

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE**

UNIVERSITE DES FRERES MENTOURI CONSTANTINE 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biochimie-Biologie Cellulaire et Moléculaire

N° d'Ordre :.....

N° de Série :.....

Thèse

En vue de l'obtention du

DOCTORAT TROISIÈME CYCLE LMD

En

Biologie et Santé

THÈME

**Les aspects génétiques des gamma-sarcoglycanopathies ou LGMD2C de l'Est
Algérien**

Présentée par : DALICHAUCHE Imane

Soutenue le/..../2017

Devant le Jury :

Présidente :	L. ROUBAH	Professeur	Université Constantine 1
Directrice de thèse :	Y. SIFI	Professeur	Université Constantine 3
Examineurs :	N. ABADI	Professeur	Université Constantine 3
	B.S. FEKRAOUI	MCA	Université Constantine 3

Année Universitaire 2016-2017

*Remerciements et
Dédicaces*

Remerciements

Je tiens à remercier très sincèrement ma directrice de thèse le Professeur SIFI Yamina, de m'avoir permis de réaliser cette thèse. Elle m'a chaleureusement accueilli au sein de l'équipe de la consultation des maladies neuromusculaires rattachée au service de neurologie du CHU de Constantine. Elle n'a pas cessé de me guider avec disponibilité et gentillesse tout au long de mon parcours. Veuillez trouver ici, Professeur, l'expression de ma profonde gratitude et de l'estime que je vous porte.

C'est avec beaucoup d'humilité et de respect que je remercie le Professeur ROUABAH Leila pour l'enseignement exemplaire qu'elle nous a prodigué, ainsi que pour sa disponibilité pendant toutes ces longues années, ses encouragements soutenus, sa rigueur scientifique et son aide à l'aboutissement de ma thèse. Merci de me faire l'honneur de présider le jury de cette thèse. Veuillez trouver ici, Professeur, l'expression de ma profonde gratitude.

Je prie le Professeur ABADI Noureddine chef de service du laboratoire de Biochimie au CHU de Constantine et responsable de l'unité de recherche de Biologie et Génétique Moléculaire de la faculté de médecine de Constantine, de trouver ici l'expression de mes remerciements et de toute ma reconnaissance pour son dévouement, sa compétence et son aide qui m'ont permis d'acquérir l'expérience nécessaire pour exercer dans un laboratoire de Biologie et Génétique Moléculaire. Merci de me faire l'honneur d'accepter de juger ce travail.

J'exprime ma profonde reconnaissance au Docteur FEKRAOUI Boubekeur saddik pour l'intérêt apporté à mon travail en acceptant de le juger. Veuillez trouver ici, Monsieur, l'expression de mes sentiments les plus respectueux.

Mes remerciements s'adressent également au Docteur SIFI Karima qui m'a initié aux techniques de Biologie Moléculaire et m'a prodiguée des conseils très précieux. Sa gentillesse et son accueil généreux dans le laboratoire de Biologie et Génétique Moléculaire du CHU de Constantine m'ont été d'une grande aide dans la réalisation de ce travail.

J'exprime toute ma reconnaissance au Professeur HAMRI Abdelmadjid Chef du Service de Neurologie du CHU de Constantine qui m'a permis de travailler dans les meilleures conditions possibles dans son service.

Je remercie vivement le Docteur Isabelle Richard, responsable de l'équipe des «Dystrophies des Ceintures >> du laboratoire Généthon à Evry (Paris, France), pour l'honneur qu'elle m'a fait en m'acceptant dans son laboratoire mais également pour la confiance qu'elle a placé en moi. Sa rigueur, son dynamisme, et ses nombreux conseils m'ont beaucoup apporté. Je ne saurai assez exprimer le plaisir d'avoir travaillé à ses côtés. Elle a surtout mis, gracieusement, à ma disposition tous les moyens techniques nécessaires à l'étude génétique. Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je tiens à remercier l'équipe du laboratoire de biologie et génétique moléculaire du CHU de Constantine, en particulier madame Yasmina pour sa gentillesse et sa générosité.

Mes remerciements les plus chaleureux s'adressent à tous les membres de l'équipe «Dystrophies des Ceintures » du laboratoire GENETHON qui m'ont permis d'évoluer dans une ambiance conviviale. Merci, en particulier, à Carinne Roudaut et Laurence Suel-Pétat qui m'ont beaucoup appris en termes de techniques de biologie moléculaire.

Mes remerciements vont également à tous les patients et leur familles qui ont participé à l'étude, ainsi qu'à l'association ADEM (Association défi et espoir de lutte contre les myopathies) de Constantine pour son intérêt à la réalisation de cette étude.

Dédicaces

Je dédie ce travail,

A mes très chers parents qui se sont dévoués pour me voir réussir dans ma vie. Que Dieu les garde. Je vous rends hommage par ce modeste travail en guise de ma reconnaissance éternelle et de mon infini amour.

A mon très cher frère Lotfi, toujours présent pour moi. Je t'exprime à travers ce travail mes sentiments de fraternité et d'amour.

A ma très chère sœur Madjeda, ton soutien moral et tes belles surprises sucrées m'ont beaucoup aidés. Puisse l'amour et la fraternité nous unir à jamais.

A mon très cher mari Sami, Je ne te remercierai jamais assez pour tes sacrifices, et ton soutien sans égal qui m'ont permis de réussir dans ce travail. Ceci est un témoignage de ma reconnaissance et de mon amour sincère.

A ma belle-famille, dont le soutien et les encouragements sont constants.

A mes très chères amies, votre soutien dans les moments les plus difficiles m'ont été précieux pour la réalisation de ma thèse.

A la mémoire de mes grands-parents paternels et maternels, puisse Dieu tout puissant, assurer le repos de votre âme par sa sainte miséricorde.

A tous ceux qui m'ont encouragé et soutenu durant les périodes les plus pénibles avec tant d'amour, je vous dédie le fruit de mon travail.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS
LISTE DES FIGURES
LISTE DES TABLEAUX
RESUME

INTRODUCTION	1
CHAPITRE. I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
LES DYSTROPHIES MUSCULAIRES DES CEINTURES (LGMD): SARCOGLYCANOPATHIES	4
I. Historique et classification actuelle.....	4
II. Epidémiologie	9
III. Présentation clinique.....	9
IV. Diagnostics clinique et génétique.....	10
V. Les sarcoglycanopathies: aspects cliniques et bases moléculaires	12
V.1 Bases moléculaires des sarcoglycanopathies	14
V.1.1 Le complexe dystrophine-glycoprotéine	14
V.1.2 Description des sarcoglycanes	15
V.1.3 Assemblage des sarcoglycanes	16
V.1.4 Physiopathologie des sarcoglycanes	17
V.2 Caractéristiques cliniques des sarcoglycanopathies	20
V.3 Corrélations phénotype/génotype des sarcoglycanopathies	21
V.3.1 Mutations et effet fondateur.....	21
LES GAMMA-SARCOGLYCANOPATHIES.....	23
I. Définition	23
II. Historique.....	24
III. Epidémiologie.....	25
IV. Acteurs moléculaires de la LGMD2C	26
IV.1 Gene SGCG codant pour la Υ -sarcoglycane	26
IV.1.1 Identification du gène SGCG	26
IV.1.2 Organisation du gène SGCG	27
IV.2 La protéine Υ -sarcoglycane.....	28
IV.2.1 Découverte de la Υ -sarcoglycane.....	28

IV.2.2 Structure et localisation de la γ -sarcoglycane	28
IV.2.3 Expression de la γ -sarcoglycane	29
IV.2.4. Rôle de la protéine γ -sarcoglycane.....	30
V. Pathologie moléculaire du gène SGCG	31
VI. Présentation clinique de la LGMD2C.....	35
VII. Diagnostic différentiel des LGMD2C.....	36
VIII. Diagnostic positif de la LGMD2C.....	38
VIII.1 Anamnèse	38
VIII.2 Examen neuromusculaire.....	38
VIII.2.1 Syndrome myogène	38
VIII.2.2 Analyse topographique	38
VIII.2.3 Signes associés.....	42
VIII.3 Examens complémentaires	44
VIII.3.1 Electroneuromyogramme (ENMG).....	44
VIII.3.2 Enzymes musculaires	44
VIII.3.3 Biopsie musculaire.....	44
IX. Analyse moléculaires de la LGMD2C	45
IX.1 Etude immunohistochimique et western blot	45
IX.2 Tests génétiques	46
X. Modèles animaux.....	47
XI. Traitement et perspectives thérapeutique	49
XI.1 Traitement	49
XI.2 Perspectives thérapeutiques.....	50
XI.2.1 Blocage de la myostatine chez la souris modèle gamma-sarcoglycanopathie..	50
XI.2.2 Approche pharmacologique.....	51
XI.2.3 Thérapie génique.....	51
XII. Pathologie associée à la LGMD2C	52
XIII. Conseil génétique et diagnostic prénatal	54
CHAPITRE. II : PATIENTS ET MÉTHODES	
I. Type et période d'étude.....	57
I.1 Etude rétrospective	57
I.2 Etude prospective	57

II. Patients.....	57
II.1 Description de la population d'étude	57
II.2 Critères d'inclusion.....	58
II.3 Critères d'exclusion	58
III. Analyse clinique	59
III.1 Détermination de la sévérité du phénotype des patients.....	59
III.2 Examens complémentaires	59
III.2.1 Etude biochimique.....	59
III.2.2 ENMG	60
III.2.3 EFR, ECG et échographie du cœur	60
IV. Analyse génétique	60
IV.1 Méthode de prélèvement sanguin et mode d'acheminement	60
IV.2 Stratégie de diagnostic adoptée	60
IV.2.1 Extraction de l'ADN génomique total.....	61
IV.2.2 Amplification de l'ADN génomique par PCR classique et PCR spécifique d'allèle.....	63
IV.2.3 Séquençage (Sanger) des produits de PCR des sept exons du gène SGCG	69
IV.2.4 Amplification de l'ADN par PCR multiplex à la recherche de macro-délétions du gène DMD	70
V. Analyse statistique.....	75
V.1 Analyses uni-variées.....	75
V.2 Analyses bi-variées.....	75
CHAPITRE. III: RÉSULTATS	
I. Analyse phénotypique de l'ensemble des patients.....	76
II. Recherche de la mutation c.525delT.....	78
II.1 Mise au point de la PCR spécifique d'allèle.....	82
II.2 Analyse phénotypique des patients LGMD2C porteurs de la mutation c.525delT à l'état homozygote	82
II.1.1 Analyse clinique des patients.....	82
II.1.2 Répartition des patients selon la sévérité du phénotype	83
III. Recherche de délétion dans le gène DMD.....	84
III.1 Corrélations phénotype/génotype des patients DMD/BMD.....	90
IV. Recherche d'autres mutations dans le gène SGCG	91

IV.1 Analyse phénotypique des patients LGMD2C porteurs de la mutation c.87dupT à l'état homozygote	97
IV.1.1 Critères cliniques des patients	97
IV.1.2 Répartition des patients selon la sévérité du phénotype.....	97
IV.2 Analyse phénotypique des patients LGMD2C porteurs de la mutation hétérozygote composite c.525delT/c.87dupT	98
IV.2.1 Critères cliniques des patients	98
IV.2.2 Répartition des patientes selon la sévérité du phénotype	98
V. Corrélation phénotype/génotype des LGMD2C.....	99
VI. Comparaison des données cliniques de l'ensemble des patients atteints de LGMD2C et de dystrophinopathies	100
VI.1 Critères cliniques de l'ensemble des patients LGMD2C	100
VI.1.1 Répartition des patients LGMD2C selon la consanguinité et les cas secondaires.....	100
VI.1.2 Répartition des patients LGMD2C selon les signes cliniques associés	100
VI.1.3 Statuts cardiaque et respiratoire des patients LGMD2C	101
VI.2 Critères cliniques de l'ensemble des patients atteints de dystrophinopathies.	101
VI.2.1 Répartition des patients selon la consanguinité et les cas secondaires.....	101
VI.2.2 Caractéristiques cliniques générales.....	102
VI.2.3 Statuts cardiaque et respiratoire des patients atteints de dystrophinopathies....	102
VI.3 Comparaison des principaux signes cliniques des deux groupes LGMD2C et dystrophinopathies.....	103

CHAPITRE. IV: DISCUSSION

I. Analyse du gène SGCG.....	105
I.1 Identification de la mutation c.525delT	105
I.2 Identification de la mutation c.87dupT	108
I.3 Identification de la mutation hétérozygote composite c.525delT/c.87dupT	109
I.4 Identification des polymorphismes c.347G>A et c.860G>A.....	109
II. Corrélations phénotype/génotype des patients LGMD2C	111
III. Analyse génétique du gène DMD.....	113
IV. Corrélations phénotype/génotype des DMD/BMD.....	114
V. Comparaison des principaux signes cliniques des groupes LGMD2C et dystrophinopathies.....	114

