deux points (éventuellement « élargie ») génère des résultats satisfaisants au niveau du foie. Cependant, pour des applications musculaires, des attributions erronées du signal de l'eau et la graisse peuvent se produire entre membres ou à l'intérieur de segments de membres, cette dernière étant particulièrement problématique (Hollingsworth *et al.* 2012). L'utilisation de séquences d'imagerie Dixon dite à trois points met presque toujours à l'abri de cet écueil.

Ignorer les autres résonances lipidiques génère un certain degré d'imprécision (Wokke *et al.* 2013). Celle-ci peut être réduite par une modélisation plus complète du spectre des lipides, habituellement avec 3 ou 4 résonances principales, ce qui nécessite la collecte de 6 échos et des calculs relativement lourds (Hu *et al.* 2012). Cette approche dénommée « décomposition itérative de l'eau et des graisses avec un écho asymétrique et une estimation par la méthode des moindres carrés » (IDEAL) et T2*-IDEAL, constitue la méthode la plus avancée actuellement disponible pour réaliser une imagerie eau-graisse. L'acquisition d'échos multiples implique un allongement des temps de répétition, ainsi que l'application de corrections pour les effets liés au T2*. La méthode IDEAL avec des échos multiples est celle qui mesure le plus précisément le pool d'hydrogène de la fraction grasseuse. Elle possède la capacité d'identifier d'éventuelles modifications du spectre lipidique, que celles-ci soient induites par l'alimentation ou par une pathologie. Il y a peu d'indications que ce soit le cas au niveau du muscle strié squelettique, ou si ces différences existent, elles sont de faible amplitude et difficilement détectables dans les conditions habituelles.

Si les intensités relatives du spectre lipidique dans les muscles infiltrés peuvent être considérées comme étant indépendantes de l'état du patient, ce qui semble une hypothèse raisonnable, il n'est pas nécessaire de passer par une acquisition avec 6 échos. Un facteur de correction linéaire peut être appliqué au signal de la graisse et la fraction de graisse exacte sera obtenue à partir d'une mesure standard à 3 points. Le facteur de correction calculé pour les conditions de notre laboratoire est de 1.82 (Azzabou *et al.* 2015c).

La façon d'exprimer la teneur en graisse musculaire peut également varier. On peut simplement regarder le pourcentage du signal RMN attribuable à la graisse dans le voxel ou dans le muscle. En fonction du temps de répétition des images et du temps d'écho choisis, des corrections pour les effets des pondérations T1 et T2 peuvent être appliquées. On peut aller plus loin et tenter d'exprimer le contenu grasseux en grammes de lipides par unité de masse ou de volume musculaire. Ces procédures ont été développées pour le foie et nécessitent des hypothèses supplémentaires ou des mesures de la composition en lipides du tissu (Longo *et al.* 1995). Comme déjà souligné, être et rester cohérent au plan méthodologique est la clé du succès dans les essais cliniques. La simplicité est un facteur vital pour assurer cette cohérence. Gardant cela à l'esprit, au moment d'écrire ces lignes, nous recommandons toujours pour l'imagerie eau-graisse du muscle

malade la méthode Dixon à 3 points, en 3D quand cela est possible, avec une forte pondération en densité de protons (par exemple, TR de 10 ms et un angle de bascule de 3°) (Hollingsworth *et al.* 2012). Le facteur de correction pour prendre en compte le spectre des lipides peut ou ne pas être appliqué et, en première intention, des cartes paramétriques du seul pourcentage de graisses sont générées. En procédant de la sorte, l'exactitude de la mesure peut être légèrement altérée mais pas la précision ou le pouvoir discriminant, qui sont les plus importants dans le cadre d'une étude longitudinale, qu'elle comporte ou non une intervention thérapeutique.

Lorsque la teneur en graisse intramusculaire est faible, il n'est pas nécessaire de déployer des processus hasardeux et compliqués (Kim *et al.* 2014 ; Azzabou et Carlier 2014). La détection des lipides peut facilement être sensibilisée en diminuant le TR dans le Dixon en 2D ou en augmentant l'angle de bascule en Dixon 3D tandis que l'exactitude de la fraction relative sera préservée par l'utilisation de facteurs de correction pour la saturation de l'eau.

Bien que la séparation eau-graisse basée sur la différence des déplacements chimiques soit la méthode acceptée suivant les règles de l'état de l'art, pour évaluer l'infiltration graisseuse tissulaire, de nombreux groupes cliniques continuent à utiliser la décroissance mono-exponentielle du T2 musculaire (Garrood *et al.* 2009 ; Kim *et al.* 2010 ; Forbes *et al.* 2014 ; Willcocks *et al.* 2014 ; Kim *et al.* 2015). En l'absence de lipides mobiles dans les

tissus, un T2 élevé pointe vers une inflammation ou un œdème tissulaire. L'augmentation du T2 due à l'inflammation ou aux œdèmes dépasse rarement 5 à 10 ms. Mais lorsque des changements dégénératifs graisseux sont présents, le T2 des lipides étant très sensiblement plus long que celui de l'eau musculaire, l'ajustement mono-exponentiel de la décroissance du T2 musculaire est largement déterminé par le degré d'infiltration graisseuse et le T2 global du muscle devient essentiellement une mesure du contenu en lipides du muscle (Carlier 2014) (voir Figure 6). On démontre l'étroite corrélation entre le T2 global et la fraction de graisse calculée à partir des images Dixon (Azzabou *et al.* 2015c) ou la fraction lipidique mesurée par une spectroscopie ¹H localisée (Kim *et al.* 2015).

Qu'elle soit basée sur une véritable séparation eau-graisse ou qu'elle soit estimée à partir de changement global du T2, l'évaluation de l'étendue des changements dégénératifs chroniques musculaires peut être précisément réalisée, de même que l'évolution de la maladie et les réponses aux traitements peuvent être finement monitorées. Cela a été démontré dans un grand nombre de maladies neuromusculaires.

Au niveau de la cuisse des patients atteints de la maladie de Duchenne, le taux moyen de progression des dégénérescences graisseuses a été mesuré à 5 % par an. Lorsque le pourcentage de graisse atteint 50 %, ce signe a une valeur prédictive élevée de la perte de la marche dans l'année (Fischmann *et al.* 2013). Sur une petite cohorte de 3 adultes atteints de la maladie de Becker, le taux annuel d'infiltration graisseuse a été évalué à 3.7 % dans la cuisse (Bonati *et al.* 2015b). En combinant les pourcentages de graisse avec une segmentation manuelle des muscles, on a pu déterminer des indices de masse contractile chez les patients atteints de la maladie de Duchenne (Wokke *et al.* 2014b). La confrontation des cartographies de pourcentages de graisses au classement de Lamminen a montré une surestimation systématique des changements dégénératifs avec les méthodes qualitatives (Wokke *et al.* 2013).

Toujours dans la maladie de Duchenne, l'exploration des avant-bras en imagerie a montré une implication plus importante des muscles fléchisseurs que des extenseurs, et une progression plus rapide des lésions dégénératives graisseuses chez les patients ayant perdu l'ambulation que chez les patients ambulants (Wary *et al.* 2015b ; Hogrel *et al.* 2016). L'administration de corticostéroïdes pendant une année à de jeunes garçons qui sont atteints de la maladie de Duchenne a arrêté le processus d'infiltration de la graisse dans la cuisse et la jambe tandis

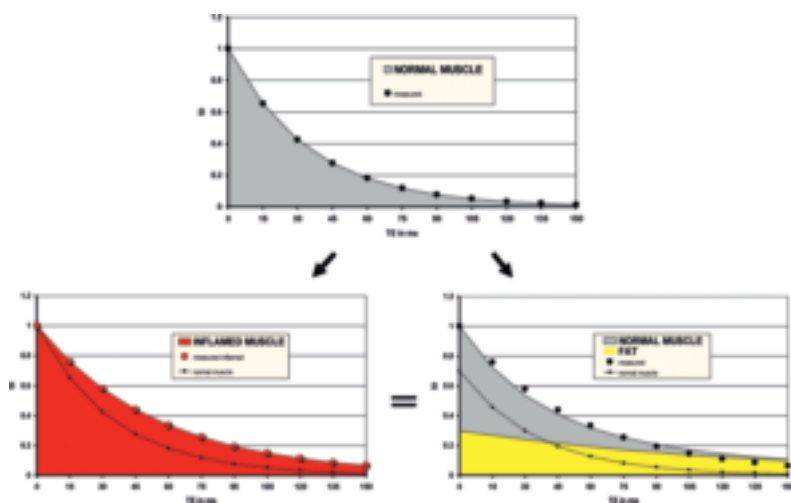


Figure 6
Le T2 global d'un muscle peut être augmenté aussi bien par la présence de lésions inflammatoires (en rouge à gauche) que d'un remplacement graisseux lors de processus dégénératifs chroniques (en jaune à droite). La simple mesure d'un T2 musculaire global par l'ajustement d'une exponentielle sur la décroissance T2 du signal ne permet pas de distinguer les deux processus.

que le taux d'infiltration graisseuse était respectivement de 7 % et 3 % chez les enfants non-traités (Arpan *et al.* 2014). La gravité de la maladie a facilité la détection d'une progression des lésions dégénératives au bout de 18 mois, cette fois basée uniquement sur des mesures d'intensité d'une imagerie pondérée en T1, avec également la démonstration d'une grande variabilité inter-individuelle et inter-musculaire (Hollingsworth *et al.* 2013a). Une telle approche est néanmoins obsolète au regard des capacités de l'imagerie quantitative et ne peut pas être recommandée pour de futurs protocoles. La même méthodologie avait été utilisée précédemment, en combinaison avec des mesures globales du T2 pour décrire les implications variables de différents territoires musculaires chez 5 patients atteints de la maladie de Duchenne (Garrod *et al.* 2009). Une étude multi-centrique qui a porté pendant un an sur des patients atteints de LGMDI a établi sans ambiguïté la supériorité de l'imagerie quantitative eau-graisse. Celle-ci a détecté des variations statistiquement significatives du contenu graisseux de l'ordre de 1 à 4 %, alors que la gradation par l'échelle de Lamminen-Mercuri n'a mis en évidence aucun changement et l'évaluation fonctionnelle standard n'a montré qu'une tendance à la dégradation, sans atteindre le seuil de signification statistique, à l'exception des tests respiratoires (Willis *et al.* 2013).

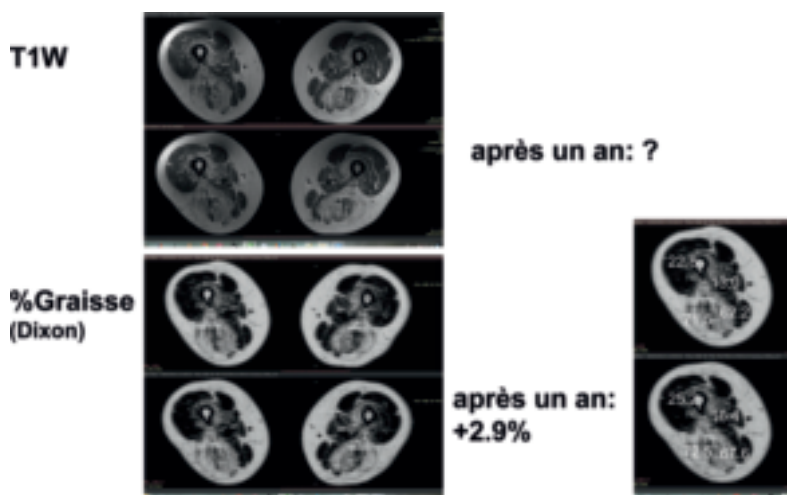


Figure 7
Évaluation qualitative *versus* quantification de la teneur en graisse musculaire. La similitude est très grande entre une imagerie pondérée en T1 (T1W) et l'image paramétrique du degré d'invololution graisseuse calculée à partir d'acquisitions Dixon. Rien ne permet de les distinguer visuellement, tout comme la simple inspection d'images acquises un an plus tard chez le même patient (montrées en dessous de la première série) ne révèle aucun changement. Dans l'image paramétrique, l'intensité du signal est une mesure du pourcentage de graisse. Et celui-ci augmente dans tous les muscles de la cuisse de ce patient atteint de maladie de Pompe, en moyenne de 2.9 %. Cet exemple illustre l'absolue nécessité de recourir à une imagerie quantitative pour suivre la progression de maladies.

Chez les patients atteints de dystrophie fascio-scapulo-humérale, l'imagerie quantitative eau-graisse a révélé une distribution bimodale particulière des lésions dégénératives au sein de leurs muscles, ainsi qu'une progression allant de distal en proximal pour les muscles affectés (Janssen *et al.* 2014).

Il a été montré chez les malades atteints de dystrophie musculaire oculo-pharyngée que le contenu en graisse des membres inférieurs pouvait augmenter jusqu'à 15 % en 13 mois, alors qu'il restait inchangé chez les sujets contrôles d'âge équivalent (Fischmann *et al.* 2012). Ni l'évaluation fonctionnelle standard exhaustive (MFM), ni le score visuel des images ne détectait le moindre changement durant la même période d'observation.

Le pouvoir discriminant extrêmement élevé des méthodes Dixon a été confirmé chez des patients adultes atteints de la maladie de Pompe. Chez la plupart d'entre eux, les lésions dégénératives musculaires progressent lentement, à un rythme considérablement ralenti par rapport à celui observé dans les dystrophinopathies. Au niveau des membres inférieurs de ces patients, le taux annuel moyen d'infiltration graisseuse s'est révélé être inférieur à 1 % mais a été détecté avec un haut degré de signification statistique (Carlier *et al.* 2015) (voir Figure 7).

Le suivi à un an de patients atteints de la maladie de Charcot-Marie-Tooth 1A a montré un accroissement significatif de la fraction graisseuse au niveau du mollet (1.2 %) mais pas au niveau de la cuisse (0.2 %) alors que chez les patients souffrant de myosite à inclusions la progression était de 2.6 % au niveau des mollets et de 3.3 % au niveau des cuisses (Morrow *et al.* 2015).

Chez les patients qui présentent des lésions de la coiffe des rotateurs, l'évaluation quantitative des changements dégénératifs graisseux a montré, plus que l'atrophie musculaire des muscles impliqués, une forte relation avec l'étendue des déchirures musculaires (Nardo *et al.* 2014 ; Nozaki *et al.* 2015).

Semblables observations ont également été faites dans des pathologies qui affectent secondairement le muscle strié squelettique.

Chez les patients atteints de sclérose latérale amyotrophique, une augmentation significative du T2 global des muscles des jambes a été notée au terme d'une période d'observation de 4 mois, signant la progression des dégénérescences graisseuses. Le déclin de la contraction isométrique volontaire maximale lors d'une dorsiflexion du pied était corrélée à celle-ci (Bryan *et al.* 1998).

Alors que le contenu total en graisse des muscles de la jambe n'était pas affecté, les diabétiques de type 2

présentaient une distribution préférentielle des lipides en intramusculaire (Karampinos *et al.* 2012). L'imagerie Dixon corps entier a identifié un contenu musculaire en graisse accru en cas de paralysie périodique hyperkaliémique (Lee *et al.* 2015).

Des changements dans la composition des muscles striés squelettiques ont été systématiquement et régulièrement constatés chez les sujets âgés, même s'ils restent d'une amplitude limitée jusqu'à un âge très avancé. Le pourcentage du signal lipidique intramusculaire double généralement, de 2 à 4 %, entre la deuxième et la septième décennie (Schwenzer *et al.* 2009a ; Alizai *et al.* 2012 ; Csapo *et al.* 2014 ; Morrow *et al.* 2014 ; Azzabou *et al.* 2015a). Pour l'essentiel, cette augmentation représente un véritable accroissement de la teneur lipidique du muscle et elle ne reflète qu'accessoirement la perte de tissu contractile avec l'âge (Csapo *et al.* 2014).

Le taux de graisse dans un muscle malade peut être considéré comme le reflet des dommages subis par le tissu tout au long de la vie du patient, ce qui en fait un biomarqueur fiable de la sévérité de la pathologie. Il paraît dès lors légitime d'utiliser l'augmentation ou la stabilisation des infiltrations graisseuses musculaires sur une période définie comme un indice quantitatif de la progression de la maladie ou de la réponse au traitement. Dans la dystrophie musculaire, et plus particulièrement chez les garçons atteints de la maladie de Duchenne, la sévérité de la maladie peut être extrêmement variable d'un patient à l'autre, ce qui se traduit par des taux annuels de transformation de graisse variant de 3 à 15 % (Fischmann *et al.* 2013 ; Wary *et al.* 2015b ; Bonati *et al.* 2015a). Ceci complique considérablement l'interprétation des résultats d'une intervention thérapeutique. Si une augmentation de 5 % de la graisse est mesurée sur une année de traitement, cela doit-il être interprété comme une réponse positive chez un patient sévèrement atteint ou comme une réponse négative chez un patient moyennement affecté ? À l'échelle d'un groupe de patients, on peut y répondre en organisant un essai contre placebo. Cette approche classique ne résout pas la question de l'efficacité du traitement à l'échelon de l'individu et pose le problème éthique de retarder un traitement potentiellement efficace chez des patients souffrant d'une maladie mortelle. On pourrait également proposer d'utiliser chaque patient comme son propre contrôle et, après une période d'observation, déterminer si la pente de la progression du remplacement graisseux diminue après l'initiation du traitement. Cela permettrait d'apprécier la réponse au traitement pour chaque patient mais posera le même problème éthique. Parce que la

teneur en graisse intramusculaire est un intégrateur naturel de tous les dommages subis par le muscle durant la vie du patient, il constitue par lui-même un puissant indicateur de la sévérité de la maladie à la condition de prendre en compte l'âge des sujets. À un âge donné, plus élevé est le contenu musculaire en graisse, plus important sera le taux de transformation graisseuse attendu au cours des mois à venir. Bien qu'elles soient en nombre limité, les données récoltées sur l'avant-bras au cours de l'étude de l'histoire naturelle Duchenne sponsorisée par le Généthon supportent cette assertion (Wary *et al.* 2015a). Des tables de référence pourraient être constituées en colligeant les données générées dans les différentes études en cours.

Dans le même ordre d'idée, une forte corrélation a été observée entre la teneur en graisse des différents muscles de la cuisse et de la jambe et le taux annuel de transformation graisseuse au sein de ces mêmes muscles dans un échantillon de patients adultes atteints de la maladie de Pompe. En effet, chez ceux-ci, la progression des dégâts musculaires est lente et relativement homogène entre individus, mais avec une grande variabilité de muscle à muscle (Carlier *et al.* 2015).

La relation entre la fraction de la graisse et sa progression tendra inévitablement vers un plateau aux valeurs élevées de contenu en graisse. On ne peut pas attendre que la fraction de graisse augmente de 15 % quand le remplacement du muscle par la graisse a atteint 80 %, même si cela avait été le cas quand il n'était seulement que de 40 %. Une solution simple pour contourner la relation sigmoïdale entre la fraction de graisse et sa progression, serait de rapporter la progression du remplacement par la graisse à la fraction de tissu contractile résiduel, c'est-à-dire le véritable taux de transformation du muscle en graisse. En prenant l'exemple ci-dessus, les 15 % d'augmentation de la graisse quand la masse de tissu contractile était encore de 60 %, équivaldrait, si la sévérité de la maladie reste constante, à une augmentation de 5 % de la teneur en graisse si la fraction de tissu contractile est tombée à 20 %.

« L'activité » de la maladie

Des études sur des modèles murins de dystrophie musculaire ont montré il y a déjà plus de vingt ans que les tissus musculaires pathologiques présentaient des T2 élevés (McIntosh *et al.* 1998 ; Tardif-de Géry *et al.* 2000). La même observation a été réalisée chez le GRMD, un modèle canin de la myopathie de Duchenne, plus proche du phénotype humain (Thibaud *et al.* 2007 ; Thibaud *et al.* 2012 ; Wang *et al.* 2013) (voir Figure 8). De façon très intéressante, le T2 musculaire a tendance à se

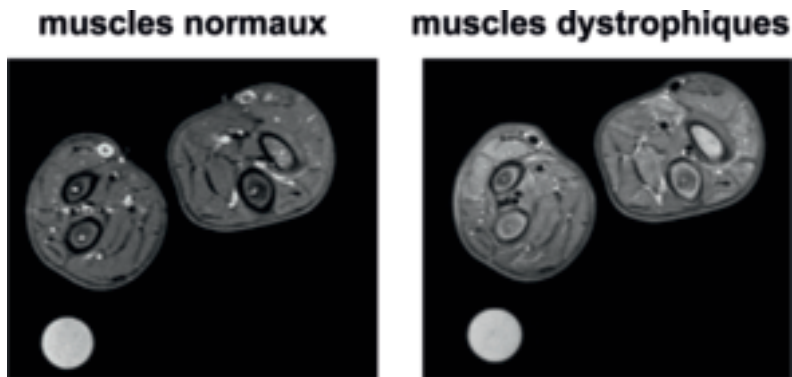


Figure 8
Imagerie pondérée en T2 montrant l'aspect caractéristique d'un muscle dystrophique, en l'absence d'infiltration graisseuse comme c'est le cas chez le chien GRMD. L'augmentation du T2 de l'eau musculaire est globale, mais avec des variations de muscle à muscle et avec également un aspect inhomogène des muscles les plus atteints.

normaliser lorsqu'une thérapie génique restaure efficacement la protéine défective (Walter *et al.* 2005 ; Pacak *et al.* 2007 ; Yokota *et al.* 2009).

Plus récemment, plusieurs travaux ont confirmé ces observations, et amélioré notre compréhension des processus d'altération du T2 sur ces modèles animaux de dystrophie musculaire. L'évolution temporelle du T2 musculaire a été précisément décrite chez la souris mdx. Un pic d'élévation du T2 est systématiquement observé entre 4 et 8 mois, suivi d'une baisse progressive (Pratt *et al.* 2013 ; Heier *et al.* 2014 ; Vohra *et al.* 2015c). Des anomalies du T2 ont également été décrites dans d'autres modèles de dystrophie (Vohra *et al.* 2015a ; Martins-Bach *et al.* 2015), avec des différences notables dans leur distribution à l'intérieur des muscles impliqués, notamment entre les souris Large et les souris mdx. Les muscles dystrophiques sont aussi caractérisés par une sensibilité plus importante à l'exercice excentrique. Cela a été illustré par une élévation anormalement importante du T2 de la souris mdx soumise à un exercice de course en descente (Mathur *et al.* 2011).

Des mesures quantitatives du T2 ont également été réalisées au cours de différents essais thérapeutiques sur ces modèles animaux. Après expression du gène de la micro-dystrophine chez la souris mdx, l'imagerie quantifiée du T2 a démontré un pouvoir discriminant supérieur à celui de l'imagerie de transfert d'aimantation et de l'imagerie du tenseur de diffusion (Park *et al.* 2015). Un autre essai, par saut d'exon U7, mené avec succès chez le chien GRMD a été accompagné d'une baisse significative du T2 dans les membres traités (Le Guiner *et al.* 2014). Enfin, un traitement au losartan a démontré un effet de normalisation du T2 musculaire sur un modèle murin de dystrophie congénitale lié au gène de la laminine (Vohra *et al.* 2015a).

Le T2, ou temps de relaxation spin-spin des molécules d'eau du muscle squelettique, peut être interprété comme un indicateur de l'activité de la maladie. Ce terme est intentionnellement vague étant donné qu'une variation de T2 est un processus non spécifique qui peut être engendré par différents mécanismes tels que l'inflammation, la nécrose, la dystrophie musculaire, la dénervation aiguë, ou toute autre situation pouvant être accompagnée par un œdème intracellulaire, extracellulaire, ou mixte. Cela a été montré de façon extensive sur des modèles animaux (Wishnia *et al.* 2001 ; Heemskerk *et al.* 2007 ; Bryant *et al.* 2014 ; Ha *et al.* 2015) ainsi que chez l'homme. L'exercice physique d'intensité modérée a beaucoup augmenté le T2 musculaire par un mécanisme d'accumulation d'eau dans les myocytes impliqués. Ce processus est transitoire, et contrairement à une élévation pathologique du T2, les valeurs de T2 se normalisent au bout de quelques heures. On comprend donc que les résultats d'une imagerie réalisée peu après un exercice physique pourront être faussés à cause de ce phénomène. C'est pour cette raison que nous conseillons de toujours réaliser l'examen radiologique avant les évaluations fonctionnelle, particulièrement chez les patients présentant des muscles fragilisés par la pathologie.

Comme déjà mentionné, les modèles pathologiques animaux ne développent que très rarement des infiltrations graisseuses au niveau des tissus musculaires. De ce fait, une augmentation globale de T2 mesurée par un ajustement mono-exponentiel de la décroissance du signal RMN sera interprétée de manière non ambiguë par une augmentation du T2 de l'eau musculaire. Chez l'homme, par contre, une infiltration graisseuse est très fréquemment observée chez des patients atteints de pathologies neuro-musculaires chroniques. Les protons des lipides ayant des temps de relaxation T2 beaucoup plus élevés que les protons de l'eau, la présence de graisse dans les tissus musculaires, même à hauteur de quelques pourcents, augmentera de façon significative le T2 global mesuré avec un modèle mono-exponentiel, vers des valeurs comparables à celles observées pour des tissus musculaires enflammés ou endommagés.

De nombreuses équipes ont mesuré le T2 des muscles infiltrés de graisse des patients Duchenne. Certaines ont observé une augmentation du T2 global avec l'âge des patients (Garrood *et al.* 2009 ; Kim *et al.* 2010 ; Arpan *et al.* 2013 ; Forbes *et al.* 2014 ; Willcocks *et al.* 2014 ; Kim *et al.* 2015), alors que d'autres, au contraire, ont observé la même diminution du T2 musculaire au cours du

temps que celle décrite dans les modèles animaux (Forbes *et al.* 2014 ; Wary *et al.* 2015b). Ces résultats, apparemment contradictoires, ont de quoi dérouter le lecteur. L'explication réside dans le fait que les premiers ont déterminé le T2 global, son augmentation reflétant alors principalement les changements dégénératifs liés aux infiltrations graisseuses. Cette information est donc redondante avec celle fournie par les séquences de type Dixon, les

résultats obtenus avec ces deux techniques étant fortement corrélés (Azzabou *et al.* 2015c). Les seconds ont mesuré spécifiquement le T2 de l'eau musculaire. La diminution progressive du T2 observée pourrait soit être due à la croissance, comme cela a déjà été montré chez des individus sains, au moins chez le chien (Thibaud *et al.* 2012), ou alors à l'épuisement progressif des capacités régénératives du muscle dystrophique.

Tableau 1
Différences entre une mesure globale du T2 musculaire et celle du T2 de l'eau musculaire

	T2 musculaire « global »	T2 de l'eau musculaire
Mesure le signal de	l'eau et la graisse	de l'eau exclusivement
Renseigne sur	essentiellement les lésions dégénératives chroniques de nature graisseuse	l'« activité de la maladie »
Sensible aux	changements lents, à long terme	changements rapides, à court terme
Considérations méthodologiques	préférer l'imagerie eau-graisse de type « Dixon »	nécessite des séquences optimisées ou des outils de traitement dédiés

Par souci de clarté, nous préconisons l'emploi d'une terminologie précise : le T2 global, dont les altérations reflètent principalement les changements dégénératifs liés à l'infiltration graisseuse et le T2 de l'eau musculaire qui évalue plus spécifiquement l'implication du tissu musculaire à proprement parler dans le processus pathologique (Carlier 2014) (voir *Tableau 1*). Nous recommandons (c'est un point de vue personnel des auteurs) d'abandonner l'utilisation de l'évaluation du T2 global dans des muscles infiltrés de graisse car les résultats générés ne permettent pas de séparer clairement les deux processus pathologiques évoqués alors qu'ils peuvent l'être en utilisant d'autres méthodes. Cela génère, en outre, une ambiguïté qui peut être levée par l'utilisation de méthodes d'analyse plus sophistiquées pour l'étude de la décroissance T2 du muscle (voir ci-dessous, le paragraphe sur les développements méthodologiques récents).

L'utilisation du T2 de l'eau musculaire comme indicateur d'activité de la maladie est non seulement possible chez l'homme, elle constitue une variable pertinente, au moins autant que dans les modèles animaux. Le T2 de l'eau est anormalement élevé dans les muscles des enfants Duchenne (Arpan *et al.* 2013 ; Forbes *et al.* 2014 ; Wary *et al.* 2015b ; Wokke *et al.* 2015), mais pas chez les patients Becker (Wokke *et al.* 2016). Chez les patients atteints de la forme tardive de la maladie de Pompe, environ un tiers des muscles examinés présentent une augmentation modérée du T2 de l'eau (Carlier *et al.* 2015). Dans les myopathies inflammatoires, le T2 de l'eau musculaire est systématiquement augmenté (Park *et al.* 1990 ; Maillard *et al.* 2004 ; Yao et Gai 2012). En imagerie diagnostique,

l'inflammation liée à la pathologie est généralement détectée grâce à des séquences pondérées en T2 combinées avec une suppression de graisse (STIR) (Walker 2008 ; Degardin *et al.* 2010). Chez les patients atteints de dystrophie musculaire fascio-scapulo-humérale (DMFSH), certains muscles sont STIR positifs et comportent des signes inflammatoires à la biopsie (Tasca *et al.* 2012). Néanmoins, cette évaluation qualitative permet uniquement de détecter des contrastes entre des muscles sains et muscles altérés. Si tous les muscles d'un membre sont atteints, cet examen standard ne détectera aucune anomalie. Une telle situation s'est par exemple présentée chez des patients atteints de dermatomyosite juvénile (Carlier *et al.* 2013). Pour éviter ces faux-négatifs, nous préconisons d'utiliser systématiquement la quantification du T2 de l'eau pour l'évaluation et la réponse aux traitements des myopathies inflammatoires, même si cette solution n'est pas encore largement acceptée par la communauté médicale.

Outre le manque de spécificité du T2, il reste également difficile d'établir avec certitude des liens temporels entre les événements pathologiques et ces modifications de T2. Existe-t-il un délai entre les deux et si oui, quelle est sa durée ? Par exemple, chez certains patients atteints de myopathies inflammatoires, il peut y avoir discordance entre les mesures de T2 et le statut clinique. La fluctuation naturelle du T2 au cours des dystrophies musculaires n'est encore que très peu documentée.

De manière intéressante, il a été montré que le T2 de l'eau musculaire pouvait être élevé dans certaines myopathies congénitales, tout au moins dans des modèles animaux avec des mutations du gène de la

nébuline, ACTA1 ou encore de la dynamine (Gineste *et al.* 2013b ; Gineste *et al.* 2013c ; Gineste *et al.* 2013a ; Martins Bach *et al.* 2015). Cela tend à démontrer qu'un certain degré de désorganisation cellulaire peut altérer suffisamment les mouvements intracellulaires, et notamment ceux des molécules d'eau pour avoir un effet sur le T2. Le fait d'avoir observé une augmentation du T2 de l'eau chez des patients atteints de myopathies plus stable représente tout de même une limitation à l'utilisation généralisée de ce biomarqueur comme indicateur absolu de l'activité de la maladie. Dans le même ordre d'idées, les modifications du T2 de l'eau observées à la suite d'une dénervation sont dus à l'augmentation relative de l'espace extracellulaire qui accompagne l'atrophie du tissu musculaire (Polak *et al.* 1988 ; Fleckenstein *et al.* 1993 ; Kamath *et al.* 2008), ce qui reflète davantage une réorganisation structurale du muscle que l'activité de la maladie au sens strict.

Il serait dès lors plus prudent de restreindre l'utilisation du T2 de l'eau musculaire au suivi de l'activité de la maladie dans des conditions maîtrisées, où l'on sait que les valeurs seront modifiées par des processus pathologiques destructifs, au moins pendant certaines périodes de leur évolution. Dans ces cas, la quantification du T2 de l'eau musculaire fournit indubitablement un biomarqueur représentatif de la progression de la pathologie ainsi que de la réponse à un traitement. De nombreuses études cliniques ont maintenant confirmé toutes les observations réalisées sur les modèles animaux. Il a été montré que la valeur du T2 avait une valeur prédictive quant à la vitesse de progression des altérations dégénératives chroniques. Chez les enfants Duchenne, l'instauration d'une corticothérapie est accompagnée rapidement d'une réduction de quelques ms du T2 au niveau des jambes, qui est suivie d'une stabilisation du processus d'infiltration graisseuse (Arpan *et al.* 2014). Comme mentionné précédemment, chez les patients adultes atteints de la maladie de Pompe, un tiers des muscles des membres inférieurs présente des altérations du T2 de l'eau, légères à modérées, sur au moins un des deux examens réalisés à un an d'intervalle. Dans ces muscles, le taux d'infiltration graisseuse a en moyenne augmenté 35 % plus rapidement que dans les muscles présentant des T2 normaux (Carlier *et al.* 2015). Pour l'ensemble des muscles, cette étude a démontré une corrélation significative entre la valeur moyenne du T2 et le taux moyen d'infiltration graisseuse entre les deux visites. Chez les patients souffrant d'une DMFSH, les muscles qui présentaient des hyperintensités sur des images pondérées en T2 avec saturation de graisse, étaient ceux qui subissaient les plus

fortes augmentations d'infiltrations graisseuses entre deux examens successifs (Friedman *et al.* 2013 ; Janssen *et al.* 2014). Ces résultats sont cruciaux et prouvent l'utilité du T2 de l'eau musculaire en tant que biomarqueur de l'activité de la maladie dans les pathologies neuromusculaires.

De nombreuses zones d'ombre restent cependant à éclaircir. Par exemple, quel sera le rôle du T2 de l'eau pour étudier la réponse à l'expression du gène de la dystrophine chez des patients Duchenne déjà sous traitement stéroïdien. Les stéroïdes normalisant quasiment les valeurs de T2, il n'est dès lors pas certain que l'expression partielle du gène de la dystrophine, dans des proportions identiques à celles obtenues dans les essais thérapeutiques de saut d'exon s'accompagnera d'une nouvelle baisse significative du T2. Des résultats préliminaires laissent à croire que si cette baisse existe, elle sera difficile à détecter (observations personnelles des auteurs).

Différents problèmes méthodologiques et expérimentaux rendent compliquée la détermination précise du T2. Nous avons déjà évoqué en détail les difficultés engendrées par l'infiltration et le remplacement graisseux des muscles. Il est extrêmement difficile d'obtenir une suppression parfaite du signal RMN des lipides, et leur présence, même à hauteur de quelques pourcents suffit déjà à perturber la mesure du T2 de l'eau. Les méthodes les plus efficaces à ce jour ne visent pas à minimiser ou éliminer totalement le signal de la graisse, mais plutôt à séparer, à l'acquisition ou à la reconstruction, les contributions de l'eau et des lipides en tirant profit du déplacement chimique entre les deux espèces de protons, ou encore de la différence entre leurs temps de relaxation T2. Ces méthodes sophistiquées ne sont pas nombreuses, et les plus populaires sont basées sur l'acquisition d'échos de spin multiples, en régime CPMG, couvrant une large gamme de temps d'échos. La séquence IDEAL-CPMG a été développée en ajoutant à cette séquence un schéma d'acquisition de type Dixon qui permet de séparer les contributions de l'eau et de la graisse (Janiczek *et al.* 2011). Une autre option consiste à réaliser un ajustement tri-exponentiel de la décroissance du signal obtenu par la séquence d'échos de spin multiples, et, à profiter de la différence importante entre les T2 de l'eau et de la graisse pour séparer avec une grande robustesse les deux composantes de protons (Azzabou *et al.* 2015c). Cette méthode de post-traitement a le grand avantage de reposer sur un schéma d'acquisition très classique, disponible sur la plupart des scanners RMN cliniques. Elle est par conséquent facilement implémentée dans un essai multicentrique, ce qui se vérifie de plus en plus.

Pour être exacte, la mesure du T2 exige une méthodologie rigoureuse. Dans une séquence d'échos de spin multiples, les impulsions d'excitation et de refo-calisation doivent être précisément ajustées à 90° et 180°. Si les angles de bascule s'écartent de ces valeurs nominales, la décroissance du signal RMN va être trop rapide dans le cas où des gradients de déphasage efficaces sont appliqués (ce qui est rarement le cas sur des systèmes cliniques), ou trop lente, dans le cas contraire où des échos stimulés vont se former et s'ajouter aux échos de spin (Hollingsworth *et al.* 2012). Une approche pratique consiste à acquérir, en plus de la séquence CPMG, une autre séquence pour cartographier le champ magnétique B1, et connaître exactement l'angle de bascule appliqué à chaque voxel du volume d'intérêt (Yarmykh 2007). Lorsque celui-ci s'écarte significativement de la valeur prescrite, le voxel en question est retiré de l'analyse T2 (Azzabou *et al.* 2015c). Cette méthode est simple et efficace, mais elle a le désavantage d'éliminer un grand nombre de voxels dans les zones où le B1 n'est pas homogène. D'autres solutions plus efficaces ont été proposées et sont sur le point d'être implémentées dans des protocoles de recherche clinique. Des modèles plus réalistes que de simples exponentielles peuvent être utilisés pour décrire précisément la formation des échos de spins et des échos stimulés, et permettent de s'affranchir de l'acquisition de la séquence de cartographie de B1. Par exemple, le formalisme EPG (pour *Extended Phase Graphs*), est un outil

puissant permettant de décrire et de comprendre le comportement de l'aimantation d'un voxel avec des temps de relaxation T1 et T2, soumis à une série d'impulsions radiofréquence et de gradients arbitraires. Lebel et Wilman ont été les premiers à modéliser le signal obtenu par la séquence MSME avec le formalisme EPG afin d'estimer précisément le T2 dans des zones présentant des échos stimulés (Lebel et Wilman 2010). Il a depuis été montré que cette méthode pouvait être utilisée pour améliorer la précision et la concordance des mesures de T2 musculaires entre plusieurs sites (Rooney *et al.* 2011).

Plus que la précision, ce qui compte en recherche clinique, c'est le pouvoir discriminant de la technique évaluée. Est rassurant en ce qui concerne les mesures de T2 de l'eau, le fait que, même si la mesure est inexacte à cause de la perturbation induite par les échos stimulés, celle-ci reste sensible aux effets pathologiques et à la réponse aux traitements. Ainsi, une étude clinique a suivi par quantification du T2 musculaire les effets de l'inflammation et sa correction par une corticothérapie même si les mesures étaient supérieures d'un facteur 2 à ce qu'elles auraient dû être à l'aide d'une méthodologie optimisée (Maillard *et al.* 2004).

Les relations entre les outils d'évaluation fonctionnelle et la RMN

Une des questions les plus fréquemment posées concerne la relation entre les outils d'évaluation fonctionnelle standards et les ceux dérivés de l'imagerie. Lorsqu'un clinicien-chercheur est à court d'imagination, une question récurrente fuse : dans quelle mesure les outils RMN corréleront-ils avec la fonction musculaire ? La réponse est connue par avance. Oui, il y a une corrélation significative entre les deux classes d'outils d'évaluation, et le coefficient de corrélation est généralement aux alentours de 0.7. Il est en effet évident que la performance du muscle va être fortement liée à sa masse et à sa composition. Cela avait clairement été démontré dès les premières études réalisées sur des patients Duchenne avec de simples indices qualitatifs de l'évaluation de l'infiltration graisseuse (Liu *et al.* 1993), et systématiquement confirmé depuis (Wren *et al.* 2008 ; Kim *et al.* 2010 ; Torriani *et al.* 2012 ; Gaeta *et al.* 2012 ; Fischmann *et al.* 2013 ; Wokke *et al.* 2014b ; Vohra *et al.* 2015b). Des études récentes l'ont également démontré pour d'autres pathologies : la dystrophie myotonique de type I (Hiba *et al.* 2012), la maladie de Charcot-Marie-Tooth, la myosite à inclusions (Morrow *et al.* 2015), mais également pour les lésions de la coiffe des rotateurs (Nardo *et al.* 2014), et le vieillissement (Csapo *et al.* 2014). Très logiquement, la force

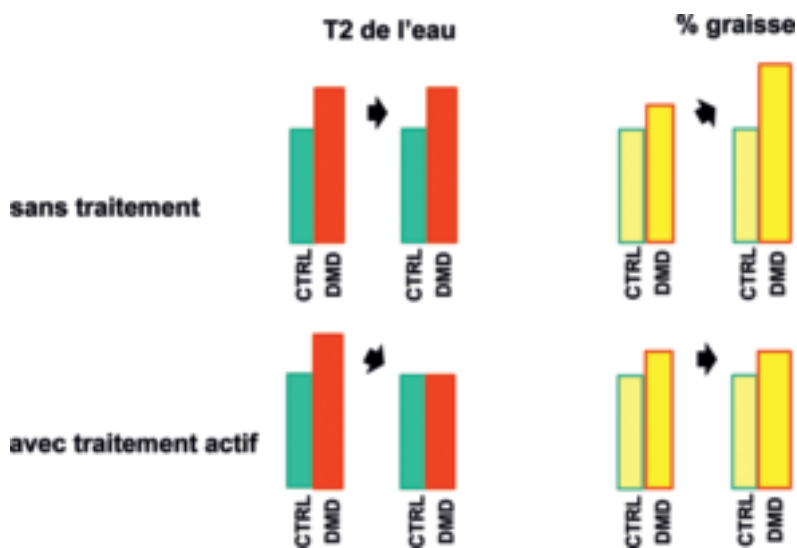


Figure 9

Résumé des informations complémentaires apportées par les deux principaux biomarqueurs, le T2 de l'eau musculaire et le % de graisse musculaire. Si la maladie est active et stable, on attend que le T2 soit augmenté et également stable au cours du temps alors que l'involution graisseuse progressera. Si un traitement efficace est appliqué, il devrait logiquement ramener le T2 à une valeur normale et induire une stabilisation de la teneur en graisse.