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 116

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

PUBLICATIONS

LISTE DES ABREVIATIONS

AAV	Adeno associated virus
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AR	Autosomique récessive
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine-triphosphate
AVC	Accident vasculaire cérébral
BMD	Becker muscular dystrophy
CHU	Centre hospitalo-universitaire
CPK	Créatine phosphokinase
DGC	Dystrophin-glycoprotein-complex
DMD	Duchenne muscular dystrophy
DMSO	Dimethyle sulfoxyde
dNTPs	Désoxyribonucléotides -tri-phosphates
DO	Densité optique
ECG	Electrocardiogramme
EDTA	Éthylène diamine tétra-acétique
EFNS	European federation of neurological societies
EFR	Exploration fonctionnelle respiratoire
EGF	Epidermal growth factor
ENMG	Electroneuromyogramme
LGMD	Limb Girdle Muscular Dystrophy

LGMD2C	Limb-girdle muscular dystrophy type 2C
LGMD R	Recessive limb-girdle muscular dystrophy
LDH	Lactico-déshydrogénase
MLPA	Multiplexe ligation-dependant probe amplification
nNOS	neuronal nitric oxide synthase
PCR	Polymerase chain reaction
SCARM1	Childhood autosomal recessive muscular dystrophy
SGCG gene	Gamma-sarcoglycan gene
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris Buffered EDTA
TE	Tris EDTA

LISTE DES FIGURES

Figure. 1: Stratégie de diagnostic étiologique des dystrophies musculaires récessives à partir d'une biopsie musculaire.	11
Figure. 2: Complexe dystrophine-glycoprotéine (DGC) dans les cellules du muscle squelettique.....	15
Figure. 3: Assemblage du complexe des sarcoglycanes.....	17
Figure. 4: Mécanisme de pathogenèse des dystrophies musculaires dues à un déficit en sarcoglycanes.....	19
Figure. 5: Localisation cytogénétique du gène SGCG sur le bras long du chromosome 13 en position 12	27
Figure. 6: Représentation schématique du gène SGCG codant pour la protéine gamma-sarcoglycane	28
Figure. 7: Représentation schématique de la protéine γ -sarcoglycane.....	29
Figure. 8: Mutations récurrentes du gène SGCG	35
Figure. 9: Signe de Gowers chez un enfant DMD.....	39
Figure. 10: Hypertrophie des mollets chez un patient Algérien atteint de LGMD2C.....	42
Figure. 11: Macroglossie chez une patiente Algérienne atteinte de LGMD2C.	43
Figure. 12: Colonne vertébrale normale et avec scoliose.....	43
Figure. 13: Association entre la γ -sarcoglycane, la dystrophine et l'archvilline chez la souris.....	53
Figure. 14: Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose à 2% des fragments amplifiés par PCR de l'exon 6 du gène SGCG.	66
Figure. 15: Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose à 2% des fragments amplifiés par PCR des exons 2, 3, 4, 5,7 et 8 du gène SGCG.....	66
Figure. 16: Principe d'une PCR spécifique d'allèle.	68
Figure. 17: Profil d'électrophorèse sur gel NuSieve/agarose à 3% des fragments amplifiés par PCR multiplexe des 19 exons du gène DMD.....	74
Figure. 18: Répartition des patients selon les résultats de l'examen neurologique.....	77

Figure. 19: Electrophérogramme de la mutation c.525delT.....	79
Figure. 20: Analyse de la mutation c.525delT par PCR spécifique d'allèle.....	82
Figure. 21: Identification des délétions dans le gène DMD par PCR multiplexe.	85
A/ Résultats de la PCR multiplexe chez les 20 patients atteints de dystrophinopathies...	85
B/ Analyse spécifique des exons 46 et 47 chez 11 patients.....	86
Figure. 22: Représentation schématique de la protéine dystrophine avec ses différents domaines et les exons correspondants.....	87
Figure. 23: Electrophérogramme de la mutation c.87dupT du gène SGCG.....	92
Figure. 24: Electrophérogramme des deux polymorphismes c.347G> A et c.806G> A dans des régions codantes du gène SGCG chez 5 patients.....	93
Figure. 25: Evaluation de la pathogénicité du polymorphisme c.343G>A	94
Figure. 26: Schéma du gène SGCG et emplacement des mutations et polymorphismes...	95
Figure. 27: Répartition des patients LGMD2C selon les signes cliniques associés.....	101
Figure 28: Caractéristiques générales des patients atteints de dystrophinopathies.....	102
Figure 29: Mutations de la γ -sarcoglycane identifiées chez nos patients LGMD2C.....	110

LISTE DES TABLEAUX

Tableau. 1: Classification des dystrophies musculaires des ceintures	7
Tableau. 2: Fréquence relative de la LGMD2C dans le monde	25
Tableau. 3: Grades fonctionnels (Score de Brook): hanches et jambes	40
Tableau. 4: Grades fonctionnels de Vignos: bras et épaules.....	41
Tableau. 5: Séquences des amorces des sept exons codants du gène SGCG.....	63
Tableau. 6: Séquences d'amorces de 19 exons du gène DMD.	72
Tableau. 7: Répartition des patients LGMD2C (c.525delT/c.525delT) selon la sévérité du phénotype.	83
Tableau. 8: Délétions des exons du gène DMD observées chez les 20 patients atteints de dystrophinopathies.....	89
Tableau. 9: Corrélations phénotype/génotype des DMD/BMD.....	90
Tableau. 10: Répartition des patients LGMD2C selon les variations observées dans le gène SGCG (NM_000231.2).....	96
Tableau. 11: Répartition des patients LGMD2C (c.87dupT/c.87dupT) selon la sévérité du phénotype.	97
Tableau. 12: Corrélation phénotype/génotype des LGMD2C.	99
Tableau. 13: Comparaison clinique des patients atteints de dystrophinopathies et de LGMD2C.....	103

RESUME

La gamma-sarcoglycanopathie est une dystrophie musculaire des ceintures autosomique récessive de type 2C (LGMD2C), elle se manifeste sur le plan clinique essentiellement par un déficit et une atrophie des muscles des ceintures pelvienne et scapulaire. Elle est secondaire à un déficit de la protéine γ -sarcoglycane. C'est la plus fréquente des sarcoglycanopathies dans les populations d'Afrique du Nord, en raison de la large diffusion d'une mutation à effet fondateur (c.525delT) situé au niveau de l'exon 6 du gène SGCG. La LGMD2C ressemble cliniquement à la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD), qui est la plus fréquente des dystrophies musculaires. Une analyse génétique est indispensable pour différencier les deux formes.

Nous rapportons une étude clinique et génétique portant sur 76 patients appartenant à 65 familles avec un phénotype de dystrophie musculaire des ceintures à transmission récessive (LGMD R) toutes issus de l'Est Algérien.

Les objectifs de notre étude étaient de rapporter les caractéristiques cliniques et génétiques des patients atteints de LGMD2C observés dans l'Est Algérien et de développer une stratégie de diagnostic moléculaire adaptée à notre population de patients atteints de LGMD R.

Nous avons d'abord recherché la mutation c.525delT chez tous les patients, ensuite, nous avons analysé les délétions les plus fréquentes du gène DMD chez les familles ayant uniquement des garçons atteints et non porteurs de la mutation c.525delT, et enfin nous avons analysé les six autres exons codants du gène SGCG chez le reste des patients.

Dix-neuf patients (25%) étaient des LGMD2C, avec l'identification de deux mutations causales majoritairement à l'état homozygote: la mutation c.525delT déjà connue et la c.87dupT qui n'a jamais été décrite auparavant en Afrique du Nord. La présentation clinique des patients était très similaire quel que soit le génotype. L'analyse du gène DMD a révélé 26% de dystrophinopathies (20 patients) avec 12 différents types de délétions d'exons.

Nos données suggèrent qu'une stratégie de diagnostic très simple constitué de 2 PCR spécifiques d'allèles et de PCR multiplexe, nous permettra de diagnostiquer la moitié des patients présentant une LGMD R dans l'Est Algérien.

Mots clés : LGMD2C, c.525delT, SGCG, DMD, stratégie de diagnostic.

ABSTRACT

Limb-girdle muscular dystrophy type 2C (LGMD2C) is described as one of the severe forms of childhood-onset muscular dystrophy, it manifests mainly by a deficiency and atrophy of the pelvic and scapular muscles, it is caused by deficiency in the γ -sarcoglycan protein. The distribution of founder mutation c.525delT of *SGCG* gene in the North of Africa has a prominent effect on the prevalence of the LGMD2C in these populations. It is also known that the LGMD2C resembles clinically to the dystrophinopathies which are the most common muscular dystrophies, the genetic analysis is essential to differentiate the two forms.

We report a clinical and genetic study of a large series of 76 Algerian patients from 65 unrelated families from eastern Algeria who presented with a recessive limb-girdle muscular dystrophy (LGMD R).

The objectives of the study was to report the clinical and genetic characteristics of patients with LGMD2C observed in East of Algeria and to develop a strategy of molecular diagnosis adapted to our population of patients with LGMD R.

We first searched for c.525delT mutation in all the patients with LGMD R. Then, we analyzed the *DMD* gene in those families that only boys were affected and negative for c.525delT mutation. Finally we completed the analysis of the all *SGCG* gene.

Nineteen patients (25%) were shown to carry *SGCG* mutations. Only 2 causative mutations were identified in the population, mostly at the homozygous state: the well-known c.525delT and the c.87dupT never described in North of Africa. The clinical presentation of these patients was very similar regardless of the genotype. We further analyzed the negative families, for the *DMD* gene and identified 26% (20 patients) of dystrophinopathies with 12 distinctive patterns of deletion were identified with a majority affecting the central region of dystrophin.

Our data suggest that a very simple molecular screening consisting of 2 allele-specific PCR and a multiplex PCR can diagnose half of the patients with LGMD R in the East of Algeria.

Keywords: LGMD2C, c.525delT, *SGCG*, *DMD*, diagnostic strategy.

ملخص :

La gamma-sarcoglycanopathie هو مرض ضمور عضلات الأحزمة من الصنف 2C (LGMD2C)، يظهر أساسا في شكل عجز وضمور عضلات أحزمة الحوض و الكتف، الناتج عن تعطيل في البروتين Y-sarcoglycane. ان هذا المرض هو الاكثر شيوعا في مجموعة les sarcoglycanopathies لدى شعوب شمال افريقيا، بسبب الانتشار الواسع لطفرة ذات تأثير مؤسس (c.del525T) في الإكسون 6 للجين SGCG.

LGMD2C تشبه سريريا الضمور العضلي المسمى Duchenne، عديد من المرضى محتملين ان يكونوا LGMD2C يمكن ان يتم تشخيصهم سريريا DMD، وبالتالي التحليل الجيني ضروري من أجل التمييز بين النوعين.

ننقل دراسة سريرية و وراثية اجريت على 76 مريض من 65 عائلة لديهم صفة متنحية لضمور عضلات الأحزمة (LGMD R)، كلهم من الشرق الجزائري.

تهدف هذه الدراسة الى وصف الخصائص السريرية والجينية للمرضى LGMD2C و اقتراح استراتيجية تشخيص جيني ملائم لهذا المرض في بلادنا.

لقد بحثنا في بادئ الامر عن الطفرة c.525delT عند كل المرضى، ثم حللنا بعد ذلك الجين DMD بحثنا عن الحذف الأكثر شيوعا عند العائلات التي ذكورهم وحدهم مصابون ونتائجهم سلبية للطفرة c.525delT واخيرا قمنا بتحليل الإكسونات الستة الدالة للجين SGCG للعائلات التي جاءت نتائجها سلبية في الفحصين السابقين.

تسعة عشرة شخصا من مرضانا (25%) كانوا LGMD2C، نتيجة طفرتين كانتا عموما في الحالة المتماثلة (homozygotes): الطفرة c.525delT المعروفة و c.87dupT التي لم توصف في شمال افريقيا من قبل، النمط الظاهري للمرضى LGMD2C كان متشابه مهما يكن النمط الجيني.

بين لنا تحليل جين DMD بان 20 مريض (26%) كانوا مصابين بداء الضمور العضلي المسمى dystrophinopathies مع 12 صنفا مختلفا لحذف الإكسونات. لا يوجد فرق كبير في النمط الظاهري للمجموعتين LGMD2C و dystrophinopathies و لكن لوحظت بعض الصفات في مجموعة أكثر من الأخرى.

تشير البيانات بان استراتيجية تشخيص جد بسيطة مكونة من 2 PCR spécifiques d'allèles و من PCR multiplexe، تسمح لنا بتشخيص نصف عدد المرضى الذين يعانون من LGMD R في الشرق الجزائري.

كلمات رئيسية: LGMD2C، c.525delT، SGCG، DMD، استراتيجية تشخيص .

INTRODUCTION

Introduction

Les dystrophies musculaires font référence à un groupe de maladies musculaires héréditaires (Hoffman et al., 1987). La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est la forme la plus fréquente des dystrophies musculaires presque partout dans le monde (TOPALOGLU, 2013). Elle débute précocement durant la petite enfance et se manifeste par un retard du développement moteur et musculaire, l'issue fatal à l'adolescence est généralement inévitable (Tayeb, 2010).

La DMD et sa forme bénigne BMD sont aussi appelées dystrophinopathies et sont toutes les deux causées par des mutations dans le gène DMD situé en Xp21 (Potnis-Lele, 2012). Le gène DMD est le plus grand gène humain connu à ce jour, il code pour la dystrophine (Tinsley et al., 1993). Les délétions et duplications intragéniques représentent ensemble plus de deux tiers des mutations conduisant aux dystrophinopathies (Wang et al., 2008).

Les dystrophies musculaires des ceintures (Limb Girdle Muscular Dystrophy ou LGMD) constituent un sous-groupe des dystrophies musculaires. Ce sont des maladies génétiques que l'on distingue selon leur mode de transmission, autosomique dominant (LGMD1) ou autosomique récessif (LGMD2) (TOPALOGLU, 2013). Les sarcoglycanopathies (LGMD2C-F) qui font partie des formes autosomiques récessives, ressemblent cliniquement aux dystrophinopathies mais avec généralement une présentation moins sévère (Solé, 2010), elles sont dues à des mutations dans les gènes codants respectivement pour γ , α , β et δ -sarcoglycane (Vermeer et al., 2004).

En Algérie, selon une étude menée par Nouioua et collaborateurs (Nouioua, 2013), les dystrophinopathies constituaient 46.7% des patients, suivi des LGMD2C avec une fréquence de 30%. Des études antérieures ont indiqué que la LGMD2C ou γ -sarcoglycanopathie est la forme de sarcoglycanopathie la plus fréquente en Afrique du Nord (Ben Hamida et al., 1996), et chez les Tziganes vivant en Europe (Lasa et al., 1998). Dans certaines contrées, comme la Tunisie, Le Maroc ou l'Algérie, elles peuvent même représenter jusqu'à la moitié des cas de dystrophie musculaire autosomique récessive (SONAN-DOUAYOUA et al., 2007). Cette fréquence élevée est généralement due à une large diffusion d'une mutation fondatrice, la c.525delT, dans l'exon 6 du gène SGCG (Khadilkar et al., 2009). La mutation del525T a été initialement mise en évidence à l'état homozygote chez des enfants ou adolescents du Maghreb présentant une forme de myopathie autosomique récessive qualifiée de Duchenne-like (Ben Hamida et al., 1983).

La LGMD2C est due à des mutations dans le gène codant pour la protéine γ -sarcoglycane (SGCG) situé sur le chromosome 13q12, la γ -sarcoglycane est une protéine de 35 kDa et l'une des composantes du complexe dystrophine-glycoprotéines (DGC) (Trabelsi et al., 2008). Le rôle exact de la γ -sarcoglycane n'est pas bien connu, mais il semblerait qu'elle relie le sarcolemme à la matrice extracellulaire afin de préserver la stabilisation du complexe DGC, le déficit de la γ -sarcoglycane s'accompagne généralement de l'absence complète ou partielle des autres sarcoglycanes, ce qui entraînerait une instabilité du sarcolemme lors de la contraction musculaire (White et al., 2005).

La LGMD2C se traduit par une faiblesse musculaire progressive en début d'enfance et la moitié de ces patients perdent la marche à l'âge de 12 ans. L'hypertrophie des mollets et l'hyperlordose sont communes. Sur la base de ces résultats cliniques, cette pathologie est décrite comme une dystrophie musculaire autosomique récessive sévère de l'enfance ou comme une dystrophie musculaire autosomique récessive Duchenne-like (El Kerch et al., 2014).

Il n'existe pas de traitement définitif pour la LGMD2C. Cependant, la gestion de la maladie est importante afin de prolonger la survie et d'améliorer la qualité de vie des patients, elle comprend une thérapie physique et des exercices d'étirement pour promouvoir la mobilité et prévenir les contractures, le contrôle du poids pour éviter l'obésité, la chirurgie des complications orthopédiques, l'utilisation d'aides mécaniques et respiratoires pour aider à la marche, la mobilité et la respiration. La surveillance de la cardiomyopathie pour les atteintes cardiaques et le soutien affectif sont également nécessaires (Diniz et al., 2014).

Le diagnostic différentiel de la LGMD2C se fait avec les dystrophinopathies. Le mode de transmission est considéré comme un critère majeur de différenciation entre ces deux formes. Toutefois, chez les cas sporadiques masculins, il est impossible de déterminer la LGMD2C des dystrophinopathies en se basant seulement sur les critères cliniques (Okizuka et al., 2010). La différenciation clinique entre ces deux formes est considérée comme un problème majeur dans la pratique clinique des maladies neuromusculaires. L'immunohistochimie sur biopsies musculaire et/ou le diagnostic génétique sont obligatoires pour établir un diagnostic définitif.

Au cours de notre travail, nous avons étudié les caractéristiques cliniques et génétiques de 76 patients avec un phénotype de dystrophie musculaire des ceintures à transmission récessive (LGMD R) issus de 65 familles de l'Est Algérien.

Les objectifs de l'étude étaient les suivants :

- 1-Rapporter les caractéristiques cliniques et génétiques des patients atteints de LGMD2C observés dans l'Est Algérien.
- 2-Developper une stratégie de diagnostic moléculaire adaptée à notre population de patients atteints de LGMD R.

L'étude a été approuvée par le conseil scientifique de l'université de Constantine 1 et par le comité scientifique du laboratoire de Biologie et Génétique Moléculaire de la faculté de médecine, Université Constantine 3.

CHAPITRE. I

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

LES DYSTROPHIES MUSCULAIRES DES CEINTURES (LGMD): SARCOGLYCANOPATHIES

I. Historique et classification actuelle

Les premières descriptions de myopathie des ceintures remontent à la fin du 19^e siècle. Leyden fut le premier à décrire, en 1876, une forme de dystrophie musculaire plus bénigne que la myopathie de Duchenne. Dans la première moitié du 20^e siècle, plusieurs tentatives de classification se sont succédé et le concept de myopathie des ceintures a été fortement débattu. Il a été attribué à William Erb les premières descriptions cliniques et histologiques de l'authentique myopathie des ceintures. Après la seconde guerre mondiale, le diagnostic des pathologies neuromusculaires connaît un nouvel essor grâce au développement des techniques d'électrophysiologie et surtout de microscope optique puis électronique. C'est Stevenson qui introduisit, en 1953, le terme « LGMD » à partir d'une série de 51 familles Irlandaises (Solé, 2010).

À cette époque, Walton et Natrass popularisent le concept dans leur classification des maladies neuromusculaires. Celle-ci prend en compte, pour la première fois en matière de dystrophies musculaires, le mode supposé de transmission héréditaire. Dans leur définition de myopathie des ceintures, les auteurs retiennent alors :

- un début relativement tardif de la maladie au cours de la première ou deuxième décennie.
- une atteinte déficitaire des muscles des ceintures pelvienne et scapulaire.
- une progression relativement lente, avec néanmoins quelques exceptions.
- un mode de transmission autosomique récessif.

Le mérite de Walton et Natrass est d'individualiser cet ensemble vis-à-vis de la maladie de Duchenne dont on découvre à l'époque qu'elle est liée au chromosome X, dont le caractère autosomique dominant est enfin clairement établi. Une lecture attentive permettait aussi d'établir, pour un clinicien, le lien direct entre ce groupe de myopathie des ceintures et les premières descriptions d'Erb concernant une forme juvénile de dystrophie musculaire qu'il publie en 1884.

Parce que les critères cliniques étaient dans l'ensemble peu discriminants, beaucoup de patients neuromusculaires vont se voir attribuer à tort un diagnostic. Les progrès en matière

d'explorations (électrophysiologiques, morphologiques ou biochimiques) ou de nosologie (c'est l'époque où l'on découvre les myopathies congénitales et les myopathies métaboliques), permettront ensuite de redresser les erreurs les plus grossières. La myopathie des ceintures était devenue, selon Michel Fardeau, un diagnostic « fourretout », assurément commode en pratique clinique mais sans spécificité aucune et souvent entaché d'erreurs. Il faut attendre les années 1980 et les succès probants du clonage positionnel pour revisiter cet ensemble de pathologies et proposer une nouvelle nomenclature. La découverte de la dystrophine dans la myopathie de Duchenne en 1987 reste la pierre angulaire de toute la saga moléculaire des dystrophies musculaires progressives. Grâce à une approche intégrée mêlant à la fois techniques de cartographie génétique et dissection moléculaire au niveau biochimique, d'autres protéines liées à la dystrophine et responsables de dystrophies musculaires sont rapidement identifiées. Les études de cartographie vont s'effectuer sur des groupes de patients rapportés dans la littérature et caractérisés par leur forte endogamie. Qu'il s'agisse des communautés des Petits Blancs de l'île de la Réunion, des Amishs de l'Indiana, des Mémonites américains ou des myopathes tunisiens du Maghreb, il y avait un vrai terreau pour la « génétique inverse » qui venait de remporter ses premiers succès. Parallèlement, les équipes de Campbell aux États-Unis et d'Ozawa au Japon disséquaient le complexe protéique lié à la dystrophine et proposaient autant de gènes candidats que de nouvelles protéines.

Il est vite apparu que les dystrophies des ceintures étaient en fait beaucoup plus hétérogènes que prévu, tant cliniquement que génétiquement. Une nomenclature destinée à faciliter les études génétiques fut proposée lors d'un séminaire de l'European Neuromuscular Centre (ENMC) en 1995. On y faisait notamment référence au mode de transmission (avec le chiffre « 1 » pour les formes autosomiques dominantes et le chiffre « 2 » pour les formes autosomiques récessives) et au locus correspondant classé par ordre alphabétique et chronologique. C'est ainsi que la forme commune aux Amishs et aux Réunionnais, par exemple, devint LGMD 2A, car autosomique récessive, « 2 », et cartographiée en premier sur le chromosome 15. Cette tentative de classification a été beaucoup critiquée car elle prenait peu en compte les disparités cliniques déjà établies ou celles qui restaient à établir entre chaque groupe. De ce fait, elle était peu opératoire pour la plupart des cliniciens, surtout les non spécialistes. Depuis, un effort certain est fait pour revisiter la clinique de chacune des sous-entités et élaborer des critères diagnostiques plus

sélectifs. C'est l'enjeu de ce qu'il est commun d'appeler la « médecine inverse », un mouvement qui n'est d'ailleurs pas spécifique aux dystrophies musculaires et qui vise à redéfinir les critères cliniques après la phase initiale de découverte des gènes morbides.

En l'absence de pistes tangibles pour rendre compte de la physiopathologie de ces affections, des interrogations demeurent, plusieurs approches ont été proposées : la clinique permet de différencier trois ou quatre grandes sortes de phénotypes (Duchenne-Becker, Erb/Réunionnais, Emery-Dreifuss). La classification protéique est intéressante mais devient de moins en moins pertinente à mesure que la liste des protéines incriminées s'allonge (calpaïnopathies, sarcoglycanopathies, etc). Les tentatives de classification par mécanisme physiopathologique supposé se heurtent à l'absence de rôle précis dévolu à chaque protéine ou chaque groupe de protéines. Si l'on peut admettre par exemple une certaine logique à regrouper les protéines du complexe liées à la dystrophine ou tout simplement du sarcolemme. Un travail conséquent attendait donc les chercheurs et les cliniciens pour les identifier d'une part, mais aussi pour essayer de comprendre leur interaction (Kaplan et al., 1996).

Les progrès de la biologie moléculaire ont permis d'individualiser les différentes dystrophies des ceintures et de clarifier en partie leur hétérogénéité. Ces progrès moléculaire ont rendu nécessaire l'établissement d'une classification. En 1995, une définition de travail et une classification des dystrophies des ceintures ont été proposées. Les dystrophies des ceintures se traduisent par un déficit moteur proximal, épargnant les muscles distaux, faciaux et oculomoteurs à la phase précoce de la pathologie et pour lequel la biopsie individualise des lésions dystrophiques. La classification repose sur le mode de transmission : LGMD1 pour les formes autosomiques dominantes et LGMD2 pour les formes autosomiques récessives. Chaque pathologie est ensuite désignée par une lettre unique, attribuée principalement selon l'ordre chronologique des publications. La classification actualisée des dystrophies musculaires des ceintures est résumée dans le tableau 1 (Kaplan, 2011).

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 1: Classification des dystrophies musculaires des ceintures (Murphy and Straub, 2015).