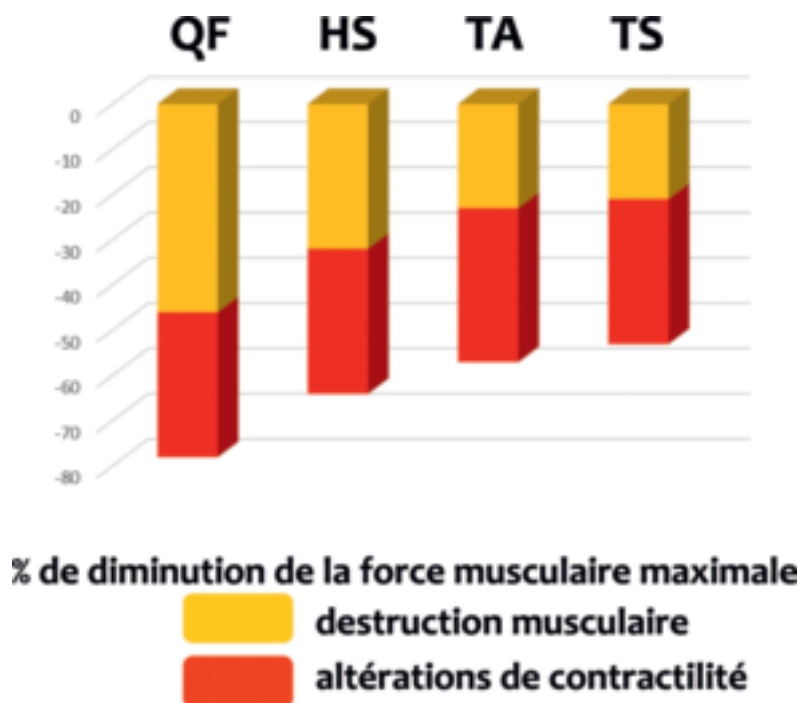


Figure 10
Diminution de la force musculaire maximale des patients Duchenne, exprimée en % des valeurs mesurées chez des enfants normaux de même âge. En orange, la part attribuable à la destruction du tissu musculaire, en rouge, la part attribuable aux altérations des propriétés contractiles du muscle. QF : quadriceps femoris, HS : ischio-jambiers, TA : tibialis anterior, TS : triceps suralis. Modifié d'après Wokke *et al.*, 2014b.

musculaire corrèle mieux avec la masse de tissu musculaire résiduelle (Wokke *et al.* 2014b) qu'avec le pourcentage d'infiltration graisseuse (Wren *et al.* 2008).

De nombreuses situations démontrent la complémentarité entre les deux modalités. La mesure de l'aire transversale contractile permet par exemple de déterminer si une diminution de la force ou du couple de force est due à la perte musculaire elle-même ou si elle est plutôt liée à une altération de la qualité de la contraction musculaire. Chez les enfants Duchenne, la force musculaire, lorsqu'elle est normalisée à la masse contractile résiduelle, reste anormalement faible, ce qui sous-tend l'existence d'anomalies contractiles du tissu musculaire dystrophique (Wokke *et al.* 2014b ; Vohra *et al.* 2015b) (voir Figure 10).

D'autres questions pertinentes peuvent être abordées. Quelle est la relation temporelle entre l'évolution de la composition musculaire et celle des altérations fonctionnelles ? Des données provenant du consortium Imaging-DMD, présentées à la conférence WMS (Voit 2014) mais non encore publiées, montrent que le test de marche de 6 minutes, qui est l'outil d'évaluation standard dans les essais, ne se dégrade guère avant que les muscles des jambes

des enfants Duchenne ne soient infiltrés à 60 % par de la graisse. Cela suggère que les outils d'imagerie pourraient avoir un rôle prédictif de l'évolution clinique. Cette observation, potentiellement d'une importance majeure, doit être confirmée. D'autres études, également chez les patients atteints de la maladie de Duchenne indiquent que le déclin de la force musculaire se produit en parallèle avec la progression des changements dégénératifs (Wokke *et al.* 2014b ; Vohra *et al.* 2015b), ou pourrait même les précéder au niveau des avant-bras (Hogrel *et al.*, 2016).

Une autre question majeure est le pouvoir discriminant des outils d'évaluations. Comment comparer les biomarqueurs quant à leur capacité à détecter les effets d'une intervention, quel est le plus petit changement qui peut être mis en évidence de manière statistiquement significative dans le plus petit échantillon de population ? Parce qu'ils sont largement sinon totalement indépendants de la collaboration du sujet, la plupart des indices quantitatifs de l'imagerie par RMN offrent la meilleure reproductibilité et ont été proposés comme les meilleurs candidats pour détecter et évaluer les effets d'une thérapie (Hiba *et al.* 2012 ; Bonati *et al.* 2015a). Cette affirmation est basée sur l'hypothèse qu'un agent thérapeutique induira des changements d'amplitude identique pour toutes les mesures d'évaluation, ce qui est peu probable. La question reste ouverte mais, la moindre dépendance, même si elle ne peut complètement s'en affranchir, de la RMN à la collaboration du patient constitue un atout majeur.

Notre enthousiasme doit être quelque peu tempéré par le scepticisme montré par la FDA pour l'utilisation de la RMN comme outil d'évaluation de la réponse du muscle dystrophique au saut d'exon 51 par le drisapersen. L'agence de régulation a émis des réserves sur l'impact de la diversité des plateformes d'imagerie, mais aussi à propos des différences entre les protocoles d'imagerie et entre les paramètres d'acquisition, ainsi que les procédures d'analyse des images sur les variables estimées de la RMN. Il y avait également des remarques sur les insuffisances des contrôles de qualité de la stabilité des systèmes et de l'évaluation de reproductibilité. Il a été reproché que l'effet attendu du traitement pourrait être du même ordre que la variabilité de la technique. La petite taille des échantillons de population a également été critiquée. Les incertitudes concernant la relation entre les variables de la RMN et les mesures fonctionnelles ont également été soulignées. Fait intéressant, il y avait à nouveau une certaine confusion dans ce rapport entre le T2 global du muscle et le T2 de l'eau du muscle. La demande de la FDA d'une harmonisation complète

des procédures entre les sites est irréaliste d'un point de vue technique. La seule façon de rassurer les agences de régulation sur la valeur des mesures par RMN sera de valider minutieusement les processus qui génèrent les images paramétriques et de démontrer l'indépendance des résultats par rapport à des conditions d'acquisitions légèrement différentes.

Ce qui apporterait un avantage définitif à la RMN serait l'identification de biomarqueurs qui seraient capables de prédire très précocement l'évolution clinique ultérieure du patient, avant toute modification fonctionnelle ou anatomique. En oncologie, des indices spectroscopiques RMN sont utilisés pour détecter très précocement les réponses positives au traitement avant tout signe morphologique de régression de la tumeur (Redmond *et al.* 1992 ; Shin *et al.* 2012 ; Leong *et al.* 2015). Des marqueurs similaires doivent encore être identifiés pour les maladies neuromusculaires. La concentration en phospho-diesters musculaires est un candidat potentiel en cas de dystrophie musculaire où leur concentration est élevée en relation avec l'augmentation du *turnover* des phospholipides membranaires (Edwards *et al.* 1982 ; Kemp *et al.* 1993 ; Wokke *et al.* 2014a ; Wary *et al.* 2015a), et semble se normaliser très rapidement quand la dystrophine est exprimée (Le Guiner *et al.* 2014).

Il y a donc de multiples raisons de poursuivre la confrontation entre les biomarqueurs fonctionnels et l'imagerie chez les patients atteints de maladies musculaires. Comme règle de conduite générale, ce sont les écarts et les déviations aux corrélations strictes qui doivent susciter de l'intérêt. Démêler les mécanismes qui sont à leur origine fera avancer les connaissances alors que la contemplation d'un accord parfait est rassurante mais reste intrinsèquement stérile.

Le rôle de la spectroscopie RMN du ^{31}P comme outil d'évaluation

La spectroscopie RMN *in vivo* s'est avérée être un outil extrêmement puissant pour l'exploration atraumatique du métabolisme énergétique musculaire, au moyen des noyaux ^1H , ^{31}P , ^{13}C pour ne nommer que les plus importants (Boesch 2007). La spectroscopie du RMN du ^{31}P identifie et quantifie des molécules-clés du métabolisme énergétique telles que la phosphocréatine, l'ATP et le phosphate inorganique (Kemp *et al.* 2007). Elle mesure le pH intracellulaire. La concentration d'ADP libre cytosolique ainsi que la production d'ATP par les voies oxydatives et non-oxydatives peuvent être déterminées. Conjugée à la mise en œuvre relativement simple d'antennes de surface posées directement en regard du segment d'intérêt,

la spectroscopie du ^{31}P a contribué énormément à l'avancée des connaissances sur l'énergétique musculaire, sa régulation à l'exercice et les perturbations introduites par les pathologies (Chance *et al.* 1986 ; Heerschap *et al.* 1999 ; Argov *et al.* 2000). À ce jour, la spectroscopie RMN n'a toutefois pas joué un rôle significatif comme outil d'évaluation des maladies neuromusculaires.

Des anomalies remarquables du spectre ^{31}P des enfants Duchenne ont été décrites plusieurs années avant que la dystrophine ne soit identifiée et que son implication dans la pathogenèse de la dystrophie musculaire de Duchenne ne soit reconnue (Edwards *et al.* 1982 ; Newman *et al.* 1982 ; Chance *et al.* 1986). Il est intéressant de noter que ces anomalies sont présentes au repos, ce qui simplifie considérablement leur détection. Elles révèlent des anomalies qui existent à différents niveaux sub-cellulaires ; la mitochondrie, l'appareil contractile et surtout la membrane sarcoplasmique (Younkin *et al.* 1987 ; Kemp *et al.* 1993 ; Tosetti *et al.* 2011 ; Wary *et al.* 2015a) : la quantité totale des composés phosphorés est abaissée, conséquence de l'atrophie musculaire et de l'adiposité ; le rapport phosphocréatine/ATP est également plus bas, reflétant la perte de tissu contractile, le rapport phosphate inorganique/phosphocréatine est anormalement élevé, révélateur de taux d'ADP au repos augmenté. Ces derniers traduisent une dysrégulation du contrôle des oxydations phosphorylantes mitochondriales et/ou une sollicitation énergétique accrue pour tenter de maintenir l'homéostasie ionique en dépit d'une perméabilité membranaire anormale. Le pH mesuré est alcalin, ou plus précisément, il y a un pool prééminent de phosphate inorganique avec un pH plus élevé, *pool* qui provient de cellules dystrophiques endommagées et/ou d'une expansion du compartiment interstitiel associée à la fibrose (Wary *et al.* 2012) ; et, enfin, la résonance dite des phosphodiester, provenant essentiellement de la glycérphosphocholine, est élevée, un indicateur d'un *turnover* accéléré des phospholipides membranaires dans le myocyte dystrophique (voir Figure 11).

Il semble qu'aucune exploration dynamique de l'énergétique musculaire n'ait été jusqu'à présent pratiquée sur des garçons atteints de la maladie de Duchenne. Chez les patients Becker et les porteuses DMD/BMD, des altérations de la régulation du pH ont été décrites, pendant et après exercice, sans toutefois pointer systématiquement dans la même direction (Barbiroli *et al.* 1992a ; Barbiroli *et al.* 1992b ; Barbiroli *et al.* 1993 ; Kemp *et al.* 1993 ; Tosetti *et al.* 2011). L'activité glycolytique a été mesurée à la hausse comme à la baisse, alors que les oxydations phosphorylantes étaient le plus

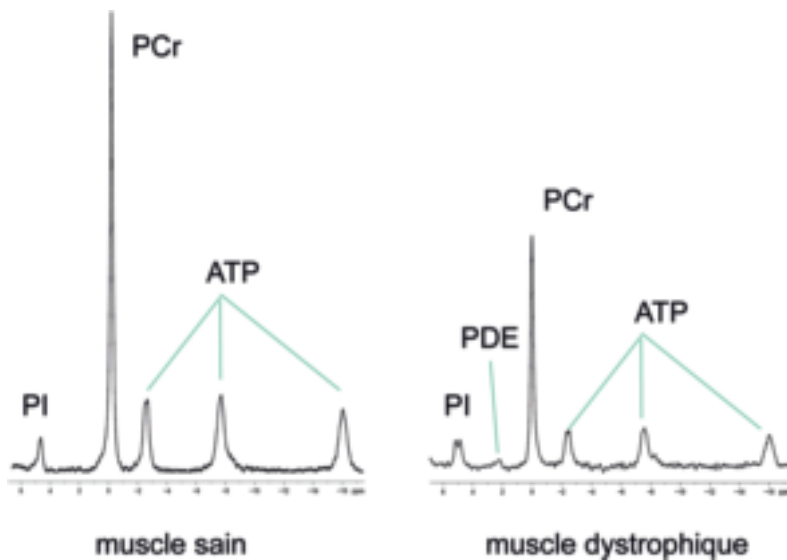


Figure 11
Exemples de spectres RMN ^{31}P musculaires montrant les anomalies patentes d'un muscle dystrophique en comparaison d'un muscle normal. Ces anomalies sont visibles dans le muscle à l'état de repos. Voir description dans le texte. Spectre pris chez le chien GRMD les mêmes altérations sont présentes dans le muscle de patients Duchenne. PCr : phosphocréatine, PI : phosphate inorganique, PDE : phospho-diester.

souvent normales (Lodi *et al.* 1999 ; Kemp *et al.* 1993 ; Tosetti *et al.* 2011 ; Torriani *et al.* 2012). Globalement, les résultats des mesures à l'exercice sont considérablement plus dispersés et ne montrent pas le caractère systématique observé au repos.

L'étendue des perturbations du spectre ^{31}P au repos corrèle à la gravité de la maladie, étant déjà détectables chez les porteurs Duchenne, plus marquées chez les patients Becker et évidentes chez les garçons Duchenne (Kemp *et al.* 1993). Les anomalies spectrales observées dans les muscles fléchisseurs des doigts de patients atteints de la maladie de Duchenne sont plus sévères chez les patients non-ambulants que chez les ambulants, et sont corrélées au nombre d'années passées en fauteuil (Wary *et al.* 2015a). Chez les patients atteints de DMFSH, le rapport PCr/ATP s'effondre dans le même temps que le muscle entre dans une phase de destruction rapide et de remplacement graisseux (Janssen *et al.* 2014).

Toujours au niveau des fléchisseurs des doigts de patients atteints de la maladie de Duchenne, la progression de ces anomalies a été monitorée pendant une année ; elle a été significative chez les patients non-ambulants (Hogrel *et al.* 2016). Chez le chien GRMD, les antérieurs traités par un *exon-skipping* U7 introduit par virus associé à l'adénovirus, ont vu leurs taux élevés de phospho-diester revenir à des valeurs normales (Le Guiner *et al.* 2014). Si elles restent relativement anecdotiques, ces observations

suggèrent fortement que la spectroscopie du ^{31}P , et en particulier la résonance des phospho-diester, puisse fournir des biomarqueurs utiles pour suivre le réponse du muscle dystrophique à l'expression de dystrophine. La spectroscopie du ^{31}P évalue l'intégrité et la stabilité de la membrane sarcoplasmique, ce qui lui confère un certain degré de spécificité et complète l'information plus globale donnée par les cartographies de la fraction de graisse et le T2. Il est intéressant de signaler qu'il a été récemment rapporté que le rapport PDE/ATP est anormalement élevé dans les muscles de patients atteints de la dystrophie musculaire de Becker à un stade où aucune élévation significative du taux d'infiltration graisseuse n'est encore détectable (Wokke *et al.* 2014a). Ceci suggère que cet indice puisse être un biomarqueur précoce du processus dystrophique, alors que le T2 de l'eau ne semble pas discriminant sur ce même échantillon de population (Wokke *et al.* 2016).

Outils d'évaluation par imagerie RMN actuellement en cours de développement

Les développements en cours sont orientés dans deux directions principales :

- l'identification de variables RMN qui reflètent d'importantes modifications histologiques, physiologiques ou biochimiques, qui ne peuvent être détectées par les approches d'imagerie standard actuelle (p. ex. la fibrose ou les troubles micro-circulatoires),
- l'utilisation de contrastes RMN, déjà connus, voire originaux, aux fins d'étendre et d'améliorer la caractérisation du muscle squelettique pathologique (p. ex. des mesures de T1 ou de diffusion).

• La fibrose

Le remplacement du muscle squelettique strié par du tissu conjonctif, majoritairement du collagène, constitue l'autre forme de transformation dégénérative chronique qui affecte les tissus musculaires pathologiques (Wynn 2008 ; Klingler *et al.* 2012 ; Kharraz *et al.* 2014). Plus encore que l'infiltration graisseuse, dont les effets délétères sont indirects et liés à la perte de tissu contractile associée, la fibrose impacte directement la fonction musculaire. La fibrose endomysiale est fortement corrélée à la perte de fonction motrice chez les patients atteints de la maladie de Duchenne (Desguerre *et al.* 2009). C'est pourquoi un pan de la recherche thérapeutique vise à bloquer voire à rendre réversible l'accumulation pathologique de tissu conjonctif (Zhou et Lu 2010). Si l'imagerie pouvait amener des biomarqueurs de la fibrose, ceux-ci constitueraient une aide cruciale à l'évaluation de l'efficacité de ces agents anti-fibrotiques. Malheureusement, si la détection et la quantification des infiltrations graisseuses sont facilement

accessibles par des méthodes dédiées d'imagerie RMN, l'évaluation de la fibrose interstitielle par RMN reste jusqu'à présent un défi majeur à relever. Le grand nombre de méthodes RMN qui ont été, et sont encore, proposées afin de détecter la fibrose reflète avant tout le fait qu'aucune d'entre elles ne donne pour le moment entière satisfaction.

Le collagène, les autres macromolécules de l'espace interstitiel, mais également leurs molécules d'eau d'hydratation ont des T2s très courts, de l'ordre de une à quelques centaines de μ s (Edzes et Samulski 1978 ; Siu *et al.* 2015). Avec des séquences standards ou même dites « rapides », acquises à des TE de une à quelques ms, le signal RMN de ces spins est totalement déphasé au moment de la réception et ne contribue plus à l'image. Les tissus conjonctifs denses, comme les tendons ou les tissus cicatriciels apparaissent comme des plages dépourvues de signal, et sont facilement détectables en imagerie standard. La fibrose interstitielle devrait également abaisser l'intensité du signal du voxel proportionnellement au volume qu'elle occupe. Néanmoins, sur ces images, les fluctuations dues à la fibrose qui devraient être typiquement de l'ordre de quelques pourcents sont masquées par les variations spatiales du signal RMN tissulaire induites par leur distance aux antennes de surface de réception. Les tentatives de correction de cette inhomogénéité de signal radiofréquence, bien que visuellement satisfaisantes, n'ont pour l'instant pas permis d'isoler et de quantifier la perte de signal générée par les dépôts de tissus conjonctifs. Ce phénomène peut tout de même contribuer aux distributions d'intensité de signal anormalement larges, observées dans des muscles profondément remodelés par une pathologie, la fibrose étant bien souvent un composant essentiel de ce remodelage. L'hétérogénéité du signal musculaire, en particulier sur les images pondérées en T2, est, selon nous, une caractéristique reproductible du muscle dystrophique et est très probablement en partie le reflet de la fibrose locale, dans une proportion difficile à quantifier pour le moment (Parzy *et al.* 2007 ; Thibaud *et al.* 2012 ; Wary *et al.* 2015a).

La décroissance T2 du signal des tissus est un processus multi-exponentiel complexe. Lorsque celle-ci est échantillonnée très finement sur des modèles animaux, il est possible de générer des spectres du T2 qui font apparaître des composantes à temps de relaxation très courts, qui ont été attribuées aux macromolécules présentes dans les tissus (Saab *et al.* 1999 ; Saab *et al.* 2000). Cette méthode a été transférée chez l'homme sous le nom d'ISIS-CPMG. Elle a permis d'identifier des composantes T2 intra- et extracellulaires mais n'a jusqu'à présent

pas mis en évidence cette composante de spins à T2 très court (Araujo *et al.* 2014).

Les expériences de transfert d'aimantation sont bien adaptées à l'étude des échanges entre spins ; que ce soit à travers des interactions dipôle-dipôle, ou des échanges chimiques entre des groupes de spins mobiles ou semi-mobiles. En pratique, sur des tissus biologiques, elles permettent de mesurer les taux d'échange entre l'eau libre et les macromolécules, ainsi que les concentrations relatives de ces différents groupes de protons (Morrison et Henkelman 1995 ; Henkelman *et al.* 2001). Par le passé, de nombreuses études ont essayé d'établir un lien entre le contraste de transfert d'aimantation et la concentration en collagène tissulaire, en particulier au niveau du foie, mais n'ont généré que des résultats mitigés. Très récemment, des séquences d'imagerie rapide avec des schémas de saturation optimisés ont donné des résultats encourageants avec une bonne corrélation entre le contraste de transfert d'aimantation et le taux de fibrose dans le foie (Yarnykh *et al.* 2015). Le contraste de transfert d'aimantation est élevé dans le muscle squelettique et son origine et les mécanismes sous-jacents ont été étudiés par plusieurs groupes dans le muscle normal, vieillissant, et pathologique, avec une attention particulière sur son lien avec la fibrose, qui reste toujours insuffisamment compris (Schwenzer *et al.* 2009a ; Sinclair *et al.* 2010 ; Sinclair *et al.* 2012 ; Morrow *et al.* 2014 ; Li *et al.* 2014 ; Li *et al.* 2015). La corrélation négative entre le contraste de transfert d'aimantation et l'âge dans une cohorte d'individus sains est par exemple, relativement déroutante (Morrow *et al.* 2014). Ces résultats ont cependant été obtenus pour une fréquence et une puissance d'irradiation particulière et ne peuvent donc pas être extrapolés facilement à d'autres conditions de saturation. L'effet négatif de l'infiltration graisseuse sur le contraste de transfert d'aimantation a également été évalué (Li *et al.* 2015). Des expériences de transfert d'aimantation combinées à du filtrage double quantum et de l'imagerie à temps d'écho très court (UTE) ont également été réalisées dans le but d'améliorer la spécificité de cette technique au collagène (Kusmia *et al.* 2013 ; Eliav *et al.* 2014). Les résultats sont encourageants mais doivent pour le moment toujours être considérés comme préliminaires.

De quasi ignorée jusqu'à devenir la base d'une des méthodes les plus efficaces et populaires pour détecter la fibrose myocardique, une expansion de l'espace interstitiel accompagne le remplacement des myocytes par du tissu conjonctif. Cet accroissement du volume interstitiel peut être facilement quantifié après injection d'un agent de contraste à faible poids moléculaire à base de gadolinium (Gd),

comme le Gd-DTPA ou le Gd-DOTA qui va diffuser rapidement dans l'espace interstitiel où sa concentration va s'équilibrer avec celle du plasma. Quelques minutes après injection, au moment où la distribution de l'agent de contraste est en pseudo-équilibre, l'augmentation du taux de relaxation T1 dans le tissu myocardique normalisé à l'augmentation du taux de relaxation T1 dans le plasma permet d'estimer le pourcentage du volume extracellulaire du tissu (Miller *et al.* 2013 ; Moon *et al.* 2013). Bien qu'indirecte, cette technique s'est imposée comme la référence pour quantifier les dépôts pathologiques de tissu conjonctif dans le myocarde. Un prérequis à l'utilisation de cette méthode de quantification de fibrose est l'absence d'œdème extracellulaire ou d'anomalies cellulaires qui pourraient avoir pour conséquence une accumulation locale d'agent de contraste Gd ou sa pénétration dans les myocytes (p. ex. la nécrose, l'inflammation ou même une dystrophie). Dans ces cas-là, ou lorsque ces phénomènes sont suspectés d'avoir lieu en même temps que le remodelage structural, le volume de distribution de l'agent de contraste Gd ne peut plus être utilisé comme un marqueur de substitution de la fibrose.

Ce même principe, et la méthodologie associée peuvent être utilisés pour détecter indirectement la fibrose interstitielle dans le muscle squelettique, mais cette technique n'a pas été évaluée jusqu'à présent. Certaines difficultés peuvent être attendues compte tenu du plus faible volume extracellulaire dans le muscle squelettique, mais aussi en relation avec le moindre degré de fibrose attendu dans le muscle pathologique, ainsi que du fait de l'absence d'un signal sanguin de référence facilement accessible comme c'est le cas au niveau cardiaque dans les cavités ventriculaires.

Pour ces mêmes raisons, et parce que la concentration en sodium est plus de 10 fois supérieure dans l'espace extracellulaire que dans les cellules, la concentration globale en sodium du myocarde est augmentée en cas de fibrose, et l'imagerie RMN du ^{23}Na peut être utilisée pour détecter ce phénomène. Néanmoins, cette évaluation est également indirecte et basée sur des changements non-spécifiques ; les mêmes réserves que celles formulées dans le cas des agents de contraste à base de Gd s'appliquent dans le cas où la concentration en sodium dans les tissus augmente pour d'autres raisons, avec une liste de situations d'interprétation délicate identique à celle énoncée précédemment (Madelin et Regatte 2013). Le signal RMN peut être sensibilisé au mouvement à une échelle submillimétrique et cela peut servir à suivre la propagation des ondes de pression. La vitesse de propagation des ondes de pression

augmente avec la rigidité du milieu traversé. Ce marqueur peut donc être utilisé pour estimer les propriétés viscoélastiques d'un tissu (Glaser *et al.* 2012). Ce phénomène est la base de l'élastographie par IRMN, qui est une méthode validée pour la quantification de la fibrose hépatique. Cette technique a été transposée au domaine du muscle squelettique et un certain nombre de situations ont été évaluées (Ringleb *et al.* 2007). Le muscle squelettique constitue un ensemble structural hautement différencié, lui-même au sein de l'environnement complexe. Il ne semble dès lors pas trivial d'établir un lien direct entre la vitesse de propagation d'une onde de pression à une position donnée et la structure tissulaire du muscle en ce même point. L'environnement global des éléments contractiles et non-contractiles doit avoir un impact et contrôler la vitesse des ondes de pression en tout point du muscle. En particulier, les effets des dépôts de graisse sont susceptibles d'être non négligeables sur la vitesse de propagation des ondes de pression. Il en est de même pour les œdèmes et autres phénomènes inflammatoires (McCullough *et al.* 2011). Encore une fois, cette technique peut manquer de spécificité. Il est également à noter que les propriétés visco-élastiques des tissus peuvent également être évaluées par des méthodes ultrasonores, avec des résultats comparables à la RMN mais un net avantage en terme de facilité d'implémentation (Drakonaki *et al.* 2012).

Une détection plus directe de la fibrose a également été proposée. Elle repose sur l'utilisation de peptides courts marqués au Gd, qui ont une forte affinité pour le collagène (Caravan *et al.* 2007). Les résultats présentés à ce jour sont convaincants (Fuchs *et al.* 2013 ; Caravan *et al.* 2013), mais les questions relatives à l'administration et à la toxicité de ces agents vont très certainement restreindre leur utilisation aux modèles animaux et expliquent l'impact relativement limité de cette méthode.

Le développement de séquences à temps d'écho « ultra court » (UTE) représente, de loin, la méthode la plus prometteuse pour une imagerie directe de la fibrose. Ces séquences opèrent à des TE très proches de zéro. Elles sont alors capables de collecter le signal RMN des spins ayant un T2 très court, jusqu'à quelques μs (Tyler *et al.* 2007). Les séquences UTE, qui possèdent ce potentiel de visualiser directement la fibrose ont donc un avantage majeur sur les méthodes présentées précédemment qui sont, elles, basées sur des liens indirects avec le phénomène étudié. Les composantes à T2 court peuvent être mises en évidence par simple soustraction d'une image de référence obtenue à un TE plus long, par une saturation double-bande, un module d'inversion

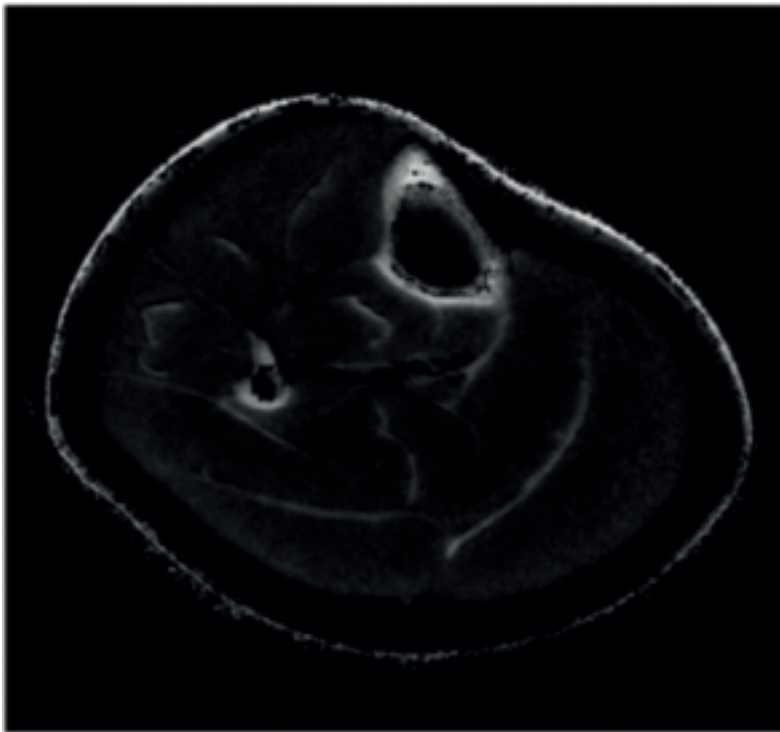


Figure 12
Exemple d'imagerie des spins à TE ultra-court (UTE), ici de la composante à T2* inférieure à une ms. Elle montre la proportion élevée de ces spins dans l'os compact, dans les fascias et dans la peau, mais aussi une fraction significative dans le tissu musculaire. La possibilité d'évaluer de manière atraumatique par cette technique UTE la composante conjonctive du muscle strié squelettique est en cours d'exploration dans plusieurs laboratoires.

adiabatique (Li *et al.* 2012) ou, encore mieux, par extraction de la fraction à T2 très court grâce à un ajustement multi-exponentiel du signal obtenu avec ces séquences à différents TE, et reconstruction de cartes paramétriques qui peuvent corriger les effets de relaxation T2*, mais aussi les effets dus à la présence de lipides (Wang *et al.* 2010 ; Caldas de A. Araujo *et al.* 2015) (voir Figure 12).

L'imagerie UTE a démontré sa capacité à visualiser de manière non ambiguë l'os cortical, les couches profondes des cartilages, les tendons et les aponévroses (Robson et Bydder 2006 ; Du *et al.* 2009 ; Du *et al.* 2011). La visualisation directe de l'infarctus du myocarde a également été établie avec cette technique (de Jong *et al.* 2011). Concernant le muscle squelettique, la visualisation des tissus conjonctifs ainsi que des tentatives de quantification ont déjà été réalisées sur des sujets normaux, sur des groupes de personnes âgées, ainsi que chez des patients myopathes (Vignaud *et al.* 2014 ; Csapo *et al.* 2014 ; Caldas de A. Araujo *et al.* 2015). De nombreux problèmes restent tout de même à élucider, en particulier la possible superposition d'une composante lipidique à T2 ultra-court. Néanmoins, le défi le plus important sera d'isoler la fraction de

molécules à T2 très court représentatifs du tissu conjonctif. La même problématique concerne également les autres approches, en particulier les expériences de transfert d'aimantation, pour lesquelles une part significative du contraste provient des protéines de l'appareil contractile. Comme mentionné précédemment, la combinaison du filtrage double quantum, de transfert d'aimantation et des séquences UTE pourrait représenter une solution pour isoler plus spécifiquement le signal provenant du collagène (Kusmia *et al.* 2013 ; Eliav *et al.* 2014).

• Perfusion et oxygénation

L'imagerie fonctionnelle par RMN est désormais la référence pour les explorations atraumatiques de la physiopathologie cérébrale en neurologie, aussi bien que pour les études cognitives en neuroscience (Ogawa *et al.* 1990 ; Detre et Wang 2002). Des approches très similaires ont été développées et appliquées avec succès au muscle squelettique (Carlier *et al.* 2006 ; Partovi *et al.* 2015). La perfusion tissulaire peut être mesurée de façon atraumatique au moyen d'un groupe de techniques qui marquent magnétiquement le sang artériel en amont du tissu d'intérêt (techniques dites « ASL »). Ce marquage résulte en une modification de l'aimantation du tissu proportionnelle à la perfusion. Cette méthode ne requiert pas d'injection d'agent de contraste, et peut donc être répétée à l'infini à un rythme très rapide, avec des intervalles de quelques secondes (Raynaud *et al.* 2001 ; Schewzow *et al.* 2014). Cette propriété est particulièrement avantageuse pour l'étude de la perfusion musculaire qui peut varier d'un facteur 20 ou plus en quelques dizaines de secondes. Le rapport contraste sur bruit en ASL est faible, et facilement contaminé par le mouvement. La plupart des études en ASL a consisté à mesurer la perfusion post-exercice ou post-ischémie. Néanmoins, si un sacrifice est réalisé sur la résolution temporelle des expériences, la perfusion au repos peut également être mesurée par ASL en moyennant le signal pendant quelques minutes (Carlier *et al.*, 2006 ; Bertoldi *et al.*, 2008). Le contraste BOLD (pour *blood oxygen level dependant*) (Ogawa *et al.* 1990), qui est bien connu pour sa capacité à détecter les activations cérébrales, est sensible au taux d'oxygénation des capillaires et du sang veineux dans les muscles squelettiques et peut également fournir des mesures semi-quantitatives de la saturation sanguine en oxygène (Jordan *et al.* 2004 ; Jacobi *et al.* 2012). Contrairement à la plupart des applications au niveau du cerveau, le contraste BOLD musculaire peut être négatif dans le cas d'une plus forte désaturation en oxygène, ou positif pour des situations

où l'extraction en oxygène décroît dans les tissus (Donahue *et al.* 1998 ; Lebon *et al.* 1998 ; Meyer *et al.* 2004 ; Damon *et al.* 2007 ; Baligand *et al.* 2011). Le volume sanguin au niveau des veines et des capillaires influence le signal BOLD et rend son interprétation relativement complexe (Duteil *et al.* 2006). La consommation du muscle en oxygène peut être calculée, selon la loi de Fick, comme le produit de la perfusion tissulaire par la différence d'oxygénation entre artère et veine. Dans sa déclinaison RMN totalement atraumatique, la perfusion est déterminée par ASL, et le taux d'oxygénation des gros vaisseaux est obtenu par des mesures de T2 ou de susceptibilité (Zheng *et al.* 2013 ; Englund *et al.* 2013 ; Decorte *et al.* 2014).

Différentes conditions qui affectent la perfusion et l'oxygénation du muscle squelettique ont été étudiées par la RMN fonctionnelle, en particulier l'ischémie aiguë ou chronique (Ledermann *et al.* 2006 ; Grözinger *et al.* 2013 ; Aschwanden *et al.* 2014 ; Englund *et al.* 2015), mais également le diabète (Zheng *et al.* 2014), la sclérose systémique (Partovi *et al.* 2012) ou encore le syndrome des loges (Andreisek *et al.* 2009).

En ce qui concerne les pathologies neuromusculaires, l'emploi de l'imagerie fonctionnelle par RMN a été jusqu'à présent très limité. Chez des patients qui souffrent de glycogénose de type 3, la combinaison de l'imagerie fonctionnelle dynamique avec des mesures de spectroscopie RMN a permis de déterminer, de façon inattendue, que la diminution de la capacité de phosphorylation oxydative

mitochondriale était au moins en partie due à une hypoperfusion musculaire relative (Wary *et al.* 2010) (voir Figure 13).

Il est légitime de penser que cette méthode pourra nous apporter bien plus d'informations encore dans un futur proche. Une des conséquences de la fibrose, quand celle-ci se développe aussi autour des artérioles est d'empiéter sur la réserve de vasodilatation. Dans une étude sur les muscles de la patte d'animaux hypertendus, il a été démontré que l'ASL permettait de quantifier précisément ce phénomène (Bertoldi *et al.* 2006). Des anomalies de la perfusion constituent également une caractéristique pathologique du muscle dystrophique chez les patients Duchenne (Thomas 2013), en partie liée à un défaut de production d'oxide nitrique (Nelson *et al.* 2014 ; Hörster *et al.* 2015), et due d'autre part aux modifications de structure liées à la fibrose (Klingler *et al.* 2012). La possibilité d'avoir, en recherche clinique, une mesure atraumatique et dynamique de perfusion musculaire chez des patients Duchenne représenterait un intérêt majeur, particulièrement lorsqu'il s'agira de déterminer l'efficacité de traitements à base de molécules vasodilatatrices ou anti-fibrotiques (Zhou et Lu 2010 ; Ennen *et al.* 2013 ; Blat et Blat 2015).

• T1 - Pré- et post-gadolinium

La cinétique d'évolution de la relaxivité T1 après injection d'un chélate de gadolinium à faible poids moléculaire peut être analysée de façon à obtenir une estimation quantitative de la vitesse d'échange de l'agent de contraste du compartiment vasculaire vers l'espace interstitiel (ou plus précisément vers l'espace accessible dans le compartiment extravasculaire) ainsi que du volume de ce compartiment extravasculaire (Tofts 1997 ; Tofts *et al.* 1999 ; Lavini *et al.* 2007). Idéalement, la fonction d'entrée artérielle doit être mesurée en même temps que le rehaussement du signal tissulaire. En pratique, celle-ci peut être supposée connue, ce qui facilite considérablement l'acquisition des données. L'ischémie, la nécrose, l'inflammation ou encore la fibrose peuvent être précisément évaluées à partir des modifications du taux d'échange du chélate de gadolinium et de son volume de distribution extravasculaire. Ces conditions correspondent respectivement à un échange lent et un volume de distribution normal, un échange lent et un volume augmenté, un échange rapide et un volume augmenté, et échange normal et un volume augmenté. Le muscle dystrophique canin est caractérisé par une augmentation du taux d'échange de l'agent de contraste, accompagné par une augmentation proportionnelle de son volume de distribution, ce qui se manifeste par une augmentation de l'amplitude de



Figure 13

La mesure de la perfusion musculaire par la technique du marquage de spins de l'eau artérielle est totalement atraumatique et autorise donc de suivre très précisément la réponse hémodynamique d'un muscle au cours de différentes manœuvres. Dans l'exemple présenté ici, on voit que la perfusion musculaire post-exercice en condition aérobie est anormalement faible chez des patients adultes atteints de glycogénose de type III (déficit en enzyme débranchant).

rehaussement de signal, sans décalage temporel de la prise de contraste (Thibaud *et al.* 2007).

Même si la procédure d'injection est peu invasive et complètement sans danger, par le recours à des agents de contraste extrêmement stables, cette technique est en perte de vitesse. Malgré la valeur ajoutée de l'information extraite par rapport à la cartographie T2 par exemple, la méthode est de nos jours rarement implémentée, à cause du coût associé, de la longueur des acquisitions nécessaires pour échantillonner convenablement les courbes de rehaussement de signal, ainsi que de la réticence à pratiquer une injection non-essentielle sur une population pédiatrique.

De la rémanence prolongée d'agents de contraste à base de gadolinium ciblant l'albumine dans le muscle dystrophique de la souris mdx a découlé une méthode attrayante pour caractériser la perméabilité membranaire et les dommages générés au niveau des myocytes (Straub *et al.* 2000 ; Amthor *et al.* 2004). Celle-ci reste cependant confinée aux expérimentations précliniques.

Plus récemment, un intérêt s'est manifesté pour la mesure de T1 « pré-gadolinium », probablement mieux qualifiée par T1 natif, ou intrinsèque du muscle squelettique. Ce biomarqueur a longtemps été laissé de côté car à l'époque des débuts de l'imagerie RMN du muscle strié, aucune modification du signal pondéré en T1 n'avait été relevée en présence de phénomènes inflammatoires ou nécrotiques. En réalité, les méthodes utilisées à cette époque souffraient d'un manque de sensibilité. Il a depuis été montré que le T1 natif était modérément mais significativement augmenté dans le muscle dystrophique du chien GRMD (Thibaud *et al.* 2012). Les cardiomyopathies dilatées et hypertrophiques engendrent également une augmentation du T1 natif, qui semble refléter les dommages cellulaires au niveau des myocytes plus que de la fibrose interstitielle (Dass *et al.* 2012 ; Friedrich 2015 ; Hinojar *et al.* 2015). Cette observation est corroborée par l'observation de T1 raccourcis dans des gels de collagène (Caldas de Araujo, communication personnelle). Ces pistes doivent être explorées plus en détail avant d'attribuer un rôle précis à la mesure du T1 natif pour la caractérisation du muscle squelettique. Un certain optimisme est de mise quant au futur de ce type d'approche au vu de la robustesse et la rapidité d'acquisition de séquences de quantification du T1 sur les scanners modernes.