Nom	Localisation	Gène	Protéine	Références
Dystrophies musculaires des ceintures, mode dominant				
LGMD1A	5q22-q34	TTTD	Myotiline	Speer et al. (1992) Hauser et al. (2000)
LGMD1B	1q11-21	LMNA	Lamine A/C	van der Koo et al. (1997) Muchir et al. (2000) Worman and Bonne. (2007)
LGMD1C	3p25	CAV3	Cavéoline 3	Minetti et al. (1998) McNally et al. (1998)
LGMD1D	7q36	DNAJB6	HSP-40 homologue, subfamily B, number 6	Speer et al. (1999) Sarparanta et al. (2011)
LGMD1E	6q23	?		Messina et al. (1997)
LGMD1F	7q32	?		Palenzuela et al. (2003)
LGMD1G	4q21	?		Starling et al. (2005)
LGMD1H	3p23-p25	?		Bisceglia et al. (2010)
Dystrophies musculaires des ceintures, mode récessif				
LGMD2A	15q15.1-q21.1	CAPN3	Calpaine 3	Beckmann et al. (1991) Young et al. (1992), Richard et al. (1995,1997)
LGMD2B	2p13	DYSF	Dysferline	Bashir et al. (1994) Bashir et al. (1998) Liu et al. (1998)
LGMD2C	13q12	SGCG	γ-sarcoglycane	Ben Othmane et al. (1992) Azibi et al. (1993) Noguchi et al. (1995) McNally et al. (1996) Piccolo et al. (1996)
LGMD2D	17q12-q21.33	SGCA	α-sarcoglycane	Roberds et al. (1994) Piccolo et al. (1995) Passos-Bueno et al. (1995) Ljunggren et al. (1995)

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

LGMD2E	4q12	SGCB	β -sarcoglycane	Carrie et al. (1997) Lim et al. (1995) Bonnemann et al. (1995) Bonnemann et al. (1996)
LGMD2F	5q33-q34	SGCD	δ -sarcoglycane	Passos-Bueno et al. (1996) Nigro et al. (1996)
LGMD2G	17q11-q34.1	TCAP	Téléthonine	Moreira et al. (1997) Moreira et al. (2000)
LGMD2H	9q31-q34.1	TRIM32	TRIM32	Weiler et al. (1998) Frosk et al. (2002)
LGMD2I	19q13.3	FKRP	Fukutin related protein	Driss et al. (2000) Brockington et al. (2001a)
LGMD2J	2q	TTN	Titine	Hackman et al. (2003)
LGMD2K	9q34	POMT1	POMT1	Balci et al. (2005) D'Amico et al. (2006)
LGMD2L	11p13	ANO5	Anoctamine 5	Jarry et al. (2007) Bolduc et al. (2008) 2010), Hicks et al. (2011)
LGMD2M	9q31	FKTN	Fukutine	Murakami et al. (2006) Godfrey et al. (2006)
LGMD2N	19q13.3	POMT2	POMT2	Biancheri et al. (2007)
LGMD2O	1p34-p33	POMTGNT1	Proteine O-linked-mannose beta-1,2-N acetylglucosaminyl transferase	Godfrey et al. (2007) Clement et al. (2008)
LGMD2P	3p21	DAG1	Dystroglycan	Dincer et al. (2003) Hara et al. (2011)
LGMD2Q	8q24	PLEC	Plectine	Gundesli et al. (2010)
LGMD2R	2q35	DES	Desmin	Cetin , et al. (2013)
LGMD2S	4q35	TRAPPC11	Transport protein particle complex 11	Bogershausen et al. (2013)
LGMD2T	3p21	GMPPB	GDP-mannose pyrophosphorylase B	Ning et al. (2000) Carss et al. (2013)
LGMD2U	7p21	ISPD	Isoprenoid synthase domain	Willer et al. (2012)
LGMD2V	17q25	GAA	Alpha-1,4 glucosidase	Preisler et al. (2013)
LGMD2W	2q14	LIMS2	Lim and senescent cell antigen-like domains 2	Legate et al. (2006) Chardon et al. (2015)

II. Epidémiologie

Les estimations épidémiologiques des LGMD sont difficiles à comparer historiquement et géographiquement. Les estimations les plus anciennes sont entravées par des critères de diagnostic qui étaient imprécis à l'époque et par la restriction la plupart du temps à des cas d'apparition à l'âge adulte.

En raison des mutations fondatrices la prévalence des LGMD peut être beaucoup plus élevée dans certaines populations, comme la population d'Afrique du Nord, certains isolats Amish, les Huttérites au Canada et également les populations juives Libyennes en Israël. En utilisant des critères diagnostiques spécifiques, Van der Kooi et associés, ont calculé une prévalence globale de $8,1 \times 10^{-4}$ et de $5,7 \times 10^{-4}$ pour les cas autosomiques récessifs et sporadiques respectivement. Les LGMD autosomiques récessives sont beaucoup plus fréquents par rapport aux formes autosomiques dominantes (Royden Jones et al., 2003).

III. Présentation clinique

Les LGMD sont génétiquement et cliniquement hétérogènes et sont caractérisées par une atrophie et une faiblesse progressive des muscles proximaux des ceintures pelvienne et scapulaire et une élévation du taux sérique des créatines kinases. Sur le plan histologique, des profils de nécrose, de régénération avec centronucléation et d'infiltrations macrophagiques, caractéristiques de la dégénérescence musculaire, sont observables (Fardeau et al., 1996).

Un grand nombre de gènes responsables de ces dystrophies ont été identifiés. Les protéines correspondantes appartiennent à différents groupes en fonction de leur localisation subcellulaire (noyau, cytoplasme, cytosquelette et sarcolemme) et de leur fonction. Plus de 30 gènes ont été identifiés pour différents types de dystrophies musculaires. Beaucoup de dystrophies sont maintenant diagnostiqués par des tests génétiques.

Les dystrophies musculaires des ceintures peuvent affecter des personnes de tous âges, bien que certaines formes précoces apparaissent dans l'enfance, d'autres peuvent apparaître plus tard. La dystrophie musculaire de Duchenne est la forme la plus répandue chez les enfants et la dystrophie myotonique de type 1 est la forme la plus courante qui touche les adultes.

Les mutations peuvent se développer «de novo» et le manque d'antécédents familiaux de dystrophie musculaire n'exclut pas la possibilité d'en être atteints. Les deux types de transmission des gènes défectueux qui cause les dystrophies musculaires des ceintures à la descendance sont les suivants:

-autosomique récessif: pour ce type de transmission, les deux parents doivent transmettre le gène défectueux, afin que les deux copies du gène coupable soient anormaux. Aucun des parents ne portent de symptôme, mais chacun de leur progéniture, que ce soit garçon ou fille, aura 25% de malchance de développer la maladie.

-autosomique dominant: dans ce cas, une seule copie du gène anormal est suffisant pour développer une dystrophie musculaire. Ce gène défectueux peut provenir de l'un des parents, et il peut affecter les deux sexes. Chaque enfant d'un parent affecté aura 50% de chance de développer la maladie. Pour ce type de transmission, la gravité du phénotype peut varier considérablement. Il peut être modéré mais peut aussi être sévère.

L'orientation du diagnostic entre ces diverses formes se base sur plusieurs paramètres: hérédité, présentation clinique, données anatomopathologiques, étude des protéines musculaires sur lame et en Western blot (Cleveland Clinic, 2015).

IV. Diagnostics clinique et génétique

Pour parvenir au diagnostic étiologique, il est essentiel de réunir les éléments cliniques et paracliniques. Généralement, le diagnostic de LGMD se fait si une personne a principalement une faiblesse musculaire des ceintures, des niveaux de créatine kinase élevés et des changements dystrophiques observés sur biopsie musculaire.

Une biopsie musculaire peut aider à révéler le type de LGMD grâce à des techniques d'immunohistochimie et de western blot. Des colorations spéciales peuvent être utilisées pour déterminer l'absence ou la présence de protéines. Le résultat d'une protéine absente ou réduite oriente vers les gènes candidats à l'étude génétique.

Comme la dystrophine est une partie importante du complexe dystrophine-sarcoglycanes, il est important d'analyser les mutations dans le gène de la dystrophine qui peuvent être la cause de la dystrophie musculaire. Enfin, l'imagerie musculaire devient un outil utile et non invasif dans le diagnostic de LGMD.

Parce que les différentes formes de LGMD peuvent être cliniquement indiscernables, des tests avec un panel de gènes est la manière la plus efficace d'obtenir une confirmation génétique (Figure 1).

Les familles sans diagnostic confirmé génétiquement peuvent être des candidats idéaux pour le séquençage de tout l'exome. Comme avec toutes les maladies du muscle, des mutations privées et des variantes de signification inconnue peuvent compliquer les résultats (Goldman, 2014).

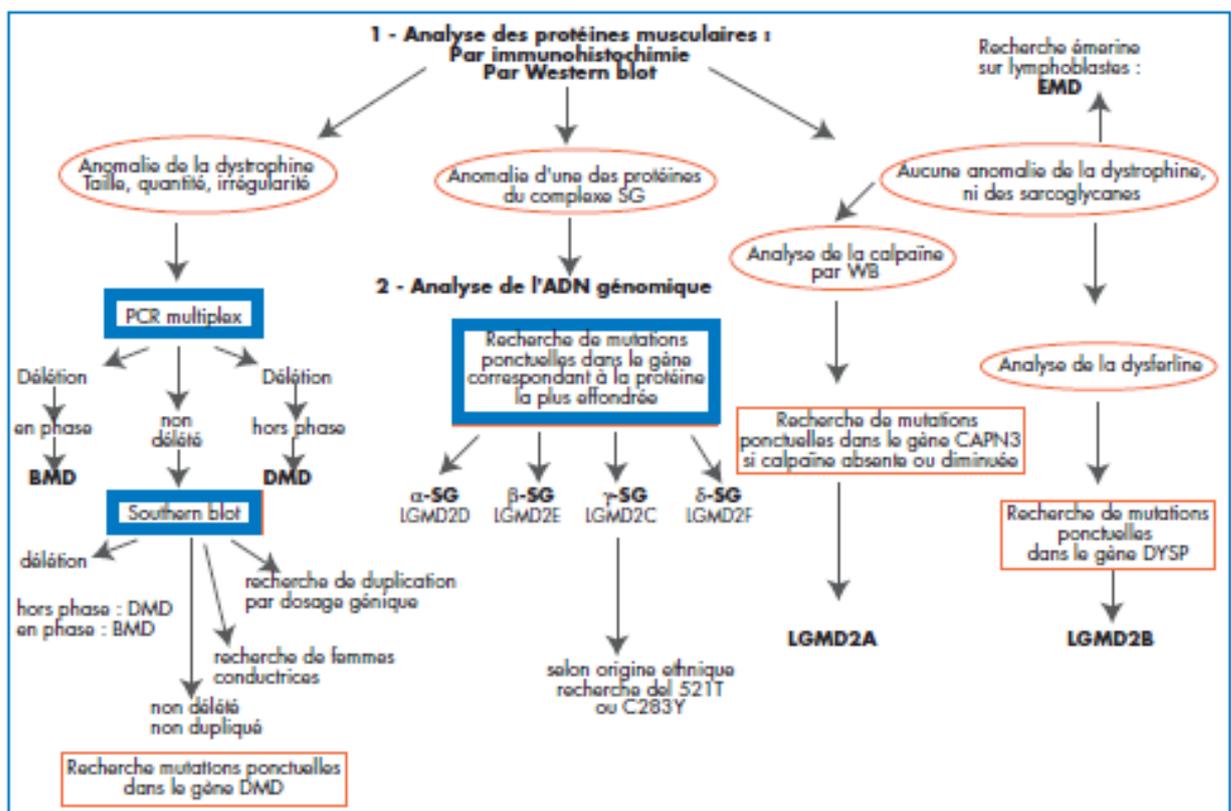


Figure. 1: Stratégie de diagnostic étiologique des dystrophies musculaires récessives à partir d'une biopsie musculaire (Leturcq and Kalpan, 2000).

V. Les sarcoglycanopathies: aspects cliniques et bases moléculaires

Les sarcoglycanopathies correspondent à des pathologies touchant les quatre gènes codant pour les sarcoglycanes alpha, bêta, delta et gamma, et correspondent depuis 1995 aux abréviations suivantes : LGMD 2C, 2D, 2E et 2F. On les retrouve aussi, et de manière plus récente, sous le terme SGCA, B, C ou D (pour sarcoglycanopathies de type A, B, C ou D). Elles sont excessivement proches sur le plan clinique, avec quelques variantes sur le plan évolutif. À la différence des dystrophinopathies, les cas avec cardiomyopathies avérées sont rares. D'un point de vue clinique il est quasi impossible de les différencier individuellement.

Seule l'approche mixte combinant l'immunocytochimie et l'analyse mutationnelle est susceptible d'y parvenir (Bushby, 1999).

Plusieurs auteurs avaient déjà rapporté des cas de myopathie de Duchenne-like chez des enfants de sexe féminin. Un neuropédiatre au Soudan, y consacre même sa thèse de médecine à partir de cas autochtones (Salih et al., 1983). C'est à Ben Hamida et collaborateurs (Ben Hamida et al., 1983), que l'on doit au début des années 1980 la description clinique de ce qui fut appelé à l'époque severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy (SCARMD). Quelques années plus tard, il apparaissait que la dystrophine était qualitativement et quantitativement normale dans le muscle de ces patients et une autre protéine devait être en cause. En fait, ce n'est pas une mais deux autres protéines qui ont été impliquées. La première fut identifiée grâce aux travaux des biochimistes qui étaient en train de disséquer parallèlement le complexe protéique lié à la dystrophine. Cette première protéine connut plusieurs synonymes: DAG50, 50kD, adhaline, avant de prendre le nom définitif de sarcoglycane alpha dans la période récente. Le terme « adhaline » fut longtemps employé et provenait du mot arabe signifiant « muscle », un clin d'œil destiné à rendre compte de la grande prévalence de cette myopathie au Maghreb.

La deuxième protéine en cause découla de la première, puisqu'il s'agissait d'une autre sarcoglycane, la gamma-sarcoglycane, appelée aussi DAG35 ou 35kD par référence à son poids moléculaire. Il fut ainsi possible de distinguer les adhalinopathies primaires (liées génétiquement au chromosome 17 et donc au gène codant pour la sarcoglycane alpha) des adhalinopathies secondaires (liées au chromosome 13 et donc au gène codant pour la sarcoglycane gamma). Ultérieurement deux autres sarcoglycanes (bêta et delta) et des

pathologies génétiques correspondantes ont été découvertes (Kaplan, 1992). Progressivement la famille s'est encore élargie avec la découverte de deux autres sarcoglycanes epsilon (Ettinger et al., 1997) et zêta sarcoglycanes (Wheeler et al., 2002).

Après la première description de sarcoglycanopathie primaire dans une famille française (Romero et al., 1994), un grand nombre de patients de différents pays ont été rapportés dans lesquels une variété de mutations génétiques et des phénotypes cliniques hétérogènes ont été trouvés. Les études génétiques et épidémiologiques des sarcoglycanopathies restent difficiles à réaliser en raison de plusieurs facteurs ; ces maladies sont rares, les méthodes utilisées pour détecter de petites mutations sont récentes et la collecte ainsi que le dépistage de tous les cas dans une zone géographique définie prend du temps.

La fréquence relative des différentes sarcoglycanopathies se distingue dans le monde entier. Moreira et collaborateurs rapportent que dans 48 familles brésiliennes et chez des cas sporadiques suspectés d'avoir une sarcoglycanopathie, des mutations ont pu être identifiées dans les deux allèles chez 35 familles : SGCA (14 familles soit 40%), SGCB (8 familles soit 23%), SGCG (8 familles soit 23%) et SGCD (5 familles soit 14%) (Moreira et al., 2003).

-En Europe et en Amérique du Nord la grande majorité des patients avec un déficit en protéines sarcoglycanes présentent des mutations du gène SGCA (Fanin et al., 1997).

-Les mutations du gène SGCG se trouvent dans presque 100% des sarcoglycanopathies en Afrique du Nord (Ben Othmane et al., 1995).

-Les mutations du gène SGCD semblent être rares partout dans le monde (Fanin et al., 1997).

Plusieurs mutations ont probablement été introduites au Brésil par ascendances africaines, y compris pour le gène SGCG (la mutation c.525delT) (McNally et al., 1996b) et le gène SGCD (la mutation c.656delC) (Moreira et al., 2003), tous les patients dans ces deux sous-groupes partagent un haplotype commun. Pour le gène SGCA, la mutation c.229C> T est associé à au moins trois haplotypes distincts au Brésil (Bueno et al., 1995).

V.1 Bases moléculaires des sarcoglycanopathies

V.1.1 Le complexe dystrophine-glycoprotéine

La dystrophine est une grande protéine du cytosquelette, elle est codée par le gène DMD qui est à ce jour le plus grand gène chez l'être humain, l'absence de cette protéine suite à des mutations dans le gène codant conduit à la myopathie de Duchenne (Wang et al., 2008). La dystrophine comporte un domaine de liaison à l'actine est qui est essentiel pour l'organisation de la membrane cellulaire associé à un complexe dystrophine-glycoprotéine (DGC). Le DGC est enrichi en costamères, qui sont spécialisés dans la liaison des structures cytosquelettique à la membrane plasmique et aux disques Z des myofibrilles périphériques.

Le DGC est composé de protéines membranaires structurellement organisés en 2 sous-complexes majeurs (Figure 2):

-Les sarcoglycanes (l' α -sarcoglycane (ou 50 DAG/A2, ou adhaline), la β -sarcoglycane (ou 43 DAG/ A3b), la γ -sarcoglycane (ou 35 DAG/A4), et la δ -sarcoglycane).

-Les dystroglycanes (l' α -dystroglycane ou 156 DAG, et la β -dystroglycane ou 43 DAG/A3a).

Beaucoup d'autres protéines sont associées au DGC au niveau du sarcolemme comme l' α -dystrobrevine, la nitric oxide synthase (nNOS), le sarcospane et les syntrophines. La présence de chacune de ces protéines est importante car elle implique un rôle de signalisation pour le DGC. Ce complexe joue un rôle central dans la liaison entre la matrice extracellulaire, via la laminine 2, et l'actine du cytosquelette, via la dystrophine (Lodish et al., 2005). Le DGC permet une stabilisation du sarcolemme pendant les phases de contraction et de relaxation et transmet à la matrice extracellulaire la force générée au niveau des sarcomères (Sandona and Betto, 2009).

Le déficit de l'un des composants de la DGC entraîne une nécrose des fibres musculaires, ce qui représente la principale cause de dystrophie musculaire progressive (Jung et al., 1996).

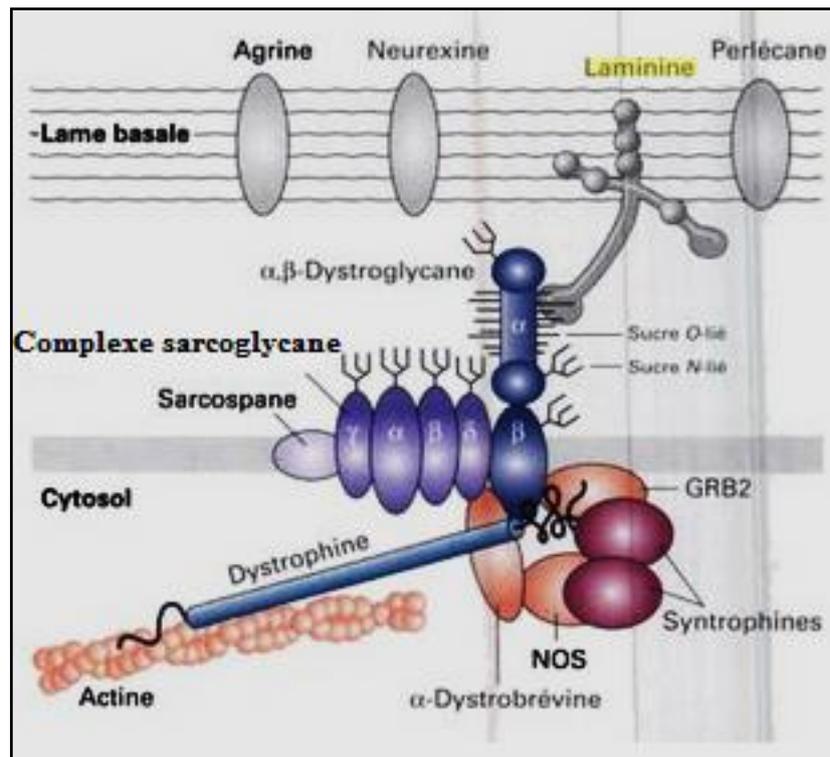


Figure. 2: Complexe dystrophine-glycoprotéine (DGC) dans les cellules du muscle squelettique (Lodish et al., 2005).

V.1.2 Description des sarcoglycanes

Les sarcoglycanes sont des glycoprotéines transmembranaires qui forment un sous-complexe majeur au sein du complexe multimérique (DGC) (Figure 3) dans la membrane cellulaire des muscles squelettique et cardiaque.

Le complexe sarcoglycane est composé de quatre glycoprotéines transmembranaires (α , β , γ , δ). Récemment, une autre glycoprotéine a été identifiée, il s'agit de l' ϵ -sarcoglycane (Ettinger et al., 1997), cette dernière présente une grande homologie avec l' α -sarcoglycane. Les sarcoglycanes sont liés ensemble par une interaction physique serrée de sorte qu'ils fonctionnent comme une structure unique. La zêta-sarcoglycane est la dernière protéine de la famille à avoir été identifiée (Wheeler et al., 2002). elle présente 57% et 55.7% d'acides aminés similaires avec la δ -sarcoglycane et la γ -sarcoglycane respectivement.

La dystrophine interagit avec la γ -sarcoglycane, alors que la δ -sarcoglycane est reliée avec le complexe dystroglycane. L'absence d'un des sarcoglycanes entraîne une instabilité du complexe sarcoglycanique et du DGC au niveau de la membrane cellulaire à l'origine de l'atteinte dégénérative musculaire (Fayssol et al., 2012).

Les sarcoglycanes n'ont aucune homologie avec d'autres protéines connues (ce qui suggère leur rôle important au cours de l'évolution), mais elles partagent certaines similitudes (elles ont un domaine transmembranaire unique, un petit domaine intracellulaire, un grand domaine extracellulaire et une masse moléculaire d'environ 35-50 KDa) et elles diffèrent dans la localisation de l'extrémité C-terminale qui est dans le côté extracellulaire pour l' α -sarcoglycane, alors que les β -, γ - et δ -sarcoglycanes ont l'extrémité C-terminale localisée dans le côté intracellulaire (Crosbie et al., 1999).

V.1.3 Assemblage des sarcoglycanes

Le complexe des sarcoglycanes est assemblé dans le réticulum endoplasmique. Pendant les années qui ont suivi la mise en évidence des sarcoglycanes α , β , γ , et δ , leur mécanisme d'assemblage en un complexe intégré au sarcolemme est resté très obscur. En 1998, des expériences préliminaires ont été réalisées par Holt & Campbell dans un système cellulaire hétérologue exprimant chacun des sarcoglycanes, séparément ou de manière concomitante. Ces travaux ont mis en évidence que la localisation des sarcoglycanes au sarcolemme dépend de la synthèse coordonnée et de l'assemblage des sous-unités α , β , γ , et δ en un complexe moléculaire. Holt & Campbell ont également démontré que l'assemblage du complexe des sarcoglycane requiert des copies normales de chacune des sous-unités (Holt and Campbell, 1998). Cependant, le travail de Crosbie *et coll.* a montré, à partir de biopsies de patients, que la présence d'une γ -sarcoglycane tronqué au niveau de son extrémité C-terminale est suffisante pour l'association avec les autres sarcoglycanes en un complexe localisé au sarcolemme, mais insuffisante pour empêcher le développement d'une dystrophie musculaire (Crosbie et al., 1999).

Des études publiées en 2004 et 2006 (Shi et al., 2004; Chen et al., 2006) ont permis d'approfondir la compréhension du processus d'assemblage du complexe des sarcoglycanes (Figure 3). Elles ont tout d'abord pu montrer que la β -sarcoglycane joue un rôle important dans l'initiation de l'assemblage du complexe des sarcoglycanes. La glycosylation du β -sarcoglycane et son association avec le δ -sarcoglycane est essentielle

pour que le complexe soit correctement localisé à la membrane. Ceci révèle que la formation du noyau structurel, β/δ -sarcoglycane, est une étape clé dans le processus d'assemblage des sarcoglycanes. Elle est suivie de la liaison du γ -sarcoglycane au noyau β/δ -sarcoglycane qui permet, dans une étape finale, d'incorporer l' α -sarcoglycane au complexe. La γ -sarcoglycane sert donc de lien pour connecter l' α -sarcoglycane au noyau β/δ -sarcoglycane (Shi et al., 2004).

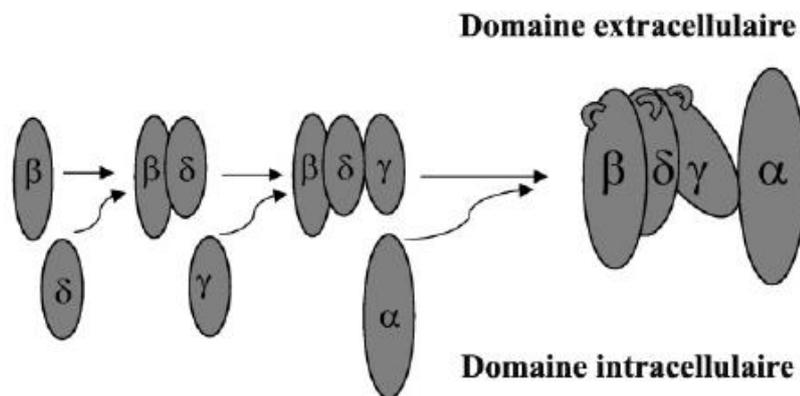


Figure. 3: Assemblage du complexe des sarcoglycanes (Shi et al., 2004).

* Les arches représentent les ponts disulfures dans les domaines extracellulaires de β -, γ - et δ -sarcoglycane.