• La diffusion

Depuis la description de son principe par Stejskal et Tanner en 1965 (Stejskal et Tanner 1965), les études de diffusion et l'imagerie de diffusion (DWI,

diffusion-weighted imaging) ont été appliquées à un nombre considérable de domaines médicaux et non-médicaux, allant de l'étude des matériaux aux tissus humains, en passant par les petits animaux. La possibilité d'évaluer finement les mouvements de protons *in vitro* et *in vivo* par l'application de gradients pulsés de sensibilisation a motivé l'usage de l'imagerie de diffusion pour accéder à des paramètres structurels microscopiques, bien au-delà de la résolution de l'imagerie conventionnelle par RMN, c'est-à-dire à l'échelle du micron. En fonction du schéma d'application des gradients pulsés et de la stratégie d'analyse des données de diffusion acquises, différentes variables peuvent être calculées au sein de l'objet étudié : le coefficient de diffusion apparent et les directions de diffusion, la probabilité de déplacement ; l'échelle des barrières de diffusion (p. e. le diamètre de la cellule), et la probabilité de transition entre des compartiments délimités par des barrières semi-perméables.

Il y a environ deux décennies que l'utilisation de l'imagerie de diffusion a commencé pour l'exploration du muscle squelettique. La vaste majorité des études publiées sur le muscle squelettique étaient basées sur une séquence de diffusion EPI (*echo-planar imaging*) *single shot*. Pour l'encodage du processus de diffusion, des gradients de diffusion mono- ou bi-polaires ont été appliqués sur une séquence RMN de type spin écho. Peu d'études ont montré des résultats obtenus avec une séquence de type écho stimulé. Plusieurs difficultés doivent être surmontées pour appliquer l'imagerie de diffusion au muscle squelettique. Afin d'obtenir des variables de diffusion exactes et reproductibles, une suppression fiable et efficace du signal de la graisse est un pré-requis. La plupart des techniques disponibles (suppression de la graisse par inversion-récupération ou sélection spectrale) suppriment efficacement la composante lipidique principale, générée par les groupements méthylène. Par contre, la composante oléfinique de la graisse, très proche de la fréquence de l'eau génère des artefacts majeurs dans l'imagerie de diffusion du muscle squelettique. De plus, l'imagerie de diffusion souffre d'un piètre rapport contraste à bruit lié à la méthode de suppression de graisse, à l'application des gradients de diffusion, et aux temps d'échos longs comparés au temps de relaxation T2 relativement court des protons dans le muscle squelettique. Nombre de paramètres des séquences de diffusion ont une influence majeure sur les résultats, ce qui s'est traduit par la publication dans la littérature de valeurs inconstantes pour les variables de diffusion.

Au-delà de ces particularités techniques, l'imagerie de diffusion est prometteuse et susceptible d'amener de nouveaux outils d'évaluation car plusieurs

variables sont corrélées à des propriétés structurelles non-accessibles par d'autres techniques d'imagerie par RMN. Le coefficient de diffusion apparent, la fraction d'anisotropie, ainsi que les directions du vecteur principal de la diffusion peuvent être calculés directement à partir du tenseur de diffusion voxel par voxel. Ils ont été évalués dans plusieurs études qui se sont intéressées aux membres inférieurs et supérieurs ainsi qu'au tronc (Yanagisawa *et al.* 2009 ; Schwenzer *et al.* 2009b ; Froeling *et al.* 2012). L'analyse de l'orientation des fibres musculaires par le tenseur de diffusion s'avère corrélée avec l'architecture histologique du muscle squelettique (Karampinos *et al.* 2009 ; Damon *et al.* 2012 ; Froeling *et al.* 2012). En utilisant des modèles de diffusion élaborés, le diamètre de la cellule musculaire ainsi que les propriétés des barrières de diffusion ont pu être calculés au départ d'images de diffusion (Sigmund *et al.* 2013 ; Sigmund *et al.* 2014). La fiabilité des variables de diffusion mesurées dans le muscle squelettique a été améliorée par l'optimisation des paramètres de séquence de diffusion ainsi que des méthodes de traitement de données diffusion (Heemskerk *et al.* 2010 ; Froeling *et al.* 2010 ; Froeling *et al.* 2013). Avec des schémas de séquence de diffusion dédiés, les variables calculées ont montré une corrélation satisfaisante avec la perfusion et la vascularisation du muscle squelettique (Karampinos *et al.* 2010 ; Filli *et al.* 2015).

La plupart des études humaines sur la diffusion musculaire ont été menées sur des volontaires sains. Peu ont exploré des pathologies musculaires (Zaraiskaya *et al.* 2006 ; Qi *et al.* 2008 ; Sigmund *et al.* 2013 ; Sigmund *et al.* 2014 ; Ponrartana *et al.* 2015) dans le contexte de l'utilisation des variables de diffusion comme biomarqueurs ou comme outils d'évaluation. Le coefficient de diffusion apparent s'est logiquement révélé anormalement élevé dans les myopathies inflammatoires, tandis que le calcul de la fraction d'anisotropie a donné des résultats divergents (Ai *et al.* 2014 ; Froeling *et al.* 2015). Il n'y a pas encore eu d'analyse longitudinale de l'activité de la maladie ni de la réponse à un traitement. Dans une étude sur la dystrophie musculaire de Duchenne, les variables de diffusion montraient une bonne corrélation avec la sévérité de la maladie et avec d'autres indicateurs RMN d'activité de la maladie (Ponrartana *et al.* 2015). Toutefois, aucune supériorité de la diffusion sur les variables RMN habituelles n'a été démontrée. Les altérations du coefficient de diffusion apparent et de fraction d'anisotropie dans les muscles de patients atteints de la maladie de Duchenne reflétaient avant tout leur degré d'infiltration graisseuse. Dans une autre étude récente sur la

maladie de Duchenne, cette fois en prenant compte les effets de l'infiltration graisseuse et du rapport contraste à bruit, une augmentation du coefficient de diffusion apparent et de la valeur propre de diffusion λ_3 , a pu être démontrée mais dans le seul tibialis antérieur (Hooijmans *et al.* 2015). Dans un modèle murin de la dystrophie musculaire, les effets d'une thérapie génique ont été suivis par de nombreuses variables RMN, dont la diffusion (Park *et al.* 2015). La valeur ajoutée de la mesure des variables de diffusion n'a pas encore pu être déterminée. Les auteurs de cette revue pensent que l'imagerie de diffusion pourrait avoir sa place comme outil d'évaluation pour caractériser aux stades précoces de la maladie les anomalies d'orientation et d'organisation des fibres musculaires dystrophiques.

• L'analyse de texture d'images

L'analyse de texture est un domaine de recherche en soi, une niche pour spécialistes qui n'a eu jusqu'à présent que peu d'impact sur la caractérisation du tissu musculaire pathologique. La fraction graisseuse et les changements du T2 sont des biomarqueurs sensibles mais pas du tout spécifiques des maladies ou des mécanismes pathologiques sous-jacents. Il est cependant concevable que de l'information supplémentaire, sous forme de subtils motifs dans la distribution des intensités du signal de certains muscles, imperceptible à l'œil humain, soit révélée au filtre d'algorithmes d'analyse de texture.

Des mécanismes pathologiques complexes interviennent dans un muscle dystrophique, causant une désorganisation progressive des tissus. Cette perte de structure musculaire normale semble se traduire par une dispersion inhabituelle de l'intensité du signal RMN. L'hétérogénéité du signal dans un muscle dystrophique fut remarquée en premier dans le myocarde hypertrophié et défaillant d'un modèle de hamster pour la gamma-sarcoglycanopathie (Parzy *et al.* 2007). Des fluctuations du signal anormalement importantes mises en évidence par un coefficient de variation plus élevé pourraient être considérées comme une anomalie de texture d'ordre zéro avec une distribution spatiale aléatoire. Des observations similaires furent rapportées dans le muscle squelettique de chiens GRMD (Thibaud *et al.* 2012) et d'enfants Duchenne (Arpan *et al.* 2013 ; Wary *et al.* 2015a). Comme mentionné plus avant, ces observations pourraient refléter, au moins en partie, l'existence d'une fibrose musculaire, qui constitue un élément non négligeable de la désorganisation du muscle dystrophique. À un degré moindre, le vieillissement normal est associé à une augmentation faible mais significative de l'hétérogénéité du signal du muscle (Azzabou *et al.* 2015a), suggérant une bonne

sensibilité de cet indicateur. Il est intéressant de noter que l'imagerie pondérée T2 combinée à des algorithmes d'analyse de texture simples permirent de discriminer des dystrophies musculaires liées à différentes mutations génétiques chez des modèles de souris (Martins-Bach *et al.* 2015).

Les images de muscle des patient atteints de myopathies centronucléaires héréditaires semblent présenter une texture particulière, déjà relevée à l'inspection visuelle (R.Y. Carlier, communication personnelle). Un groupe de travail a été mis en place au sein de l'action MyoMRI (www.myo-mri.eu) de la Coopération Européenne en Science et Technologie (COST), avec pour objectif précis d'identifier les motifs texturaux anormaux qui pourraient être présents dans les myopathies dystrophiques et héréditaires. Des résultats positifs ont déjà été obtenus à partir d'images de chiens GRMD (Certaines *et al.* 2015 ; Lerski *et al.* 2015). Dans cette étude, il fut montré que les matrices de co-occurrence sont des descripteurs de la texture locale plus efficaces que des indices basés sur des moments, des matrices de longueurs ou une mesure de l'anisotropie locale. Des résultats similaires furent relevés dans d'autres essais d'analyse de texture d'images RMN (Brown *et al.* 2015). Il faut souligner que les matrices de co-occurrence sont sensibles au nombre et à la taille des voxels acquis. Cette observation se révéla particulièrement problématique dans l'étude mentionnée ci-avant. La valeur ajoutée de l'analyse de texture pour la caractérisation des anomalies du muscle squelettique au cours du temps reste à déterminer.

L'extrême dépendance des résultats de l'analyse de texture aux paramètres d'acquisition et aux particularités des plateformes demeure un obstacle à son utilisation dans des essais multi-centres. Il suffit de mentionner l'impact de la résolution spatiale sur la texture dont l'apparence sera radicalement modifiée en fonction de la taille du voxel : trop grande et la texture pourrait tout simplement disparaître, trop petite et l'augmentation du niveau de bruit pourrait la masquer. Un contrôle rigoureux et une harmonisation des paramètres d'acquisition seront un préalable indispensable à tout usage futur de l'analyse de texture comme outil d'évaluation.

Les développements techniques récents et leur impact sur l'usage de la RMN comme outil d'évaluation

L'imagerie du muscle, en particulier par RMN, est de plus en plus utilisée comme outil d'évaluation dans les essais cliniques. C'est une discipline encore relativement jeune, ayant certainement un grand potentiel, mais qui doit encore se développer, et ceci dans plusieurs directions. Il est prioritaire d'élargir

l'offre d'outils disponibles pour caractériser plus précisément les muscles normaux et pathologiques. Un certain nombre d'options importantes furent présentées dans les paragraphes précédents. Les protocoles dédiés à l'étude de muscles spécifiques, en particulier dans les zones situées dans la profondeur des tissus, va aussi gagner en importance. Très peu de travaux ont jusqu'à présent été consacrés à l'évaluation de la structure et la composition *in-vivo* du diaphragme (Thibaud *et al.* 2013). La conformation anatomique ainsi que le mouvement respiratoire compliquent l'étude du diaphragme, mais son rôle fonctionnel et son implication dans de nombreuses maladies justifient ces efforts (Mead *et al.* 2014). Un autre exemple, parmi une multitude : la thérapie cellulaire de patients atteints de dystrophie musculaire oculo-pharyngée (Périé *et al.* 2014). Une imagerie de haute résolution des muscles laryngés injectés avec des myoblastes homologues pourrait permettre de suivre, sinon directement les cellules thérapeutiques éventuellement marquées avec un agent de contraste, tout au moins leur impact éventuel sur la progression des lésions dégénératives.

La quantité d'information additionnelle sur la structure et la fonction du muscle que la RMN sera capable de fournir dans le futur, et qu'elle est déjà largement capable de générer, ainsi que la multiplicité des sites anatomiques à étudier amènent une difficulté majeure : le temps nécessaire à la réalisation de ces mesures. Le problème est double : à la fois économique, au travers du coût accru de l'examen, et pratique ainsi qu'éthique, de par l'obligation pour les patients d'avoir à supporter des acquisitions de plus d'une heure. Ce dernier aspect est particulièrement pénalisant en pédiatrie. Afin de limiter le temps d'acquisition, des efforts considérables ont été consacrés, et continueront de l'être, vers 1) une accélération des acquisitions, 2) une collecte simultanée de plusieurs variables RMN et d'autant de potentiels biomarqueurs au cours d'une acquisition unique. Ces deux objectifs peuvent être poursuivis conjointement dans de nombreux cas.

• Des acquisitions plus rapides

Pour accélérer l'étape d'acquisition, l'imagerie parallèle utilise l'information spatiale capturée par des maillages d'antennes réceptrices, ce qui permet de diminuer le nombre de lignes du plan de Fourier à acquérir et ainsi de réduire d'autant le temps d'acquisition. Divers scénarios d'imagerie parallèle ont été proposés depuis presque deux décennies (Pruessmann *et al.* 1999 ; Griswold *et al.* 2002 ; Deshmane *et al.* 2012) et sont couramment sinon systématiquement mis en œuvre. Plus récemment, même si cela remonte déjà à dix ans, un nouveau

concept a été introduit sous le nom d'acquisition comprimée (*compressed sensing*) (Donoho 2006 ; Lustig *et al.* 2008). Son principe est de tirer parti de redondances spatiales ou temporelles présentes dans certaines représentations de l'objet sous-jacent, ainsi que de l'incohérence des artefacts générés par un échantillonnage irrégulier, pour éviter de remplir des pans entiers de la matrice d'acquisition tout en reconstruisant une image avec un minimum de perte de qualité. Ce principe a été récemment appliqué à l'imagerie Dixon du muscle, notamment sur des patients Becker, avec des facteurs d'accélération pouvant atteindre 6 par comparaison aux techniques d'acquisition standard (Hollingsworth *et al.* 2013b ; Loughran *et al.* 2015). La combinaison de l'acquisition comprimée avec un échantillonnage dit non-cartésien, radial par exemple, permet d'atteindre des facteurs de 10 et plus, avec pratiquement aucune perte de qualité d'image (Feng *et al.* 2013).

Plus spécifiquement pour la cartographie T2, de nouvelles stratégies d'acquisition ont été dérivées de séquences utilisant la précession libre en régime stationnaire (SSFP) (Bieri *et al.* 2011, de Sousa *et al.* 2012, Heule *et al.* 2014). Une de ces approches utilise la technique pSSFP proposée par Bieri *et al.* (Bieri *et al.* 2011). Cette méthode permet de réaliser une cartographie 3D, rapide et sélective, du T2 de l'eau du muscle squelettique, et peut être assez facilement implémentée sur un imageur commercial (de Sousa *et al.* 2012). Une nouvelle méthode de cartographie T2 rapide utilisant la technique TESS a récemment été

proposée pour diminuer la sensibilité au mouvement qui affecte généralement les méthodes basées sur un état stationnaire non-compensé, notamment la pSSFP (Heule *et al.* 2014). La TESS-T2 est non-seulement débarrassée de l'habituel biais T1/T2, commun à toutes les méthodes mono-paramétriques à état stationnaire, mais fait aussi preuve d'une grande insensibilité aux inhomogénéités de champ B1. Ces nouvelles méthodes sont bien entendu compatibles avec les techniques d'imagerie parallèle et d'acquisition comprimée.

• Acquisitions simultanées de variables

L'idée d'acquérir plusieurs variables RMN d'intérêt en une seule séquence n'est pas nouvelle (Thulborn *et al.* 1981 ; Eleff *et al.* 1988 ; Brillault-Salvat *et al.* 1997). C'est peut-être avec la réalisation simultanée d'une imagerie fonctionnelle de la perfusion et de l'oxygénation, ainsi que d'une spectroscopie dynamique ^1H et ^{31}P qu'elle a été poussée le plus loin au niveau musculaire (Duteil *et al.* 2004) (voir Figure 14). Une telle approche fait gagner du temps, elle autorise une analyse combinée de variables dynamiques qui n'aurait pas été possible si celles-ci avaient été acquises séparément, ceci du fait de la difficulté pour un sujet à reproduire plusieurs fois le même exercice musculaire. Il a été démontré que l'extraction d'oxygène musculaire pouvait être déduite de tels protocoles fonctionnels d'imagerie et de spectroscopie multi-paramétriques (Carlier *et al.* 2005). C'est à l'aide d'outils multi-paramétriques qu'il a été identifié qu'une perfusion anormale contribuait à une réduction de la capacité des oxydations phosphorylantes mitochondriales chez les patients atteints de glycogénose de type III (Wary *et al.* 2010).

Dans le domaine de la caractérisation tissulaire musculaire, l'acquisition simultanée de cartographies pour plusieurs variables est une direction prometteuse, toujours dans l'objectif d'accélérer les évaluations quantitatives. Notre équipe a étudié la faisabilité d'une imagerie multi-paramétrique rapide, avec des temps d'acquisition de 2 secondes par coupe. Elle a permis de suivre les adaptations rapides du muscle squelettique à divers stimuli physiologiques et métaboliques (de Sousa *et al.* 2011). Cette séquence est constituée d'une impulsion d'inversion suivie de l'acquisition de plusieurs images en régime SSFF équilibré pendant que le signal s'approche d'un état stationnaire (Schmitt *et al.* 2004). Les valeurs de T1, T2 et M0 (la densité de protons relative) peuvent alors être déduites d'une régression mono-exponentielle à trois paramètres sur la série d'images. La trajectoire du signal en IR-bSSFP peut être modélisée plus précisément à partir des équations de Bloch ou du formalisme EPG afin de

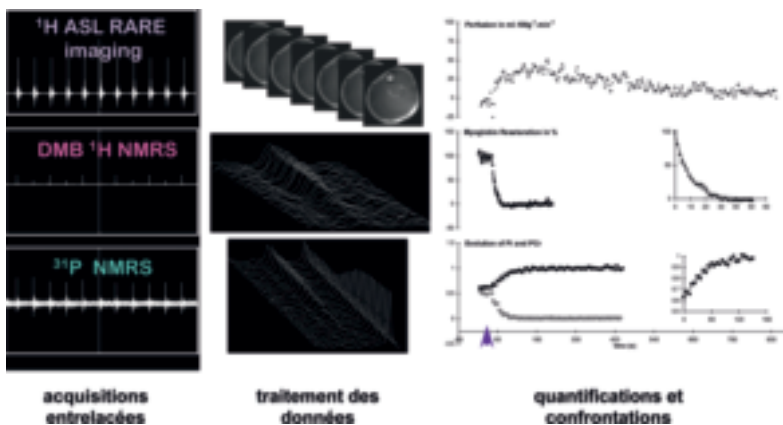


Figure 14

Il y a une vingtaine d'années, l'acquisition entrelacée de signaux RMN d'imagerie et de spectroscopie, provenant de plusieurs noyaux, a été mise au point sur des spectromètres de recherche et a permis des études originales du métabolisme de l'oxygène musculaire, en intégrant au cours d'un seul examen des données sur l'apport, l'extraction et la consommation d'oxygène, par la mesure simultanée de la perfusion musculaire via le marquage des spins artériels, de l'oxygénation intra-myocytaire via la spectroscopie ^1H de la désoxymyoglobine et de l'énergétique musculaire via la spectroscopie du ^{31}P . Cette approche peut maintenant être mise en œuvre sur des imageurs cliniques, ce qui devrait élargir le champ d'applications et d'utilisations de cette technique originale.

prendre en compte certaines erreurs d'instrumentation (les inhomogénéités de B1+ et B0, l'efficacité d'inversion et les profils de coupes non-idéaux) (Hennig *et al.* 2004 ; Weigel 2014 ; Marty *et al.* 2015) et la composition des tissus (les composantes eau/graisse).

Les cartographies de fraction grasseuse et de T2 sont les deux biomarqueurs RMN les plus matures et s'affirment comme les plus utiles pour les études musculaires. Parvenir à extraire d'une même séquence l'information nécessaire à la création de cartographies de fraction grasseuse et de T2 représentera un gain de temps considérable.

Une méthode appelée IDEAL-CPMG, combinant l'algorithme IDEAL avec une séquence de Carr-Purcell-Meiboom-Gill a récemment été proposée (Janiczek *et al.* 2011). Les images produites sont séparées en eau et grasse pour chaque écho. On procède ensuite à une régression exponentielle sur chaque décroissance pour quantifier le T2 de l'eau et celui de la grasse. La fraction grasseuse est calculée à partir des images en densité de proton de l'eau et de la grasse obtenues *via* la méthode de reconstruction IDEAL. Néanmoins, des formes d'impulsion RF imparfaites et un champ RF inhomogène peuvent donner lieu à la génération d'échos stimulés et rendre l'estimation du T2 très incertaine avec des modèles purement exponentiels. De plus, la conception de cette séquence d'impulsions

impose l'utilisation d'une large bande passante de lecture, ce qui abaisse le rapport signal sur bruit des images produites.

Une autre approche pour mesurer simultanément le T2 de l'eau et la fraction grasseuse est de procéder à une régression multi-composante sur la séquence standard MSME en tirant partie des différences de relaxations T1 et T2 entre les protons de l'eau et de la grasse. Des modèles exponentiels peuvent être utilisés pour décrire la décroissance du signal MSME, comme dans les travaux d'Azzabou *et al.* (Azzabou *et al.* 2015). Dernièrement, notre équipe a proposé d'utiliser uniquement la séquence MSME et une régression de modèles à base d'EPG pour extraire simultanément la fraction de grasse et le T2 de l'eau (Marty *et al.* 2016). La validation de cette approche par rapport à des acquisitions séparées est en cours et, espérons-le, justifiera son implémentation dans des protocoles en permettant une réduction du temps d'acquisition d'environ 50 % (voir Figure 15).

Conclusions

En dépit de coûts élevés, de l'impossibilité d'intervenir au lit du patient, d'une technologie complexe élevée et d'une interprétation parfois ardue, le rôle de l'imagerie et la spectroscopie par RMN comme outil d'évaluation s'affirme progressivement dans les études musculaires. S'il paraît accuser un retard par rapport à la contribution de l'imagerie dans l'évaluation d'autres organes, tels que le cerveau, c'est le résultat d'une plus faible incidence des pathologies musculaires, d'un accès limité aux imageurs et du manque de perspectives thérapeutiques, ces deux derniers obstacles sont progressivement en train d'être levés. Les cartographies paramétriques de la fraction grasseuse et du T2 fournissent des mesures atraumatiques et quantitatives, respectivement des lésions dégénératives du muscle squelettique et de l'activité de la maladie. Ils sont de loin les deux biomarqueurs RMN les plus utilisés dans les protocoles musculaires. En dépit des limitations et contraintes mentionnées plus haut, la valeur ajoutée d'une telle caractérisation a conduit progressivement à l'intégration quasi systématique de l'imagerie RMN comme outil d'évaluation dans les essais cliniques récents. Les développements actuels visent à raccourcir les séquences d'acquisitions et à collecter en même temps fraction grasseuse et T2, et vont considérablement diminuer le temps d'examen. Leur implémentation dans des protocoles multicentriques est attendue dans les prochains mois et années, et va grandement améliorer la compliance des patients, notamment pédiatriques, à ce type d'examen. Accélérer les acquisitions des cartographies de fraction

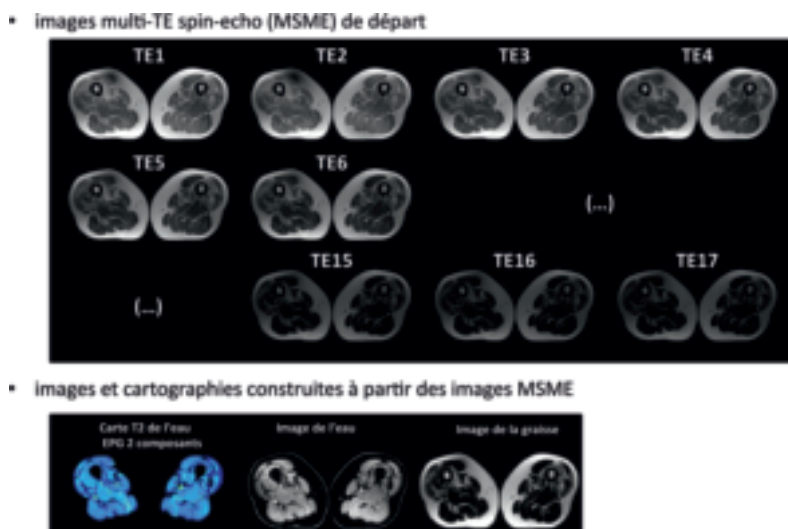


Figure 15

Les deux principaux biomarqueurs RMN musculaires, le pourcentage de grasse et le T2 de l'eau musculaire peuvent être calculés à partir d'une seule série d'images en écho de spin qui couvre une gamme de TEs. Dans l'extraction des données, il est possible de prendre en compte les inhomogénéités de champ radio-fréquence. Cette approche, basée exclusivement sur une optimisation du post-processing, permet de réduire très significativement la durée d'un examen puisqu'elle fait l'économie d'une imagerie eau-graisse complémentaire, tout en ne demandant que la mise en œuvre d'une séquence standard, disponible sur tous les imageurs.

graisseuse et de T2 pourra aussi dégager du temps pour inclure la mesure d'autres biomarqueurs dans des protocoles cliniques, comme par exemple le contenu en phospho-diester par spectroscopie du ^{31}P , la perfusion musculaire par marquage de spins artériels et/ou la fibrose interstitielle avec des séquences UTE. Explorer les muscles squelettiques, superficiels ou profonds, et caractériser l'anatomie, la structure, la biochimie et la fonction du muscle de façon atraumatique, et potentiellement simultanément, sont spécifiques à la RMN. Grâce aux innovations technologiques sans cesse introduites, ces propriétés devraient, dans un futur proche, être de plus en plus exploitées dans des contextes cliniques et viendront renforcer le rôle de la RMN comme outil d'évaluation dans les essais thérapeutiques sur le muscle squelettique.

Abstract

Recent years have seen tremendous progress towards therapy of many previously incurable neuromuscular diseases. This new context has acted as a driving force for the development of novel non-invasive outcome measures. These can be organized in three main categories: functional tools, fluid biomarkers and imagery. In the latest category, nuclear magnetic resonance imaging (NMRI) offers a considerable range of possibilities for the characterization of skeletal muscle composition, function and metabolism. Nowadays, three NMR outcome measures are frequently integrated in clinical research protocols. They are: 1/ the muscle cross sectional area or volume, 2/ the percentage of intramuscular fat and 3/ the water T2 maps, which quantify muscle trophicity, chronic fatty degenerative changes and edema (or more broadly, "disease activity"), respectively. A fourth biomarker, the contractile tissue volume is easily derived from the first two ones. The fat fraction maps most often acquired with Dixon sequences have proven their capability to detect small changes in muscle composition and have repeatedly shown superior sensitivity over standard functional evaluation. This outcome measure will more than likely be the first of the series to be validated as an endpoint by regulatory agencies. The versatility of contrast generated by NMR has opened many additional possibilities for characterization of the skeletal muscle and will result in the proposal of more NMR biomarkers. Ultra-short TE (UTE) sequences, late gadolinium enhancement and NMR elastography are being investigated as candidates to evaluate skeletal muscle interstitial fibrosis. Many options exist to measure muscle perfusion and oxygenation by NMR. Texture analysis algorithms could generate complementary information on muscle organization at a

mesoscopic scale. ^{31}P NMR spectroscopy is the reference technique to assess muscle energetics non-invasively during and after exercise. In dystrophic muscle, ^{31}P NMR spectrum at rest is profoundly perturbed, and several resonances inform on cell membrane integrity. Considerable efforts are being directed towards acceleration of image acquisitions using a variety of approaches, from the extraction of fat content and water T2 maps from one single acquisition to partial matrices acquisition schemes. Spectacular decreases in examination time are expected in the near future. They will reinforce the attractiveness of imaging outcome measures and will further facilitate their integration in clinical research trials.

Key words : magnetic resonance imaging - MRI - magnetic resonance spectroscopy - outcome measure - clinical trials

Skeletal muscle quantitative nuclear magnetic resonance imaging and spectroscopy as an outcome measure for clinical trials

LIENS D'INTÉRÊT

Pierre Carlier a participé à des réunions du conseil scientifique de Genzyme-Sanofi et Biomarín-Prosensa, pour lesquelles il a perçu des honoraires. Il est intervenu ou intervient bénévolement comme conseiller scientifique de Servier, Atyr, Tarix, Esperare, Roche et CRIS.

Olivier Scheidegger a bénéficié d'aides de Genzyme et de Bayer pour la participation à des congrès.

Les autres auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

- Ai T, Yu K, Gao L, et al. Diffusion tensor imaging in evaluation of thigh muscles in patients with polymyositis and dermatomyositis. *Br J Radiol* 2014 ; 87 (1043) : 20140261.
- Alexander, Matthew S, Kunkel, et al. Skeletal Muscle MicroRNAs: Their diagnostic and therapeutic potential in human muscle disease. *J Neuromuscul Dis* 2015 ; 2 : 1-11.
- Alizai H, Nardo L, Karampinos DC, et al. Comparison of clinical semi-quantitative assessment of muscle fat infiltration with quantitative assessment using chemical shift-based water/fat separation in MR studies of the calf of post-menopausal women. *Eur Radiol* 2012 ; 22 : 1592-600.
- Amthor H, Egelhof T, McKinnell I, et al. Albumin targeting of damaged muscle fibres in the mdx mouse can be monitored by MRI. *Neuromuscul Disord* 2004 ; 14 : 791-6.
- Andreisek G, White LM, Sussman MS, et al. T2*-weighted and arterial spin labeling MRI of calf muscles in healthy volunteers and patients with chronic exertional compartment syndrome: preliminary experience. *Am J Roentgenol* 2009 ; 193 : 327-33.
- Araujo ECA, Fromes Y, Carlier PG. New Insights on Human Skeletal Muscle Tissue Compartments Revealed by In Vivo T2 NMR Relaxometry. *Biophys J* 2014 ; 106 : 2267-74.
- Arechavala-Gomez V, Anthony K, Morgan J, Muntoni F. Antisense oligonucleotide-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy: progress and challenges. *Curr Gene Ther* 2012 ; 12 : 152-60.
- Argov Z, Löfberg M, Arnold DL. Insights into muscle diseases gained by phosphorus magnetic resonance spectroscopy. *Muscle Nerve* 2000 ; 23 : 1316-34.
- Arpan I, Forbes SC, Lott DJ, et al. T2 mapping provides multiple approaches for the characterization of muscle involvement in neuromuscular diseases: a cross-sectional study of lower leg muscles

Remerciements

Ce travail a bénéficié du support de l'Action COST BM1304, « Applications of MR imaging and spectroscopy techniques in neuromuscular disease : collaboration on outcome measures and pattern recognition for diagnostics and therapy development » (<http://myo-mri.eu/>).

- in 5-15-year-old boys with Duchenne muscular dystrophy. *NMR Biomed* 2013 ; 26 : 320-8.
- Arpan I, Willcocks RJ, Forbes SC, *et al.* Examination of effects of corticosteroids on skeletal muscles of boys with DMD using MRI and MRS. *Neurology* 2014 ; 83 : 974-80.
- Aschwanden M, Partovi S, Jacobi B, *et al.* Assessing the end-organ in peripheral arterial occlusive disease-from contrast-enhanced ultrasound to blood-oxygen-level-dependent MR imaging. *Cardiovasc Diagn Ther* 2014 ; 4 : 165-72.
- Azzabou N, Carlier PG Fat quantification and T2 measurement. *Pediatr Radiol* 2014 ; 44 : 1620-1.
- Azzabou N, Hogrel J-Y, Carlier PG. NMR based biomarkers to study age-related changes in the human quadriceps. *Exp Gerontol* 2015a ; 70 : 54-60.
- Azzabou N, Loureiro de Sousa P, Caldas E, Carlier PG. Validation of a generic approach to muscle water T2 determination at 3T in fat-infiltrated skeletal muscle. *J Magn Reson Imaging* 2015b ; 41 : 645-53.
- Azzabou N, Sousa PL de, Caldas E, Carlier PG. Validation of a generic approach to muscle water T2 determination at 3T in fat-infiltrated skeletal muscle. *J Magn Reson Imaging* 2015c ; 41 : 645-53.
- Baligand C, Wary C, Ménard JC, *et al.* Measuring perfusion and bioenergetics simultaneously in mouse skeletal muscle: a multiparametric functional-NMR approach. *NMR Biomed* 2011 ; 24 : 281-90.
- Barbiroli B, Funicello R, Ferlini A, *et al.* Muscle energy metabolism in female DMD/BMD carriers: a 31P-MR spectroscopy study. *Muscle Nerve* 1992a ; 15 : 344-48.
- Barbiroli B, Funicello R, Lotti S, *et al.* 31P-NMR spectroscopy of skeletal muscle in Becker dystrophy and DMD/BMD carriers. Altered rate of phosphate transport. *J Neurol Sci* 1992b ; 109 : 188-95.
- Barbiroli B, McCully KK, Lotti S, *et al.* Further impairment of muscle phosphate kinetics by lengthening exercise in DMD/BMD carriers. An in vivo 31P-NMR spectroscopy study. *J Neurol Sci* 1993 ; 119 : 65-73.
- Barnouin Y, Butler-Browne G, Voit T, *et al.* Manual segmentation of individual muscles of the quadriceps femoris using MRI: a reappraisal. *J Magn Reson Imaging* 2014 ; 40 : 239-47.
- Bertoldi D, Parzy E, Fromes Y, *et al.* New insight into abnormal muscle vasodilatory responses in aged hypertensive rats by in vivo nuclear magnetic resonance imaging of perfusion. *J Vasc Res* 2006 ; 43 : 149-56.
- Bertoldi D, Loureiro de Sousa P, Fromes Y, *et al.* Quantitative, dynamic and non-invasive determination of skeletal muscle perfusion in mouse leg by NMR arterial spin-labeled imaging. *Magn Reson Imaging* 2008 ; 26 : 1259-65.
- Bieri O, Scheffler K, Welsch GH, *et al.* Quantitative mapping of T2 using partial spoiling. *Magn Reson Med* 2011 ; 66 : 410-8.
- Blat Y, Blat S. Drug Discovery of Therapies for Duchenne Muscular Dystrophy. *J Biomol Screen* 2015 ; 10 : 1189-203. Epub 2015 May 14.
- Bley TA, Wieben O, François CJ, *et al.* Fat and water magnetic resonance imaging. *J Magn Reson Imaging* 2010 ; 31 : 4-18.
- Boesch C. Musculoskeletal spectroscopy. *J Magn Reson imaging* 2007 ; 25 : 321-38.
- Bonati U, Hafner P, Schädelin S, *et al.* Quantitative muscle MRI: A powerful surrogate outcome measure in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 2015a ; 25 : 679-85.
- Bonati U, Schmid M, Hafner P, *et al.* Longitudinal 2-point dixon muscle magnetic resonance imaging in becker muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 2015b ; 51 : 918-21.
- Brillault-Salvat C, Giacomini E, Jouvensal L, *et al.* Simultaneous determination of muscle perfusion and oxygenation by interleaved NMR plethysmography and deoxyhemoglobin spectroscopy. *NMR Biomed* 1997 ; 10 : 315-23.
- Brown AM, Nagala S, McLean MA, *et al.* Multi-institutional validation of a novel textural analysis tool for preoperative stratification of suspected thyroid tumors on diffusion-weighted MRI. *Magn Reson Med* 2015 ; doi: 10.1002/mrm.25743
- Bryan WW, Reisch JS, McDonald G, *et al.* Magnetic resonance imaging of muscle in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 1998 ; 51 : 110-3.
- Bryant ND, Li K, Does MD, *et al.* Multi-parametric MRI characterization of inflammation in murine skeletal muscle. *NMR Biomed* 2014 ; 27 : 716-25.
- Bushby K, Finkel R, Wong B, *et al.* Ataluren treatment of patients with nonsense mutation dystrophinopathy. *Muscle Nerve* 2014 ; 50 : 477-87.
- Buyse GM, Voit T, Schara U, *et al.* Efficacy of idebenone on respiratory function in patients with Duchenne muscular dystrophy not using glucocorticoids (DELOS) : a double-blind randomised placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet* 2015 ; 385 : 1748-57.
- Caldas de A. Araujo E, Azzabou N, Vignaud A, *et al.* Quantitative NMR imaging of the short-T2 components in the SKM tissue: alterations observed in myopathic patients. In: ISMRM 23rd Annual Meeting & Exhibition. Toronto, Ontario, Canada, 2015 ; p. 251.
- Caravan P, Das B, Dumas S, *et al.* Collagen-targeted MRI contrast agent for molecular imaging of fibrosis. *Angew Chem Int Ed Engl* 2007 ; 46 : 8171-3.
- Caravan P, Yang Y, Zachariah R, *et al.* Molecular magnetic resonance imaging of pulmonary fibrosis in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013 ; 49 : 1120-6.
- Carlier PG. Global T2 versus water T2 in NMR imaging of fatty infiltrated muscles: different methodology, different information and different implications. *Neuromuscul Disord* 2014 ; 24 : 390-2.
- Carlier PG, Azzabou N, de Sousa PL, *et al.* P.14.4 Diagnostic role of quantitative NMR imaging exemplified by 3 cases of juvenile dermatomyositis. *Neuromuscul Disord* 2013 ; 23 : 814.
- Carlier PG, Azzabou N, de Sousa PL, *et al.* Skeletal muscle quantitative nuclear magnetic resonance imaging follow-up of adult Pompe patients. *J Inherit Metab Dis* 2015 ; 38 : 565-72.
- Carlier PG, Bertoldi D, Baligand C, *et al.* Muscle blood flow and oxygenation measured by NMR. *NMR Biomed* 2006 ; 19 : 954-67.
- Carlier PG, Brillault-Salvat C, Giacomini E, *et al.* How to investigate oxygen supply, uptake, and utilization simultaneously by interleaved NMR imaging and spectroscopy of the skeletal muscle. *Magn Reson Med* 2005 ; 54 : 1010-3.
- Carlier PG, Shukelovich A, Baudin PY, *et al.* Fast, precise, interactive segmentation of skeletal muscle NMR images. *Neuromuscul Disord* 2014 ; 24 : 836-37.
- Certaines JD De, Larcher T, Duda D, *et al.* Application of texture analysis to muscle MRI: 1-What kind of information should be expected from texture analysis? *EPJ Nonlinear Biomed Phys* 2015 ; 1-3 : 1-14.
- Chance B, Younkin DP, Kelley R, *et al.* Magnetic resonance spectroscopy of normal and diseased muscles. *Am J Med Genet* 1986 ; 25 : 659-79.
- Cirak S, Arechavala-Gomez V, Guglieri M, *et al.* Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study. *Lancet* 2011 ; 378 : 595-605.
- Csapo R, Malis V, Sinha U, *et al.* Age-associated differences in triceps surae muscle composition and strength - an MRI-based cross-sectional comparison of contractile, adipose and connective tissue. *BMC Musculoskelet Disord* 2014 ; 15 : 209 Epub 2014 Jun 17.
- Damon BM, Heemskerk AM, Ding Z. Polynomial fitting of DT-MRI fiber tracts allows accurate estimation of muscle architectural parameters. *Magn Reson Imaging* 2012 ; 30 : 589-600.
- Damon BM, Wadington MC, Hornberger JL, Lansdown DA. Absolute and relative contributions of BOLD effects to the muscle functional MRI signal intensity time course: effect of exercise intensity. *Magn Reson Med* 2007 ; 58 : 335-45.
- Dass S, Suttie JJ, Piechnik SK, *et al.* Myocardial Tissue Characterization Using Magnetic Resonance Noncontrast T1 Mapping in Hypertrophic and Dilated Cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Imaging* 2012 ; 5 : 726-33.
- de Jong S, Zwanenburg JJ, Visser F, *et al.* Direct detection of myocardial fibrosis by MRI. *J Mol Cell Cardiol* 2011 ; 51 : 974-79.
- de Sousa PL, Vignaud A, Caldas de Almeida Araújo E, Carlier PG. Factors controlling T2 mapping from partially spoiled SSFP

- sequence: optimization for skeletal muscle characterization. *Magn Reson Med* 2012 ; 67 : 1379-90.
- de Sousa PL, Vignaud A, Fleury S, Carlier PG. Fast monitoring of T(1), T(2), and relative proton density (M(0)) changes in skeletal muscles using an IR-TrueFISP sequence. *J Magn Reson imaging* 2011 ; 33 : 921-30.
- Decorte N, Buehler T, Caldas de Almeida Araujo E, et al. Non-invasive estimation of oxygen consumption in human calf muscle through combined NMR measurements of ASL perfusion and T₂ oxymetry. *J Vasc Res* 2014 ; 51 : 360-8.
- Decostre V, Canal A, Ollivier G, et al. Wrist flexion and extension torques measured by highly sensitive dynamometer in healthy subjects from 5 to 80 years. *BMC Musculoskelet Disord* 2015 ; 16 : 4. Epub 2015 Jan 31.
- Degardin A, Morillon D, Lacour A, et al. Morphologic imaging in muscular dystrophies and inflammatory myopathies. *Skeletal Radiol* 2010 ; 39 : 1219-27.
- Desguerre I, Mayer M, Leturcq F, et al. Endomysial Fibrosis in Duchenne Muscular Dystrophy. *J Neuropathol Exp Neurol* 2009 ; 68 : 762-73.
- Deshmane A, Gulani V, Griswold MA, Seiberlich N. Parallel MR imaging. *J Magn Reson Imaging* 2012 ; 36 : 55-72.
- Detre JA, Wang J. Technical aspects and utility of fMRI using BOLD and ASL. *Clin Neurophysiol* 2002 ; 113 : 621-34.
- Donahue KM, Van Kylen J, Guven S, et al. Simultaneous gradient-echo/spin-echo EPI of graded ischemia in human skeletal muscle. *J Magn Reson Imaging* 1998 ; 8 : 1106-13.
- Donoho DL. Compressed sensing. *IEEE Trans Inf Theory* 2006 ; 1289-306.
- Dowling P, Holland, Ashling, Ohlendieck K. Mass spectrometry-based identification of muscle-associated and muscle-derived proteomic biomarkers of dystrophinopathies. *J Neuromuscul Dis* 2014 ; 1 : 15-40.
- Douglas AGL, Wood MJA. Splicing therapy for neuromuscular disease. *Mol Cell Neurosci* 2013 ; 56 : 169-85.
- Drakonaki EE, Allen GM, Wilson DJ. Ultrasound elastography for musculoskeletal applications. *Br J Radiol* 2012 ; 85 : 1435-45.
- Du J, Bydder M, Takahashi AM, et al. Short T2 contrast with three-dimensional ultrashort echo time imaging. *Magn Reson Imaging* 2011 ; 29 : 470-82.
- Du J, Takahashi AM, Chung CB. Ultrashort TE spectroscopic imaging (UTESI): application to the imaging of short T2 relaxation tissues in the musculoskeletal system. *J Magn Reson Imaging* 2009 ; 29 : 412-21.
- Duteil S, Bourrilhon C, Raynaud JS, et al. Metabolic and vascular support for the role of myoglobin in humans: a multiparametric NMR study. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004 ; 287 : R1441-9.
- Duteil S, Wary C, Raynaud JS, et al. Influence of vascular filling and perfusion on BOLD contrast during reactive hyperemia in human skeletal muscle. *Magn Reson Med* 2006 ; 55 : 450-4.
- e Lima KMM, da Matta TT, de Oliveira LF. Reliability of the rectus femoris muscle cross-sectional area measurements by ultrasonography. *Clin Physiol Funct Imaging* 2012 ; 32 : 221-6.
- Edwards RH, Dawson MJ, Wilkie DR, et al. Clinical use of nuclear magnetic resonance in the investigation of myopathy. *Lancet* 1982 ; 725-30.
- Edzes H, Samulski ET. The measurement of cross-relaxation effects in the proton NMR spin-lattice relaxation of water in biological systems: Hydrated collagen and muscle. *J Magn Reson* 1978 ; 31 : 207-29.
- Eleff SM, Schnell MD, Ligetti L, et al. Concurrent measurements of cerebral blood flow, sodium, lactate, and high-energy phosphate metabolism using 19F, 23Na, 1H, and 31P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Med* 1988 ; 7 : 412-24.
- Eliav U, Komlosch ME, Bassar PJ, Navon G. Collagen composition and content-dependent contrast in porcine annulus fibrosus achieved by using double quantum and magnetization transfer filtered UTE MRI. *Magn Reson Med* 2014 ; 71 : 388-93.
- Englund EK, Langham MC, Li C, et al. Combined measurement of perfusion, venous oxygen saturation, and skeletal muscle T₂* during reactive hyperemia in the leg. *J Cardiovasc Magn Reson* 2013 ; 15 : 70.
- Englund EK, Langham MC, Ratcliffe SJ, et al. Multiparametric assessment of vascular function in peripheral artery disease: dynamic measurement of skeletal muscle perfusion, blood-oxygen-level dependent signal, and venous oxygen saturation. *Circ Cardiovasc Imaging* 2015 ; doi: 10.1161/CIRCIMAGING.114.002673.
- Ennen JP, Verma M, Asakura A. Vascular-targeted therapies for Duchenne muscular dystrophy. *Skelet Muscle* 2013 ; 3-9 : 1-12.
- Erriquez D, Perini G, Ferlini A. Non-coding RNAs in muscle dystrophies. *Int J Mol Sci* 2013 ; 14 : 19681-704.
- Feng L, Grimm R, Block KT, et al. Golden-angle radial sparse parallel MRI: Combination of compressed sensing, parallel imaging, and golden-angle radial sampling for fast and flexible dynamic volumetric MRI. *Magn Reson Med* 2013 ; 72 : 707-17.
- Filli L, Boss A, Wurnig MC, et al. Dynamic intravoxel incoherent motion imaging of skeletal muscle at rest and after exercise. *NMR Biomed* 2015 ; 28 : 240-6.
- Fischmann A, Hafner P, Fasler S, et al. Quantitative MRI can detect subclinical disease progression in muscular dystrophy. *J Neurol* 2012 ; 259 : 1648-54.
- Fischmann A, Hafner P, Gloor M, et al. Quantitative MRI and loss of free ambulation in Duchenne muscular dystrophy. *J Neurol* 2013 ; 260 : 969-74.
- Fischmann A, Morrow JM, Sinclair CDJ, et al. Improved anatomical reproducibility in quantitative lower-limb muscle MRI. *J Magn Reson imaging* 2014 ; 39 : 1033-8.
- Fleckenstein JL, Watumull D, Conner KE, et al. Denervated human skeletal muscle: MR imaging evaluation. *Radiology* 1993 ; 187 : 213-8.
- Forbes SC, Willcocks RJ, Triplett WT, et al. Magnetic resonance imaging and spectroscopy assessment of lower extremity skeletal muscles in boys with Duchenne muscular dystrophy: a multicenter cross sectional study. *PLoS One* 2014 ; 9 : e106435.
- Friedrich MG. Myocardial T1: The Rise of a Novel Biomarker Continues. *JACC Cardiovasc Imaging* 2015 ; 8 : 47-49.
- Froeling M, Nederveen AJ, Heijtel DFR, et al. Diffusion-tensor MRI reveals the complex muscle architecture of the human forearm. *J Magn Reson Imaging* 2012 ; 36 : 237-48.
- Froeling M, Nederveen AJ, Nicolay K, Strijkers GJ. DTI of human skeletal muscle: the effects of diffusion encoding parameters, signal-to-noise ratio and T2 on tensor indices and fiber tracts. *NMR Biomed* 2013 ; 26 : 1339-52.
- Froeling M, Oudeman J, Strijkers GJ, et al. Muscle changes detected with diffusion-tensor imaging after long-distance running. *Radiology* 2015 ; 274 : 548-62.
- Froeling M, Oudeman J, van den Berg S, et al. Reproducibility of diffusion tensor imaging in human forearm muscles at 3.0 T in a clinical setting. *Magn Reson Med* 2010 ; 64 : 1182-90.
- Fuchs BC, Wang H, Yang Y, et al. Molecular MRI of collagen to diagnose and stage liver fibrosis. *J Hepatol* 2013 ; 59 : 992-8.
- Gaeta M, Messina S, Mileto A, et al. Muscle fat-fraction and mapping in Duchenne muscular dystrophy: evaluation of disease distribution and correlation with clinical assessments. Preliminary experience. *Skeletal Radiol* 2012 ; 41 : 955-61.
- Garrood P, Hollingsworth KG, Eagle M, et al. MR imaging in Duchenne muscular dystrophy: quantification of T1-weighted signal, contrast uptake, and the effects of exercise. *J Magn Reson imaging* 2009 ; 30 : 1130-8.
- Gineste C, De Winter JM, Kohl C, et al. In vivo and in vitro investigations of heterozygous nebulin knock-out mice disclose a mild skeletal muscle phenotype. *Neuromuscul Disord* 2013a ; 23 : 357-69.
- Gineste C, Duhamel G, Le Fur Y, et al. Multimodal MRI and (31P)-MRS investigations of the ACTA1(Asp286Gly) mouse model of nemaline myopathy provide evidence of impaired in vivo muscle function, altered muscle structure and disturbed energy metabolism. *PLoS One* 2013b ; 8 : e72294.
- Gineste C, Le Fur Y, Vilmen C, et al. Combined MRI and 31P-MRS investigations of the ACTA1(H40Y) mouse model of nemaline myopathy show impaired muscle function and altered energy metabolism. *PLoS One* 2013c ; 8 : e61517.
- Glaser KJ, Manduca A, Ehman RL. Review of MR elastography applications and recent developments. *J Magn Reson imaging* 2012 ; 36 : 757-74.

- Griswold MA, Jakob PM, Heidemann RM, *et al.* Generalized auto-calibrating partially parallel acquisitions (GRAPPA). *Magn Reson Med* 2002 ; 47 : 1202-10.
- Grözinger G, Pohmann R, Schick F, *et al.* Perfusion measurements of the calf in patients with peripheral arterial occlusive disease before and after percutaneous transluminal angioplasty using MR arterial spin labeling. *J Magn Reson imaging* 2013 ; 40 : 980-7.
- Ha D-H, Choi S, Kang E-J, Park HT. Diffusion tensor imaging and T2 mapping in early denervated skeletal muscle in rats. *J Magn Reson Imaging* 2015 ; 42 : 617-23.
- Heemskerk AM, Sinha TK, Wilson KJ, *et al.* Repeatability of DTI-based skeletal muscle fiber tracking. *NMR Biomed* 2010 ; 23 : 294-303.
- Heemskerk AM, Strijkers GJ, Drost MR, *et al.* Skeletal muscle degeneration and regeneration after femoral artery ligation in mice: monitoring with diffusion MR imaging. *Radiology* 2007 ; 243 : 413-21.
- Heerschap A, Houtman C, in 't Zandt HJ, *et al.* Introduction to in vivo 31P magnetic resonance spectroscopy of (human) skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* 1999 ; 58 : 861-70.
- Heier CR, Guerron AD, Korotcov A, *et al.* Non-invasive MRI and spectroscopy of mdx mice reveal temporal changes in dystrophic muscle imaging and in energy deficits. *PLoS One* 2014 ; 9 : e112477.
- Henkelman RM, Stanisz GJ, Graham SJ. Magnetization transfer in MRI : a review. *NMR Biomed* 2001 ; 14 : 57-64.
- Hennig J, Weigel M, Scheffler K. Calculation of Flip Angles for Echo Trains with Predefined Amplitudes with the Extended Phase Graph (EPG)-Algorithm: Principles and Applications to Hyperecho and TRAPS Sequences. 2004 ; 49 : 527-35.
- Heule R, Ganter C, Bieri O. Triple echo steady-state (TESS) relaxometry. *Magn Reson Med* 2014 ; 71 : 230-7.
- Hiba B, Richard N, Hébert LJ, *et al.* Quantitative assessment of skeletal muscle degeneration in patients with myotonic dystrophy type 1 using MRI. *J Magn Reson imaging* 2012 ; 35 : 678-85.
- Hinojar R, Foote L, Arroyo Ucar E, *et al.* Native T1 in Discrimination of Acute and Convalescent Stages in Patients With Clinical Diagnosis of Myocarditis. *JACC Cardiovasc Imaging* 2015 ; 8 : 37-46.
- Hogrel J-Y, Allenbach Y, Canal A, *et al.* Four-year longitudinal study of clinical and functional endpoints in sporadic inclusion body myositis: implications for therapeutic trials. *Neuromuscul Disord* 2014 ; 24 : 604-10.
- Hogrel J-Y, Barnouin Y, Azzabou N, *et al.* NMR imaging estimates of muscle volume and intramuscular fat infiltration in the thigh: variations with muscle, gender, and age. *Age* 2015 ; 37 (3) : 9798.
- Hollingsworth KG, de Sousa PL, Straub V, Carlier PG. Towards harmonization of protocols for MRI outcome measures in skeletal muscle studies: consensus recommendations from two TREAT-NMD NMR workshops, 2 May 2010, Stockholm, Sweden, 1-2 October 2009, Paris, France. *Neuromuscul Disord* 2012 ; 22 Suppl 2 : S54-67.
- Hollingsworth KG, Garrood P, Eagle M, *et al.* Magnetic resonance imaging in Duchenne muscular dystrophy: Longitudinal assessment of natural history over 18 months. *Muscle Nerve* 2013a ; 48 : 586-8.
- Hollingsworth KG, Higgins DM, McCallum M, *et al.* Investigating the quantitative fidelity of prospectively undersampled chemical shift imaging in muscular dystrophy with compressed sensing and parallel imaging reconstruction. *Magn Reson Med* 2013b ; 72 : 1016-19.
- Hooijmans MT, Damon BM, Froeling M, *et al.* Evaluation of skeletal muscle DTI in patients with duchenne muscular dystrophy. *NMR Biomed* 2015 ; 28 : 1589-97.
- Horn M. 23Na magnetic resonance imaging for the determination of myocardial viability: the status and the challenges. *Curr Vasc Pharmacol* 2004 ; 2 : 329-33.
- Hörster I, Weigt-Usinger K, Carmann C, *et al.* The L-arginine/NO pathway and homoarginine are altered in Duchenne muscular dystrophy and improved by glucocorticoids. *Amino Acids* 2015 ; 47 : 1853-63.
- Hu HH, Börmert P, Hernando D, *et al.* ISMRM workshop on fat-water separation: insights, applications and progress in MRI. *Magn Reson Med* 2012 ; 68 : 378-88.
- Hu HH, Kan HE. Quantitative proton MR techniques for measuring fat. *NMR Biomed* 2013 ; 26 : 1609-29.
- Hunter DJ, Zhang W, Conaghan PG, *et al.* Systematic review of the concurrent and predictive validity of MRI biomarkers in OA. *Osteoarthritis Cartil* 2011 ; 19 : 557-88.
- Jacobi B, Bongartz G, Partovi S, *et al.* Skeletal muscle BOLD MRI: from underlying physiological concepts to its usefulness in clinical conditions. *J Magn Reson imaging* 2012 ; 35 : 1253-65.
- Janiczek RL, Gambarota G, Sinclair CDJ, *et al.* Simultaneous T2 and lipid quantitation using IDEAL-CPMG. *Magn Reson Med* 2011a ; 66 : 1293-302.
- Janssen BH, Voet NBM, Nabuurs CI, *et al.* Distinct disease phases in muscles of facioscapulohumera dystrophy patients identified by MR detected fat infiltration. *PLoS One* 2014 ; 9 : e85416.
- Jordan BF, Kimpalou JZ, Beghein N, *et al.* Contribution of oxygenation to BOLD contrast in exercising muscle. *Magn Reson Med* 2004 ; 52 : 391-6.
- Jovicich J, Marizzoni M, Sala-Llonch R, *et al.* Brain morphometry reproducibility in multi-center 3T MRI studies: a comparison of cross-sectional and longitudinal segmentations. *Neuroimage* 2013 ; 83 : 472-84.
- Kamath S, Venkatanarasimha N, Walsh MA, Hughes PM. MRI appearance of muscle denervation. *Skeletal Radiol* 2008 ; 37 : 397-404.
- Karampinos DC, Baum T, Nardo L, *et al.* Characterization of the regional distribution of skeletal muscle adipose tissue in type 2 diabetes using chemical shift-based water/fat separation. *J Magn Reson imaging* 2012 ; 35 : 899-907.
- Karampinos DC, King KF, Sutton BP, Georgiadis JG. Myofiber ellipticity as an explanation for transverse asymmetry of skeletal muscle diffusion MRI in vivo signal. *Ann Biomed Eng* 2009 ; 37 : 2532-46.
- Karampinos DC, King KF, Sutton BP, Georgiadis JG. Intravoxel partially coherent motion technique: characterization of the anisotropy of skeletal muscle microvasculature. *J Magn Reson Imaging* 2010 ; 31 : 942-53.
- Karlsson A, Rosander J, Romu T, *et al.* Automatic and quantitative assessment of regional muscle volume by multi-atlas segmentation using whole-body water-fat MRI. *J Magn Reson imaging* 2015 ; 41 : 1558-69.
- Kemp GJ, Meyerspeer M, Moser E. Review Article Absolute quantification of phosphorus metabolite concentrations in human muscle in vivo by 31 P MRS : a quantitative review. *NMR Biomed* 2007 ; 20 : 555-65.
- Kemp GJ, Taylor DJ, Dunn JF, *et al.* Cellular energetics of dystrophic muscle. *J Neurol Sci* 1993 ; 116 : 201-6.
- Kharraz Y, Guerra J, Pessina P, *et al.* Understanding the process of fibrosis in Duchenne muscular dystrophy. *Bio Med Res Int* 2014 ; doi: 10.1155/2014/965631.
- Kim HK, Laor T, Horn PS, *et al.* T2 mapping in Duchenne muscular dystrophy: distribution of disease activity and correlation with clinical assessments. *Radiology* 2010 ; 255 : 899-908.
- Kim HK, Serai S, Lindquist D, *et al.* Quantitative Skeletal Muscle MRI: Part 2, MR Spectroscopy and T2 Relaxation Time Mapping-Comparison Between Boys With Duchenne Muscular Dystrophy and Healthy Boys. *Amer J of Roentgenol* 2015 ; 205 : 216-23.
- Kim HK, Serai S, Merrow AC, *et al.* Objective measurement of minimal fat in normal skeletal muscles of healthy children using T2 relaxation time mapping (T2 maps) and MR spectroscopy. *Pediatr Radiol* 2014 ; 44 : 149-57.
- Klingler W, Jurkat-Rott K, Lehmann-Horn F, Schleip R. The role of fibrosis in Duchenne muscular dystrophy. *Acta Myol* 2012 ; 31 : 184-95.
- Kornegay JN, Bogan JR, Bogan DJ, *et al.* Canine models of Duchenne muscular dystrophy and their use in therapeutic strategies. *Mamm genome* 2012 ; 23 : 85-108.
- Kusmia S, Eliav U, Navon G, Guillot G. DQF-MT MRI of connective tissues: application to tendon and muscle. *Magma* 2013 ; 26 : 203-14.

- Lamminen AE. Magnetic resonance imaging of primary skeletal muscle diseases: patterns of distribution and severity of involvement. *Br J Radiol* 1990 ; 63 : 946-50.
- Lavini C, de Jonge MC, van de Sande MGH, *et al.* Pixel-by-pixel analysis of DCE MRI curve patterns and an illustration of its application to the imaging of the musculoskeletal system. *Magn Reson Imaging* 2007 ; 25 : 604-12.
- Le Guiner C, Montus M, Servais L, *et al.* Forelimb treatment in a large cohort of dystrophic dogs supports delivery of a recombinant AAV for exon skipping in Duchenne patients. *Mol Ther* 2014 ; 22 : 1923-35.
- Lebel RM, Wilman AH. Transverse relaxometry with stimulated echo compensation. *Magn Reson Med* 2010 ; 64 : 1005-14.
- Lebon V, Brillault-Salvat C, Bloch G, *et al.* Evidence of muscle BOLD effect revealed by simultaneous interleaved gradient-echo NMRI and myoglobin NMRS during leg ischemia. *Magn Reson Med* 1998 ; 40 : 551-8.
- Ledermann H-P, Schulte A-C, Heidecker H-G, *et al.* Blood oxygenation level-dependent magnetic resonance imaging of the skeletal muscle in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation* 2006 ; 113 : 2929-35.
- Lee YH, Lee HS, Lee HE, *et al.* Whole-Body Muscle MRI in Patients with Hyperkalemic Periodic Paralysis Carrying the SCN4A Mutation T704M: Evidence for Chronic Progressive Myopathy with Selective Muscle Involvement. *J Clin Neurol* 2015 ; 11 : 331-8.
- Leong KM, Lau P, Ramadan S. Utilisation of MR spectroscopy and diffusion weighted imaging in predicting and monitoring of breast cancer response to chemotherapy. *J Med Imaging Radiat Oncol* 2015 ; 59 : 268-77.
- Leroy-Willig a., Willig TN, Henry-Feugeas MC, *et al.* Body composition determined with MR in patients with Duchenne muscular dystrophy, spinal muscular atrophy, and normal subjects. *Magn Reson Imaging* 1997 ; 15 : 737-44.
- Lerski RA, de Certaines JD, Duda D, *et al.* Application of texture analysis to muscle MRI: 2 - technical recommendations. *EPJ Non-linear Biomed Phys* 2015 ; 3 : 1-20.
- Li C, Magland JF, Rad HS, *et al.* Comparison of optimized soft-tissue suppression schemes for ultrashort echo time MRI. *Magn Reson Med* 2012 ; 68 : 680-9.
- Li K, Dortch RD, Kroop SF, *et al.* A rapid approach for quantitative magnetization transfer imaging in thigh muscles using the pulsed saturation method. *Magn Reson Imaging* 2015 ; 33 : 709-17.
- Li K, Dortch RD, Welch EB, *et al.* Multi-parametric MRI characterization of healthy human thigh muscles at 3.0 T - relaxation, magnetization transfer, fat/water, and diffusion tensor imaging. *NMR Biomed* 2014 ; 27 : 1070-84.
- Liu G-C, Jong Y-J, Chiang C-H, Jaw T-S. Duchenne muscular Dystrophy: MR grading system with functional correlation. *Radio-logy* 1993 ; 186 : 475-80.
- Lodi R, Kemp GJ, Muntoni F, *et al.* Reduced cytosolic acidification during exercise suggests defective glycolytic activity in skeletal muscle of patients with Becker muscular dystrophy. An in vivo ³¹P magnetic resonance spectroscopy study. *Brain* 1999 ; 122 : 121-30.
- Longo R, Pollesello P, Ricci C, *et al.* Proton MR spectroscopy in quantitative in vivo determination of fat content in human liver steatosis. *J Magn Reson Imaging* 1995 ; 5 : 281-85.
- Loughran T, Higgins DM, McCallum M, *et al.* Improving highly accelerated fat fraction measurements for clinical trials in muscular dystrophy: origin and quantitative effect of R2* changes. *Radio-logy* 2015 ; 275 : 570-78.
- Lustig M, Donoho DL, Santos JM, Pauly JM. Compressed Sensing MRI. *IEEE Signal Processing Magazine* 2008 ; 25 : 72-85.
- Lynn S, Aartsma-Rus A, Bushby K, *et al.* Measuring clinical effectiveness of medicinal products for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 2015 ; 25 : 96-105.
- Ma J. Dixon techniques for water and fat imaging. *J Magn Reson imaging* 2008 ; 28 : 543-58.
- Madelin G, Regatte RR. Biomedical applications of sodium MRI in vivo. *J Magn Reson imaging* 2013 ; 38 : 511-29.
- Maillard SM, Jones R, Owens C, *et al.* Quantitative assessment of MRI T2 relaxation time of thigh muscles in juvenile dermatomyositis. *Rheumatology (Oxford)* 2004 ; 43 : 603-8.
- Martins Bach A, Matot B, Wary C, *et al.* Non-invasive NMR study of the mouse model for centronuclear myopathy with mutation in the dynamin-2 gene. *Neuromuscul Disord* 2015 ; 25 : 275.
- Martins-Bach AB, Malheiros J, Matot B, *et al.* Quantitative T2 combined with texture analysis of nuclear magnetic resonance images identify different degrees of muscle involvement in three mouse models of muscle dystrophy: mdx, Largemyd and mdx/Largemyd. *PLoS One* 2015 ; 10 : e0117835.
- Marty B, Vignaud A, Greiser A, *et al.* BLOCH equations-based reconstruction of myocardium t1 maps from modified look-locker inversion recovery sequence. *PLoS One* 2015 ; 10 : e0126766.
- Marty B, Baudin PY, Reyngoudt H, *et al.* Simultaneous muscle water T2 and fat fraction mapping using transverse relaxometry with stimulated echo compensation. *NMR Biomed* 2016 ; 29 : 431-43.
- Mathur S, Vohra RS, Germain SA, *et al.* Changes in muscle T2 and tissue damage after downhill running in mdx mice. *Muscle Nerve* 2011 ; 43 : 878-86.
- Mattei JP, Le Fur Y, Cuge N, *et al.* Segmentation of fascias, fat and muscle from magnetic resonance images in humans: The DIS-PIMAG software. *Magn Reson Mater Physics, Biol Med* 2006 ; 19 : 275-79.
- Mayhew A, Mazzone ES, Eagle M, *et al.* Development of the Performance of the Upper Limb module for Duchenne muscular dystrophy. *Dev Med Child Neurol* 2013 ; 55 : 1038-45.
- Mazzone E, De Sanctis R, Fanelli L, *et al.* Hammersmith Functional Motor Scale and Motor Function Measure-20 in non ambulant SMA patients. *Neuromuscul Disord* 2014 ; 24 : 347-52.
- Mazzone ES, Vasco G, Palermo C, *et al.* A critical review of functional assessment tools for upper limbs in Duchenne muscular dystrophy. *Dev Med Child Neurol* 2012 ; 54 : 879-85.
- McCullough MB, Domire ZJ, Reed AM, *et al.* Evaluation of muscles affected by myositis using magnetic resonance elastography. *Muscle Nerve* 2011 ; 43 : 585-90.
- McDonald CM, Henricson EK, Abresch RT, *et al.* The 6-minute walk test and other clinical endpoints in duchenne muscular dystrophy: reliability, concurrent validity, and minimal clinically important differences from a multicenter study. *Muscle Nerve* 2013 ; 48 : 357-68.
- McIntosh LM, Baker RE, Anderson JE. Magnetic resonance imaging of regenerating and dystrophic mouse muscle. *Biochem Cell Biol* 1998 ; 76 : 532-41.
- Mead AF, Petrov M, Malik AS, *et al.* Diaphragm remodeling and compensatory respiratory mechanics in a canine model of Duchenne muscular dystrophy. *J Appl Physiol* 2014 ; 116 : 807-15.
- Mercuri E, Muntoni F. Muscular dystrophy: new challenges and review of the current clinical trials. *Curr Opin Pediatr* 2013 ; 25 : 701-7.
- Meyer RA, Towse TF, Reid RW, *et al.* BOLD MRI mapping of transient hyperemia in skeletal muscle after single contractions. *NMR Biomed* 2004 ; 17 : 392-8.
- Miller CA, Naish JH, Bishop P, *et al.* Comprehensive Validation of Cardiovascular Magnetic Extracellular Volume. *Circ Cardiovasc Imaging* 2013 ; 6 : 373-83.
- Mills KL, Tamnes CK Methods and considerations for longitudinal structural brain imaging analysis across development. *Dev Cogn Neurosci* 2014 ; 9 : 172-90.
- Mitsiopoulos N, Baumgartner RN, Heymsfield SB, *et al.* Cadaver validation of skeletal muscle measurement by magnetic resonance imaging and computerized tomography. *J Appl Physiol* 1998 ; 85 : 115-22.
- Moon JC, Messroghli DR, Kellman P, *et al.* Myocardial T1 mapping and extracellular volume quantification: a Society for Cardiovascular Magnetic Resonance (SCMR) and CMR Working Group of the European Society of Cardiology consensus statement. *J Cardiovasc Magn Reson* 2013 ; 15 : 92-103.
- Morrison C, Henkelman RM. A model for magnetization transfer in tissues. *Magn Reson Med* 1995 ; 33 : 475-82.

- Morrow JM, Sinclair CDJ, Fischmann A, *et al.* MRI biomarker assessment of neuromuscular disease progression: a prospective observational cohort study. *Lancet Neurol* 2015 ; 4422 : 1-13.
- Morrow JM, Sinclair CDJ, Fischmann A, *et al.* Reproducibility, and age, body-weight and gender dependency of candidate skeletal muscle MRI outcome measures in healthy volunteers. *Eur Radiol* 2014 ; 24 : 1610-20.
- Morse CI, Degens H, Jones DA. The validity of estimating quadriceps volume from single MRI cross-sections in young men. *Eur J Appl Physiol* 2007 ; 100 : 267-74.
- Muntoni F, Wood MJA. Targeting RNA to treat neuromuscular disease. *Nat Rev Drug Discov* 2011 ; 10 : 621-37.
- Nardo L, Karampinos DC, Lansdown DA, *et al.* Quantitative assessment of fat infiltration in the rotator cuff muscles using water-fat MRI. *J Magn Reson imaging* 2014 ; 39 : 1178-85.
- Nelson MD, Rader F, Tang X, *et al.* PDE5 inhibition alleviates functional muscle ischemia in boys with Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 2014 ; 82 : 2085-91.
- Newman RJ, Bore PJ, Chan L, *et al.* (1982) Nuclear magnetic resonance studies of forearm muscle in Duchenne dystrophy. *Br Med J (Clin Res Ed)* 284 : 1072-74.
- Nozaki T, Tasaki A, Horiuchi S, *et al.* Quantification of Fatty Degeneration Within the Supraspinatus Muscle by Using a 2-Point Dixon Method on 3-T MRI. *Amer J Roentgenol* 2015 ; 205 : 116-22.
- Ogawa S, Lee TM, Kay AR, Tank DW. Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 9868-72.
- Pacak CA, Walter GA, Gaidosh G, *et al.* Long-term skeletal muscle protection after gene transfer in a mouse model of LGMD-2D. *Mol Ther* 2007 ; 15 : 1775-81.
- Pane M, Mazzone ES, Sormani MP, *et al.* 6 Minute walk test in Duchenne MD patients with different mutations: 12 month changes. *PLoS One* 2014 ; 9 : e83400.
- Park J, Wicki J, Knoblauch SE, *et al.* Multi-parametric MRI at 14T for muscular dystrophy mice treated with AAV vector-mediated gene therapy. *PLoS One* 2015 ; 10 : e0124914.
- Park JH, Vansant JP, Kumar NG, *et al.* Dermatomyositis: correlative MR imaging and P-31 MR spectroscopy for quantitative characterization of inflammatory disease. *Radiology* 1990 ; 177 : 473-9.
- Partovi S, Schulte A-C, Aschwanden M, *et al.* Impaired skeletal muscle microcirculation in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther* 2012 ; 14 : R209.
- Partovi S, von Tengg-Koblighk H, Bhojwani N, *et al.* Advanced Noncontrast MR Imaging in Musculoskeletal Radiology. *Radiol Clin North Am* 2015 ; 53 : 549-67.
- Parzy E, Fromes Y, Thiaudiere E, Carlier PG. Rapid Communication Refinement of cardiac NMR imaging in awake hamsters: proof of feasibility and characterization of cardiomyopathy. *NMR Biomed* 2007 ; 20 : 615-23.
- Périer S, Trollet C, Mouly V, *et al.* Autologous myoblast transplantation for oculopharyngeal muscular dystrophy: a phase I/IIa clinical study. *Mol Ther* 2014 ; 22 : 219-25.
- Pichiecchio A, Uggetti C, Egitto MG, *et al.* Quantitative MR evaluation of body composition in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Eur Radiol* 2002 ; 12 : 2704-9.
- Polak JF, Jolesz FA, Adams DF (1988) Magnetic resonance imaging of skeletal muscle. Prolongation of T1 and T2 subsequent to denervation. *Invest Radiol* 23 : 365-9.
- Ponrartana S, Ramos-Platt L, Wren TAL, *et al.* Effectiveness of diffusion tensor imaging in assessing disease severity in Duchenne muscular dystrophy: preliminary study. *Pediatr Radiol* 2015 ; 45 : 582-9.
- Pratt SJ, Xu S, Mullins RJ, Lovering RM. Temporal changes in magnetic resonance imaging in the mdx mouse. *BMC Res Notes* 2013 ; 6 : 262.
- Pruessmann KP, Weiger M, Scheidegger MB, Boesiger P. SENSE: sensitivity encoding for fast MRI. *Magn Reson Med* 1999 ; 42 : 952-62.
- Qi J, Olsen NJ, Price RR, *et al.* Diffusion-weighted imaging of inflammatory myopathies: polymyositis and dermatomyositis. *J Magn Reson Imaging* 2008 ; 27 : 212-7.
- Ravaglia S, Pichiecchio A, Ponzio M, *et al.* Changes in skeletal muscle qualities during enzyme replacement therapy in late-onset type II glycogenosis: temporal and spatial pattern of mass vs. strength response. *J Inheret Metab Dis* 2010 ; 33 : 737-45.
- Raynaud JS, Duteil S, Vaughan JT, *et al.* Determination of skeletal muscle perfusion using arterial spin labeling NMRI: Validation by comparison with venous occlusion plethysmography. *Magn Reson Med* 2001 ; 46 : 305-11.
- Redmond OM, Stack JP, O'Connor NG, *et al.* 31P MRS as an early prognostic indicator of patient response to chemotherapy. *Magn Reson Med* 1992 ; 25 : 30-44.
- Ringleb SI, Bensamoun SF, Chen Q, *et al.* Applications of magnetic resonance elastography to healthy and pathologic skeletal muscle. *J Magn Reson imaging* 2007 ; 25 : 301-9.
- Robson MD, Bydder GM. Clinical ultrashort echo time imaging of bone and other connective tissues. *NMR Biomed* 2006 ; 19 : 765-80.
- Rooney WD, Pollaro JR, Forbes SC, *et al.* Application of the Extended Phase Graph Technique to Improve T2 Quantitation Across Sites. In: Proceedings ISMRM 5419 2011.
- Saab G, Thompson RT, Marsh GD. Effects of exercise on muscle transverse relaxation determined by MR imaging and in vivo relaxometry. *J Appl Physiol* 2000 ; 88 : 226-33.
- Saab G, Thompson RT, Marsh GD. Multicomponent T2 Relaxation of In Vivo Skeletal Muscle. *Magn Reson Med* 1999 ; 157 : 150-7.
- Schewzow K, Fiedler GB, Meyerspeer M, *et al.* Dynamic ASL and T2*-weighted MRI in exercising calf muscle at 7 T: A feasibility study. *Magn Reson Med* 2014 ; 73 : 1190-5.
- Schmitt P, Griswold MA, Jakob PM, *et al.* Inversion recovery True-FISP: quantification of T(1), T(2), and spin density. *Magn Reson Med* 2004 ; 51 : 661-7.
- Schwenzer NF, Martirosian P, Machann J, *et al.* (2009a) Aging effects on human calf muscle properties assessed by MRI at 3 Tesla. *J Magn Reson imaging* 29 : 1346-54.
- Schwenzer NF, Steidle G, Martirosian P, *et al.* (2009b) Diffusion tensor imaging of the human calf muscle: distinct changes in fractional anisotropy and mean diffusion due to passive muscle shortening and stretching. *NMR Biomed* 22 : 1047-53.
- Scott E, Eagle M, Mayhew A, *et al.* Development of a functional assessment scale for ambulatory boys with Duchenne muscular dystrophy. *Physiother Res Int* 2012 ; 17 : 101-9.
- Scotter EL, Shaw CE. Neuromuscular disease: new insights and avenues for therapy. *Lancet Neurol* 2013 ; 12 : 13-5.
- Seferian AM, Moraux A, Annoussamy M, *et al.* Upper limb strength and function changes during a one-year follow-up in non-ambulant patients with Duchenne Muscular Dystrophy: an observational multicenter trial. *PLoS One* 2015a ; 10 : e0113999.
- Seferian AM, Moraux A, Canal A, *et al.* Upper limb evaluation and one-year follow up of non-ambulant patients with spinal muscular atrophy: an observational multicenter trial. *PLoS One* 2015b ; 10 : e0121799.
- Servais L, Deconinck N, Moraux A, *et al.* Innovative methods to assess upper limb strength and function in non-ambulant Duchenne patients. *Neuromuscul Disord* 2013 ; 23 : 139-48.
- Shin HJ, Baek H-M, Ahn J-H, *et al.* Prediction of pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer using diffusion-weighted imaging and MRS. *NMR Biomed* 2012 ; 25 : 1349-59.
- Sigmund EE, Novikov DS, Sui D, *et al.* Time-dependent diffusion in skeletal muscle with the random permeable barrier model (RPBM) : application to normal controls and chronic exertional compartment syndrome patients. *NMR Biomed* 2014 ; 27 : 519-28.
- Sigmund EE, Sui D, Ukpebor O, *et al.* Stimulated echo diffusion tensor imaging and SPAIR T2 - weighted imaging in chronic exertional compartment syndrome of the lower leg muscles. *J Magn Reson Imaging* 2013 ; 38 : 1073-82.
- Sinclair CDJ, Morrow JM, Miranda MA, *et al.* Skeletal muscle MRI magnetisation transfer ratio reflects clinical severity in peripheral neuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012 ; 83 : 29-32.
- Sinclair CDJ, Samson RS, Thomas DL, *et al.* Quantitative magnetization transfer in in vivo healthy human skeletal muscle at 3 T. *Magn Reson Med* 2010 ; 64 : 1739-48.