V.1.4 Physiopathologie des sarcoglycanes

Par définition, les sarcoglycanopathies correspondent à des pathologies touchant les quatre gènes situés sur quatre chromosomes différents (respectivement 17q, 4q, 13q, 5q), codant pour les sarcoglycanes alpha, bêta, gamma et delta, et correspondent depuis 1995 aux abréviations suivantes : LGMD 2D, 2E, 2C et 2F, on les retrouve aussi, et de manière plus récente, sous le terme SGCA, B, G ou D. Elles sont dues à des mutations dans les gènes codant les α , β , γ et δ - sarcoglycanes (Noguchi et al., 1995; Roberds et al., 1994; Bönnemann et al., 1995; Lim et al., 1995; Nigro et al., 1996).

Deux des sarcoglycanes sont exprimées exclusivement dans le muscle cardiaque et squelettique (α et γ), alors que les deux autres (β et δ) sont plus ubiquitaires. Malgré plusieurs tentatives de mise à plat des interactions à l'intérieur de ce complexe, on connaît peu le rôle de chacun de ces éléments pris individuellement.

Les études de biopsies musculaires de patients donnent des informations importantes supplémentaires sur le complexe sarcoglycanes et sa contribution à l'organisation moléculaire du DGC. Les analyses de biopsies musculaires de patients atteints de sarcoglycanopathies ont montré que l'absence ou l'expression réduite d'une protéine sarcoglycane a des conséquences importantes, mais variable pour la stabilité des autres composants restants sur la membrane cellulaire.

En général, le phénotype le plus sévère cliniquement est observé chez les patients dont la protéine sarcoglycane impliqué est absente, un phénotype plus modéré est observé lorsque la protéine résiduelle est présente. Les premières études sur les patients atteints de sarcoglycanopathies ont rapporté que des mutations dans un gène de l'une des protéines sarcoglycanes conduisent à la diminution ou l'absence des autres sarcoglycanes, avec des conséquences non négligeables pour le DGC car il sert de lien entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette contractile. La mutation d'un gène sarcoglycane entraîne un problème d'assemblage et une altération de la fonction du complexe des sarcoglycanes au niveau du sarcolemme (Figure 4). Ceci a pour conséquence de rompre le lien entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette contractile (Lim and Campbell, 1998), entraînant la fragilisation de la membrane de la fibre musculaire et la déstabilisation du complexe DGC, provoquant l'afflux cytoplasmique incontrôlé des ions Ca^{2+} , ce qui entraîne une cascade d'événements se terminant par la mort cellulaire (Angelini and Fanin, 2016).

Le dysfonctionnement du complexe sarcoglycanes est due à des sarcoglycanes mutantes soit incapables de se regrouper correctement dans le complexe DGC, soit pas correctement transportées du réticulum endoplasmique vers le sarcolemme et donc rapidement dégradées dans le cytoplasme. Cela est probablement dû à l'exigence que toutes les sarcoglycanes doivent s'associer et former un complexe avant la maturation et le relargage de ces dernières au sarcolemme (Holt and Campbell, 1998).

Il a été rapporté chez des patients atteints de sarcoglycanopathie, une diminution variable de la nNOS sarcolemmique, selon l'intégrité du complexe sarcoglycane, lorsque le complexe était totalement perdu, la nNOS était absente. L'absence de la nNOS sarcolemmale est des sarcoglycanopathies a toujours été associée à une dystrophie musculaire sévère et parfois aussi à une cardiomyopathie sévère, soutenant l'hypothèse que le défaut de nNOS pourrait contribuer à la progression de la maladie du muscle squelettique et cardiaque (Fanin et al., 2009).

-Chez des patients LGMD-2E et LGMD-2F, les défauts dans les gènes codant pour β - et δ -sarcoglycanes provoquent l'absence des quatre sarcoglycanes de la membrane plasmique et la réduction de la dystrophine et des dystroglycane.

-Chez les patients LGMD-2D, les défauts de l' α -sarcoglycane provoquent la perte secondaire de β et δ -sarcoglycanes et une forte réduction de la γ -sarcoglycane, qui peut être totalement absente chez les patients plus sévèrement touchés, la β -dystroglycane et la dystrophine sont réduites dans la plupart des cas.

-Chez les patients LGMD-2C déficients pour la protéine γ -sarcoglycane, des quantités infimes de résidus sarcoglycanes sont évidents à la membrane cellulaire. Cependant, il n'y a aucune réduction de la dystrophine.

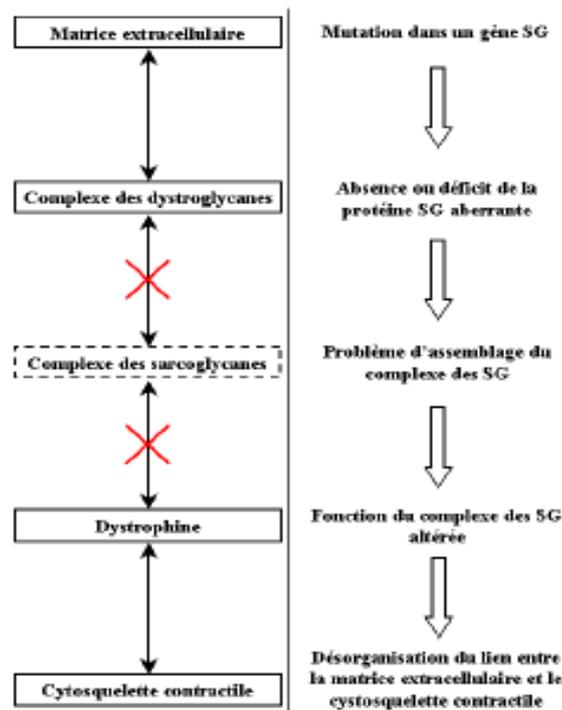


Figure. 4: Mécanisme de pathogénèse des dystrophies musculaires dues à un déficit en sarcoglycanes (Lim and Campbell, 1998).

V.2 Caractéristiques cliniques des sarcoglycanopathies

➤ α -sarcoglycanopathie (LGMD2D)

La LGMD2D se transmet de manière autosomique récessive et est causée par des mutations du gène SGCA localisé sur le chromosome 17q21 et codant pour l'alpha-sarcoglycane, une glycoprotéine associée à la dystrophine. La sévérité du phénotype est corrélée à l'importance du déficit musculaire en alpha-sarcoglycane (Angelini and Fanin, 2016). Un certain nombre de rapports d'études contiennent des informations variables et détaillées sur les caractéristiques cliniques des patients avec des cas génétiquement confirmés de α -sarcoglycanopathie. Le travail d'Eymard et ses collègues présente une analyse très complète à partir de laquelle un certain nombre de lignes directrices cliniques ont été établies (Eymard et al, 1997).

➤ γ -sarcoglycanopathie (LGMD2C)

Beaucoup moins de rapports d'études de patients atteints de γ -sarcoglycanopathie génétiquement confirmés sont disponibles. Bien que cette maladie soit mondialement distribuée, l'hétérogénéité génétique est connue pour exister en Afrique du Nord. Dans l'ensemble, les descriptions cliniques de γ -sarcoglycanopathie qui existent, ont tendance à être les mêmes décrites dans la présentation clinique de l' α -sarcoglycanopathie, mais le phénotype peut être plus sévère (de type Duchenne), avec une faiblesse proximale des membres inférieurs en début de pathologie, une hypertrophie des mollets fréquente, une perte de la marche entre 12 et 15 ans, des rétractions tendineuses sont fréquentes, une scoliose peut être observée, une variabilité de la gravité qui peut être intrafamiliale est rapportée, une prédominance de l'apparition à l'enfance avec généralement peu de complications cardiaques mais une insuffisance respiratoire très fréquente. L'intelligence est normale (Bushby, 1999).

➤ β -sarcoglycanopathie (LGMD2E)

La gravité clinique a été rapportée chez les patients atteints de β -sarcoglycanopathie génétiquement confirmés. Cette forme a été décrite chez des familles Amish aux Etats Unis porteurs d'une mutation privée faux-sens homozygote. Le déficit débute après l'âge de 5 ans par une atteinte proximale pelvienne puis scapulaire d'évolution lente (Bushby 1999).

➤ **δ -sarcoglycanopathie (LGMD2F).**

Il s'agit d'une forme très rare avec une évolution clinique très sévère (Moreira et al., 2003). L'âge de début varie de 4 à 10 ans, avec confinement au fauteuil roulant entre 9 et 16 ans et la mort peut survenir entre 9 et 19 ans. Ces patients peuvent être potentiellement à risque de développer des complications cardiaques (Bushby, 1999).

V.3 Corrélations phénotype/ génotype des sarcoglycanopathies

D'une manière générale, les sarcoglycanopathies partagent sur le plan clinique des traits qui les apparentent plutôt aux dystrophinopathies, comme l'hypertrophie des mollets, la fréquente macroglossie, l'atteinte musculaire proximale et peu sélective et l'élévation marquée de la créatine kinase. En revanche, l'atteinte respiratoire et cardiaque y est beaucoup moins prédominante. Quant au retard mental, il semble absent.

Il semble que les β , γ et δ -sarcoglycanopathies soient en règle générale sévères, avec un début dans l'enfance et un tableau de Duchenne ou de Becker sévère. Il faut cependant insister sur le fait que l'échantillon de patients analysés jusqu'à présent est encore restreint, se limitant aux cas les plus sévères.

En dehors de ces situations extrêmes, il est difficile d'attribuer un phénotype constant à une mutation particulière. Pour une même mutation homozygote, ou avec le même assortiment d'allèles en cas d'hétérozygotie composite, on observe des variations d'une famille à une autre, et dans une même fratrie. Ces variations, qui avaient déjà été soulignées dans les observations princeps des cliniciens, pourraient refléter l'intervention de gènes modificateurs (Kaplan et al., 1996).

V.3.1 Mutations et effet fondateur

Un grand nombre de mutations ont été identifiées dans les gènes des sarcoglycanes, notamment des mutations faux-sens et non-sens, des altérations d'épissage, ainsi que des délétions plus ou moins importantes. Toutes les mutations dans les gènes des sarcoglycanes identifiées jusqu'à aujourd'hui peuvent être consultées sur la base de données du site de l'université de Leiden aux Pays-Bas (<http://www.dmd.nl>).

Les mutations retrouvées dans les sarcoglycanes sont essentiellement localisées dans les domaines extracellulaires, constituant les domaines les plus importants des protéines.

Les sarcoglycanopathies peuvent représenter un pourcentage variable des LGMD2 selon les populations. Par exemple, elles représentent 68% des LGMD2 dans la population Brésilienne alors qu'elles n'en constituent que 23% dans la population hollandaise. Elles sont souvent retrouvées dans des populations isolées ou dans lesquelles la consanguinité est fréquente, telles que la communauté Amish aux Etats-Unis, la communauté tzigane en Europe, le Brésil, la Sicile ou encore le Maghreb. Ces données valident la notion que ces mutations proviennent d'un effet fondateur.

Certaines mutations, comme la mutation α -R77C qui cause l'alpha-sarcoglycanopathie, sont particulièrement fréquentes (Kobuke et al., 2008). Le fait qu'elles soient retrouvées sur des haplotypes différents et dans différentes populations indique qu'il s'agit de mutations récurrentes.

Dans le gène SGCG responsable de la LGMD2C, deux mutations avec effet fondateur ont été mises en évidence dans deux populations fortement consanguines. La mutation c.525delT, prévalente en Afrique du Nord (El Kerch et al., 2014), et la mutation C283Y, qui semble être propre aux Tsiganes d'Europe occidentale (Piccolo et al., 1996). Dans ce dernier cas, la reconstitution d'un haplotype ancestral a permis de dater la mutation à plus de 60 générations, c'est-à-dire avant la date présumée de la migration historique des ancêtres des Gitans hors de l'Inde (Kaplan et al., 1996).

LES GAMMA-SARCOGLYCANOPATHIES

I. Définition

La gamma-sarcoglycanopathie ou myopathie des ceinture de type 2C (LGMD2C), est une pathologie autosomique récessive causée par des mutations dans le gène SGCG (OMIM#253700), situé sur le chromosome 13q12 et codant pour la protéine γ -sarcoglycane (Al-Zaidy et al., 2015).

En Afrique du Nord, la LGMD2C est principalement due à une délétion commune d'un seul résidu de thymidine (correspondant aux positions d'ADNc 521-525), dans l'exon 6 du gène SGCG (Bushby and Anderson, 2010).

Comme d'autres LGMD, la LGMD2C est également caractérisé par une faiblesse dans les muscles proximaux (bassin, hanches, cuisses et épaules), une démarche anormale, une perte de la masse musculaire et des rétractions musculotendineuses. Cependant, cette pathologie est généralement plus grave que les autres types de LGMD, elle ressemble à la dystrophie musculaire de Duchenne dans les caractéristiques cliniques. L'âge moyen de survenue est précoce d'environ 5 ans et l'âge de la perte de la marche est de 10-13 ans. Les mollets et la langue apparaissent grands et musclé, c'est la pseudohypertrophie. Les complications comprennent l'insuffisance respiratoire et / ou l'atteinte cardiaque. Les patients qui ont un âge plus avancé d'apparition ont généralement une évolution beaucoup plus lente de la maladie.