- Siu AG, Ramadeen A, Hu X, *et al.* Characterization of the ultrashort-TE (UTE) MR collagen signal. *NMR Biomed* 2015 ; 28 : 1236-44.
- Smeulders MJC, van den Berg S, Oudeman J, *et al.* Reliability of in vivo determination of forearm muscle volume using 3.0 T magnetic resonance imaging. *J Magn Reson imaging* 2010 ; 31 : 1252-5.
- Sproule DM, Montgomery MJ, Punyanitya M, *et al.* Thigh muscle volume measured by magnetic resonance imaging is stable over a 6-month interval in spinal muscular atrophy. *J Child Neurol* 2011 ; 26 : 1252-9.
- Statland, Jeffrey, Donlin-Smith, Colleen M, Tapscott, Stephen J, Van der Maarel, Silvère M, Tawil, Rabi Multiplex screen of serum biomarkers in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *J Neuromuscul Dis* 2014 ; 1 : 181-90.
- Stejskal EO, Tanner JE (1965) Spin diffusion measurements: spin echoes in the presence of a time-dependant field gradient. *J Chem Phys* 42 : 288-292.
- Strandberg S, Wretling M-L, Wredmark T, Shalabi A. Reliability of computed tomography measurements in assessment of thigh muscle cross-sectional area and attenuation. *BMC Med Imaging* 2010 ; 10 : 18.
- Straub V, Donahue KM, Allamand V, *et al.* Contrast agent-enhanced magnetic resonance imaging of skeletal muscle damage in animal models of muscular dystrophy. *Magn Reson Med* 2000 ; 44 : 655-9.
- Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS* 2010 ; 5 : 463-6.
- Tanaka NI, Kanehisa H. Applicability of Single Muscle CSA for Predicting Segmental Muscle Volume in Young Men. *Int J Sports Med* 2014 ; 35 : 608-14.
- Tardif-de Gèry S, Vilquin J, Carlier P, *et al.* Muscular transverse relaxation time measurement by magnetic resonance imaging at 4 Tesla in normal and dystrophic dy/dy and $dy(2j)/dy(2j)$ mice. *Neuromuscul Disord* 2000 ; 10 : 507-13.
- Tasca G, Pescatori M, Monforte M, *et al.* Different molecular signatures in magnetic resonance imaging-staged facioscapulohumeral muscular dystrophy muscles. *PLoS One* 2012 ; 7 : e38779.
- Thibaud J, Matot B, Barthélémy I, *et al.* Diaphragm structural abnormalities revealed by NMR imaging in the dystrophic dog. *Neuromuscul Disord* 2013 ; 23 : 809-10.
- Thibaud J-L, Azzabou N, Barthelemy I, *et al.* Comprehensive longitudinal characterization of canine muscular dystrophy by serial NMR imaging of GRMD dogs. *Neuromuscul Disord* 2012 ; 22 Suppl 2 : 85-99.
- Thibaud J-L, Monnet A, Bertoldi D, *et al.* Characterization of dystrophic muscle in golden retriever muscular dystrophy dogs by nuclear magnetic resonance imaging. *Neuromuscul Disord* 2007 ; 17 : 575-84.
- Thomas GD. Functional muscle ischemia in Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Front Physiol* 2013 ; 4 : 381-6.
- Thomas MS, Newman D, Leinhard OD, *et al.* Test-retest reliability of automated whole body and compartmental muscle volume measurements on a wide bore 3T MR system. *Eur Radiol* 2014 ; 24 : 2279-91.
- Thulborn K, Soffe N, Kadda G. (1981) Simultaneous in vivo measurement of oxygen utilization and high-energy phosphate metabolism in rabbit skeletal muscle by multinuclear 1H and ^{31}P NMR. *J Magn Reson* 1981 ; 45 : 362-66.
- Tofts PS. Modeling tracer kinetics in dynamic Gd-DTPA MR imaging. *J Magn Reson Imaging* 1997 ; 7 : 91-101.
- Tofts PS. Quantitative MRI of the brain: measuring changes caused by disease. John Wiley 2003.
- Tofts PS, Brix G, Buckley DL, *et al.* Contrast-enhanced T1-weighted MRI of a diffusible tracer: standardized quantities and symbols. *J Magn Reson Imaging* 1999 ; 232 : 223-32.
- Torriani M, Townsend E, Thomas BJ, *et al.* Lower leg muscle involvement in Duchenne muscular dystrophy: an MR imaging and spectroscopy study. *Skeletal Radiol* 2012 ; 41 : 437-45.
- Tosetti M, Linsalata S, Battini R, *et al.* Muscle metabolic alterations assessed by ^{31}P -phosphorus magnetic resonance spectroscopy in mild Becker muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 2011 ; 44 : 816-9.
- Touznik A, Lee JJA, Yokota T. New developments in exon skipping and splice modulation therapies for neuromuscular diseases. *Expert Opin Biol Ther* 2014 ; 14 : 809-19.
- Tyler DJ, Robson MD, Henkelman RM, *et al.* Magnetic resonance imaging with ultrashort TE (UTE) PULSE sequences: technical considerations. *J Magn Reson imaging* 2007 ; 25 : 279-89.
- Vasan RS. Biomarkers of cardiovascular disease: molecular basis and practical considerations. *Circulation* 2006 ; 113 : 2335-62.
- Vignaud A, Guillot G, Caldas de Almeida Araújo E, Carlier PG. NMR imaging of short T2-components in skeletal muscle tissue. *Neuromuscul Disord* 2014 ; 24 : 837.
- Vohra R, Accorsi A, Kumar A, *et al.* Magnetic Resonance Imaging Is Sensitive to Pathological Amelioration in a Model for Laminin-Deficient Congenital Muscular Dystrophy (MDC1A). *PLoS One* 2015a ; 10 : e0138254.
- Vohra RS, Lott D, Mathur S, *et al.* Magnetic Resonance Assessment of Hypertrophic and Pseudo-Hypertrophic Changes in Lower Leg Muscles of Boys with Duchenne Muscular Dystrophy and Their Relationship to Functional Measurements. *PLoS One* 2015b ; 10 : e0128915.
- Vohra RS, Mathur S, Bryant ND, *et al.* Age-related T2 changes in hindlimb muscles of mdx mice. *Muscle Nerve* 2015c ; 53 (1) : 84-90.
- Voit T. The challenge of making therapies happen for neuromuscular diseases. *Neuromuscul Disord* 2014 ; 24 : 918-9.
- Voit T, Topaloglu H, Straub V, *et al.* Safety and efficacy of drisapersen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy (DEMAND II): an exploratory, randomised, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet Neurol* 2014 ; 13 : 987-96.
- Wagner KR, Fleckenstein JL, Amato AA, *et al.* A phase I/II trial of MYO-029 in adult subjects with muscular dystrophy. *Ann Neurol* 2008 ; 63 : 561-71.
- Walker UA. Imaging tools for the clinical assessment of idiopathic inflammatory myositis. *Curr Opin Rheumatol* 2008 ; 20 : 656-61.
- Walter G, Cordier L, Bloy D, Sweeney HL. Noninvasive monitoring of gene correction in dystrophic muscle. *Magn Reson Med* 2005 ; 54 : 1369-76.
- Wang J, Fan Z, Vandenborne K, *et al.* A computerized MRI biomarker quantification scheme for a canine model of Duchenne muscular dystrophy. *Int J Comput Assist Radiol Surg* 2013 ; 8 (5) : 763-74.
- Wang K, Yu H, Brittain J. K space water fat decomposition with T2* estimation and multifrequency fat spectrum modeling for ultrashort echo time imaging. *J Magn Reson Imaging* 2010 ; 31 (4) : 1027-34.
- Wary C, Azzabou N, Giraudeau C, *et al.* Quantitative NMRI and NMRS identify augmented disease progression after loss of ambulation in forearms of boys with Duchenne muscular dystrophy. *NMR Biomed* 2015a ; 28 : 1150-62.
- Wary C, Azzabou N, Giraudeau C, *et al.* Quantitative NMRI and NMRS identify augmented disease progression after loss of ambulation in forearms of boys with Duchenne muscular dystrophy. *NMR Biomed* 2015b ; 28 : 1150-62.
- Wary C, Nadaj-Pakleza A, Laforêt P, *et al.* Investigating glycogenesis type III patients with multi-parametric functional NMR imaging and spectroscopy. *Neuromuscul Disord* 2010 ; 20 : 548-58.
- Wary C, Naullet T, Thibaud J-L, *et al.* Splitting of Pi and other ^{31}P NMR anomalies of skeletal muscle metabolites in canine muscular dystrophy. *NMR Biomed* 2012 ; 25 : 1160-9.
- Weigel M. Extended phase graphs: Dephasing, RF pulses, and echoes - pure and simple. *J Magn Reson Imaging* 2014.
- Willcocks RJ, Arpan I a, Forbes SC, *et al.* Longitudinal measurements of MRI-T2 in boys with Duchenne muscular dystrophy: effects of age and disease progression. *Neuromuscul Disord* 2014 ; 24 : 393-401.
- Williams SA, Reid S, Elliott C, *et al.* Muscle volume alterations in spastic muscles immediately following botulinum toxin type-A treatment in children with cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol* 2013 ; 55 : 813-20.
- Willis TA, Hollingsworth KG, Coombs A, *et al.* Quantitative muscle MRI as an assessment tool for monitoring disease progression in LGMD2I: a multicentre longitudinal study. *PLoS One* 2013 ; 8 : e70993.

- Wishnia A, Alameddine H, Tardif de Gery S, Leroy-Willig A. Use of magnetic resonance imaging for noninvasive characterization and follow-up of an experimental injury to normal mouse muscles. *Neuromuscul Disord* 2001 ; 11 : 50-55.
- Wokke BH, Bos C, Reijnen M, *et al.* Comparison of Dixon and T1-weighted MR methods to assess the degree of fat infiltration in Duchenne muscular dystrophy patients. *J Magn Reson imaging* 2013 ; 38 : 619-24.
- Wokke BH, Hooijmans MT, van den Bergen JC, *et al.* Muscle MRS detects elevated PDE/ATP ratios prior to fatty infiltration in Becker muscular dystrophy. *NMR Biomed* 2014a ; 27 : 1371-7.
- Wokke BH, van den Bergen JC, Versluis MJ, *et al.* Quantitative MRI and strength measurements in the assessment of muscle quality in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 2014b ; 24 : 409-16.
- Wokke BH, van den Bergen JC, Hooijmans MT, *et al.* T2 relaxation times are increased in skeletal muscle of DMD but not BMD patients. *Muscle Nerve* 2016 ; 53 : 38-43.
- Wren TA, Bluml S, Tseng-Ong L, Gilsanz V. Three-point technique of fat quantification of muscle tissue as a marker of disease progression in Duchenne muscular dystrophy: preliminary study. *Amer J Roentgenol* 2008 ; 190 : W8-12.
- Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 2008 ; 214 : 199-210.
- Xi W, Perdanasari AT, Ong Y, *et al.* Objective breast volume, shape and surface area assessment: a systematic review of breast measurement methods. *Aesthetic Plast Surg* 2014 ; 38 : 1116-30.
- Yanagisawa O, Shimao D, Maruyama K, *et al.* Diffusion-weighted magnetic resonance imaging of human skeletal muscles: gender-, age- and muscle-related differences in apparent diffusion coefficient. *Magn Reson Imaging* 2009 ; 27 : 69-78.
- Yao L, Gai N. Fat-corrected T2 measurement as a marker of active muscle disease in inflammatory myopathy. *Am J Roentgenol* 2012 ; 198 : 475-81.
- Yarnykh VL. Actual flip-angle imaging in the pulsed steady state: a method for rapid three-dimensional mapping of the transmitted radiofrequency field. *Magn Reson Med* 2007 ; 57 : 192-200.
- Yarnykh VL, Tartaglione EV, Ioannou GN. Fast macromolecular proton fraction mapping of the human liver in vivo for quantitative assessment of hepatic fibrosis. *NMR Biomed* 2015 ; 28 : 1716-25.
- Yasuda T, Loenneke JP, Thiebaud RS, Abe T. Effects of detraining after blood flow-restricted low-intensity concentric or eccentric training on muscle size and strength. *J Physiol Sci* 2015 ; 65 : 139-44.
- Yokota T, Lu Q-L, Partridge T, *et al.* Efficacy of systemic morpholino exon-skipping in Duchenne dystrophy dogs. *Ann Neurol* 2009 ; 65 : 667-76.
- Younkin DP, Berman P, Sladky J, *et al.* 31P NMR studies in Duchenne muscular dystrophy: age-related metabolic changes. *Neurology* 1987 ; 37 : 165-69.
- Zaraiskaya T, Kumbhare D, Noseworthy MD. Diffusion tensor imaging in evaluation of human skeletal muscle injury. *J Magn Reson Imaging* 2006 ; 24 : 402-8.
- Zheng J, An H, Coggan AR, *et al.* Noncontrast skeletal muscle oximetry. *Magn Reson Med* 2013 ; 71 : 318-25.
- Zheng J, Hasting MK, Zhang X, *et al.* A pilot study of regional perfusion and oxygenation in calf muscles of individuals with diabetes with a non-invasive measure. *J Vasc Surg* 2014 ; 59 : 419-26.
- Zhou L, Lu H. Targeting fibrosis in Duchenne muscular dystrophy. *J Neuropathol Exp Neurol* 2010 ; 69 : 771-6.

Des mutations perte de fonction de SCN4A causent une hypokinésie foetale sévère ou une myopathie congénitale « classique »

Valérie Allamand

Résumé

Les myopathies congénitales (MC) sont un groupe de maladies du muscle, hétérogènes cliniquement et génétiquement, caractérisées par une hypotonie et une faiblesse musculaire congénitale ou de début précoce, associées à des anomalies spécifiques sur la biopsie musculaire. Les présentations cliniques vont de l'akinésie foetale, entraînant une mortalité *in utero* ou néonatale, à des formes moins sévères. Dans la dernière décennie, plus de 20 nouveaux gènes de MC ont été identifiés, codant majoritairement des protéines impliquées dans la contraction musculaire ; cependant, des mutations de gènes codant des canaux ioniques sont maintenant reconnues comme cause de MC. Le gène *SCN4A* code la sous-unité α du canal sodium voltage-dépendant (Nav1.4) exprimé dans le muscle squelettique. Ce canal est essentiel pour la génération et la propagation du potentiel d'action dont dépend la contraction musculaire. Des mutations gain de fonction du gène *SCN4A* sont responsables de myotonie et de paralysie périodique. Par séquençage d'exome entier, les auteurs ont identifié des mutations homozygotes et hétérozygotes composites dans le gène *SCN4A* chez une cohorte de 11 individus atteints de MC, issus de 6 familles non apparentées. Les patients développent une faiblesse musculaire *in utero* ou néonatale de sévérité variable. Dans 7 cas, la faiblesse musculaire sévère a entraîné la mort dans le 3^e trimestre de vie ou peu après la naissance. Les 4 cas restant présentaient une hypotonie congénitale ou néonatale et une faiblesse touchant aussi le visage et le cou, des difficultés de déglutition et de respiration néonatales importantes, ainsi que des déformations du rachis dans l'enfance. Les 4 membres survivants s'étaient améliorés cliniquement dans la première décennie de vie. Les biopsies musculaires ont montré des caractéristiques de myopathie dont une variabilité de la taille des fibres, une présence de tissu fibrotique et gras de sévérité variable, sans anomalies structurales spécifiques. L'analyse électrophysiologique a suggéré un processus myopathique, sans myotonie. L'étude fonctionnelle *in vitro* de l'impact des mutations *SCN4A* sur des cellules HEK293 a démontré la perte de fonction des canaux mutants Nav1.4. Toutes les mutations, sauf une, abolissent totalement la

fonction des canaux, ou réduisent leur activité. Chaque patient porte au moins une mutation perte de fonction. Dans 5 des 6 familles, une seconde mutation perte de fonction était présente sur l'autre allèle. Ces résultats fonctionnels contribuent à établir la pathogénicité des mutations identifiées et suggèrent que des degrés différents de perte de fonction des canaux mutants Nav1.4 sont associés à une atténuation de l'amplitude du potentiel d'action musculaire ne permettant plus la fonction musculaire normale. L'ensemble des données présentées ici démontrent que des mutations récessives perte de fonction du gène *SCN4A* doivent être prises en considération chez des patients atteints de myopathie congénitale.

Commentaire

Chez les mammifères, la famille des canaux sodiques dépendant du voltage (Nav) comprend 10 membres. Nav1.4, codé par le gène *SCN4A*, est la sous-unité formant le pore du canal, exprimé de façon prépondérante dans le muscle squelettique ; à ce titre, elle joue donc un rôle majeur dans le déclenchement de la contraction musculaire. Ce canal est d'ailleurs très fortement enrichi à la jonction neuromusculaire.

Depuis le début des années 2000, de nombreuses mutations du gène *SCN4A* ont été impliquées dans différentes atteintes musculaires : myotonie (défaut de relaxation après contraction volontaire) de sévérité variable, paralysie périodique. Les mutations rapportées sont héritées de façon autosomique dominante, changent des acides aminés ponctuels (mutations faux-sens). Leur pathogénicité résulte d'un gain de fonction.

L'étude présentée ici [1] identifie donc *SCN4A* comme le 26^e gène impliqué dans de nouvelles formes de myopathies congénitales, et le second codant un canal ionique (le premier étant un canal calcique). Un séquençage d'exome (séquences codantes) a conduit à l'identification des 2 premières mutations dans une famille, et une collaboration internationale a permis la détection de nouvelles mutations chez 10 patients additionnels issus de 5 familles. Les mutations du gène *SCN4A* identifiées sont récessives, affectent différentes régions de la protéine et conduisent à une perte de fonction du

Valérie Allamand

Centre de Recherche en Myologie, Sorbonne Universités, UPMC - Inserm UMRS 974, CNRS FRE 3617, Institut de Myologie, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris, France

Contact
v.allamand@institut-myologie.org

canal, totale ou partielle. Cette non-fonctionnalité du canal a été démontrée *in vitro*, par des études d'électrophysiologie des courants sodiques en présence du canal muté. Il est à noter que les 3 patients portant une mutation homozygote entraînant une perte de fonction totale de Nav1.4 présentent un phénotype particulièrement sévère et léthal.

Cette étude apporte donc de nouvelles données intéressantes sur les conséquences des mutations du gène *SCN4A* et élargit à la fois le spectre des

phénotypes associés, et des causes de myopathies congénitales.

En complément de lecture, je recommande la très bonne revue de Cannon [2] présentant les différents défauts d'excitabilité musculaire dus à des « canalo-pathies ».

Genetics

LIENS D'INTÉRÊT

L'auteur déclare n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Zaharieva IT, Thor MG, Oates EC, *et al.* Loss-of-function mutations in *SCN4A* cause severe foetal hypokinesia or classical congenital myopathy. *Brain* 2016 ; 139 ; 674-91.
2. Cannon SC. Channelopathies of skeletal muscle excitability. *Compr Physiol* 2015 ; 5 : 761-90.

UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE-PARIS VI		UFR PITIÉ-SALPÊTRIÈRE	
UNIVERSITÉ AIX-MARSEILLE II		UFR MÉDECINE	
Diplôme Inter-Universitaire de Myologie			
Année Universitaire 2016-2017			
Responsables de l'Enseignement :		Pr Bruno Eymard Pr Jean Pouget, Mme Gisèle Bonne	
OBJECTIF	Les progrès rapides de la recherche, le renouveau des concepts, l'évolution de la prise en charge des malades font désormais de la myologie un champ bien différencié de la médecine. L'objectif de l'enseignement est d'apporter aux étudiants une vision cohérente, structurée et moderne de cette discipline dans ses bases anatomo-physiologiques, sa pratique clinique, ses explorations complémentaires, ses développements en terme de recherche		
PROGRAMME	<ul style="list-style-type: none"> ➢ Cours magistraux, présentations de dossiers et documents, ➢ démonstrations pratiques des différents types d'explorations Un stage pratique, en équipe clinique ou de biologie fondamentale (différentes possibilités seront proposées, les modalités de stage de chaque étudiant seront à préciser avec les coordinateurs du DIU)		
MODALITÉS	<ul style="list-style-type: none"> ➢ Durée de l'enseignement : 12 modules, 6 jeudi et vendredi de décembre à mai ➢ Validation finale : examen de contrôle des connaissances et soutenance de mémoire de stage ➢ Lieux : <ol style="list-style-type: none"> 1. Institut de myologie, Auditorium, Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris (10 modules de 2 jours) 2. Service des maladies neuromusculaires, Hôpital de la Timone, Marseille (2 modules de 2 jours) 		
CANDIDATURES	Ce diplôme de titre universitaire est ouvert aux médecins et étudiants en médecine français et étrangers ayant validé le 2 ^{ème} cycle des études médicales : <ul style="list-style-type: none"> ➢ résidents ➢ internes DES et DIS ➢ Titulaires d'un doctorat en médecine. Tout autre candidat intéressé par cette information pourra contacter les responsables de l'enseignement. 		
INSCRIPTIONS	Clôture des inscriptions : 29 novembre 2016 Montant des droits de laboratoire* : 274€ (n)/1000€ (rc-fce) + droits de scolarité : 261,10 € *tarifs : 2015-2016		
Professeur Jean Chambaz Président Université Paris VI		Professeur Georges Leonetti Doyen de la faculté de médecine Aix-Marseille	
		Professeur Serge Uzan Doyen de la faculté de médecine Pierre et Marie Curie	

Renseignements :
Institut de myologie
 Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière
 Bâtiment Behonaki
 47-83 bd de l'Hôpital 75643 PARIS
 Tél : 01 42 16 58 88
 Fax : 01 42 16 58 87
 Mail : diu@institut-myologie.org
 Site internet : www.institut-myologie.org (institute@institut-myologie.org)

LUPOURVOUS

L'importance du diagnostic génétique pour la dystrophie musculaire de Duchenne

Dominique Mornet

Résumé

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) et la dystrophie musculaire de Becker sont causées par des mutations du gène *DMD* codant la dystrophine. Les grands réarrangements du gène de type délétions et/ou duplications sont les mutations les plus communes, même si des mutations ponctuelles existent également. Selon les recommandations publiées, il est important d'avoir un diagnostic exact pour l'accès à une prise en charge adaptée des patients et pour le planning familial. Avec l'émergence des thérapies mutation-spécifiques, un diagnostic moléculaire précis est maintenant également important pour évaluer si les patients sont éligibles pour ces traitements. Cette revue discute des différentes mutations *DMD*, des techniques diagnostiques disponibles pour faire un diagnostic génétique à des enfants suspectés d'être atteints de DMD et l'importance d'avoir un diagnostic génétique spécifique dans le contexte des thérapies génétiques émergentes pour la dystrophie musculaire de Duchenne [1].

Commentaire

Il est maintenant bien connu que le maintien de l'intégrité de la fibre musculaire nécessite des protéines situées au niveau du sarcolemme. Ces protéines permettent un ancrage et une adhésion structurellement fonctionnels avec les fibres voisines conduisant à une cohésion au sein d'un muscle pour la rendre capable de subir sans rupture les cycles de contraction-relaxation. Mais du côté interne cytoplasmique de la fibre musculaire, où se situent les filaments épais qui glissent sur les filaments fins à l'origine des changements de volume de la fibre, des connexions se produisent avec un ensemble de protéines qui transmettent à la membrane de la fibre les contractions. Au centre d'un tel ensemble, on trouve une molécule essentielle, la dystrophine, qui va agir comme un amortisseur lors de la contraction des fibres musculaires.

La séquence primaire de la dystrophine constitua ainsi le premier succès de la génétique inverse à partir de son gène (*DMD*) localisé sur le chromosome sexuel X et qui occupe le locus p21. C'est une séquence génomique qui couvre plus de 2,5 millions de paires de bases (Mb), et la séquence codante qui résulte seulement de 79 exons se traduit par un ARN-messager de 14 kilobases (kb) [2]. Il va alors

être possible, résultant directement d'une altération (mutation) de ce gène *DMD*, de diagnostiquer une dystrophie musculaire héréditaire grave, avec une atrophie musculaire progressive (dystrophie musculaire de Duchenne, DMD). Une pathologie moins sévère qui apparaît souvent plus tardivement et connaît une progression plus lente (dystrophie musculaire de Becker, BMD) peut également être diagnostiquée.

C'est pourquoi, comme cela est présenté en détail dans l'article en référence [1], même si parfois dans la littérature on trouve de nouvelles études qui proposent un diagnostic prénatal non invasif des dystrophies musculaires de Duchenne et Becker en développant par exemple un dosage haplotype [3], il est important de suivre à la lumière des récentes connaissances un type de protocole bien standardisé en vue d'un diagnostic précis. Un rapide aperçu de ce protocole qui consiste en trois différentes étapes à suivre est ainsi établi pour réaliser une recherche standard d'une mutation suspectée sur le gène *DMD*.

Comme la majorité des mutations détectables est en général obtenue avec la procédure dite par ligatures multiplex dépendantes de diverses sondes d'amplification (MLPA, *multiplex ligation-dependent probe amplification*) au niveau de l'ADN, cela sera toujours la première étape à effectuer. Toutefois une technique plus performante est également disponible [4] et conduit à une identification précise d'une altération du gène *DMD* dans 92 % des cas.

Puis en seconde étape au vu du profil clinique un séquençage ciblé d'exon(s) sera parfois directement envisagé. Une mutation est détectée, la dystrophinopathie est confirmée. Il faut alors suivre et utiliser la nomenclature standard décrite sur le site du génome humain *Variation Society* (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>), pour d'une part notifier le profil porteur de la mère, et d'autre part inscrire le site de mutation trouvé chez ce patient dans un registre dédié.

Si ces procédures ne donnent pas de résultat pour identifier une mutation, une troisième étape pourra être programmée avec une biopsie musculaire pour évaluer si la dystrophine est bien localisée dans les fibres musculaires (étude en Immunofluorescence sur coupe musculaire et analyse de la distribution totalement et/ou partiellement membranaire) et en

Dominique Mornet

Ancien DR2CNRS,
Webmaster de l'Unité :
PhyMedExp,
Université de Montpellier,
Inserm U1046, CNRS
UMR 9214,
34295 Montpellier Cedex
5, France.

Contact

domimornet@gmail.com

estimer la quantité dans le tissu musculaire ainsi prélevé (étude selon la technique de l'immunoempreinte sur extraits des protéines du muscle permettant d'évaluer si la quantité de dystrophine détectée est normale, anormale et/ou nulle). Selon le résultat, la détection de dystrophine est totalement normale et le diagnostic n'est pas une dystrophinopathie, la présence de dystrophine est altérée (localisation et/ou quantité) et des études complémentaires sont nécessaires. Il faut alors engager une analyse de l'ARN pour tenter d'identifier la présence éventuelle d'un exon cryptique en raison d'une mutation intronique.

Cependant, même si cette option n'est présentée qu'en 3^e choix par Aartsma-Rus *et al.* [5], la biopsie est toujours informative. Elle a l'avantage de proposer un matériel susceptible de fournir une réponse rapide sur la présence et/ou l'absence de dystrophine dans le muscle. De plus, la large panoplie d'anticorps spécifiques actuellement disponible va permettre un

dépistage précis de la dystrophine (localisation et/ou quantité) et donc fournir une aide précieuse pour orienter une observation clinique vers un ciblage préférentiel sur un ou plusieurs exons à séquencer.

En bilan de cette analyse, il s'avère important que les patients soient identifiés le plus tôt possible pour examiner tous les traitements potentiellement efficaces au début de l'évolution de la maladie pour un meilleur bénéfice. En moyenne, actuellement, les patients sont en général diagnostiqués à l'âge de 4,1 ans.

Pour conclure, ce travail indique qu'avec les nouvelles thérapies génétiques qui font leur apparition, on pourrait bientôt envisager d'offrir le dépistage néonatal pour la DMD.

Preclinical studies

LIENS D'INTÉRÊT

L'auteur déclare n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Aartsma-Rus A, Ginjaar IB, Bushby K. The importance of genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy. *J Med Genet* 2016 ; 53 : 145-51.
2. Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 1988 ; 53 : 219-28.
3. Parks M, Court S, Cleary S, *et al.* Non-invasive prenatal diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophies by relative haplotype dosage. *Prenat Diagn* 2016 Jan 29. doi : 10.1002/pd.4781.
4. Okubo M, Minami N, Goto K, *et al.* Genetic diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy using next-generation sequencing : validation analysis of DMD mutations. *J Hum Genet* 2016 Feb 25. doi : 10.1038/jhg.2016.7.
5. Aartsma-Rus A, Ginjaar IB, Bushby K. The importance of genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy. *J Med Genet* 2016 ; 53 : 145-51.

Une stratégie de délétion CRISPR-Cas9 unique ciblant la majorité des patients DMD rétablit la fonction de la dystrophine dans les cellules musculaires dérivées de cellules *hiPS*

Dominique Mornet

Résumé

Les mutations du gène *DMD* perturbent le cadre de lecture, empêchent la traduction de la dystrophine, et conduisent à la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD). Les auteurs décrivent ici une stratégie CRISPR/Cas9 applicable à 60 % des patients porteurs de mutations *DMD*. Ils ont appliqué cette stratégie à des cellules dérivées de cellules *hiPS* de patients DMD où la délétion jusqu'à 725 kb du gène et la jonction des extrémités non-homologues ont réussi à remettre en phase le cadre de lecture du gène *DMD*. À ce jour, ceci est la plus grande

délétion obtenue par la technique CRISPR/Cas9 pour le gène *DMD*. L'utilisation de cellules *hiPS* a permis l'évaluation de la dystrophine dans des types cellulaires appropriés de la maladie. Les cardiomyocytes et les myotubes dérivés de lignes clonales *hiPS* expriment une dystrophine corrigée. La dystrophine portant cette délétion en phase est fonctionnelle comme démontré *in vitro* et *in vivo* par l'amélioration de l'intégrité membranaire et la restauration du complexe des glycoprotéines lié à la dystrophine. En outre, l'expression du micro ARN miR31 est réduite après « rephasage » du cadre de lecture,

comme cela est observé dans les dystrophies musculaires de Becker. Ce travail démontre la faisabilité de l'utilisation d'une seule paire CRISPR pour corriger la phase de lecture pour une majorité de patients DMD [1].

Commentaire

Dès 2002 [2], on trouve dans la littérature la description d'une nouvelle méthode simple pour dépister les mutations, délétions, duplications sous le terme de MLPA (*multiplex ligation probe amplification*) au niveau d'un gène. Rapidement la méthode est exploitée et parmi les gènes cibles sera abordée dix ans plus tard l'étude du gène *DMD* dont le détail est donné dans le travail en référence [3]. C'est cette première étape qui va permettre, selon le type d'altérations détectées au sein de la dystrophine, d'envisager une éventuelle thérapie génique chez le patient atteint de dystrophinopathie. Mais comme cette technique ne permet en fait de détecter qu'environ 70 % des altérations sur le gène *DMD*, il est récemment proposé d'utiliser une technique plus performante [4], qui conduit à une identification dans 92 % des cas).

Par ailleurs, dans le domaine de la régénération/réparation d'un tissu comme le tissu musculaire on avait conscience de la présence des cellules satellites que l'on considère comme les cellules souches du muscle. Cependant, l'existence d'un nouveau type de cellules souches est par la suite révélée : les souches pluripotentes induites (iPS). Ces cellules se distinguent des cellules souches standards (ES) car elles peuvent être directement obtenues par transduction transitoire avec un cocktail de facteurs de transcription à partir des fibroblastes d'un donneur [5].

Cette étape va en effet permettre l'isolement de cellules iPS provenant d'un patient, pour servir de source précieuse dans l'étude de la maladie dont il est affecté et/ou évaluer l'efficacité de divers médicaments. Néanmoins, de telles cellules peuvent également être utilisées pour une médecine régénérative. Cependant, l'absence d'une méthode de modification génomique efficace à l'exception des insertions de gènes par des vecteurs viraux limita dans un premier temps leur utilisation.

L'émergence de nouvelles technologies d'édition du génome va alors grandement faciliter la possibilité de corriger des altérations génomiques au niveau des cellules iPS humaines comme l'indique avec une nouvelle technique prometteuse récemment proposée par Li *et al.* [6]. Cette technique permet une

correction précise d'une altération génétique en utilisant le système CRISPR-Cas9, et peut s'appliquer chez l'homme à partir de la nouvelle source de cellules souches dites induites iPS provenant d'un patient donneur.

Dans les travaux présentés par Young *et al.* [1], les auteurs démontrent et illustrent dans plusieurs schémas récapitulatifs la possibilité d'utiliser une unique paire de répétitions palindromiques courtes régulièrement espacées de nucléotides en l'associant à l'endonucléase Cas9 (CRISPR/Cas9) pour corriger le cadre de lecture dans la majorité des cas de pathologie DMD.

Une telle stratégie est applicable chez environ 60 % de la population des patients atteints de dystrophinopathie. Ce sera donc une stratégie personnalisée puisqu'elle va tenir compte du type de mutation/délétion que possède le gène *DMD* du patient considéré. Selon le type de délétion/mutation présent au sein du muscle du patient DMD, il est possible, avec le protocole suggéré par Young *et al.* [1], de supprimer en une seule étape une zone comprise entre les exons 45 et 55. La méthode va permettre d'obtenir une dystrophine dont une portion interne est absente et de réaliser une élimination personnalisée, par exemple de l'exon 46 à 51, ou au maximum une lecture directe sautant de l'exon 44 vers l'exon 56, comme cela a été observé avec la détection d'une mini-dystrophine tronquée d'origine naturelle chez un patient qui ne présentait qu'un profil bénin d'une dystrophie musculaire de Becker (BMD).

En outre, dans ce travail [1], les auteurs observent une restauration d'une dystrophine tronquée associée avec le bêta-dystroglycane *in vivo* après une greffe de cellules musculaires dérivées de cellules hiPSC appliquée chez le modèle murin de la DMD. Un schéma général récapitulatif des diverses étapes mentionnées plus haut est proposé par les auteurs. Il suggère qu'une application à l'homme pourrait être prometteuse car elle conduira à une amélioration de la qualité de vie du patient DMD vers le statut moins sévère de patient BMD. Ajoutons qu'une telle stratégie si elle est applicable dans le cadre de la DMD elle peut s'appliquer efficacement dans le cas de la FSHD [7].

Preclinical studies

LIENS D'INTÉRÊT

L'auteur déclare n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Young CS, Hicks MR, Ermolova NV, *et al.* A single CRISPR-Cas9 deletion strategy that targets the majority of DMD patients restores dystrophin function in hiPSC-derived muscle cells. *Cell Stem Cell* 2016 Feb 10. pii: S1934-5909(16)00022-9.
2. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, *et al.* Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002 ; 30 : e57.
3. Verma PK, Dalal A, Mittal B, Phadke SR. Utility of MLPA in mutation analysis and carrier detection for Duchenne muscular dystrophy. *Indian J Hum Genet* 2012 ;18 : 91-4.
4. Okubo M, Minami N, Goto K, *et al.* Genetic diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy using next-generation sequencing: validation analysis of DMD mutations. *J Hum Genet* 2016 Feb 25. doi: 10.1038/jhg.2016.7.
5. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007 ; 131 : 861-72.
6. Li HL, Gee P, Ishida K, Hotta A. Efficient genomic correction methods in human iPSC cells using CRISPR-Cas9 system. *Methods* 2015 Oct 23. pii : S1046-2023(15)30133-X.
7. Himeda CL, Jones TI, Jones PL. Scalpel or straitjacket : CRISPR/Cas9 approaches for muscular dystrophies. *Trends Pharmacol Sci* 2016 Feb 22. pii: S0165-6147(16)00025-0.

www.myobase.org

Ce portail documentaire rassemble les documents sur les **maladies neuromusculaires**, les **situations de handicap** qu'elles génèrent et leurs **aspects psychologiques**.

Une sélection pertinente de plus de 31 000 notices bibliographiques

- > **articles** de la littérature biomédicale et psycho-sociale
- > **livres, thèses...**
- > **guides** d'associations et **rapports** institutionnels d'agences internationales
- > **brèves en français**, synthèses des articles médico-scientifiques internationaux les plus pertinents
- > **publications AFM-Téléthon** destinées aux professionnels de santé ou aux personnes atteintes de maladie neuromusculaire et à leur entourage

UN OUTIL ERGONOMIQUE, UNE INTERFACE BILINGUE

- Laissez-vous guider par les **tutoriels**
- Lancez une **recherche** et affinez votre sélection grâce aux **filtres**

TOUT MYOBASE

Rechercher...

Recherche avancée

Historique

FILTRES

Type de document

- Article [3443]
- Publication AFM [176]
- Thèse/Mémoire [107]
- Brève [102]

► PUBLICATIONS AFM-Téléthon

► BRÈVES

► DOCUMENTS DE SYNTHÈSE

► INSTITUT DES BIOTHÉRAPIES PUBLICATIONS

- Téléchargez le **texte intégral** des documents libres de droit
- Partagez les résultats de votre recherche

DIFFÉRENTS ACCÈS AUX NOUVEAUTÉS QUOTIDIENNES

- Alertes Myobase**
Les alertes rassemblent une sélection des dernières acquisitions de Myobase et passent deux fois...
- Veille Neuromusculaire**
Publiée tous les 15 jours par le Service de Documentation du Hôpital Trousseau, LA "V"...
- Fils RSS**
Les fils RSS vous permettent de suivre quotidiennement les nouveautés de Myobase, mais aussi...

- Cliquez sur l'**onglet thématique** qui vous convient (haut de la page d'accueil)
- Abonnez-vous aux **alertes thématiques**. Créez vos alertes personnalisées en ouvrant un **compte personnel**
- Téléchargez la **Veille Neuromusculaire**
- Abonnez-vous aux **flux RSS**

Participer à un essai clinique dans la dystrophie musculaire de Duchenne

Christian Réveillère

Résumé

Cette recherche vise à mieux comprendre le processus de décision qui amène des parents à accepter que leur enfant, atteint de dystrophie musculaire de Duchenne (DMD), participe à un essai clinique [1]. L'étude aborde la question de la motivation des parents, leurs attentes et espoirs. Le point de vue des cliniciens investigateurs est également analysé. L'étude est qualitative et rétrospective (patients inclus dans un essai au cours des trois dernières années). Elle a été effectuée à partir d'un entretien semi-structuré.

Effectifs

15 parents (13 mères et 2 pères, 15 enfants inclus âgés de 6 à 15 ans) ; 6 essais différents réalisés aux États-Unis ou au Canada ; 11 cliniciens investigateurs impliqués.

Résultats

Le caractère évolutif et létal de la maladie influe principalement sur la décision qu'ont les parents de participation de leur enfant à un essai ; avec à la fois une attente forte et particulière de bénéfice direct, et une attente de moindre intensité de réussite globale de l'essai. Le niveau d'attente favorable est élevé et la possibilité d'un échec très peu envisagée par les parents (le *ratio* avantages/risques est nettement en faveur des premiers). La prise de décision est faite précocement car arrêtée avant la consultation spécifique d'informations et de signature du consentement éclairé. Cette prise de décision est complexe lorsque l'enfant peut être recruté dans plusieurs essais. Faire partie d'un essai a valeur de soutien moral important pour les parents : augmentation de l'optimisme et du sentiment de contrôle (être « actif et combatif » face à l'évolution de la maladie). Les cliniciens disent avoir du mal à réfréner le niveau d'attente élevé des parents comparé aux résultats cliniques escomptés. Enfin, parents et cliniciens partagent le même point de vue quant à la lourdeur de la démarche, ses délais et la complexité de la réglementation.

Commentaire

Alors que la démarche d'informations et d'acceptation, formalisée par la signature du formulaire de consentement éclairé, doit s'effectuer lors d'une consultation avec le médecin investigateur, l'étude montre que la décision des parents est prise bien avant. Pour la DMD, elle repose essentiellement sur la question de l'évolution et du pronostic vital. L'espoir et la « vigilance scientifique » se mettent en place très précocement et créent un phénomène, parfois intense, d'attente, d'impatience voire d'anxiété (« chaque mois qui passe, mon enfant est moins susceptible d'être en mesure de profiter de ce médicament » ; « il faut faire quelque chose avant qu'il ne soit trop tard », notamment éviter la perte de la marche...). D'où une perception de lenteur, lourdeur, complexité des différents étapes d'un essai clinique. Alors que le niveau de compréhension par les parents de la technique de l'essai est jugé bon par les cliniciens, ceux-ci disent en revanche avoir du mal à être entendus sur les risques potentiels qu'il comporte.

On peut enfin regretter que cette étude n'aborde pas ce qui se passe du côté des attentes et interrogations de l'enfant atteint, au moins du côté de l'information à donner à l'enfant. Pour la France, « La loi du 9 août 2004 relative à la politique de santé publique impose (article L.1122-2.-1) que l'enfant soit informé selon ses capacités de compréhension. Si son état et son âge le permettent, il est consulté : en cas de refus, son avis prime sur celui de ses parents » (pour complément voir *Repères Savoir & Comprendre, AFM-Téléthon : « Essais cliniques et maladies neuromusculaires »*, février 2016).

Clinical research

LIENS D'INTÉRÊT

L'auteur déclare n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCE

1. Peay HL, Scharff H, Tibben A, Wilfond B, Bowie J, Johnson J, Nagaraju K, Escolar D, Piacentino J, Biesecker BB, Watching time tick by... decision making for Duchenne muscular dystrophy trials. *Contemp Clin Trials* 2016 ; 46 : 1-6.

Christian Réveillère

Psychologue,
Attaché au Centre
de Référence Maladies
Neuromusculaires,
CHU Henri Mondor,
Créteil, France,
AFM, Évry.
Professeur, Université
de Tours, France.

Contact

creveillere@
afm-telethon.fr

Potentiels évoqués vestibulaires myogéniques oculaires (oVEMP) : un test diagnostique pour la myasthénie auto-immune ?

Tuy Nga Brignol

Résumé

Une évaluation correcte des symptômes oculaires est essentielle pour réduire le délai de diagnostic de la myasthénie auto-immune (MG). Cependant, les muscles extra-oculaires ne sont pas directement accessibles par *testing* clinique.

Afin d'explorer si les potentiels évoqués vestibulaires myogéniques oculaires (oVEMP pour *ocular vestibular evoked myogenic potentials*) peuvent être utilisés pour détecter une diminution de l'activité des muscles oculomoteurs dans la MG, une équipe australienne a réalisé une étude incluant 27 patients atteints de MG (dont 13 avec forme oculaire isolée et 14 avec forme généralisée) et 28 contrôles sains [1]. Les potentiels évoqués vestibulaires sont déclenchés par une stimulation vibratoire transcutanée à conduction osseuse, au niveau du front à la jonction cheveu/peau. Pour mettre en évidence la fatigabilité de la paupière supérieure, il est demandé à chaque participant de regarder vers le haut de façon soutenue afin de solliciter les muscles droits supérieurs et obliques inférieurs des deux yeux. Deux électrodes d'enregistrement de surface sont placées sous les yeux pour mesurer le signal EMG de surface des muscles obliques inférieurs. Les auteurs ont évalué le décrement de plus de 10 répétitions de stimulus à 3 Hz, 10 Hz et 20 Hz. La stimulation répétitive à 20 Hz a donné la meilleure différenciation entre patients MG et sujets contrôles, avec une sensibilité à 89 % et une spécificité de 64 % en décrement unilatéral de $\geq 15,2$ %. En utilisant un décrement bilatéral $\geq 20,4$ %, le test oVEMP a permis de diagnostiquer les patients MG avec une spécificité de 100 %, mais une sensibilité légèrement réduite de 63 %. Pour les seuils, la sensibilité est similaire dans les deux formes de MG oculaire isolée et MG généralisée.

Cette étude fournit des preuves de classe III que le test oVEMP permet de faire un examen direct et non invasif de l'activité des muscles oculomoteurs, avec une bonne sensibilité diagnostique de MG.

Commentaire

La mise en évidence d'altérations de la transmission neuromusculaire est un élément clé dans le

diagnostic de la myasthénie. Les auteurs ont combiné le test de Simpson (mise en évidence la fatigabilité de la paupière supérieure dans la MG en demandant au malade de regarder vers le haut de façon soutenue afin de solliciter les muscles droit supérieur et oblique inférieur des deux yeux) à un test d'exploration de l'oreille interne utilisé par les ORL, les potentiels évoqués vestibulaires myogéniques oculaires (oVEMP).

À l'origine, oVEMP a été conçu pour évaluer la fonction des otolithes de l'oreille interne. Les auteurs ont démontré l'utilité du test oVEMP pour détecter le décrement de l'EMG de surface des muscles oculomoteurs, notamment du muscle oblique inférieur. Comparé à d'autres tests, oVEMP serait un outil unique en MG oculaire, car il permet de révéler directement et de manière non invasive la fatigabilité pathognomonique des muscles extra-oculaires.

La myasthénie peut affecter l'un des six muscles extra-oculaires. La fréquence de la participation de chaque muscle extra-oculaire n'est pas bien établie dans la littérature. D'après une récente étude [2] comportant 30 patients ayant un diagnostic clinique de myasthénie avec atteinte des muscles extra-oculaires et diplopie, le muscle oblique inférieur a été impliqué plus souvent que tout autre muscle (63,3 %). Dix-huit (60 %) patients avaient un ptosis, dont six (20 %) d'entre eux avaient un ptosis bilatéral. Cependant, malgré l'importance du diagnostic précoce, il est souvent retardé car l'implication des muscles extra-oculaires peut mimer d'autres maladies. Étant donné le large spectre des pathologies des muscles extra-oculaires, toute atteinte de la motilité oculaire acquise, avec ou sans ptosis, mais avec un réflexe pupillaire normal, devrait faire suspecter la MG. Le test oVEMP pourrait alors représenter un outil de diagnostic prometteur pour la MG, en étant couplé à un équipement standard EMG dans toute unité d'électrophysiologie.

Clinical research

LIENS D'INTÉRÊT

L'auteur déclare n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Valko Y, Rosendren SM, Jung HH, Straumann D, Landau K, Weber KP. Ocular vestibular evoked myogenic potentials as a test for myasthenia gravis. *Neurology* 2016 ; 86 : 660-8.
2. Almog Y, Ben-David M, Nemet AY. Inferior oblique muscle paresis as a sign of myasthenia gravis. *J Clin Neurosci* 2016 ; 25 : 50-3.

Tuy Nga Brignol
AFM-Téléthon, Évry,
France.

Contact
tnbrignol@afm-telethon.fr

Un nouvel Institut de Myologie en Floride

Gillian Butler-Browne

La mission de l'Institut de Myologie de l'Université de Floride est de découvrir les causes et la physiopathologie des maladies neuromusculaires, de mener des études précliniques pour évaluer des thérapies innovantes, de conduire des essais cliniques pour ces maladies et de réunir les chercheurs et cliniciens de l'Université de Floride, mais aussi d'autres institutions qui veulent comprendre les bases de la biologie et de la physiopathologie de ces atteintes et développer des traitements.

L'Institut de Myologie de l'Université de Floride (UF) a été créé il y a un an, et est actuellement dirigé par le Dr H. Lee Sweeney, un chercheur de réputation mondiale dans le domaine des maladies neuromusculaires (MNM). Les recherches du Dr Sweeney sont principalement centrées sur les myosines, « moteurs » moléculaires de la cellule musculaire, les maladies cardiovasculaires d'origine génétique, les aspects cardiaques et squelettiques des dystrophies musculaires, ainsi que le développement de traitements pour les MNM à l'aide de petites molécules. L'Institut de Myologie de l'UF n'est pas regroupé dans un seul bâtiment, mais il rassemble des chercheurs répartis sur le campus de l'UF avec des industries privées et d'autres institutions dans le but de créer un effort collaboratif pour mieux comprendre et traiter les MNM. Les activités de l'Institut de Myologie de l'UF concernent la recherche fondamentale sur les muscles squelettiques, cardiaques et lisses, et la recherche translationnelle impliquant des modèles cellulaires et animaux des MNM et cardiovasculaires. L'Institut a pour mission de faciliter les études et les essais cliniques dans ces domaines, ainsi que d'assurer la formation, d'organiser des conférences nationales et internationales dans ces domaines, et enfin de mettre en place des plateformes performantes pour aider à accomplir ces missions.

L'Institut comprend actuellement 33 chercheurs confirmés, et a recruté récemment comme directrice adjointe Karyn Essen, une chercheuse fondamentale professeur de Physiologie et de Génomique fonctionnelle. Au cours de sa première année d'existence, l'Institut est progressivement monté en puissance avec la labellisation de « *Senator Paul Wellstone Muscular Dystrophy Cooperative Research Centre* », et pour mission d'améliorer la régénération dans les dystrophies musculaires en inhibant le

développement de la fibrose et l'infiltration graisseuse. Cette labellisation a été suivie en octobre 2015 par un soutien financier du NIH (*National Institutes of Health*) à hauteur de 10,76 millions de dollars pour développer un projet multidisciplinaire portant sur la dégénérescence musculaire en situation pathologique.

Une valeur ajoutée à cet Institut est sa proximité avec les hôpitaux locaux, l'école de médecine et l'école vétérinaire. Les efforts sont actuellement développés pour multiplier les essais cliniques pour les dystrophies musculaires, et l'Institut développe une expertise mondiale dans l'utilisation de l'IRM dans le suivi des patients souffrant de Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD). Ainsi, dans une

étude multicentrique financée par une subvention du NIH de 7,5 millions de dollars dont l'investigateur principal est Krista Vandenborne, les chercheurs de l'UF ont montré que la technologie IRM

permet des mesures précises et non invasives sur les membres inférieurs des enfants souffrant de DMD. L'IRM permet de suivre rapidement les effets de thérapies innovantes dans les essais cliniques, permettant ainsi aux chercheurs de détecter des changements au niveau musculaire en seulement quelques mois. Dans une nouvelle étude, les Drs Vandenborne, Sweeney, et Maren et d'autres membres de l'équipe vont suivre la progression de la DMD chez 136 patients ayant déjà participé à l'étude princeps d'imagerie, et les chercheurs vont aussi tester l'efficacité de l'IRM pour l'évaluation des membres supérieurs. Si les résultats obtenus montrent une sensibilité égale sur les membres supérieurs, cela permettra d'accroître de manière significative le nombre d'enfants DMD pouvant rentrer dans des essais cliniques, souvent limités jusqu'alors à des patients ambulants. Le but final de l'étude est de développer l'imagerie par IRM comme biomarqueur



Gillian Butler-Browne

Centre de Recherche
en Myologie
UMRS974 - UPMC
Sorbonne
Universités/U974
- Inserm/FRE3617 -
CNRS/AIM
Groupe hospitalier
Pitié-Salpêtrière, Paris,
France

Contact
gillian.butler-browne@
upmc.fr

pouvant être utilisé chez des enfants non ambulants, et donc d'accroître les inclusions dans les études cliniques.

L'Institut de Myologie de l'Université de Floride, bien qu'encore jeune, présente déjà de nombreux atouts pour devenir un acteur majeur dans la Myologie internationale, et il a déjà développé des contacts avec d'autres Instituts internationaux : ainsi des discussions fructueuses ont déjà été menées avec

l'Institut de Myologie de la Pitié-Salpêtrière, en attendant la signature d'accords entre les tutelles qui viendront formaliser cette coopération internationale au plus haut niveau scientifique.

A novel Myology Institute in Florida

LIENS D'INTÉRÊT

L'auteur déclare n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

Partenariat France-Brésil

Vincent Mouly

Le Laboratoire International Associé (LIA) « Thérapie cellulaire et immunothérapie » a été créé par l'Inserm et l'Université Pierre et Marie Curie (UPMC) en France et la Fondation Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) et l'Université Fédérale de Rio de Janeiro (UFRJ) au Brésil (2009-2016). Il réunit les expertises en immunologie et matrice extracellulaire des équipes brésiliennes (W. Savino, I. Riederer, F. Pinto-Mariz, C. Benjamim), et en maladies neuromusculaires des équipes françaises (G. Butler-Browne, V. Mouly, O. Benveniste) et a donné lieu à ce jour à trois thèses, 11 publications, et un brevet (biomarqueur pour la DMD).

Le LIA de Thérapie Cellulaire et Immunothérapie est né d'une forte collaboration existant entre l'équipe de G. Butler-Browne du Centre de Recherche en Myologie (CRM, UMRS 974, Institut de Myologie, Paris) et celle de W. Savino à l'Institut Oswaldo Cruz de la FIOCRUZ au Brésil. Initialement créé entre l'Inserm et la FIOCRUZ, il a très rapidement été reconnu aussi par l'UPMC, puis par l'UFRJ, et a reçu des financements des programmes CAPES-Cofecub, Inserm-FIOCRUZ et récemment Ciencia sin Fronteras (Figure 1). Les deux partenaires ont choisi de travailler ensemble sur la migration des précurseurs musculaires humains et leur interaction avec la matrice extracellulaire dans un modèle de xénogreffe qu'ils ont mis au point ensemble avec le laboratoire de J. di Santo (Institut Pasteur, Paris). Ils ont ainsi montré l'importance de la laminine pour ces xénogreffes [1] et l'effet d'un choc thermique sur l'efficacité de la greffe de myoblastes [2]. La cinétique de régénération des précurseurs humains a été établie [3], et le rôle que jouent les macrophages dans la régénération musculaire a été étudié par un étudiant en co-direction [4]. Une étude d'expression de miARN a aussi été réalisée au cours de la différenciation des précurseurs humains [5]. Le potentiel myogénique *in vivo* de cellules souches (AC133) a été quantifié

(Torrente, Rome, Italie) [6]. Enfin, les deux équipes ont mis au point un modèle de souris immunodéficientes et déficientes en dystrophine (RAG/DMD). Le partenariat initial, basé sur la confiance et l'amitié réciproques, a été étendu à des équipes de l'UFRJ (A. Pruffer-Araujo et F. Pinto-Mariz, C. Benjamim), de la FIOCRUZ (A. Bonomo), du LNCC (pour Laboratório Nacional de Computação Científica, A.T. Ribeiro de Vasconcelos) et du CRM (O. Benveniste). Ce partenariat a permis la mise en évidence d'un biomarqueur circulant, VLA-4, chez le chien GRMD (collaboration École nationale vétérinaire d'Alfort) [7] et chez les patients DMD, prédictifs de l'évolution de la maladie [8]. Ce biomarqueur a été breveté, puisqu'il sera un instrument précieux pour la sélection de cohortes de patients et leur suivi au cours



Figure 1
Une équipe du LIA avec G. Butler-Browne et V. Mouly (CRM), I. Riederer (Fiocruz), deux étudiantes et deux post-doctorantes, dans le laboratoire de la FIOCRUZ à Rio-de-Janeiro.

Vincent Mouly
DR2 CNRS, UPMC,
Institut de Myologie,
Groupe Hospitalier
Pitié-Salpêtrière, Paris,
France

Contact
vincent.mouly@upmc.fr

d'essais thérapeutiques innovants. Les projets actuels concernent l'expression des différentes isoformes de laminine au cours de la différenciation musculaire de précurseurs humains et au cours de la régénération *in vivo* par une analyse globale des transcrits humains dans les xéno greffes, particulièrement ceux en relation avec la matrice extracellulaire. Les mêmes approches seront appliquées pour détecter les modifications de la matrice extracellulaire en absence de dystrophine. Enfin, des expériences de perturbation d'expression de ces isoformes (surexpression ou *knock-down*) sont aussi prévues, ainsi que l'analyse d'une lignée immortalisée dérivée d'un patient déficient en laminine (mérosine). D'autres projets concernent l'implication potentielle des cellules dendritiques dans la régénération, et l'étude de facteurs impliqués dans des myopathies inflammatoires. Le projet concernant le biomarqueur VLA-4 sera étendu à l'étude du cœur dystrophique. Enfin, des essais d'induction de tolérance immunologique par voie orale sont en cours chez la souris.

Au-delà des projets communs et de la formation des étudiants, principalement masters et doctorants, ce LIA sert aussi de point d'ancrage pour le développement de coopérations franco-brésiliennes. Ainsi, nous avons participé aux discussions fondatrices concernant une coopération dans le cadre plus général de la neurologie, avec la création future d'un Institut des Neurosciences à la FIOCRUZ. De même, des premiers contacts ont été récemment établis entre l'Institut Universitaire du Cancer de l'UPMC et des chercheurs de la FIOCRUZ, dans le cadre

d'un nouveau développement brésilien dans ce domaine, intitulé FIOCANCER. Nous espérons que ce rôle de cristallisateur de notre LIA permettra le développement de coopérations futures aussi fructueuses que celle que nous connaissons avec nos collègues brésiliens dans le cadre du LIA.

France-Brazil partnership

LIENS D'INTÉRÊT

L'auteur déclare n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Silva-Barbosa SD, Butler-Browne GS, de Mello W, *et al.* Human myoblast engraftment is improved in laminin enriched microenvironment. *Transplantation* 2008 ; 85 : 566-75.
2. Riederer I, Negroni E, Bigot, *et al.* Heat shock treatment increases engraftment of transplanted human myoblasts into immunodeficient mice. *Transplant Proc* 2008 ; 40 : 624-30.
3. Riederer I, Negroni E, Bencze M, *et al.* Slowing down differentiation of engrafted human myoblasts into immunodeficient mice correlates with increased proliferation and migration. *Mol Ther* 2012 ; 20 : 146-54.
4. Bencze M, Negroni E, Vallese D, *et al.* Proinflammatory macrophages enhance the regenerative capacity of human myoblasts by modifying their kinetics of proliferation and differentiation. *Mol Ther* 2012 ; 20 : 2168-79.
5. Portilho DM, Alves MR, Kratassiouk G, *et al.* miRNA expression in control and FSHD fetal human muscle biopsies. *PLoS One* 2015 ; 10 : e0116853.
6. Negroni E, Riederer I, Chaouch S, *et al.* In vivo myogenic potential of human CD133⁺ muscle-derived stem cells: a quantitative study. *Mol Ther* 2009 ; 17 : 1771-8.
7. Barthélémy I, Pinto-Mariz F, Yada E, *et al.* Predictive markers of clinical outcome in the GRMD dog model of Duchenne muscular dystrophy. *Dis Model Mech* 2014 ; 7 : 1253-61.
8. Pinto-Mariz F, Rodrigues Carvalho L, Prufer De Queiroz Campos Araujo A, *et al.* CD49d is a disease progression biomarker and a potential target for immunotherapy in Duchenne muscular dystrophy. *Skelet Muscle* 2015 ; 5 : 45.

Excitation et crispations autour de CRISPR : lorsque la réalité dépasse la science-fiction

*Elation and crispations about CRISPR:
when truth is stranger than science-fiction*



Jean-Claude Kaplan

C'est un clin d'œil appuyé que le dinosaure émérité vous adresse aujourd'hui. Il est déclenché par une percée méthodologique de première grandeur qui bouleverse la donne en matière de biologie fondamentale et appliquée, myologie comprise. Il s'agit de CRISPR-Cas9, ce scalpel moléculaire qui « fait le buzz » (*Encadré 1*). En fait, bien plus que d'une mode, il s'agit d'une véritable révolution, car en permettant l'édition génomique (*Encadré 2*) cet outil constitue un véritable saut qualitatif. À cet égard, on peut l'assimiler à ce qu'ont représenté les enzymes de restriction dans les années 1970 et la PCR dans les années 1980. En effet, la méthode CRISPR-Cas9 permet de modifier à volonté et à l'endroit désiré la séquence de l'ADN génomique de n'importe quel organisme, aussi bien *ex vivo* qu'*in vivo*, avec une facilité déconcertante et à un prix dérisoire. Élaboré par les biologistes Emmanuelle Charpentier et Jennifer

Doudna il y a à peine 4 ans, le procédé a très vite suscité un intérêt considérable, attesté par l'explosion du rythme des publications, qui est passé de 29 articles par mois en 2013 à 115/mois en 2015, cadence encore doublée pendant le premier trimestre 2016. Comme toute invention majeure, la technologie CRISPR-Cas9 suscite non seulement des espoirs mais des craintes, d'autant plus médiatisés que les enjeux scientifiques et sociétaux sont considérables.

Un engouement sans précédent dans l'histoire de la biologie

• L'envol de CRISPR

Très vite l'outil CRISPR-Cas9 - perfectionné par les chercheurs de tous bords qui se sont engouffrés dans la brèche ouverte en 2012 par le tandem Emmanuelle/Jennifer et ont fait assaut d'ingéniosité pour

1 CRISPR-Cas9 : l'acronyme et au-delà

- **CRISPR** est l'acronyme de *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, nom d'un motif présent dans le génome des procaryotes. **Cas** est l'acronyme de *CRISPR ASSociated gene* et désigne une famille de gènes spécifiant des endonucléases bactériennes.

- **Cibler/couper/recoller pour réparer, abolir voire créer :**

L'outil **CRISPR-Cas9** est un instrument forgé de toutes pièces par la main de l'Homme, en l'occurrence de deux femmes, Emmanuelle Charpentier et Jennifer Doudna^{1,2}. En s'inspirant d'un mécanisme complexe d'immunité adaptative des procaryotes contre l'invasion de leur génome par des séquences mobiles exogènes^{3,4}, elles ont conçu un dispositif ribonucléoprotéique d'**édition génomique programmable** comportant la protéine **Cas9**, une endonucléase bactérienne qui joue le rôle de ciseau coupant les deux brins de l'ADN cible, attelée à un **ARN guide** inspiré du modèle bactérien CRISPR auquel est ajoutée une séquence de 20 nucléotides complémentaires de la cible choisie*, jouant le rôle de tête chercheuse ultra-spécifique. **La protéine Cas9** est une pièce universelle disponible dans toutes les quincailleries moléculaires, le segment d'**ARN guide** est aisément synthétisé à façon selon la cible que l'on veut atteindre. Au niveau de la coupure, on peut enlever, rajouter, substituer, réparer, le rétablissement de la continuité des deux brins étant assuré par les systèmes de réparation endogènes**.

* Reposant sur une reconnaissance de type Watson-Crick (G/C, T/A).

** Le rabotage est approximatif dans le mode dit *NHEJ* (*Non Homologous End Joining*) qui introduit des micro-insertions ou délétions (*indels*) mises à profit pour les manipulations invalidantes. Pour les manipulations correctrices, où il faut obtenir une reconstitution parfaite au niveau des points de cassure, on doit mettre en jeu le mode *HDR* (*Homology Directed Repair*) qui nécessite la présence d'une séquence modèle.

Jean-Claude Kaplan

Institut Cochin,
Faculté de Médecine
Paris-Descartes,
Paris, France

Contact
jeanclaudio.kaplan@
gmail.com

2 Pas de crispation terminologique autour du terme « édition » génomique

Les manipulations génomiques permises par CRISPR-Cas9 consistent à opérer ce que les Anglo-Saxons appellent un *genome editing*. L'expression n'est pas traduisible littéralement en français car le mot *edition* est un faux ami. En anglais, il désigne la correction d'erreurs typographiques, orthographiques ou syntaxiques, avec, éventuellement, améliorations ponctuelles du texte au sens où on l'entend pour la révision d'un manuscrit ou d'un jeu d'épreuves imprimées, ce qui est exactement le but recherché avec CRISPR-Cas9. En français classique, « éditer » signifie publier, ou faire paraître un texte et éventuellement le diffuser. Parmi les équivalents linguistiquement corrects, les désignations « modifications ciblées du génome » ou « ingénierie du génome » ont la faveur de l'Académie de Médecine⁵. En fait, il suffit de se reporter au Dictionnaire Historique de la Langue Française d'Alain Rey⁶ qui avalise l'acception anglaise, déjà en vigueur dans le vocabulaire informatique français, pour adopter une fois pour toutes et sans réticence l'expression « édition génomique ».

l'améliorer^{7,8,9} -, s'est avéré efficace au-delà de toute espérance. De plus, il est d'exécution facile et son coût est dérisoire comparé à celui des autres procédés de modification génomique ciblée (méga-nucléases, protéines à doigt de Zn, effecteur trans-activateurs de type TALEN) qui sont plus coûteux, et moins efficaces¹⁰. En l'espace de trois années, il a été appliqué avec succès dans tous les domaines de la génétique moléculaire et dans un nombre croissant d'espèces, y compris chez *H. sapiens*. Il est apparu qu'on tenait là un outil d'une formidable puissance utilisable en génomique fondamentale et appliquée, en biomédecine, en biotechnologie. En ce qui concerne l'Homme et les recherches biomédicales, le premier acquis incontestable a été le pouvoir de produire n'importe quelle mutation ayant un intérêt médical dans le génome de n'importe quelle espèce animale y compris les primates non-humains, ceci aux fins d'élargir la panoplie des modèles animaux expérimentaux¹¹. Par exemple, en myologie, l'une des premières réalisations a consisté à enrichir la palette des modèles animaux de dystrophinopathie (rat¹², singe rhésus¹³).

La méthode CRISPR-Cas9 a été très vite utilisée à des fins thérapeutiques et on a assisté à une explosion de travaux visant à apporter des preuves de concept - les POC du *Clin d'œil* précédent¹⁴ - laissant espérer que l'édition génomique pourrait être exploitée à des fins médicales^{15,16,17} : (1) pour la correction *in situ* de mutations pathogènes constitutionnelles (maladies génétiques monogéniques) ou somatiques (cancers¹⁸) ; (2) pour la destruction du génome d'agents infectieux viraux (HIV¹⁹, HBV²⁰, HPV²¹) ; (3) pour l'élimination des insectes vecteurs d'organismes pathogènes²².

• Quelques pépites dans la moisson de résultats obtenus chez l'animal

Depuis l'article princeps [1], la plupart des 2 600 publications relatives à CRISPR visent à perfectionner la méthode et à démontrer que l'édition génomique est opérationnelle dans des modèles expérimentaux très variés. Beaucoup moins vont au-delà pour analyser les conséquences biologiques des

modifications introduites. Parmi les réalisations les plus significatives dans le domaine biomédical voici quelques exemples spectaculaires donnés dans l'ordre chronologique :

- 2014 : obtention de réarrangements chromosomiques reproduisant des situations observées en oncologie²³ ;

- 2015 : élaboration de la méthode MCR (*Mutagenic Chain Reaction*) où une modification hétérozygote agit en *trans* de manière autocatalytique pour obtenir l'homozygotie en court-circuitant la transmission mendélienne²⁴. Ce procédé d'abord validé chez la *Drosophile* a été appliqué chez l'Anophèle vecteur de l'agent du paludisme. Il permettrait par un mécanisme appelé « *gene drive* »²⁵ d'éliminer complètement les espèces propageant des maladies parasitaires, et par exemple d'éradiquer le paludisme [22].

- 2016 : l'année a commencé en fanfare avec les premiers possibles succès thérapeutiques obtenus par édition génomique post-natale de modèles animaux après injection par voie systémique de l'outil CRISPR-Cas9. Ces POC ont été apportées notamment dans le modèle murin de tyrosinémie²⁶, et chez la souris *mdx* modèle murin de dystrophinopathie^{27,28,29,30}. Dans ce dernier cas, l'édition consistait à faire sauter l'exon 23 du gène *dmd* porteur d'une mutation stop pour rétablir le cadre de lecture. Ici le saut d'exon thérapeutique a lieu au niveau génomique, c'est donc un *exon snipping*³¹ et non un *exon skipping* lequel intervient au niveau de l'épissage³². L'effet thérapeutique est *a priori* pérenne dans les myocytes post-mitotiques et une injection unique devrait suffire³³. De plus, le génome des cellules satellites semble être accessible à l'édition [30].

• Une ambiance de ruée vers l'or

Une véritable course de vitesse s'est engagée entre les laboratoires académiques renommés, les grands groupes pharmaceutiques. C'est à qui sera le premier à apporter sa POC, source d'espoirs thérapeutiques, et, en attendant la première guérison, source de prestige et de brevets. Les *start-up* fleurissent, les capitaux affluent, Wall-Street est en effervescence.

Cette ruée vers l'or s'explique par la rapide confirmation expérimentale de l'efficacité de l'outil, tant à l'échelle cellulaire qu'à l'échelle de l'organisme entier. Pourtant, dans cette frénésie, des sujets de préoccupations se font jour dans le monde scientifique et sont désormais sur la place publique.

Les crispations à propos de CRISPR

Elles se cristallisent autour d'un conflit de brevets et de la question de l'édition du génome humain germinale. Dans les deux cas, l'éthique est en jeu et le retentissement médiatique est considérable³⁴.

• Qui a inventé CRISPR-Cas9 ?

Cette question a trait à la guerre des brevets qui oppose les Universités de Vienne et de Californie-Berkeley, tutelles des inventrices de la méthode (Emmanuelle Charpentier et Jennifer Doudna), et dont le brevet déposé en 2012 n'a pas encore été octroyé, au *Broad Institute* Harvard/MIT auquel appartient Feng Zhang, qui dans les mois ayant suivi la publication princeps [1] a perfectionné l'outil en l'appliquant avec succès à des eucaryotes (souris et homme) et obtenu un brevet par une procédure d'urgence. La bataille, qui ne met pas en jeu les chercheurs mais leurs universités, seules détentrices des droits potentiels, risque d'être longue et acharnée car il y a des milliards à la clé. Ces tensions qui défraient la chronique^{35,36}, ont été ravivées par un remarquable article d'Éric Lander³⁷, Directeur du *Broad Institute*, et étoile de première grandeur dans l'univers de la génétique moléculaire, où il retrace en détail l'histoire de l'invention de CRISPR-Cas9, mais d'une façon biaisée avantageant son poulain. Il y a là un conflit d'intérêt non mentionné dans l'article, et cette infraction à la déontologie des publications a valu à son auteur une réprobation quasi-générale^{38,39}. Au-delà des dollars, il y a naturellement un problème de prestige concernant les futurs lauréats du Prix Nobel.

• Les risques de dissémination

Il s'agit des risques inhérents aux expériences sur l'animal visant à éradiquer par le mécanisme du *gene drive* ([22] et note 25) une espèce jugée nuisible en relâchant dans la nature des spécimens « édités ». Il y a là un risque de bouleversement des écosystèmes, ce qui entraîne une crispation bien compréhensible de la part des scientifiques responsables. Ceux-ci proposent d'approfondir la réflexion et d'édicter des règles strictes d'encadrement^{40,41}.

• Le défi éthique de l'édition du génome germinale humain

Chez l'animal, l'édition thérapeutique *in vivo* a été expérimentée avec succès dans le génome somatique



Figure 1
Les deux héroïnes (E. Charpentier à gauche ; J. Doudna à droite) de CRISPR-Cas9 lors de la remise du Prix 2016 l'Oréal-Unesco pour les Femmes et la Science (24 mars 2016).
© Fondation L'Oréal

post-natal et aussi dans le génome germinale (gamète, zygote, embryon) avec, dans ce cas, transmission à la descendance⁴².

En revanche, jusqu'à nouvel ordre, les expériences sur embryons humains sont prohibées dans la plupart des pays. C'est pourquoi les protocoles d'essais cliniques de thérapie génique conventionnelle par transfert de gène exigent d'exclure tout risque de contamination des lignées germinales. Aussi, lorsque la révolution CRISPR a fait son irruption, les seules éditions pratiquées sur du matériel humain l'ont été *ex vivo* sur le génome somatique de cellules en culture, et en particulier des cellules souches pluripotentes induites (en anglais *Induced pluripotent stem cells* ou *hiPSC*)^{43,44,45}.

Or, le tabou du génome germinale humain a été transgressé en Chine au printemps 2015 avec une expérience d'édition du génome d'embryons humains non viables et non suivie de réimplantation utérine, la cible étant le gène de la bêta-globine⁴⁶. Les résultats ont été intéressants à deux titres : (1) en démontrant une efficacité limitée (production de mosaïque) et un

manque de spécificité (nombreux événements *off-target*) ; (2) en mettant au premier plan les problèmes éthiques inhérents aux manipulations du génome germinale humaine, objectif d'ailleurs revendiqué par les auteurs. Sur ce dernier point, le succès a été total puisque la publication a soulevé une émotion considérable au niveau mondial⁴⁷. Dans une atmosphère rappelant l'ère des débuts de la génétique moléculaire des années 1970 avec le moratoire de Berg et la conférence d'Asilomar en 1975⁴⁸, la communauté scientifique a appelé à une réunion internationale pour réfléchir aux inquiétantes potentialités de l'édition du génome germinale et, semble-t-il, pour la bannir^{49, 50, 51, 52, 53}. Cette réunion a eu lieu à Washington en décembre 2015, rassemblant autour des inventeurs et utilisateurs de CRISPR des biologistes de tous bords - dont Paul Berg et David Baltimore déjà présents à Asilomar exactement 40 ans plus tôt - ainsi que des juristes, des éthiciens et des représentants de la société civile, y compris les usagers potentiels, en provenance de nombreux pays. On y a débattu des perspectives bénéfiques de l'édition génomique germinale et réfléchi aux aspects potentiellement néfastes de ce genre de manipulation en évoquant le spectre d'un retour à l'eugénisme devenu moléculaire, voire même d'une utilisation pour des objectifs transhumanistes⁵⁴. Dans sa résolution finale⁵⁵, l'assemblée a considéré que la seule justification de l'édition génomique germinale dans l'espèce humaine était d'ordre cognitif, avec pour objectif de déchiffrer les mécanismes moléculaires mis en jeu lors des premières divisions du zygote, et à condition de ne pas le réimplanter dans un utérus préparé. Toute édition germinale humaine à des fins reproductives était jugée « irresponsable » dans l'état actuel de nos connaissances. Bertrand Jordan a judicieusement résumé ce point de vue en intitulant son article « Feu orange pour la thérapie germinale ? »⁵⁶. En attendant que le sujet mûrisse, la communauté scientifique internationale était conviée à continuer sa réflexion en se réunissant périodiquement. La conséquence la plus importante de ce premier sommet a été de réveiller les consciences dans les pays les plus actifs dans le domaine de l'édition génomique (États-Unis, Chine, Europe) où le sujet a été sérieusement abordé par les instances professionnelles. En France, l'Académie de Médecine, après une réflexion approfondie avec audition de nombreux spécialistes, a adopté en avril 2016 un rapport très documenté sur la question [5] comportant des recommandations similaires à celles issues de la réunion de Washington. Il y est souligné en outre que si la législation française, avec notamment ses lois évolutives de Bioéthique, et la vigilance active du comité consultatif national d'éthique (CCNE) offrent déjà une bonne protection

contre le mésusage de l'édition génomique chez l'Homme, l'effort de réflexion ne doit pas se relâcher. Enfin, dans les tout derniers jours du mois d'avril 2016, un deuxième sommet international post-Washington s'est tenu à Paris, suivi d'une réunion de consensus⁵⁷.

Ce remue ménage n'a pas empêché la Chine d'aller de l'avant et de pratiquer une seconde expérience d'édition germinale dans des embryons humains non viables, ciblant cette fois le gène codant le récepteur CCR5 pour y introduire la mutation conférant une résistance au virus HIV^{58, 59}. Les résultats ont été décevants, prouvant que la technique était loin d'être maîtrisée, et les auteurs concluent à la nécessité de proscrire la pratique de l'édition génomique des embryons tant qu'elle ne serait pas fiable...



Figure 2

Janus est le dieu romain des commencements et des fins, des choix, du passage et des portes. Il a deux visages (bifrons), l'un tourné vers l'avenir, l'autre vers le passé. Le symbole est ici détourné pour représenter la dualité des réactions suscitées par CRISPR : éclat prométhéen des lendemains qui chantent/peurs cassandresques de lendemains incertains.

© Fubar Obfusco - Foto taken himself, upload to English wikipedia by Fubar Obfusco, Domaine public, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=177247>

Quelques commentaires depuis Sirius⁶⁰

Face au mélange d'enthousiasme et de crispations suscitées par la technique CRISPR, on ne peut ni ne doit rester indifférent, car les enjeux sont importants. Le sujet est tellement mouvant, et le recul si faible qu'il paraît vain de tenter une synthèse et *a fortiori* d'anticiper. Voici cependant quelques réflexions que le sujet m'inspire en tant que médecin.

Les nucléases programmables de type CRISPR-Cas9 représentent un instrument de recherches fondamentales incomparable. Il est perfectionné tous les jours et appliqué à un nombre sans cesse croissant de domaines. C'est la baguette magique qui fera enfin parler le génome et l'épigénome humains, et

par voie de conséquence le « pathome » et tous les autres « omes » y compris le « pharmacome ».

- Concernant l'édition somatique, dont personne ne conteste la légitimité, il faut éviter de retomber dans les errements de la thérapie génique conventionnelle par transfert de gène [14] où l'on a commencé à crier victoire avant d'avoir mesuré et surmonté les difficultés de l'entreprise. À la célèbre injonction de Stuart Orkin et Arno Motulski⁶¹ réclamant il y a déjà plus de 20 ans *less hype, more biology*, je me permets d'ajouter aujourd'hui à propos de CRISPR « *and more common sense* ». En effet, le fait de remplacer le transfert de gène par l'édition du génome ne contourne en aucune façon les verrous que représentent la vectorisation et l'adressage dans un maximum de noyaux et dans les tissus ou organes adéquats⁶². C'est pour cela que, dans le domaine de la myologie, les publications rapportant une édition efficace du gène de la dystrophine (DMD) [27-30] ne sont que des POC expérimentales et non des avancées thérapeutiques immédiatement applicables en clinique⁶³. Les avantages de l'édition génomique que sont la correction *in situ* (donc régulée) et définitive sont contrebalancés par la nécessité absolue de réussir sans bavure (aucun impact *off-target*) et le risque que comporte l'abandon du bistouri (l'endonuclease Cas9) dans le champ opératoire⁶⁴. Or, les méthodes d'édition génomique en vigueur, même très améliorées, sont encore loin d'offrir les garanties de sécurité nécessaires^{65,66}. Le bon sens nous amène à peser soigneusement les maladies qui pourraient être candidates à une édition thérapeutique. *A priori*, les situations les plus favorables devraient être les suivantes : (1) *édition suppressive* : élimination de séquences rétrovirales intégrées et pathogènes (VIH) ou d'allèles avec gain de fonction dominants (maladies à expansion de triplets comme la chorée de Huntington) ; élimination de fusions géniques aboutissant à un gain de fonction oncogénique (nombreux types de leucémies, certains cancers) ; (2) *édition restauratrice* : les maladies génétiques affectant une protéine catalytique (enzymes, facteurs de coagulation) où le seuil thérapeutique est très bas [26]. En matière de myologie, rappelons que les structuropathies, comme les dystrophinopathies, ont au contraire un seuil thérapeutique élevé. En revanche, la dystrophie facio-scapulo-humérale (FSH), où l'anomalie microsatellitaire entraîne par voie épigénétique une dépression ectopique de *DUX4*, paraît être un excellent choix par ciblage de Cas9 vers son promoteur et l'exon 1⁶⁷ ; (3) édition topique (rétine).

- Concernant l'édition germinale, nous retompons dans le dilemme *Cassandra versus*

Prométhée déjà évoqué dans un précédent *Clin d'œil*⁶⁸. Ici aussi, le problème est avant tout d'ordre éthique puisque le savoir-faire progresse à une allure vertigineuse. Or, le vertige n'est pas propice à une réflexion éthique sereine. En permettant de façonner à sa guise n'importe quel génome, la méthode CRISPR-Cas9 apparaît comme une technologie de rupture⁶⁹. Si on songe qu'elle confère à l'Homme une maîtrise jusqu'alors réservée au tandem hasard/nécessité⁷⁰ ou pour les croyants monothéistes au seul Créateur⁷¹, elle apparaît même comme une technologie de transgression capable de nous affranchir de la fatalité darwino-mendélienne. Je ne doute pas que le sujet sera proposé au prochain bac philo (voir à la fin de ce *Clin d'œil*), mais, en attendant, on aimerait se faire une philosophie en terme de perspectives thérapeutiques. Que dire aux malades et à leurs familles sachant que les Associations se sont montrées plutôt réceptives aux manipulations du génome embryonnaire⁷² ?

• Entre le cauchemar de Jennifer et le rêve de George

Une maîtrise de la maîtrise est-elle envisageable ? D'abord est-elle souhaitable ? Pour la plupart des scientifiques, à commencer par les inventrices de la méthode, la réponse est positive. C'est le point de vue que l'on peut résumer par la formule « *Le cauchemar de Jennifer* »⁷³ qui récapitule les appréhensions justifiant un encadrement. Pour d'autres, dont le chef de file est George Church^{74,75}, il faut avant tout aller de l'avant, ne pas freiner le progrès, ne pas boudier son plaisir heuristique et ses pulsions entrepreneuriales⁷⁶. Dans ce que j'intitule « *Le rêve de George* », on promet ainsi d'utiliser CRISPR pour éditer les embryons humains en leur conférant une dizaine d'allèles protecteurs de pathologies courantes [74]. Entre ces deux points de vue contrastés, ici illustrés par une représentation de *Janus bifrons*, il devrait y avoir place pour une **édition génomique bien tempérée**⁷⁷. Mais plusieurs facteurs s'y opposent : loi du marché, où pèsera la pression combinée des éditeurs cotés en Bourse et des commanditaires demandeurs légitimes (les Associations de malades) ou moins légitimes (parents en quête de bébé parfait ou sur commande) ; incapacité des nations à adopter une charte universelle ; impuissance des Comités d'éthique pour lesquels il est plus facile d'interdire les pratiques irréalisables, mais qui ensuite finissent tôt ou tard par céder. De toute façon, comme le fait justement remarquer Jennifer Doudna⁷⁸, il est impossible d'empêcher une manipulation dès lors que son faible coût et sa simplicité la mettent à la portée de n'importe qui. D'où le fantasme frankensteinien d'éditeurs clandestins à but inventif, lucratif,

récréatif⁷⁹, voire criminel. En attendant, il ne serait pas étonnant que des aventuriers de la science sans conscience franchissent le pas, quelque part dans le *global village*, en effectuant la réimplantation d'un embryon humain édité... « juste pour voir ». Ce serait le dernier degré de la réification de l'individu puisque les exemplaires défectueux seraient voués au pilon comme il est d'usage chez les éditeurs.

• Moralité en forme de sujet pour le bac philo

Commentez les citations suivantes et expliquez en quoi elles se rapportent au débat actuel portant sur CRISPR.

1. En 1838, François Arago, astronome, physicien et homme politique français, fait part de ses craintes sur la naissance du chemin de fer.

« Les malheureux voyageurs sont transportés brusquement de la température extérieure dans l'atmosphère glaciale des tunnels... J'affirme sans hésiter que dans ce passage subit les personnes sujettes à la transpiration seront incommodées, qu'elles

gagneront des fluxions de poitrine, des pleurésies... Il est possible qu'une machine locomotive éclate... ; là, vous auriez à craindre les coups directs et les coups réfléchis ; là, vous auriez à craindre que la voûte ne s'éboulat sur vos têtes ! ».

Rapport d'Arago présenté au nom de la commission des chemins de fer lors de la première discussion générale à la Chambre, 1838.

2. « *There may come a time when, ethically, we can't not do this.* » (un jour viendra peut-être où on ne pourra pas ne pas le faire), propos tenus lors du premier colloque sur les incidences éthiques de CRISPR organisé par J. Doudna en 2015 à Napa Valley [73].

**The Emeritus Dinosaur's viewpoint
Elation and crispations about CRISPR: when truth is stranger than science-fiction**

LIENS D'INTÉRÊT

L'auteur regrette de n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

• Quelques sites web dédiés à CRISPR-Cas9 où l'on trouvera d'excellentes revues générales

Nature genome editing outlook : <http://www.nature.com/nature/outlook/genome-editing/>

Nature special : <http://www.nature.com/news/crispr-1.17547#/Special-sponsored-supplement>

Science : <http://www.sciencemag.org/tags/crispr>

Cell : <http://onlinedigeditions.com/publication/frame.php?i=223322&p=&pn=&ver=flex>

The Scientist : <http://www.the-scientist.com/articles.list/categoryNo/2625/category/The-Scientist/tagNo/6252/tag/CRISPR-Cas/>

NOTES

1. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012 ; 337 : 816-21.

2. Voir le vivant historique de J. Kahn : The CRISPR quandary. *New York Times* 15 novembre 2015. http://www.nytimes.com/2015/11/15/magazine/the-crispr-quandary.html?_r=0.

3. Charpentier E. CRISPR-Cas9 : how research on a bacterial RNA-guided mechanism opened new perspectives in biotechnology and biomedicine. *EMBO Mol Med* 2015 ; 7 : 363-5.

4. Marraffini LA. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. *Nature* 2015 ; 526 : 55-61.

5. Jouannet P. Rapport à l'Académie de Médecine. Modifications du génome des cellules germinales et de l'embryon humains (avril 2016).

<http://www.academie-medicine.fr/articles-du-bulletin/publication/?idpublication=100523>

6. Dictionnaire Historique de la Langue Française. Paris : Éditions Dictionnaires Le Robert, 1992.

7. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang, F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 2013 ; 339 : 819-23.

8. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 2013 ; 339 : 823-6.

9. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 2014 ; 157 : 1262-78.

10. Dans ces systèmes, la spécificité est fondée sur des interactions directes de type protéine-ADN beaucoup plus difficiles à maîtriser.

11. Whitelaw CB, et al. Engineering large animal models of human disease. *J Pathol* 2016 ; 238 : 247-56.

12. Nakamura K, Fujii W, Tsuboi M, Tanihata J, Teramoto N, Takeuchi S, Naito K, Yamanouchi K, Nishihara M. Generation of muscular dystrophy model rats with a CRISPR/Cas system. *Sci Rep* 2014 ; 4 : 5635.

13. Chen Y, Zheng Y, Kang Y, Yang W, Niu Y, Guo X, Tu Z, Si C, Wang H, Xing R, et al. Functional disruption of the dystrophin gene in rhesus monkey using CRISPR/Cas9. *Hum Mol Genet* 2015 ; 24 : 3764-74.

14. Kaplan JC. L'enfer du génothérapeute est pavé de POC. *Med Sci (Paris)* 2015 ; 31 (suppl 3 - Les Cahiers de Myologie) : 41-4.

15. Cox DB, et al. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nat Med* 2015 ; 21 : 121-31.

16. Prakash V, et al. Current progress in therapeutic gene editing for monogenic diseases. *Mol Ther* 2016 ; 24 : 465-74.

17. Savic N, et al. Genome-editing technologies for gene and cell therapy. *Mol Ther* 2016 ; 24 : 430-46.

18. White MK, Khalili K. CRISPR/Cas9 and cancer targets: future possibilities and present challenges. *Oncotarget* 2016 ; 7 : 12305-17.