Bien que l'incidence exacte de cette observation ne soit pas connue, la LGMD2C se manifeste plus fréquemment chez les Nord-Africains, en particulier chez les Tunisiens, les Algériens et les Marocains, ainsi que chez les Tsiganes européens, principalement de Bulgarie.

En plus de l'examen clinique, le diagnostic des LGMD2C consiste à tester le niveau de créatine phosphokinase (CPK) dans le sérum et à analyser les biopsies musculaires et / ou électromyogrammes pour évaluer le fonctionnement des muscles. Les tests génétiques comme le dépistage de mutation, ou le séquençage complet du gène incriminé sont disponible pour les patients suspects ainsi que le dépistage prénatal (Award, 2010).

II. Historique

La LGMD2C, une forme de myopathie sévère ressemblant à la myopathie de Duchenne mais de transmission autosomique récessive, appelée SCARMD (childhood autosomal recessive muscular dystrophy) ou Duchenne-like en 1983 (Ben Hamida et al., 1983). En cette même année, il a été mis en évidence que les caractéristiques cliniques de cette forme grave de dystrophie musculaire étaient liées au chromosome 13q, définissant un premier locus appelé « LGMD2C ». Il a été décrit que la SCARMD était caractérisée par une variabilité de l'âge d'apparition, la gravité de l'évolution et la gravité des changements myopathiques à la biopsie musculaire (Ben Hamida et al., 1983).

En 1992, une étude de liaison visant à localiser le locus SCARMD chez trois familles Tunisiennes a conduit à une localisation en 13q12 (Ben Othmane et al., 1992), cette liaison a été confirmée chez 13 familles Algériennes (Azibi et al., 1993) et chez 6 familles Marocaines (Azibi et al., 1993; El Kerch et al., 1994). Ces régions géographiques de l'Afrique du Nord sont caractérisées par une population arabo-berbère commune à forte fréquence de consanguinité (El Kerch et al., 1994). Toutes les études de liaisons visant à localiser le locus SCARMD chez des populations Maghrébines, ont conduit à une localisation en 13q12 (Ben Othmane et al., 1995).

Noguchi et collaborateurs, ont ensuite découvert que le gène localisé en 13q12 responsable du phénotype SCARMD au Maghreb était celui codant pour une protéine de 35kDa (maintenant appelé γ -sarcoglycane), les auteurs ont rapporté les premières mutations, en introduisant le terme « sarcoglycanopathies » pour désigner ce groupe de troubles (Noguchi et al., 1995).

Le clonage de l'adhaline humaine, faisant suite au premier clonage chez le lapin a permis de révéler une localisation du gène en 17q21, indiquant que le déficit en adhaline des SCARMD liées au chromosome 13 (locus LGMD2C) était nécessairement un phénomène secondaire. La mise en évidence d'une famille française où la myopathie était liée aux marqueurs de la région chromosomique 17q21, et où le gène de l'adhaline était muté démontrait l'existence de vraies adhalinopathies primaires (au locus LGMD2D qui est donc celui de l'adhaline) (Kaplan et al., 1996).

En 2003, une étude portant sur 132 patients Tunisiens a démontré que tous les patients Tunisiens étaient homozygotes pour la mutation c.525delT du gène de la γ -sarcoglycane, ils portaient le même allèle de 122 pb du marqueur D13S232 indiquant un effet fondateur. Tous les 132 patients LGMD2C étudiés avaient la même mutation c.525delT homozygote.

Cependant, cette mutation pouvait conduire à un phénotype modéré, intermédiaire et sévère dans différentes familles. Les études immuno-histochimiques de la biopsie musculaire ont montré une absence totale de la γ -sarcoglycane et des α et δ -sarcoglycanes normales ou légèrement réduites, alors que l'expression de la β -sarcoglycane était variable. Ils expliquent cette variabilité phénotypique par une éventuelle implication d'un gène contrôlant les modifications de la maladie (Kefi et al., 2003). Suite à cette variabilité phénotypique, le terme SCARMMD utilisé pour décrire la sévérité de la maladie n'était pas toujours exact en tant que description de la maladie parce que le phénotype peut être plus modéré, avec un début précoce ou à l'âge adulte (Gulati et al., 2003).

Il est à noter que la même mutation c.525delT a été trouvée chez des patients de l'Ouest de l'Inde (Khadilkar et al., 2009), et chez les tribus Towareg du Niger (Moumouni et al., 2012), pourrait être liées à la migration humaine (Teebi, 2010).

III. Epidémiologie

La LGMD2C est la forme la plus fréquente de sarcoglycanopathies dans les pays Maghrébins et en Inde, en raison du taux élevé de consanguinité dans ces populations (Tableau 2). Cependant, la LGMD2C est la deuxième forme la plus fréquente de sarcoglycanopathies après la LGMD2D dans la plupart des pays d'Europe (Angelini and Fanin, 2016). Dans d'autres pays, la fréquence reste néanmoins faible, de l'ordre de 10 à 20 % des formes autosomiques récessives de dystrophies musculaires progressives (Urtizbera and Cobo, 2011).

Tableau. 2: Fréquence relative de la LGMD2C dans le monde (Angelini and Fanin, 2016).

	Fréquence (%)	Ethnicité
LGMD2C	10–50	Maghreb
	44	India
	8	Italy, USA
	26	France
	33	Turkey
	16–23	Brazil
	2	USA
	18–26	Italy
	12	UK

IV. Acteurs moléculaires de la LGMD2C

IV.1 Gene SGCG codant pour la γ -sarcoglycane

IV.1.1 Identification du gène SGCG

Le gène SGCG a été identifié pour la première fois en 1990 par les travaux d'Ervasti (Ervasti et al., 1990) qui ont décrit la protéine γ -sarcoglycane comme étant une protéine de 35 kDa.

En 1995, ce gène a été identifié chez des malades appartenant à des familles tunisiennes qui présentaient une myopathie sévère avec un début à l'enfance. La localisation du gène responsable de la LGMD2C sur le chromosome 13q12 (Figure 5) a été faite initialement par Ben Othmane et collaborateurs, sur des tribus tunisiennes en se basant sur l'observation de l'expression de la maladie avec des marqueurs présents dans cette région chromosomique (Ben Othmane et al., 1995). D'autres études avec 13 familles algériennes (Azibi et al., 1993) et 6 marocaines (El Kerch et al., 1994) ont confirmé la cartographie.

Le clonage du gène SGCG de la γ -sarcoglycane a été d'abord réalisé par (Noguchi et al., 1995). Ces auteurs ont cloné les séquences de la protéine après avoir cribler de l'ADNc humain de muscle squelettique et cardiaque permettant l'identification d'un clone contenant un cadre de lecture codant pour 291 acides aminés à partir de l'ADNc du lapin. Les auteurs de cette étude ont par la suite étudié la migration électrophorétique en gel de polyacrylamide (contenant du laurylsulfate de sodium) de chaque composant du complexe des sarcoglycanes. Ces derniers ont été révélés par l'utilisation d'une part, d'anticorps polyclonaux PA2, PA3b1 et PA3a pour le domaine intracellulaire de l' α -SG, la protéine β -SG et le domaine intracellulaire de béta-sarcoglycane respectivement. D'autre part, un anticorps monoclonal MP4-2 a été utilisé pour la révélation de la protéine γ -sarcoglycane (Noguchi et al., 1995).

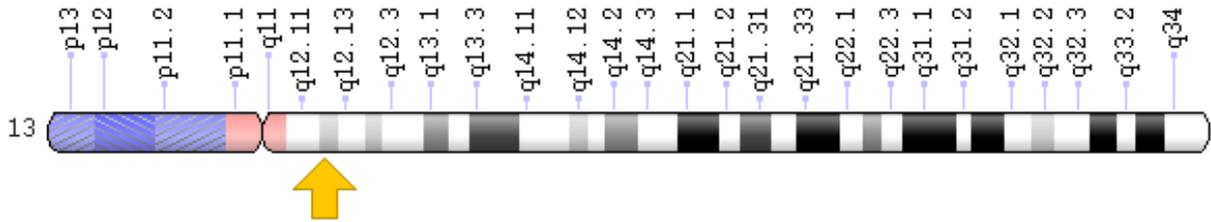


Figure. 5: Localisation cytogénétique du gène SGCG sur le bras long du chromosome 13 en position 12 (<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/SGCG#location>).

IV.1.2 Organisation du gène SGCG

Le gène SGCG est localisé sur le bras long du chromosome 13q12 (OMIM 608896). Il s'étend sur une région génomique d'environ 164 kb et comporte huit exons d'environ 997 pb séparés par sept introns s'étendant sur une région génomique de 70 kb (NM_000231.2). Les extrémités 5' et 3' sont des régions non traduites comprises respectivement entre l'exon 1 et 8 (Figure 6). La séquence complète du gène SGCG est illustrée dans l'annexe 1A.

Au niveau du gène SGCG, les huit exons ne sont pas tous exprimés, seuls les exons 2 à 8 sont codants et la séquence d'ADNc d'environ 873 pb code pour une protéine de 291 acides aminés (Annexe 1B), cette dernière possède une homologie structurale avec la δ -sarcoglycane. De ce fait, certains auteurs ont suggéré que les gènes des Υ et δ -sarcoglycanes seraient issus d'un phénomène de duplication (Nigro et al., 1996).

L'étude des transcrits du gène SGCG montre la présence d'un ARNm unique de 1.7 kb qui est exprimé exclusivement dans le muscle strié squelettique et cardiaque (Noguchi et al., 1995).

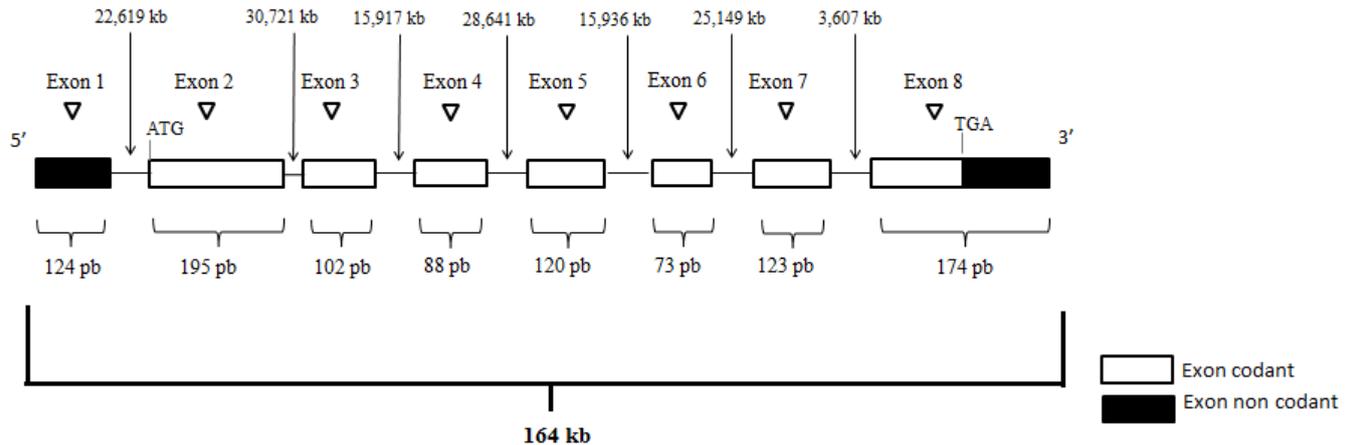


Figure. 6: Représentation schématique du gène SGCG codant pour la protéine gamma-sarcoglycane (Trabelsi et al., 2008).

IV.2 La protéine γ -sarcoglycane

IV.2.1 Découverte de la γ -sarcoglycane

Elle est parmi les premières sarcoglycanes identifiées avec les travaux pionniers du groupe de (Campbell and Kahl, 1989), et classée selon son poids moléculaire la protéine dite « 35DAG » à l'origine répertoriée par le groupe du Professeur Ozawa en 1990 (Yoshida and Ozawa, 1990) comme une protéine d'environ 35 kDa, que l'on va séparer du complexe des protéines associées à la dystrophine avec le dérivé sucré « n-octyl beta-D-glucoside ».

Rapidement cette protéine fut identifiée comme appartenant au complexe des sarcoglycanes et au complexe DGC puis plus tard associé à un type de dystrophies musculaires des ceintures, cette protéine sera baptisée alors la γ -Sarcoglycane (Serosé, 2007).

IV.2.2 Structure et localisation de la γ -sarcoglycane

La γ -sarcoglycane est une protéine transmembranaire de type 2, elle possède un domaine intracellulaire N-terminal de 35 acides aminés, un domaine transmembranaire unique de 25 acides aminés, et un domaine extracellulaire C-terminal de 231 acides aminés (Nowak et al., 2000) (Figure 7) . Elle possède également un site de glycosylation lié à l'asparagine (résidu 110) dans le domaine extracellulaire et un site de phosphorylation putatif de thréonine (résidu 7) dans le domaine intracellulaire. En outre, il existe quatre tyrosines intracellulaires. Comme pour les β et δ -sarcoglycanes, il existe quatre résidus Cys conservé (Cys265, Cys267, Cys283 and Cys290) à l'extrémité C-terminale (Bushby and Anderson, 2010).