19. Hu W, et al. RNA-directed gene editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014 ; 111 : 11461-6.

20. Ramanan V, et al. CRISPR/Cas9 cleavage of viral DNA efficiently suppresses hepatitis B virus. *Sci Rep* 2015 ; 5 : 10833.

21. Kennedy EM, et al. Inactivation of the human papillomavirus E6 or E7 gene in cervical carcinoma cells by using a bacterial CRISPR/Cas9 RNA-guided endonuclease. *J Virol* 2014 ; 88 : 11965-72.

22. Gantz VM, et al. Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015 ; 112 : E6736-43.

23. Maddalo D, et al. In vivo engineering of oncogenic chromosomal rearrangements with the CRISPR/Cas9 system. *Nature* 2014 ; 516 : 423-7.

24. Gantz VM, Bier E. Genome editing. The mutagenic chain reaction: a method for converting heterozygous to homozygous mutations. *Science* 2015 ; 348 : 442-4.
25. Gene drive : échappement génétique avec propagation non mendélienne rapide d'un variant génique dans une population entière, pouvant aboutir à son extinction en deux générations si le variant porte une mutation délétère.
26. Yin H, *et al.* Therapeutic genome editing by combined viral and non-viral delivery of CRISPR system components in vivo. *Nat Biotechnol* 2016 ; 34 : 328-33.
27. Xu L, *et al.* CRISPR-mediated genome editing restores dystrophin expression and function in mdx Mice. *Mol Ther* 2016 ; 24 : 564-9.
28. Long C, *et al.* Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy. *Science* 2016 ; 351 : 400-3.
29. Nelson CE, *et al.* In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science* 2016 ; 351 : 403-7.
30. Tabebordbar M, *et al.* In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. *Science* 2016 ; 351 : 407-11.
31. Kemaladewi DU, Cohn RD. Exon snipping in Duchenne muscular dystrophy. *Trends Mol Med* 2016 ; 22 : 187-9.
32. Kaplan JC. DMD et saut d'exon thérapeutique : tout ce qu'il faut savoir en deux leçons. *Cahiers de Myologie* 2011 (octobre) ; 46-47.
33. Ce qui règle le problème de l'immunisation contre les protéines du vecteur viral, inévitable après injections itératives.
34. Voir la remarquable synthèse de M. Specter : The gene hackers *The New Yorker*. *Annals of Science* 16 novembre 2015, consultable sur http://www.moseslab.csb.utoronto.ca/alan/Specter_New_Yorker_2015.pdf
35. Begley S (2016). Controversial CRISPR history sets off an online firestorm. <https://www.statnews.com/2016/01/19/crispr-history-firestorm/>
36. Dessibourg O. Guerre des brevets pour la « chirurgie du gène ». *Le Temps* 22/02/16. <http://www.letemps.ch/sciences/2016/02/22/guerre-brevets-chirurgie-gene>
37. Lander ES. The heroes of CRISPR. *Cell* 2016 ; 164 : 18-28.
38. Hall J. The embarrassing, destructive fight over biotech's big breakthrough. *Scientific American* 2016 (4 février).
39. Begley S. 2016. Controversial CRISPR history sets off an online firestorm. Site internet statnews. <https://www.statnews.com/2016/01/19/crispr-history-firestorm/>
40. Oye KA, *et al.* Regulating gene drives. *Science* 2014 ; 345 : 626-8.
41. Esvelt KM (2016). Strategies for responsible gene editing. <https://www.project-syndicate.org/commentary/crispr-gene-drive-editing-rules-by-kevin-m-esvelt-2016-01>
42. Wu Y, *et al.* Correction of a genetic disease by CRISPR-Cas9-mediated gene editing in mouse spermatogonial stem cells. *Cell Res* 2015 ; 25 : 67-79.
43. Maury Y, *et al.* Les cellules souches pluripotentes humaines : un outil-clé pour décrypter les mécanismes physiopathologiques. *Med Sci (Paris)* 2011 ; 27 : 443-6.
44. Li HL, *et al.* Precise correction of the dystrophin gene in duchenne muscular dystrophy patient induced pluripotent stem cells by TALEN and CRISPR-Cas9. *Stem Cell Rep* 2015 ; 4 : 143-54.
45. Xue H, *et al.* Genetic modification in human pluripotent stem cells by homologous recombination and CRISPR/Cas9 system. *Meth Mol Biol* 2016 ; 1307 : 173-90.
46. Liang P, *et al.* CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human triploid zygotes. *Protein Cell* 2015 ; 6 : 363-72.
47. Cyranoski D, Reardon S. Embryo editing sparks epic debate. *Nature* 2015 ; 520 : 593-4.
48. Berg P. Meetings that changed the world. Asilomar 1975: DNA modification secured. *Nature* 2008 ; 455 : 290-1.
49. Lanphier E, *et al.* Don't edit the human germ line. *Nature* 2015 ; 519 : 410-1.
50. Ledford H. CRISPR, the disruptor. *Nature* 2015 ; 522 : 20-4.
51. Doudna J. Embryo editing needs scrutiny. *Nature* 2015 ; 528 : S6.
52. Baltimore D, *et al.* A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. *Science* 2015 ; 348 : 36-8.
53. Caplan AL, *et al.* No time to waste: the ethical challenges created by CRISPR. *EMBO Rep* 2015 ; 16 : 1421-6.
54. Travis J. Genetic engineering. Germline editing dominates DNA summit. *Science* 2015 ; 350 : 1299-300.
55. The National Academies of Sciences. Engineering medicine on human gene editing: international summit statement. <http://www8.nationalacademies.org/onpinews/newsitem.aspx?RecordID=12032015a>
56. Jordan B. Sommet de Washington : feu orange pour la thérapie germinale ? *Med Sci (Paris)* 2016 ; 32 : 217-20.
57. <https://www.ipsell.com/2016/04/meeting-summary-of-paris-human-gene-editing-workshop/>
58. Kang X, *et al.* 2016. Introducing precise genetic modifications into human 3PN embryos by CRISPR/Cas-mediated genome editing. *J Assist Reprod Genet.* 10.1007/s10815-016-0710-8
59. Callaway E. Second Chinese team reports gene editing in human embryos. *Nat News* 2016 ; 532 : 289-90.
60. <http://www.linternaute.com/expression/langue-francaise/19373/voir-les-rares-exceptions-de-type-SCID-decrites-dans-111/>
61. Orkin SH, Motulsky AG. Report and recommendations of the panel to assess the NIH investment in research on gene therapy. <http://www.nih.gov/news/panelrep.html>. 7 décembre 1995.
62. Sauf les rares exceptions de type SCID décrites dans [11].
63. Hawkes N. Cautious welcome for gene editing of Duchenne muscular dystrophy in animal model. *BMJ* 2016 ; 351 : h7033.
64. Cet obstacle pourrait être levé par des astuces permettant l'inactivation du bistouri après usage.
65. Peng R, *et al.* Potential pitfalls of CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *FEBS J* 2016 ; 283 : 1218-31.
66. Kaiser J. The gene editor CRISPR won't fully fix sick people anytime soon. Here's why. *Science* 2016. Doi : 10.1126/science.aaf568. <http://www.sciencemag.org/news/2016/05/gene-editor-crispr-won-t-fully-fix-sick-people-anytime-soon-here-s-why>
67. Himeda CL, *et al.* 2016. CRISPR/dCas9-mediated transcriptional inhibition ameliorates the epigenetic dysregulation at D424 and represses DUX4-fl in FSH muscular dystrophy. *Mol Ther* 24 : 527-535.
68. Kaplan JC. Le génome low cost : entre Cassandre et Prométhée. *Clin d'œil*. *Cahiers de Myologie* 2010 ; n° 10 : 43-5.
69. La formule est de Hervé Chneiweiss, Président du Comité d'Éthique de l'Inserm.
70. https://fr.wikipedia.org/wiki/Le_Hasard_et_la_N%C3%A9cessit%C3%A9
71. https://fr.wikipedia.org/wiki/Livre_de_la_Gen%C3%A8se
72. Regalado A. Patients favor changing the genes of the next generation with CRISPR. *MIT Technology Review* 2015 ; december 2, 2015. (<http://www.technologyreview.com/biomedicine/>).
73. Jennifer Doudna a relaté ses angoisses d'apprentie-sorcière dans Doudna J. Genome-editing revolution: my whirlwind year with CRISPR. *Nature* 2015 ; 528 : 469-71.
74. Church G (2015). A conversation with George Church on genomics and germline human genetic modification. <https://www.ipsell.com/2015/03/georgechurchinterview/>
75. Church G. Encourage the innovators. *Nature* 2015 ; 528 : S7.
76. George Church est non seulement un savant incontestable mais aussi un businessman avisé dans le domaine de la génomique, voire de la génomancie.
77. Voir l'analyse très pertinente donnée par le spécialiste de bioéthique Hank Greely dans son compte rendu de la première réunion organisée sur le sujet en janvier 2015. Greely HT. Of science, CRISPR-Cas9, and Asilomar. April 4, 2015. <https://law.stanford.edu/2015/04/04/of-science-crispr-cas9-and-asilomar/#comments>
78. Doudna J. Embryo editing needs scrutiny. *Nature* 2015 ; 528 : S6.
79. Allusion aux micro-cochons fabriqués en Chine comme animaux d'agrément. Cyranoski D. Gene-edited "micropigs" to be sold as pets at Chinese institute. *Nature* 2015 ; 526 : 18.

Symposium AFM-Téléthon/FILNEMUS

Quels nouveaux outils pour réduire l'errance diagnostique en France ?

Paloma Moreno-Elgard, Carole André

Le 15 mars dernier, lors du congrès Myology 2016 à Lyon, s'est tenu le symposium intitulé « Quels nouveaux outils pour réduire l'errance diagnostique en France ? ». Cent-vingt personnes impliquées dans le domaine du diagnostic y ont participé. Ce symposium, co-organisé par l'AFM-Téléthon et la filière de santé FILNEMUS, avait pour modérateurs Christian Cottet (AFM-Téléthon), le Pr Nicolas Levy (CHU de Marseille) et le Pr Jean Pouget (coordinateur de FILNEMUS).

Ce symposium avait pour objectif de rassembler des cliniciens, des chercheurs et des responsables de laboratoires de génétique afin d'échanger sur les

nouveaux outils permettant de réduire l'errance diagnostique. La thématique principale portait sur la génétique moléculaire et les progrès du séquençage.



Paloma Moreno-Elgard
 Direction des Affaires Publiques, AFM-Téléthon, Evry, France
Carole André
 Direction Scientifique, AFM-Téléthon Evry, France
Contact
 pmoreno-elgard@afm-telethon.fr
 candre@afm-telethon.fr

À cette occasion, le Pr Judith Melki (Inserm, Université Paris Sud) et le Dr Jocelyn Laporte (IGBMC) ont présenté leurs travaux de recherche. Ils ont exposé les avantages et les limites des nouvelles techniques de séquençage (NGS, pour *Next Generation Sequencing*) ainsi que des exemples de patients pour lesquels ces techniques ont permis d'aboutir à un diagnostic.

La voix des patients y a également été entendue avec la présentation par Christophe Duguet (AFM-Téléthon) des premiers résultats de l'enquête portée par l'AFM-Téléthon à destination des malades atteints de maladies neuromusculaires sans diagnostic précis. Parmi les enseignements de cette enquête, on peut noter que les malades (288 participants) sont en errance en moyenne depuis plus de

16 ans (25 % sont en errance depuis plus de 20 ans, 50 % sont en errance depuis plus de 10 ans). Ces malades voient leurs projets personnels et familiaux ainsi que leurs projets d'études et d'avenir professionnel fortement perturbés. Il est donc urgent de mettre fin à cette errance.

Ces malades en errance de diagnostic nécessitent-ils un suivi médical particulier ? Le Pr Jean-Christophe Antoine (CHU de Saint-Étienne) a répondu à cette question en présentant les spécificités cliniques de ce suivi.

Parmi les points forts de ce symposium, on peut également noter la présentation faite par le Dr Mireille Cossée (CHU de Montpellier) sur l'organisation des laboratoires de diagnostic, soulignant l'avancée des travaux actuellement menés par la filière FILNEMUS. En effet, la nécessité d'une réorganisation suite à l'évolution des techniques de séquençage à haut débit est aujourd'hui admise par tous les professionnels du domaine et a conduit à de nombreux travaux de restructuration actuellement en cours dans les différentes commissions de la filière. Ces travaux devraient mener, entre autre, à de nouveaux arbres décisionnels pour le NGS ainsi qu'à une nouvelle organisation nationale des laboratoires de diagnostics génétiques. Par ailleurs, comme l'a présenté le Pr Michel Vidaud (Hôpital Cochin), l'intégration du NGS dans la nouvelle nomenclature des actes innovants devrait sécuriser le financement de cette technique.

Enfin, ce symposium a été l'occasion d'évoquer les perspectives et l'avenir du séquençage très haut débit (THD), sujet d'actualité puisque les conclusions d'un rapport ministériel sur une plate-forme THD en France étaient attendues dans les semaines suivant le symposium.

En attendant ces conclusions, le Pr Thierry Frebourg (Inserm, CHU de Rouen) a présenté sa vision quant à l'apport de ces nouvelles techniques et a confirmé qu'il restait encore de nombreux défis à relever. Parmi ces défis, l'interprétation des variants génétiques rares sera un obstacle à franchir pour tous les spécialistes, tout comme le stockage des données génétiques. Par ailleurs, la démonstration de l'intérêt médico-économique de ces techniques sera indispensable pour que tous les patients puissent en bénéficier.

En définitive, l'indispensable amélioration du diagnostic pour que celui-ci soit fiable et précis pour tous implique la poursuite des efforts et des travaux engagés et traduit, entre autre, la nécessité d'un 3^e Plan National Maladies Rares.

Symposium AFM-Téléthon/Filnemus
Which new tools to reduce the time lapse for obtaining an accurate diagnosis in France?

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.



Test de la marche (© AFM-Téléthon/Christophe Hargoues)

I-Motion : une plate-forme de pointe pour les essais pédiatriques

L'Institut I-Motion (*Institute of Muscle-Oriented Translational Innovation*) a ouvert ses portes à l'Hôpital Trousseau dès juin 2015 et a été inauguré en février 2016. Cette plate-forme créée par l'AFM-Téléthon, l'Assistance publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), l'Institut de Myologie et l'Université Pierre et Marie Curie (UPMC) est dédiée aux essais cliniques pédiatriques dans les maladies neuromusculaires.

I-Motion a pour objectif de répondre aux nouveaux besoins créés par l'émergence des essais pour enfants dans le domaine de la myologie, dans un environnement adapté au sein d'un centre hospitalier pédiatrique. Actuellement, 22 essais cliniques sont en cours ou en préparation à l'Institut I-Motion, concernant une dizaine de maladies neuromusculaires telles que la dystrophie musculaire de Duchenne, l'amyotrophie spinale, la myopathie myotubulaire...

AFM-Téléthon Congrès *Myology* 2016 : cinq jours d'une rare intensité

Tuy Nga Brignol, Gaëlle Barrier, J. Andoni Urtizberea

La 5^e édition du congrès international de Myologie organisée par l'AFM-Téléthon s'est déroulée au Palais des congrès de Lyon, du 14 au 18 mars derniers, en présence des plus grands experts mondiaux de la discipline. Un rassemblement marqué par des avancées thérapeutiques pour les maladies neuromusculaires, la présentation des résultats d'essais cliniques et les premiers enseignements tirés de ces essais.



Cinq ans après le dernier congrès dédié à la myologie ayant eu lieu à Lille en 2011, la nouvelle édition du congrès *Myology* à Lyon a rassemblé 982 participants (experts, chercheurs, patients, industriels). Quelques chiffres clés : 420 posters, 10 séances plénières, 14 symposia, 6 conférences satellites, 1 séance plénière du conseil scientifique de l'AFM-Téléthon.

La 1^{re} journée a été marquée par la conférence inaugurale de Kenneth Fischbeck (Bethesda, USA), l'un des signataires en 1986 de la publication annonçant la découverte du gène *DMD* responsable de la myopathie de Duchenne (NB : la dystrophine, c'est l'année d'après).

Lors de la 2^e journée, les sessions plénières ont été consacrées à la biologie du muscle et à la jonction neuromusculaire. Christophe Marcelle (Lyon), précédemment responsable d'une équipe de recherche à l'*Australian Regenerative Medicine Institute* de l'Université Monash (Melbourne) a ouvert la journée. Le projet qu'il mène depuis 2009 sur la formation,

le développement et la réparation du muscle se poursuit aujourd'hui au sein du tout nouvel Institut NeuroMyoGène à Lyon, en étroite interaction avec l'Alliance MyoNeurALP sur les maladies neuromusculaires en Auvergne-Rhône-Alpes.

La 3^e journée a débuté par une session plénière consacrée au développement des thérapies innovantes. Matthew Wood (Université d'Oxford, UK) a présenté ses travaux sur la restauration de l'expression de la dystrophine chez la souris *mdx* grâce à des peptides de nouvelle génération améliorant le saut d'exon, et permettant de cibler plus efficacement un grand nombre de tissus de l'organisme, notamment le cœur et le système nerveux central. Aurélie Goyenville (Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines) a développé une approche de pharmacogénomique utilisant un nouveau type d'oligonucléotide antisens qui a été testé avec succès chez la souris. Caroline Le Guiner (Atlantic Gene Therapies, Nantes) a présenté les résultats de ses travaux de thérapie génique utilisant un vecteur AAV sur le chien *GRMD*. Dans la session plénière de l'après-midi, les intervenants ont présenté plusieurs traitements pharmacologiques potentiels pour diverses maladies neuromusculaires : tamoxifène dans la myopathie de Duchenne (Olivier Dorchies, Suisse), tréhalose dans la dystrophie musculaire oculo-pharyngée (Zohar Argov, Israël), ManNAc dans la myopathie GNE (Ichizo Nishino, Japon) et N-Acétylcystéine dans la myopathie liée à la sélénoprotéine N (Ana Ferreira, Université Paris Diderot). La 4^e journée du congrès s'est ouverte sur une session plénière dédiée aux différentes avancées en Myologie. Lee Sweeney (Floride, USA), co-président du congrès, a fait le panorama des essais cliniques utilisant des oligonucléotides dans la dystrophie musculaire de Duchenne. Il a souligné la

Tuy Nga Brignol,
Gaëlle Barrier
 AFM-Téléthon, Évry,
 France
J. Andoni Urtizberea
 APHP, Hôpital Marin,
 Hendaye, Centre
 de Référence GNMH
 Chargé de Mission,
 FILNEMUS, Marseille,
 France

Contact
 tbrignol@afm-telethon.fr
 gbarrier@afm-telethon.fr
 andoni.urtizberea@aphp.fr

nécessité d'améliorer l'homogénéité des patients inclus, ainsi que le choix des critères d'évaluation de l'efficacité des essais (test de marche de 6 minutes 6MWT par exemple). Helge Amthor (Université de Versailles Saint-Quentin-en Yvelines) a présenté le rôle de la myostatine, des protéines BMP et des facteurs de croissance TGF- β sur la plasticité musculaire. Ana Buj-Bello (Généthon, Évry) a rapporté ses travaux de thérapie génique dans la myopathie myotubulaire liée à l'X qui ont permis une récupération rapide et à long terme (le recul est désormais de 3 ans) après une seule injection chez le chien modèle.

Dans l'après-midi, un moment fort a ponctué le congrès lors de la présentation des résultats d'essais cliniques menés chez des bébés atteints de SMA de type 1 par Richard Finkel (Philadelphie, USA) et Jerry Mendell (Colombus, USA). Des vidéos de bébés relevant leur tête et se tenant assis ou debout ont particulièrement ému l'assemblée. Deux stratégies thérapeutiques sont actuellement testées : un produit oligonucléotide antisens d'Ionis Pharmaceuticals (Californie, USA) et un produit de thérapie génique d'AveXis (Illinois, USA).

Le 5^e et dernier jour a été consacré aux projets de thérapies génique et cellulaire du muscle cardiaque, qu'il s'agisse de cardiomyopathies ou d'insuffisance cardiaque post-infarctus. Philippe Menasché (HEGP, Paris) qui mène le 1^{er} essai français utilisant des cellules souches embryonnaires chez des patients atteints d'infarctus (4 patients traités à ce jour) a souligné l'importance des facteurs trophiques apportés par les cellules greffées. Lucie Carrier (Hambourg, Allemagne) a présenté ses travaux chez la souris pour une thérapie génique d'une forme de cardiomyopathie hypertrophique liée aux mutations du gène *MYBPC3*. De son côté, Hélène Puccio (Illkirch, France) a rapporté de bons résultats de la thérapie génique chez la souris pour la cardiomyopathie de l'ataxie de Friedreich. Le vecteur utilisé (AAV10-FXN) est en cours de développement par la société Anapurna pour un essai chez l'Homme.



Visite des posters (© AFM-Téléthon/Jean-Jacques Bernard)

Cette 5^e édition du congrès a également permis aux jeunes chercheurs financés par l'AFM-Téléthon de présenter leurs travaux devant la communauté scientifique internationale. Deux d'entre eux ont reçu un prix pour leur présentation orale : Muriel Sébastien (Institut des neurosciences, Grenoble) et Pierre Klein (Institut de Myologie, Paris).

Enfin, à noter dans vos agendas, **rendez-vous en 2019 pour la 6^e édition du congrès Myology !**

International Congress of Myology: five days of unusual excitement



Une séance plénière (© AFM-Téléthon/Jean-Jacques Bernard)

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

La myostatine

Une cible thérapeutique potentielle pour les myopathies centronucléaires

David Arnould, Anne-Cécile Durieux

L'unique modèle murin reproduisant la myopathie centronucléaire autosomique dominante associé à une mutation du gène *dynamine-2* (*KI-dnm2*^{R465W/+}) reproduit la plupart des signes cliniques observés chez l'Homme, notamment une atrophie et une perte de force musculaire. La myostatine (MSTN) est un régulateur négatif majeur du muscle strié squelettique. Nous faisons l'hypothèse que l'inactivation de la *mstn* pourrait limiter la perte de masse et de force musculaire chez la souris KI. Afin de valider cette hypothèse, nous avons généré une souris doublement mutée (KIKO) par croisement entre souris KI et souris inactivée pour la *mstn* (KO-*mstn*). Les animaux sont suivis durant 12 mois. La force musculaire et la motricité ont significativement été altérées chez la souris KI à 1 mois. Une perte significative de masse et du volume musculaire (microIRM) a été observée à partir de 2 mois. Entre 2 et 12 mois, tous ces paramètres restent en dessous des valeurs contrôles. En comparaison de la souris KI, la souris KIKO présente une augmentation de la force musculaire ainsi qu'une capacité motrice moins affectée. De plus, la masse et le volume musculaire ont été augmentés dès l'âge de 1 mois. Les analyses moléculaires montrent que l'inactivation de la *mstn* entraîne une augmentation du niveau d'expression de différentes protéines impliquées dans la voie IGF1/Akt/mTOR, mais aussi une diminution du niveau d'expression de différents acteurs de la voie de dégradation ubiquitine-protéasome. L'inactivation de la *mstn* montre une amélioration de la masse et de la fonction musculaire chez la souris KI. À l'avenir, nous souhaitons intervenir après la mise en place de la pathologie, par injection d'une drogue anti-*mstn* permettant de piéger la molécule.
Mots clés : myopathie centronucléaire ; dynamine ; myostatine ; modèles animaux.

La myopathie centronucléaire autosomique dominante (MCN-AD) est une maladie musculaire congénitale rare liée à des mutations majoritairement retrouvées dans le gène *dynamine 2* (*DNM2*) [1]. Les caractéristiques cliniques reportées sont notamment une atrophie et une faiblesse musculaire progressives. La MCN-AD est peu sévère, lentement progressive et représente 50 % des MCN. Les patients atteints de MCN-AD développent une faiblesse musculaire localisée préférentiellement au niveau des muscles du visage, des muscles proximaux, et le plus souvent associée à un ptosis ou une ophtalmoplégie [2]. L'ensemble des caractéristiques cliniques observées conduit à terme à une détérioration de la qualité de vie des patients. Bien qu'aucune thérapie curative ne soit actuellement disponible, de nombreux efforts sont réalisés afin de proposer une prise en charge du déficit musculaire associé. La taille du muscle dépend d'un équilibre dynamique entre la dégradation et la synthèse de ses protéines

constituantes [3]. Les voies autophagie-lysosome et ubiquitine-protéasome (UP) sont les voies principales de dégradation des protéines musculaires. La voie de signalisation IGF1/Akt/mTOR représente la voie principale de stimulation de la synthèse des protéines dans le muscle. Toute action sur cette balance dynamique peut conduire à l'hypertrophie et inversement à l'atrophie du tissu musculaire. La connaissance des mécanismes cellulaires et moléculaires de régulation de la masse musculaire en conditions normales, ainsi que la nature de leur dysfonctionnement dans la physiopathologie de la MCN-AD, permettrait d'imaginer des interventions sur ces voies de contrôle de la masse musculaire, en conditions pathologiques. C'est le cas par exemple, pour la maladie de Pompe, caractérisée par une surcharge lysosomale due au déficit d'une enzyme. Le traitement enzymatique substitutif de la société Genzyme *Myozyme*[®] *alpha* *glucosidase* agit directement sur la voie de dégradation autophagie-lysosome en

David Arnould
Docteurant
Anne-Cécile Durieux
Chercheur au Laboratoire
Interuniversitaire
de Biologie de la Motricité
(LBM), pôle santé
innovations, Faculté
de Médecine
de Saint-Étienne, France

INFOS

permettant la dégradation des surcharges lysosomales inhérentes à la pathologie.

La myostatine (*mstn*) est un facteur de croissance spécifique du muscle strié squelettique qui lorsque son expression/signalisation est bloquée conduit à l'acquisition d'un phénotype hypermusclé [4].

Dans le modèle murin *mdx*, modèle pour la myopathie de Duchenne, il a été reporté une augmentation de la taille des fibres, associée à une augmentation de la masse et de la force musculaire lorsque le gène de la *mstn* était inactivé [5]. Une telle stratégie *mstn* interférente a également été utilisée sur un modèle de myopathie myotubulaire (MCN liée à une mutation de *MTM1*) [6]. Dans ce cas, il a été montré une amélioration du phénotype musculaire mais seulement de façon transitoire. En effet, cela ne permettait pas l'allongement de la durée de vie qui dans ce modèle animal sévère est de l'ordre de 8 à 9 semaines. Récemment, une invalidation de la *mstn* chez des souris développant une cachexie liée au cancer du côlon a prolongé leur durée de vie de façon spectaculaire (doublement de la durée de survie) associée à une diminution de l'évolution du nombre de polypes intestinaux [7]. L'inactivation de la *mstn* pourrait être un outil thérapeutique envisageable dans des pathologies musculaires de faible sévérité reportée chez l'animal modèle. Le but du projet primé par le prix Master 2014 de la Société Française de Myologie consiste à évaluer la faisabilité et l'efficacité d'une stratégie *mstn* interférente dans le seul modèle murin actuellement disponible pour la MCN-AD. Ce modèle porte la mutation la plus fréquemment retrouvée dans les cas de MCN-AD, localisée dans le gène de la *dynamine 2* (*dnm2*). Le modèle Knock-In KI-*Dnm-2*^{R465W/+} (KI) est une souris porteuse à l'état hétérozygote d'une mutation faux sens donnant lieu au remplacement d'un acide aminé arginine R en position 465 par un acide aminé tryptophane W. Les souris KI expriment à la fois une version normale et mutée du gène *dnm2*. Bien que le modèle soit déjà décrit [8, 9], les conséquences fonctionnelles de la mutation sur la fonction de la protéine restent mal connues.

Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle l'inactivation du gène de la *mstn* pourrait être bénéfique à la souris KI, en limitant/stopant la perte de masse et de force musculaire. Pour répondre à cette question, les souris KI ont été croisées avec des souris KO-*mstn* (KO), porteuses à l'état homozygote d'une mutation aboutissant à l'excision de l'exon 3 du gène de la *mstn*, conduisant à la synthèse d'une protéine tronquée non fonctionnelle entraînant un phénotype hypermusclé (modèle KIKO).

Nous avons étudié l'évolution du poids et le volume des différents muscles postérieurs durant 12 mois.

Parmi ces différents muscles, le *Tibial antérieur* présente chez la souris KI, une atrophie lentement progressive correspondant à l'évolution connue de la maladie chez l'homme. En effet, à 1 mois nous n'observons pas de diminution du poids et du volume musculaire chez la souris KI. Nous observons cependant une diminution de ces deux paramètres dès l'âge de 2 mois et toujours présente à 8 et 12 mois. L'ensemble des analyses biochimiques et histologiques sera réalisé sur ce muscle.

Les premiers résultats des effets de l'inactivation de la *mstn* sont encourageants puisqu'ils démontrent un bénéfice certain dans ce contexte pathologique avec une augmentation du poids du muscle *Tibial antérieur*. L'étude microIRM réalisée au CERMEP de Lyon met également en évidence une augmentation du volume du muscle *Tibial antérieur*. De façon concomitante, les animaux présentent une amélioration de la force musculaire et de leur capacité locomotrice.

Au niveau moléculaire, l'analyse des voies de régulation de la masse musculaire montre que l'inactivation de *mstn* permet de diminuer le niveau d'expression de certains acteurs impliqués dans la voie de dégradation ubiquitine-protéasome et d'augmenter celui d'acteurs impliqués dans la voie stimulant la synthèse des protéines, la voie IGF1/Akt/mTOR. Ces résultats nécessitent d'être approfondis afin d'affiner nos conclusions sur les mécanismes moléculaires impliqués, mais aussi de s'assurer de l'absence d'effet délétère d'une telle stratégie.

Une étude histologique (coupe transversale du muscle *Tibial antérieur*) est en cours pour compléter l'ensemble des résultats de mes 1^{re} et 2^e années de thèse. Nous utiliserons la coloration Hématoxyline Éosine (HE), afin de visualiser l'état général du muscle. La coloration *Nicotinamide adenine dinucleotide reduced* (NADH) - tétrazolium réductase (TR), reflet du nombre de mitochondries, permet également la mise en évidence du réticulum sarcoplasmique. Elle nous permettra par ailleurs de mettre en évidence des anomalies de structures, observées à partir de deux mois chez la souris et proche de ce qui est également caractéristique de la MCN-AD chez l'homme. De plus, la coloration NADH, nous informera sur le typage des fibres musculaires. Des colorations immunohistochimiques permettant de mettre en évidence des protéines impliquées dans les voies de signalisation précédemment étudiées en *qPCR* et *Western blot*, seront également réalisées.

Compte tenu des résultats encourageants que nous avons obtenus, nous allons évaluer l'efficacité d'un traitement chez l'animal visant à piéger la *mstn* circulante. Ceci est un préambule indispensable afin d'envisager à plus long terme la transposition d'une telle application en situation clinique.

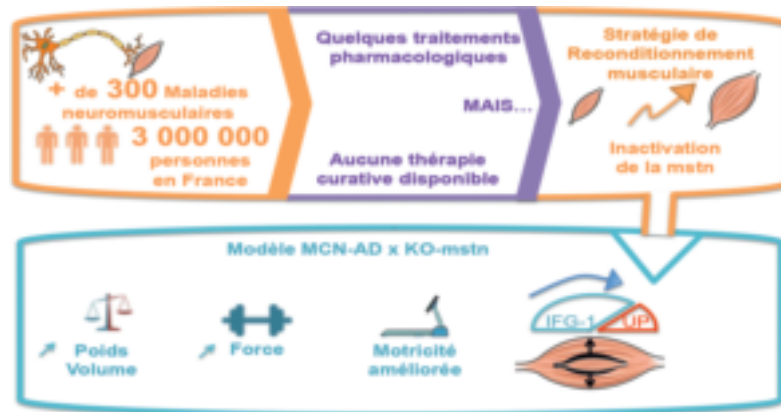


Figure 1

MNM et bénéfice d'une stratégie mstn interférente. Avec environ 3 millions de personnes atteintes de MNM en France et aucune thérapie curative disponible, il y a nécessité de développer des stratégies de reconditionnement musculaire. L'inactivation de la mstn est une piste thérapeutique intéressante. Dans le cas de la MCN-AD, nous avons démontré le bénéfice évident sur la physiologie musculaire d'une telle stratégie : augmentation du poids et du volume musculaires associée à une amélioration de la force musculaire et la capacité locomotrice. Au niveau moléculaire, l'inactivation de la mstn permet une stimulation de la voie de signalisation enclenchée par l'IGF-1, et une atténuation de la voie de dégradation ubiquitine-protéasome (UP). Ces deux événements contribuent à l'amélioration du phénotype musculaire lié à la maladie.

Abstract

Master Award 2014

Myostatin: a potential therapeutic target in centronuclear myopathies

The unique mouse model for autosomal dominant centronuclear myopathy ($KI-dnm2^{R465W/+}$), associated to mutation of the dynamin-2 gene ($dnm2$) reproduces some of the human clinical features, notably muscle atrophy and weakness. Myostatin (MSTN), is a master negative regulator of skeletal muscle mass. We hypothesized that inactivation of mstn could limit muscle atrophy and weakness reported in the KI mouse. To validate this, we intercrossed KI mice with mice inactivated for mstn ($KO-mstn$) to generate a double mutated lineage (KIKO mice). Animals were followed during 12 months. Muscle force, and locomotor activity were significantly altered in 1 month-old KI mice. A significant loss of muscle mass and volume (microRMI) was observed in KI mice from 2 months of age. From 2 to 12 months, all these parameters remained below of control values. When compared to KI mice, KIKO mice presented an increase of muscle grip strength and less affected motor skills. In agreement with these data, muscle mass and volume were increased at all ages. Molecular analyzes showed that inactivation of mstn allowed for an increase of several proteins involved in the IGF1/Akt/mTOR pathway, but also a down regulation of several factors involved in the ubiquitin-proteasome pathway. Overall, we demonstrated that inactivation of mstn improves muscle mass and function of KI mice. These results are very promising since genetic inactivation of mstn shows a real benefit for KI mice. The perspective to this work is to evaluate the efficiency of an anti-mstn

based pharmacological approach to restore muscle function after the establishment of the disease.

Key words: centronuclear myopathy - dynamin - myostatin - animals models

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Bitoun M, Maugenre S, Jeannet PY, et al. Mutations in dynamin 2 cause dominant centronuclear myopathy. *Nat Genet* 2005 ; 37 : 1207-9.
2. Romero NB. Centronuclear myopathies: a widening concept. *Neuromuscul Disord* 2010 ; 20 : 223-8.
3. Freyssenat D. A propos des mécanismes de contrôle de la masse musculaire. *Cahiers de Myologie* octobre 2009 ; n° 1 : 11-3.
4. McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* 1997 ; 387 : 83-90.
5. Amthor H, Hoogaars WMH. Interference with myostatin/ActRIIB signaling as a therapeutic strategy for Duchenne muscular dystrophy. *Curr Gene Ther* 2012 ; 12 : 245-59.
6. Lawlor MW, Read BP, Edelstein R, et al. Inhibition of activin receptor type IIB increases strength and lifespan in myotubularin-deficient mice. *Am J Pathol* 2011 ; 178 : 784-93.
7. Gallot YS, Durieux AC, Castells J, et al. Myostatin gene inactivation prevents skeletal muscle wasting in cancer. *Cancer Res* 2014 ; 74 : 7344-56.
8. Durieux AC, Vassilopoulos S, Lainé J, et al. A centronuclear myopathy: dynamin 2 mutation impairs autophagy in mice. *Traffic* 2012 ; 13 : 869-79.
9. Durieux AC, Vignaud A, Prudhon B, et al. A centronuclear myopathy-dynamin 2 mutation impairs skeletal muscle structure and function in mice. *Hum Mol Genet* 2010 ; 19 : 4820-36.

Abréviations

Akt : protéine kinase B ; dnm2 : dynamine 2 ; IGF-1 : insulin-like growth factor 1 ; Mstn : myostatine ; mTOR : mammalian target of rapamycin.

Signaux moléculaires et mécaniques intervenant dans la différenciation des cellules tendineuses

Ludovic Gaut, Marie-Ange Bonnin, Nicolas Robert, Mathias Mericskay, Delphine Duprez

Les tendons sont des formes uniques de tissu conjonctif du système musculo-squelettique. Ils sont formés par une matrice dense de fibres de collagène de type I qui sont orientées parallèlement à l'axe du tendon. Cette organisation spécifique leur donne la capacité de supporter les forces générées par le muscle pour les transmettre à l'os, permettant ainsi le mouvement. Le développement, l'homéostasie et la réparation du tendon reposent sur une combinaison spécifique de facteurs de transcription, de facteurs de croissance ainsi que de paramètres mécaniques régulant la production et l'assemblage des fibres de collagène [1, 2]. Les cascades moléculaires régissant la différenciation du tendon ne sont pas aussi bien décrites que celles des cellules musculaires. Toutefois, l'étude du tendon a été rendue possible grâce à la découverte de certains acteurs moléculaires tels que le facteur de transcription Scx [1-3], le plus spécifique et précoce dans le développement du tendon, ou encore le facteur de transcription mécanosensitif *Egr1* [1, 2, 4, 5]. Au cours des dernières années, de nombreuses études ont montré l'importance des forces mécaniques générées par les cellules ou les tissus au cours du développement ou des processus de différenciation cellulaire [6]. Notre objectif est de comprendre comment la cellule de tendon va intégrer les signaux mécaniques et d'identifier quelles voies de signalisation seront activées en aval de ces signaux pour déclencher la différenciation tendineuse.

La mécanobiologie du tendon a été étudiée *in vivo* au cours du développement. Une paralysie des embryons de poulet au stade E7.5 a été induite par traitement au bromure de décéméthonium (DMB), un agoniste du récepteur à l'acétylcholine bloquant la jonction neuromusculaire [7]. Le traitement au DMB va induire une paralysie musculaire et donc interrompre les mouvements rythmiques effectués par l'embryon (*Figure 1A*). Chez les embryons

paralysés, l'expression du marqueur de tendon SCX est diminuée dès 5h et à 48h de traitement (*Figure 1A*). Ce défaut a notamment été observé avant la diminution des marqueurs musculaires PAX7 et MYF5 (*Figure 1A*), indiquant que le changement observé est dû à une absence de contraction plutôt qu'à une perte d'un signal biochimique provenant du muscle adjacent.

La mécanobiologie a également été étudiée dans un système *in vitro* mimant la formation d'un tendon *in vitro*. Des cultures de cellules souches dans un système en trois dimensions (3D), consistant en un tube de gel de fibrine maintenu sous tension, miment la formation d'un tendon *in vitro* (*Figure 1B*) [8]. Des tendons *in vitro* ont ainsi été réalisés en utilisant une lignée murine de cellules souches mésenchymateuses (CSM), les C3H10T1/2. La comparaison de l'expression de différents gènes dans les CSM cultivées en 3D versus 2D met en évidence une augmentation des marqueurs de tendon *Scx*, et *Col1a1* ainsi que du facteur de transcription mécanosensitif *Egr1* (*Figure 1B*). La perte de tension de ces tendons *in vitro* (après section) conduit à la diminution de l'expression d'*Egr1* et des gènes de tendon, *Scx* et *Col1a1* (*Figure 1C*). L'expression forcée de *Egr1* dans les cellules C3H10T1/2 permet d'empêcher la diminution des marqueurs de tendons dans ces tendons *in vitro* sans tension (*Figure 1D*). Ces résultats démontrent l'importance des forces mécaniques dans le maintien de l'identité tendon des CSM. De plus, ils montrent l'implication du facteur de transcription *Egr1* en aval des forces mécaniques dans le maintien des marqueurs de tendons.

Ces résultats soulignent l'importance des signaux mécaniques pour le développement du tendon et la différenciation tendineuse à partir des cellules souches. Cependant, les liens existant entre les signaux mécaniques et moléculaires restent à être identifiés dans le contexte de la différenciation du tendon.

Ludovic Gaut
CNRS UMR 7622,
IBPS-Laboratoire
de Biologie
du Développement,
F-75005, Paris, France
Inserm U1156, F-75005
Paris, France
Sorbonne Universités,
UPMC Univ Paris 06,
IBPS, F-75005 Paris,
France
CNRS UMR 8256,
IBPS-Adaptation
Biologique et
Vieillessement, F-75005,
Paris, France
Inserm U1164, F-75005
Paris, France

Marie-Ange Bonnin
Nicolas Robert
Delphine Duprez
CNRS UMR 7622,
IBPS-Laboratoire
de Biologie
du Développement,
F-75005, Paris, France
Inserm U1156, F-75005
Paris, France
Sorbonne Universités,
UPMC Univ Paris 06,
IBPS, F-75005 Paris,
France

Mathias Mericskay
Sorbonne Universités,
UPMC Univ Paris 06,
IBPS, F-75005 Paris,
France
CNRS UMR 8256,
IBPS-Adaptation
Biologique
et Vieillessement,
F-75005, Paris, France
Inserm U1164, F-75005
Paris, France

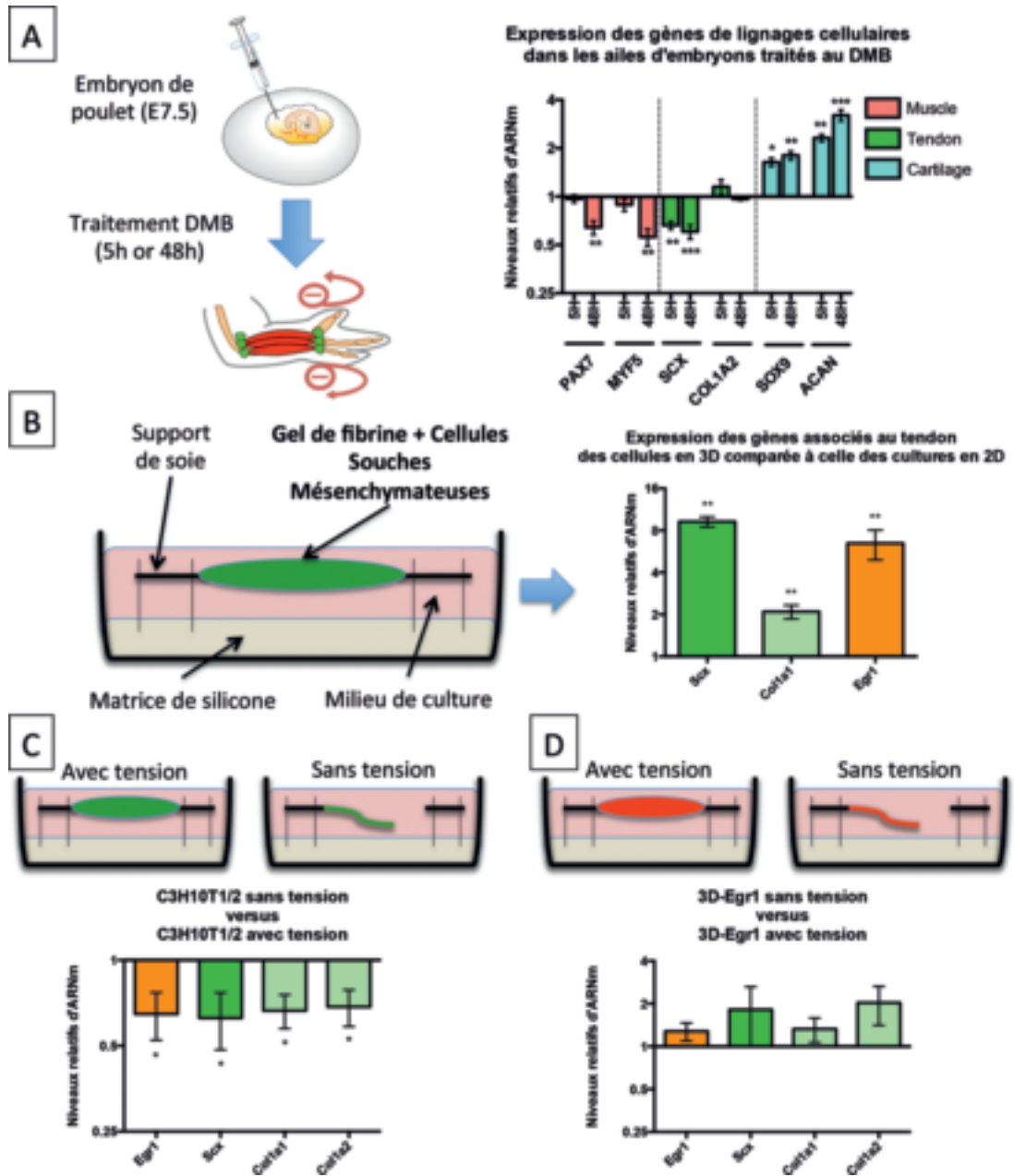


Figure 1

Signaux moléculaires et mécaniques intervenant dans la différenciation des cellules tendineuses.

(A) Procédure expérimentale du traitement au bromure de déc méthonium (DMB) induisant une inhibition des mouvements (flèches rouges) et expression des gènes associés aux différents lignages cellulaires. (B) Représentation d'une construction 3D de tendon *in vitro* et graphe d'expression des gènes dans des cultures cellulaires 3D comparée aux cultures 2D. (C) Représentation des constructions 3D avec tension (gauche) et sans tension (droit) et graphe d'expression des gènes associés aux tendons dans les 3D sans tension *vs* avec tension. (D) Représentation des constructions 3D surexprimant *Egr1* (3D-*Egr1*) avec tension (gauche) et sans tension (droit) et graphe d'expression des gènes associés aux tendons dans les 3D-*Egr1* avec tension *vs* sans tension. Tests statistiques utilisés sont les tests non-paramétriques de Mann-Whitney. * = p-value ≤ 0,05 ; ** = p-value ≤ 0,01 ; *** = p-value ≤ 0,001.

Oral communications and Posters Awards 2015

Molecular and mechanical signals underlying tendon cell differentiation

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Gaut L, Duprez D. Tendon development and diseases. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2016 ; 5 : 5-23.
2. Huang AH, Lu HH, Schweitzer R. Molecular regulation of tendon cell fate during development. *J Orthop Res* 2015 ; 33 : 800-12.
3. Schweitzer R, Chyung JH, Murtaugh LC, et al. Analysis of the tendon cell fate using scleraxis, a specific marker for tendons and ligaments. *Development* 2001 ; 128 : 3855-66.
4. Lejard V, Blais F, Guerquin MJ, et al. EGR1 and EGR2 involvement in vertebrate tendon differentiation. *J Biol Chem* 2011 ; 286 : 5855-67.
5. Guerquin MJ, Charvet B, Nourissat G, et al. Transcription factor EGR1 directs tendon differentiation and promotes tendon repair. *J Clin Invest* 2013 ; 123 : 3564-76.
6. Mammoto T, Mammoto A, Ingber DE. Mechanobiology and developmental control. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2013 ; 29 : 27-61.
7. Nowlan N, Sharpe J, Roddy K, et al. Mechanobiology of embryonic skeletal development: Insights from animal models. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2010 ; 90 : 203-13.
8. Bayer M, Yeung C, Kadler K, et al. The initiation of embryonic-like collagen fibrillogenesis by adult human tendon fibroblasts when cultured under tension. *Biomaterials* 2010 ; 31 : 4889-97.

EMC
45TH EUROPEAN MUSCLE CONFERENCE

MONTPELLIER
2, 3, 4, 5, 6th of September
2016 - FRANCE

The Muscles

SESSIONS / SPEAKERS

- ▶ **Keynote lecture**
→ Andrew Marks (Columbia University, New York, USA)
- ▶ **Molecular motor and Contractile structure**
→ Anne Houdouart (France) & Lee Swannery (USA)
- ▶ **Molecular motor and Contractile function (actin-myosin)**
→ Robert Candau (France) & Vincenzo Lombardi (Italy)
- ▶ **Muscle plasticity and Chronic disease**
→ Xavier Rigaud (France) & Volker Adams (Germany)
- ▶ **Mechanotransduction (YIDD, Shear stress, Starling's law)**
→ Stefan Plesch (France) & Basil Patel (Canada)
- ▶ **Muscle development and aging**
→ Robert Kelly (France) & Peter Zammit (UK)
- ▶ **Epigenetics of muscle regeneration**
→ Shirohige Tsubouchi (France) & Esther Barreiro (Spain)
- ▶ **Excitation-contraction coupling in skeletal muscle**
→ Bruno Allard (France) & Holger Wenzelbach (Germany)
- ▶ **Excitation contraction coupling in cardiac muscle**
→ Allen Lacampagne (France) & Stephan Lehmann (Germany)
- ▶ **Metabolism... and bio-energetics**
→ Jeremy Faucquier (France) & Martin Picard (USA)
- ▶ **Bio energetism... and Metabolism**
→ Philippe Dierckx (France) & Fabio Di Lisa (Italy)
- ▶ **Neuro-muscular disease and therapeutic approach**
→ Vincent Phouly (France) & Kevin Flanagan (USA)
- ▶ **Muscle cytoskeleton**
→ Oliver Caspari (France) & Hank Granger (USA)
- ▶ **Smooth muscle motility**
→ Vincent Sasseau (France) & Kathleen Morgan (USA)
- ▶ **Cardiomyopathy and Heart failure**
→ Işın Aydın (France) & Michel Dizez (France)

www.emc2016-montpellier.com

Dynamique de l'organisation des triades

Muriel Sébastien, Éric Denarier, Julie Brocard, Oriana Sarrault, Didier Grunwald, Isabelle Marty, Julien Fauré

La cellule musculaire est organisée afin d'optimiser la contraction. Elle est majoritairement constituée de myofibrilles, les éléments contractiles du muscle. L'influx nerveux provenant du motoneurone se transforme en un relâchement de calcium au niveau des triades, une structure membranaire particulière composée de l'accolement de deux citernes terminales de réticulum sarcoplasmique de part et d'autre d'un tubule transverse, une invagination de la membrane plasmique [1]. Le complexe de relâchement du calcium, exclusivement localisé à la triade, permet les relâchements de calcium nécessaires à la contraction du muscle. Ce complexe est composé principalement de deux canaux calciques physiquement associés [2] et ancrés face à face dans leurs membranes respectives : le récepteur des dihydropyridines dans la membrane du tubule transverse et le récepteur de la ryanodine dans la membrane du réticulum sarcoplasmique. D'autres protéines régulatrices telles que la junctine, la calséquestrine ou la triadine [3] leurs sont associées.

Le bon fonctionnement du muscle dépend donc de la structure de la triade et de la localisation précise des protéines du complexe de relâchement du calcium. Or, les mécanismes de mise en place et d'adressage des protéines vers la triade sont peu connus.

Des mutations de protéines du complexe de relâchement du calcium entraînent des pathologies des muscles squelettiques comme les myopathies à cores centraux (CCD) [4]. L'hypothèse physiopathologique la plus courante est celle d'une dérégulation des relâchements de calcium réalisés par le récepteur de la ryanodine, mais un mauvais adressage d'une des protéines du complexe de relâchement du calcium pourrait également avoir des conséquences importantes sur la fonction du complexe. Cette hypothèse est peu étudiée en raison du manque d'informations fondamentales sur les processus de mise en place de la triade. Pour étudier ces processus et l'adressage des protéines du complexe de relâchement du calcium à la triade, nous avons choisi comme protéine modèle la triadine. La triadine interagit directement avec le récepteur de la ryanodine et la calséquestrine, indirectement avec les microtubules, et elle est capable de multimériser. Ces trois types d'interactions pourraient favoriser un

rôle d'ancrage de la triadine pour les autres protéines du complexe [5, 6].

Pour ces études, nous avons développé un modèle expérimental basé sur l'expression grâce à des transductions virales de chimères fluorescentes de la triadine dans des myotubes de souris KO pour la triadine, différenciés *in vitro*. Ce modèle cellulaire nous permet d'étudier, d'une part, la mise en place des triades, et, d'autre part, l'adressage et le trafic de la triadine à différents stades de développements/différenciation des cellules. Le suivi par vidéomicroscopie de la triadine fluorescente permet d'observer la présence de triades dès les premiers jours de différenciation, mais ces triades sont dispersées dans les myotubes. L'organisation des triades se fait progressivement dans les jours suivants pour atteindre leur positionnement final à l'interface des bandes A et I, et ce processus semble dépendant du réseau de microtubules. Afin de suivre plus en détail le devenir de quelques molécules, nous avons également développé des chimères photoactivables (PAGFP) [7]. Nous avons ainsi pu suivre le trafic de ces molécules. Par rapport à un marqueur du réticulum diffusant librement, la triadine diffuse dans les membranes du réticulum tout en présentant une rétention au niveau des triades. Différents domaines de la triadine semblent être impliqués dans ce mécanisme de rétention.

En conclusion, nous avons pu observer que l'organisation des triades le long des sarcomères dépend du réseau de microtubules, et que, malgré l'idée générale d'une structure musculaire figée, la triadine est bien mobile dans les membranes du réticulum, tout en étant retenue à la triade. Ces résultats pourraient aboutir à un modèle applicable à l'ensemble des protéines du complexe de relâchement du calcium du réticulum sarcoplasmique. La compréhension des mécanismes de mise en place des protéines du complexe de relâchement du calcium dans la triade est essentielle pour mieux aborder la physiopathologie de certaines myopathies. Mon travail permet d'approfondir les connaissances fondamentales sur la physiologie musculaire ainsi que de disposer de modèles supplémentaires d'étude de mutations des gènes du complexe de relâchement du calcium (Figure 1).

Muriel Sébastien
Julie Brocard
Oriana Sarrault
Didier Grunwald
Isabelle Marty

Cellular Myology
and Pathologies, Grenoble
Institute of Neurosciences,
Inserm U1216, Grenoble,
France

Eric Denarier
Physiopathology
of the Cytoskeleton,
Grenoble Institute
of Neurosciences, Inserm
U1216, Grenoble, France

Julien Fauré
Cellular Myology
and Pathologies, Grenoble
Institute of Neurosciences,
Inserm U1216, Grenoble,
France
CHU Grenoble,
Biochemistry
and Molecular Genetics,
Grenoble, France

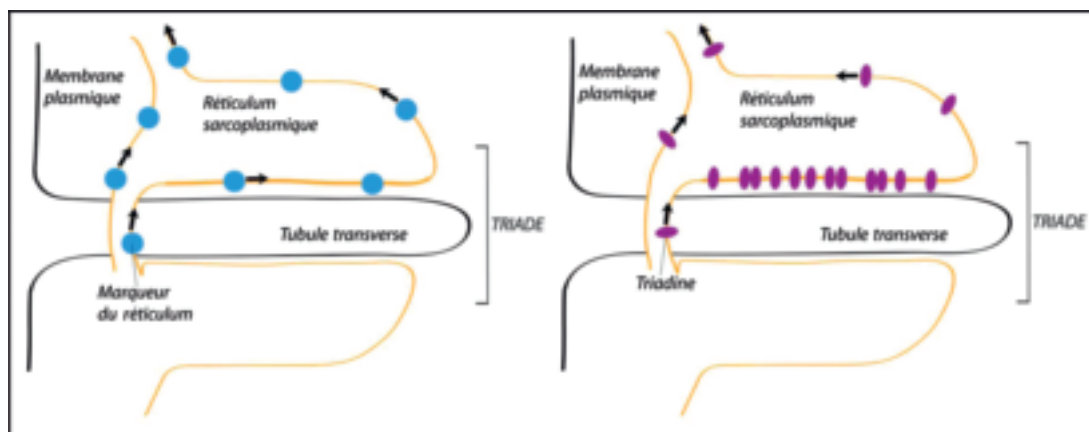


Figure 1

Dynamique des protéines dans la membrane du réticulum des cellules musculaires. Une protéine marqueur du réticulum (rond bleu à gauche) entre, sort et diffuse dans la triade de la même manière que dans le réticulum, tandis que la triadine (ovale rose à droite) tout en circulant dans la membrane du réticulum est ralentie au niveau de la triade.

Dynamics of triad organization

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Flucher BE. Structural analysis of muscle development: transverse tubules, sarcoplasmic reticulum, and the triad. *Dev Biol* 1992 ; 154 : 245-60.
2. Marty I, Robert M, Villaz M, et al. Biochemical evidence for a complex involving dihydropyridine receptor and ryanodine receptor in triad junctions of skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; 91 : 2270-4.

3. Marty I. Triadin regulation of the ryanodine receptor complex. *J Physiol* 2015 ; 593 : 3261-6.
4. MacLennan DH, Zvaritch E. Mechanistic models for muscle diseases and disorders originating in the sarcoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 2011 ; 1813 : 948-64.
5. Fourest-Lieuvin A, Rendu J, Osseni A, et al. Role of triadin in the organization of reticulum membrane at the muscle triad. *J Cell Sci* 2012 ; 125 : 3443-53.
6. Cusimano V, Pampinella F, Giacomello, Sorrentino V, Assembly and dynamics of proteins of the longitudinal and junctional sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009 ; 106 : 4695-700.
7. Patterson GH, Lippincott-Schwartz J. A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells. *Science* 2002 ; 297 : 1873-7.

Impact d'un traitement antioxydant sur le transfert de gène par un vecteur AAVr dans un modèle murin de la dystrophie musculaire de Duchenne

Jean-Baptiste Dupont, Benoît Tournaire, Romain Durand, Béatrice Marolleau, Émilie Bertil, Christophe Georger, Émilie Lecomte, Benjamin Cogné, Bernard Gjata, Laetitia Van Wittenberghe, Alban Vignaud Richard, O. Snyder, Philippe Moullier, Adrien Léger

Les vecteurs recombinants dérivés du virus adéno-associé (AAVr) sont des outils prometteurs pour la thérapie génique de la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD). Plusieurs études menées chez des modèles murins ou canins de la DMD ont en effet décrit des améliorations phénotypiques significatives sans effet toxique notable suite à l'injection d'importantes quantités de vecteur [1, 2]. Même si ces études sont prometteuses, le maintien à long terme de l'expression du transgène demeure peu ou pas documenté. Dans plusieurs modèles de souris DMD, notre équipe et d'autres laboratoires avons ainsi démontré que cette expression diminuait progressivement, même après injection de doses de vecteurs AAVr cliniquement pertinentes [3, 4]. En corrélation, nous avons observé une perte des génomes de vecteurs résultant de la nécrose des cellules musculaires DMD, ainsi que des dommages oxydatifs affectant les molécules d'ARNm du transgène. Ces observations soulignent l'importance du contexte tissulaire dans lequel sont injectés les vecteurs AAVr, et l'impact majeur qu'il peut avoir sur leur efficacité. Mais elles permettent également de dégager des perspectives d'amélioration : en neutralisant ces « facteurs de restriction » préalablement à l'injection d'AAVr, la persistance et l'efficacité de ces vecteurs pourraient se trouver renforcées. Dans le cas de la DMD, le stress oxydatif semble occuper une position centrale à la fois dans la physiopathologie cellulaire, et dans la dégradation de l'ARNm du transgène [4, 5]. Par conséquent, nous avons développé une stratégie innovante utilisant un composé antioxydant fréquemment employé en médecine humaine. Des souris DMD, prétraitées ou non par cette molécule, ont reçu dans un deuxième temps un vecteur AAVr portant un transgène rapporteur. L'efficacité de transduction, l'expression et l'activité du transgène ont ensuite été mesurées deux mois après injection. Le résultat de cette approche

innovante sera certainement précurseur pour de futurs protocoles de traitement combinatoires pour la DMD, alliant l'efficacité de molécules pharmacologiques à celle des vecteurs AAVr de thérapie génique.

Impact of an antioxidant treatment on rAAV-mediated gene transfer in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy

Recombinant adeno-associated virus (rAAV)-based vectors are promising tools for the gene therapy of Duchenne muscular dystrophy (DMD) (*Figure 1*). Several studies in murine and canine models of DMD reported significant phenotype improvements without any notable toxicity following the injection of substantial amounts of vector [1, 2]. While this has raised hope for future translations in DMD patients, long term maintenance of the therapeutic benefits is an important, and yet unresolved issue. In previous studies conducted in DMD mice, we and others have demonstrated that rAAV-mediated transgene expression is progressively reduced, even after injection of clinically relevant vector doses [3, 4]. This could be explained, at least in part, by the loss of vector genomes resulting from muscle cell necrosis but also by the oxidative damage affecting transgene mRNA molecules. These elements support the fact that the tissue context in which rAAV vectors are delivered is of critical importance and can significantly affect their efficiency. But they also open new avenues for improvement, since we can now consider counteracting these “restriction” phenotypes prior to rAAV injection. In the case of DMD, oxidative stress seems to occupy a central position in both muscle cell pathophysiology and rAAV transgene mRNA degradation [4, 5]. Therefore, we designed an innovative strategy using a relevant antioxidant agent routinely used in human

Jean-Baptiste Dupont
UMR Inserm 1089,
Atlantic Gene Therapies,
Nantes, France
jeanbaptiste.dupont@
univ-nantes.fr
Benoît Tournaire
Romain Durand
Emilie Lecomte
Benjamin Cogné
Adrien Léger
UMR Inserm 1089,
Atlantic Gene Therapies,
Nantes, France
Béatrice Marolleau
Emilie Bertil
Christophe Georger
Bernard Gjata
Laetitia van
Wittenberghe
Alban Vignaud
Généthon, Evry, France
Richard O. Snyder
UMR Inserm 1089,
Atlantic Gene Therapies,
Nantes, France
Department of Molecular
Genetics
and Microbiology,
University of Florida
College of Medicine,
Gainesville, Florida,
États-Unis
Center of Excellence
for Regenerative Health
Biotechnology, University
of Florida College
of Medicine, Gainesville,
Florida, États-Unis
Philippe Moullier
UMR Inserm 1089,
Atlantic Gene Therapies,
Nantes, France
Center of Excellence
for Regenerative Health
Biotechnology, University
of Florida College
of Medicine, Gainesville,
Florida, États-Unis

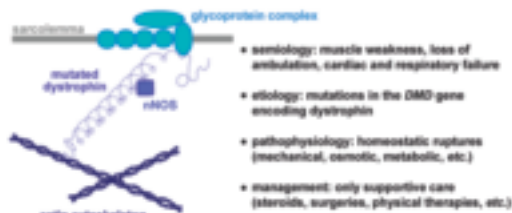
Impact of an antioxidant treatment on recombinant adeno-associated virus (rAAV) vector-mediated gene transfer in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy

Jean-Baptiste Dupont¹, Benoit Tournaine¹, Romain Durand¹, Béatrice Marolleau¹, Emille Bertif¹, Christophe Georger¹, Emille Lecoq¹, Benjamin Cogné¹, Bernard Gjata¹, Laetitia van Wittenberghé¹, Alban Vignaud¹, Richard O. Snyder^{1,2,3}, Philippe Moullier^{1,2} and Adrien Léger¹

¹ UMR INSERM 1058, Adulte Care Therapies, Nantes, France; ² GENETHON, Evry, France; ³ Department of Molecular Genetics and Microbiology, University of Florida College of Medicine, Gainesville, Florida, USA; ⁴ Center of Excellence for Regenerative Health Biotechnology, University of Florida College of Medicine, Gainesville, Florida, USA

Contact: jeanbaptiste.dupont@univ-nantes.fr

Duchenne muscular dystrophy (DMD)



Recombinant adeno-associated virus (rAAV)

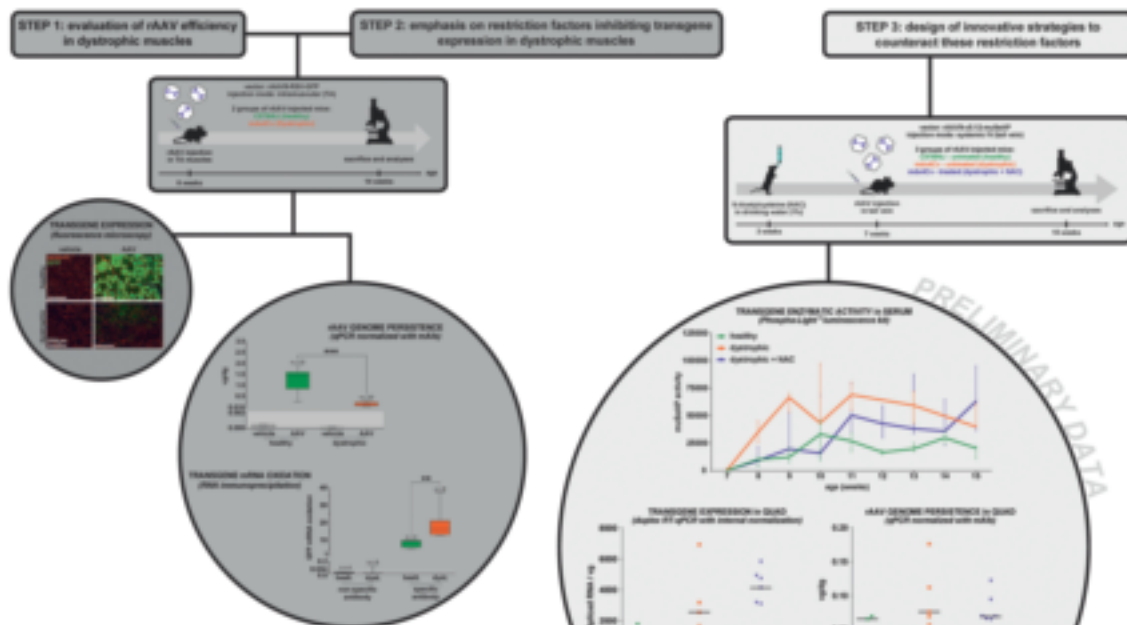


rAAV vectors in DMD animal models

- more than 30 studies with different transgenes (UT, μ Dys, Fc, rDMD, etc.)
- average injected dose: around $1.0E+14$ vector genomes (vg) / kg
- studies rarely continued over 6 months
- loss of transgene expression and vector genomes over time when the injected vector dose is subtherapeutic

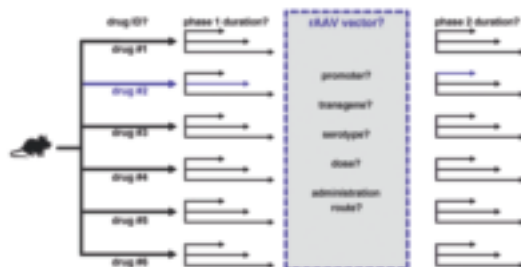
Hypothesis: Specific DMD phenotypes impair one or several step(s) of the rAAV transduction process
What are these "restriction factors" and can they be counteracted?

Study plan in 3 successive steps:



Conclusion & future directions

- sharp reduction of rAAV efficiency in mdxCv muscles
- vector genome persistence and transgene mRNA metabolism (oxidative status) are affected
- other restriction factors?
- improvement with pharmacology? Many parameters to consider...



Statistics: Mann-Whitney U test, *** p<0.001, ** p<0.01



medicine. DMD mice, pre-treated or not with this compound, were subsequently injected with a rAAV vector carrying a reporter transgene. The transduction efficiency, together with the expression and activity of the transgene, were monitored and compared two months later. The outcome of this innovative approach will certainly pave the way for future combinatorial protocols using pharmacological agents and rAAV vectors in DMD muscles.

Impact of an antioxidant treatment on recombinant adeno-associated virus (rAAV) vector-mediated gene transfer in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Le Guiner C, Montus M, Servais L, *et al.* Forelimb treatment in a large cohort of dystrophic dogs supports delivery of a recombinant AAV for exon skipping in Duchenne patients. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther* 2014 ; 22 : 1923-35.
2. Kawecka K, Theodoulides M, Hasoglu Y, *et al.* Adeno-associated virus (AAV) mediated dystrophin gene transfer studies and exon skipping strategies for Duchenne muscular dystrophy (DMD). *Curr Gene Ther* 2015 ; 15 : 395-415.
3. Le Hir M, Goyenvallé A, Peccate C, *et al.* AAV genome loss from dystrophic mouse muscles during AAV-U7 snRNA-mediated exon-skipping therapy. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther* 2013 ; 21 : 1551-8.
4. Dupont JB, Tournaire B, Georger C, *et al.* Short-lived recombinant adeno-associated virus transgene expression in dystrophic muscle is associated with oxidative damage to transgene mRNA. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2015 ; 2 : 15010.
5. Tidball JG, Wehling-Henricks M. The role of free radicals in the pathophysiology of muscular dystrophy. *J Appl Physiol* 2007 ; 102 : 1677-86.

Progrès dans la classification clinique de la dystrophie myotonique de type 1

Céline Dogan, Marie de Antonio, Dalil Hamroun, Pascale Chevalier, Malya Mati, Bruno Eymard, Guillaume Bassez et le groupe d'étude français dystrophie myotonique

La dystrophie myotonique de type 1 (DM1, maladie de Steinert) est considérée comme l'une des maladies génétiques les plus variables [1]. L'émergence de thérapies innovantes renforce encore la nécessité d'harmoniser, à l'échelon international, la classification clinique de la maladie [2, 10]. Malgré les initiatives de groupes de travail d'experts internationaux aucun consensus n'existe à ce jour. Plus récemment, le développement de bases de données fournit de puissants outils pour appréhender la complexité de maladies hétérogènes sur une large population. Nous nous appuyons sur les données de l'Observatoire national des dystrophies myotoniques, DM-Scope, pour évaluer la robustesse d'une classification de la DM1 en cinq formes cliniques, définies selon l'âge de début de la maladie. L'étude a été réalisée à partir d'une large collection de données standardisées issues de 1 962 patients DM1 français adultes. Les patients ont été classés comme suit : forme congénitale (3,7 %), forme infantile (17,8 %), forme juvénile (25,9 %), forme adulte (39,4 %) et forme tardive (13,1 %). Dans un premier temps, les cinq formes cliniques ont été comparées pour la distribution de la taille de l'expansion CTG, la fréquence et l'âge d'apparition des principaux symptômes. De plus, nous avons déterminé, grâce à une méthode statistique originale combinant fréquence et temporalité, les profils d'apparition des manifestations cliniques dans chacune des formes. Les résultats ont permis de valider le modèle de classification de la DM1 en cinq groupes. Nous montrons qu'au-delà du continuum, qui s'étend depuis la forme congénitale jusqu'à la forme tardive, les cinq formes cliniques se distinguent par des particularités cliniques propres. Cette étude confirme la robustesse d'un modèle de classification de la DM1 en cinq formes et met en exergue des caractéristiques cliniques spécifiques à chacune d'elles. Ces résultats devraient permettre d'optimiser le design des essais cliniques et plus particulièrement la constitution de groupes homogènes de patients.

Refining myotonic dystrophy type 1 clinical classification

Myotonic dystrophy (DM) is considered to be one of the most variable genetic diseases [1]. With the arrival of innovative DM therapies, it is becoming of crucial importance to reach harmonization on the classification of the disease [2-10]. In spite of ongoing initiatives involving working-groups of experts, no consensus is yet available. Databases are powerful tools to address the complex issue of heterogeneous diseases. Here, we assessed the robustness of a DM1 classification model divided into five clinical forms based on age of onset. The study was performed using a large collection of standardized data obtained in 1,962 French DM1 patients (> 18 years) from the nationwide DM-Scope registry. Patients were classified as follows: congenital (3.7%), infantile (17.8%), juvenile (25.9%), adult (39.4%) and late onset forms (13.1%). The five clinical forms were first compared regarding the distribution of CTG expansion size and the occurrence and onset of the main symptoms. Then, using a special two-dimensional method combining time and frequency as parameters, we determined the clinical profile of the DM1 manifestations for each clinical form. Analyses validated the five-grade model of DM1 classification with regard to the triplet repeat expansion size, frequency, age of onset and clinical profiles of the main symptoms. We show that the assumption that there is a continuum from the congenital form to the late onset form is a reality. Furthermore, our data allows us to highlight clinical manifestations specific to some clinical forms. This study provides strong evidence supporting a five-grade DM1 clinical classification model. In addition we observed specific features in clinical profiles related to particular DM1 forms. Together these results contribute to refine the DM1 classification and to improve clinical trial design, in particular enhancing the enrolment of homogeneous patients in clinical studies.

Céline Dogan
Pascale Chevalier
Malya Mati
Guillaume Bassez
Centre de Référence
Maladies
Neuromusculaires, CHU
Henri Mondor, Créteil,
France
Marie De Antonio
Centre de Référence
Maladies
Neuromusculaires, CHU
Henri Mondor, Créteil,
France
Inserm UMRS1138,
team22, Centre
de recherche des
Cordeliers, Paris, France
Dalil Hamroun
Institut Universitaire
de Recherche Clinique,
CHU de Montpellier,
France
Bruno Eymard
Centre de Référence
Maladies
Neuromusculaires
Paris-Est, CHU
Pitié-Salpêtrière, Paris,
France

Celine Dogan¹, Marie De Antonio^{2,3}, Dalil Hamroun³, Pascale Chevalier¹, Malya Mat², Bruno Eymard⁴, Guillaume Bassez² and French myotonic dystrophy clinical research network*

* Centre de Référence Myopathies Neuro-musculaires, CHU Pitié-Salpêtrière, CHU de France, France
 1 Centre de Référence Myopathies Neuro-musculaires, CHU Pitié-Salpêtrière, CHU de France, France
 2 Centre de Référence Myopathies Neuro-musculaires, CHU de France, France
 3 Centre de Référence Myopathies Neuro-musculaires, CHU de France, France



Figure 1 Contribution de l'Observatoire national des dystrophies myotoniques, DM-Scope, à la validation d'un modèle de classification de la DM1 divisé en cinq formes cliniques.

Refining myotonic dystrophy type 1 clinical classification

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Harper P. *Myotonic dystrophy*, 3rd ed. Major problems in neurology. London : W.B. Saunders, 2001.
2. Nakamori M, Taylor K, Mochizuki H, *et al.* Oral administration of erythromycin decreases RNA toxicity in myotonic dystrophy. *Ann Clin Transl Neurol* 2015 ; 3 : 42-54.
3. Chau A, Kalsotra A. Developmental insights into the pathology and therapeutic strategies for DM1: back to the basics. *Dev Dyn* 2015 ; 244 : 377-90.
4. Pandey SK, Wheeler TM, Justice SL, *et al.* Identification and characterization of modified antisense oligonucleotides targeting DMPK in mice and nonhuman primates for the treatment of

myotonic dystrophy type 1. *J Pharmacol Exp Ther* 2015 ; 355 : 329-40.

5. Jirka S, Aartsma-Rus A. An update on RNA-targeting therapies for neuromuscular disorders. *Curr Opin Neurol* 2015 ; 28 : 515-21.

6. Klein AF, Dastidar S, Furling D, Chuah MK. Therapeutic approaches for dominant muscle diseases: highlight on myotonic dystrophy. *Curr Gene Ther* 2015 ; 15 : 329-37.

7. Bisset DR, Stepniak-Konieczna EA, Zavaljevski M, *et al.* Therapeutic impact of systemic AAV-mediated RNA interference in a mouse model of myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* 2015 ; 24 : 4971-83.

8. Wojtkowiak-Szlachcic A, Taylor K, Stepniak-Konieczna E, *et al.* Short antisense-locked nucleic acids (all-LNAs) correct alternative splicing abnormalities in myotonic dystrophy. *Nucleic Acids Res* 2015 ; 43 : 3318-31.

9. Nguyen L, Lee J, Wong CH, Zimmerman SC. Small molecules that target the toxic RNA in myotonic dystrophy type 2. *Chem Med Chem* 2014 ; 9 : 2455-62.

10. Takahashi MP, Nakamori M, Mochizuki H. Therapeutic development in myotonic dystrophy. *Rinsho Shinkeigaku* 2014 ; 54 : 1077-9.

14^{es} Journées de la Société Française de Myologie 23 - 25 novembre 2016 à Bordeaux

Inscrivez-vous dès à présent aux 14^{es} Journées de la SFM

Tarifs Net	Avant le 18 novembre 2016	Sur place
Membres de la SFM*	120 €	150 €
Non membres	250 €	280 €
Formation continue	290 €	
Internes / Doctorants**	40 €	50 €
Externes / Étudiants en master**	Gratuit	50 €
Soirée du congrès (jeudi 24/11/2016)	50 €	

*À jour de leurs cotisations - Sur présentation du n° adhérent ** Sur présentation d'un justificatif

Formulaire d'inscription à télécharger <http://congres-sfmyologie.com/inscription>

L'appel à communication est ouvert !

Soumettez votre projet de communication orale ou affichée.

La date limite de réception des résumés est fixée au **15 septembre 2016** minuit.

Les résultats seront disponibles au 1er octobre 2016.

Pour soumettre un projet de communication, rendez-vous sur le site du congrès

www.congres-sfmyologie.com

AGENDA

2016

3-6 mai 2016 (Londres, Grande-Bretagne)
École anglaise de myologie (Update on Neuromuscular disorders)

www.ucl.ac.uk/ion/articles/courses/update

26-29-mai 2016 (Hsinchu, Taiwan)
Congrès annuel de l'Asian-Oceanian Myology Center (AOMC)

www.aomc.info/

1-3 juin 2016 (Strasbourg, Centre des Congrès)

20^e journées francophones d'ENMG

www.lepublicsystemepco.com/events.php?IDManif=873&IDModule=71&IDRub=1477

9 juin 2016 (Paris, Institut de Myologie)

4^e journée du Centre de Référence Neuropathies Périphériques Rares de Limoges

Contact : crm.n@chu-limoges.fr

10 juin 2016 (Institut Imagine - Necker, Paris)

3^e journée du Réseau Dystrophie Myotonique - DM-Scope

Contact : celine.dogan@aphp.fr

15-17 juin 2016 (GH Pitié-Salpêtrière, Paris)

MYO-MRI training school

<http://myo-mri.eu/training-school/>

16-19 juin 2016 (Anaheim, Californie, USA)

Cure-SMA conférence annuelle

www.curesma.org/get-involved/conference/

23 juin-1^{er} juillet 2016 (Institut de Myologie, Paris)

Summer School of Myology (École d'Été de Myologie, 19^e édition)

Avec une séance du GEM le jeudi 30 juin de 14 h à 16 h 30

<http://ssmparis.free.fr/>

26-30 juin 2016 (Orlando, Floride, USA)

Parent Project Duchenne - conférence annuelle

<http://community.parentprojectmd.org/events/2016-annual-connect-conference>

29 juin-1^{er} juillet 2016 (Mâcon, Parc des Expositions)

Journées de Neurophysiologie Clinique

<http://amhmr.free.fr/Bulletin%20Inscription%20JNC%20Macon.pdf>

29 juin-2 juillet 2016 (Orlando, Floride, USA)

New Directions in Biology and Disease of Skeletal Muscle

www.med.upenn.edu/muscle/

30 juin-1^{er} juillet 2016 (Montpellier)

Journées de la Filière SLA (FILSLAN)

Renseignements en attente.

2017

20-24 juin 2017 (Lyon)

EPNS Congress

www.epns2017.com/

27-29 novembre 2017 (Freiburg, Allemagne)

Conférence TREAT-NMD Alliance

www.treat-nmd.eu/

1^{er} juillet 2016 (ICM, Paris)

Journée annuelle Résocanaux

Contact : savine.vicart@aphp.fr

4-9 juillet 2016 (Toronto, Canada)

ICNMD (congrès mondial neuromusculaire)

<http://icnmd2016.org/>

8-9 juillet 2016 (Oxford, Angleterre)

Oxford Muscle Symposium

Contact : monika.hofer@ndcn.ox.ac.uk

2-6 septembre 2016 (Montpellier)

45^e European Muscle Conference

www.emc2016-montpellier.com/

16 septembre 2016 (Montigny Le Bretonneux)

Journée de travail du groupe « Respi » AFM-Téléthon

Contact : mvanderdonth@afm-telethon.fr

22 septembre 2016 (Paris, Institut de Myologie)

Journée Interdisciplinaire du Muscle Inflammatoire (JIMI n° 8)

Contact : olivier.benveniste@aphp.fr

Programme :

<http://amhmr.free.fr/Programme%20JIMI%202016%20BD%20V8.pdf>

4-8 octobre 2016 (Grenade, Espagne)

Congrès annuel de la World Muscle Society (WMS, 21^e édition)

www.worldmusclesociety.org/

8 octobre 2016 (Paris)

Séminaire international Myosite Ossifiante (FOP)

www.fopfrance.fr/

20-21 octobre 2016 (Amphi de l'ICM, Paris)

Journées internationales de la Société Française de Neurologie

Contact : info@sfn-congres.org

28-29 octobre 2016 (Essen, Allemagne)

EPNS research meeting

www.epns.jmre.es/meetings/

3-5 novembre 2016 (Paris)

Cours sur les myopathies métaboliques (Recordati)

<http://www.rrd-foundation.org/fr/course/cours-sur-les-myopathies-metaboliques/90?qt-coursetab=0#qt-coursetab>

23-25 novembre 2016 (Bordeaux, ENSEIRB, MATEMECA)

Journées Annuelles de la Société Française de Myologie (SFM)

www.sfmyologie.org/

3-7 octobre 2017 (Saint-Malo)

Congrès Annuel de la World Muscle Society (WMS, 22^e édition)

www.worldmusclesociety.org/

2017 (Stanford-San Francisco, USA)

Congrès international sur les dystrophies myotoniques (IDMC-11)

14^{èmes} Journées de la Société Française de Myologie

**23 - 25
NOV. 2016**

**BORDEAUX
ENSEIRB-MATMECA**

Actualités en myologie
Focus sur le cœur

Comité local d'organisation :

- Dr Guilhem SOLÉ
- Dr Fanny DUVAL
- Dr Caroline ESPIL-TARIS
- Dr Xavier FERRER-MONASTERIO
- Pr Cyril GOIZET

Comité scientifique :

- Dr Nathalie DAMON-PERRIÈRE
 - Dr Claire DELLECI
 - Dr Fanny DUVAL
 - Dr Caroline ESPIL-TARIS
- Dr Xavier FERRER-MONASTERIO
 - Pr Cyril GOIZET
- Pr Marie-Laure NEGRIER-LEIBREICH
 - Dr Patricia RÉANT
- Dr Marie-France ROUANET-LARRIVIÈRE
 - Dr Caroline ROORYCK-THAMBO
 - Dr Frédéric SACHER
 - Dr Guilhem SOLÉ
- Pr Jean-Benoît THAMBO

sfm

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MYOLOGIE

www.congres-sfmyologie.com - www.sfmyologie.org