L'analyse de la structure secondaire de la protéine γ -sarcoglycane ainsi que celle des sarcoglycanes α , β et δ , révèle qu'elles contiennent plusieurs feuillets β et hélices α . Ainsi la γ -sarcoglycane est ancrée à la membrane cytoplasmique du muscle squelettique et se trouve exposer dans la matrice extracellulaire avec pour environnement les autres formes de Sarcoglycane (Leiden Muscular Dystrophy pages, 2005).

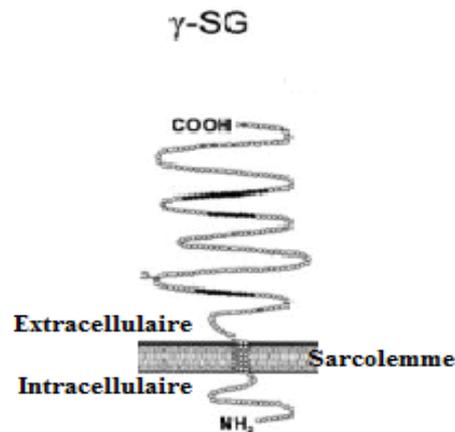


Figure. 7: Représentation schématique de la protéine γ -sarcoglycane. D'après (Lim and Campbell, 1998).

*Les sites prédits de N-glycosylation sont représentés par des petites ramifications et les cercles gris individualisés correspondent aux résidus cystéines extracellulaires. Les hélices « a » présentes dans les structures secondaires des sarcoglycanes, sont en noir.

IV.2.3 Expression de la γ -sarcoglycane

La spécificité de la protéine γ -sarcoglycane pour les muscles striés a été confirmée en 1994 (Suzuki et al., 1994), des expériences d'immunohistochimie ont également permis de visualiser la protéine au niveau du sarcolemme (Serose, 2007).

L'expression de la γ -sarcoglycane est musculaire, comme celle de l' α -sarcoglycane contrairement à la β -sarcoglycane qui est plus largement distribuée. La séquence d'ADNc de la γ -sarcoglycane contient 873 pb.

Les mutations du gène SGCG n'affectent pas seulement cette protéine mais perturbe également le complexe des sarcoglycanes dans son ensemble. En effet, chez une souris transgénique invalide pour le gène SGCG et présentant une dystrophie musculaire

prédominante sur la musculature proximale des membres, l'absence de la protéine gamma-sarcoglycane s'accompagne d'une absence presque complète des β et δ sarcoglycanes alors que leur ARN messager est normal. Ainsi la γ -sarcoglycane est nécessaire à l'assemblage des β et δ -sarcoglycanes et son absence provoque l'apparition d'une dystrophie musculaire dont la survenue ne peut être empêchée par la seule présence de la dystrophine (J De Recondo and AM De Recondo, 2001).

IV.2.4. Rôle de la protéine γ -sarcoglycane

➤ Hypothèse d'un rôle structural

La protéine γ -sarcoglycane, permet le maintien de la structure du tissu musculaire et la stabilisation du complexe DGC. Le grand complexe de la dystrophine renforce les fibres musculaires et les protège contre les blessures. Il agit comme une ancre, cadre structural de liaison de chaque cellule musculaire (cytosquelette) avec le réseau de protéines et d'autres molécules à l'extérieur de la cellule (matrice extracellulaire) (McNally, 2013).

➤ Hypothèse d'un rôle métabolique

Le complexe des sarcoglycanes pourrait agir comme un récepteur membranaire et ainsi jouer un rôle dans la traduction des signaux intracellulaires. En effet, les études de Yoshida et al. 1998, montrent que les sarcoglycanes peuvent être impliqués dans la régulation et la signalisation des intégrines et de la filamine au niveau du muscle strié (Thompson et al., 2000).

L'identification de la filamine-2 comme étant une protéine interagissant avec les sarcoglycanes est en faveur du concept que le complexe glycoprotéique des sarcoglycanes ne fonctionne pas seulement comme un support structural mais plutôt que ce complexe a un rôle de signal dans le maintien de l'intégrité du muscle squelettique. En effet, les sarcoglycanes γ et δ qui interagissent avec la filamine-2 sont impliquées dans l'organisation de l'actine et des transductions de cascades de signalisations vitales pour la cellule, telles que la migration cellulaire, l'adhésion, la différenciation, la force de transduction et la survie (De Salman et al., 2007).

V. Pathologie moléculaire du gène SGCG

La pathologie du gène SGCG conduit à des défauts quantitatifs ou qualitatifs de l'expression de la protéine γ -sarcoglycane. Il est maintenant clairement établi que les mutations de ce gène sont à l'origine de la gamma-sarcoglycanopathie. Les mutations ont été décrites pour la première fois dans les pays du Maghreb (Nowak et al., 2000).

Le déficit de la γ -sarcoglycane conduit à une importante réduction ou à l'absence de la totalité du complexe des sarcoglycanes à la membrane des cellules du muscle strié. Ce qui a pour conséquence de perturber l'assemblage ou la stabilisation de l'ensemble de ce complexe, de modifier la perméabilité de la membrane et donc de déstabiliser le lien entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette contractile (Vermeer et al., 2004).

❖ Types de mutations du gène SGCG

Environ 40 mutations du gène SGCG sont décrites, 16 mutations faux-sens générant une protéine complète avec une seule substitution de résidus et 24 qui génèrent une protéine tronquée ou aucune protéine du tout. Trois parties du domaine extracellulaire de la γ -sarcoglycane ont potentiellement des fonctions importantes, deux pour l'assemblage avec soit β -sarcoglycane ou α -sarcoglycane et le domaine EGF-like. Les résidus 60-155 de la partie proximale de la γ -sarcoglycane au domaine transmembranaire sont essentiels pour l'interaction avec l' α et β sarcoglycanes (Sandona and Betto, 2009).

Bien que les résidus correspondants à la liaison aux sarcoglycanes ne soient pas connus, il semblerait que certaines mutations faux-sens dans cette région altèrent l'assemblage correct du complexe.

Cependant, certaines mutations pourraient simplement produire des mutants. Les mutations qui produisent une γ -sarcoglycane tronquée sans les cystéines dans le domaine EGF, ne permettent pas l'assemblage du complexe sarcoglycane, Ceci a été démontré dans des échantillons de muscle de patients. Par contre, chez deux patients LGMD 2C, une mutation homozygote c.del525T génère une protéine γ -sarcoglycane tronquée sans domaine EGF, qui est apparemment en mesure de s'assembler avec les autres sarcoglycanes.

La mutation faux-sens C283Y dans le domaine de la γ -sarcoglycane riche en cystéine pourrait être fonctionnellement pertinente, car cette cystéine est cruciale dans le domaine EGF.

La plupart des mutations du gène SGCG sont des mutations ponctuelles, dans la région extracellulaire de la γ -sarcoglycane. Cependant des délétions importantes dans le gène SGCG ont été rapportées, s'étendant de l'exon 2 à l'exon 8 (Bönnemann et al., 2002), ou impliquant l'exon 7 (White et al., 2005) entier ou l'exon 6 (Takano et al., 2000) sont associées à un phénotype sévère.

Toutes les mutations du gène SGCG identifiées jusqu'à aujourd'hui peuvent être consultées sur la base de données du site de l'université de Leiden aux Pays-Bas (<http://www.dmd.nl>).

***Mutations récurrentes:**

Certaines mutations du gène SGCG sont à effet fondateur et donc retrouvées plus fréquemment chez des populations spécifiques (Figure 8), comme pour :

➤ **La mutation c.525delT :**

Cette mutation a été initialement mise en évidence à l'état homozygote chez des enfants ou adolescents du Maghreb présentant une forme de myopathie autosomique récessive qualifiée de Duchenne-like (Ozawa et al., 1998). La mutation c.del525T a été retrouvée dans des pays limitrophes, en Tunisie (Ben Othmane et al., 1992), en Algérie (Azibi et al., 1993) et au Maroc (El Kerch et al., 1994), puis dans les terres de migration ou d'échange pour les populations maghrébines comme en Espagne (Verdura et al., 2011), au Portugal (Dos Santos et al., 2001), en Italie (Boito et al., 2003) et chez des patients brésiliens d'origine africaine (McNally et al., 1996b).

La c.del525T a également été identifiée, en Palestine (Buzzini and Macmilan, 2001), en Arabie Saoudite (Boyden et al., 2010) et au Niger, particulièrement dans la communauté Touareg de Agadez (Nord du Niger); les parents unis par un mariage consanguin, étaient porteurs de la mutation c.525delT à l'état hétérozygote, deux de leur enfants étaient homozygotes pour la mutation contre un enfant hétérozygote (Moumouni et al., 2012).

En 2009, c'est la découverte de la c.del525T chez cinq patients indiens résidant à Mumbai (Khadilkar et al 2009). Les relations commerciales entre la rive occidentale de l'Inde et les pays arabes du Golfe étaient connues et très anciennes. Pour autant, l'origine de la mutation reste débattue. L'hypothèse d'un foyer originel berbère est actuellement la plus solide (Urtizberea and Cobo, 2011). Même si une première étude des haplotypes avait permis de

dater grossièrement la mutation à l'an 1000, d'autres analyses complémentaires seraient certainement nécessaires et l'aide des historiens serait également utile dans ce contexte.

➤ **La mutation c.848G>A :**

En 1996, lors d'une étude de 18 patients non apparentés tziganes d'Europe occidentale, une LGMD2C avec un début précoce et sévère a été identifiée, une transition dans le gène SGCG de la base G à A, résultant en une substitution d'une cystéine par une tyrosine (C283Y). Tous les chromosomes touchés par cette mutation à l'état homozygote ou hétérozygote portaient le même allèle 5 du marqueur D13S232 intragénique. Cette mutation a été trouvée exclusivement chez les patients tziganes de différents pays européens (Piccolo et al., 1996).

En 1998, une étude a été menée chez 11 familles tziganes non apparentées de LGMD2C (9 espagnols et 2 portugais). Les biopsies musculaires de ces patients ont montré une diminution immunologique considérable des anticorps de l'alpha et gamma-sarcoglycane. Tous les patients étaient homozygotes pour la mutation faux-sens C283Y, et tous les chromosomes affectés par cette mutation à l'état homozygote ou hétérozygote présentaient l'allèle 5 (112 pb) du marqueur D13S232 intragénique. De façon inattendue, cet allèle a été jugée le plus fréquent dans la population caucasienne, mais pas dans la population tzigane normale (Lasa et al., 1998).

En 1999, une équipe de chercheurs a utilisé la technique de polymorphisme de conformation simple brin (SSCP) pour la détection rapide de la mutation C283Y après avoir amplifié directement des taches de sang séchées, ils ont trouvé une fréquence de 2.25% d'hétérozygotie pour la mutation C283Y auprès de 400 nouveau-nés tziganes au nord-Est de la Bulgarie, les résultats ont suggéré que 1 à 50 Tziganes porte la mutation, ce qui indique un effet fondateur (Todorova et al., 1999).

En 2000, une étude détaillée du phénotype de la mutation Cys283Tyr (848G>A) a été réalisée chez 68 patients tziganes (36 hommes, 32 femmes) appartenant à 35 familles vivant dans 6 pays européens différents (4 en provenance de France, 4 d'Espagne, 2 d'Allemagne, 2 de Portugal, 2 d'Italie et 21 de la Bulgarie). Cinquante pourcent des patients présentaient une progression sévère comme chez les patients atteints de DMD, Vingt-cinq pourcent avaient un phénotype intermédiaire et 25% avaient un phénotype BMD-like. Le retard mental et la cardiomyopathie dilatée n'ont pas été observés (Merlini et al., 2000).

En 2004, la mutation C283Y et 4 autres mutations privées parmi les Roms (Tziganes) ont été utilisées à fin d'étudier certains des paramètres manquants et nécessaires à la caractérisation complète de l'histoire de la population des Gitans. La répartition des mutations

et le taux élevé de porteurs de ces mutations sont en faveur d'un fort effet fondateur (Morar et al., 2004). En cette même année, la répartition géographique précise de la mutation C283Y dans la population générale des Roms de l'ensemble du territoire Bulgare a été établie. La fréquence de la mutation a été déterminée dans des échantillons de sang séché de nouveau-nés. Les résultats de cette étude ont montré que la répartition géographique de cette mutation fondatrice et la maladie ne sont pas géographiquement limités que chez les Tsiganes de Bulgarie du nord (Georgieva et al., 2004).

➤ **La mutation c.87dupT:**

En 1996, une insertion de 1 pb homozygote dans le gène SGCG a été identifiée chez un patient avec une LGMD2C qui présentait des symptômes à l'âge de 7 ans et était au fauteuil roulant à 14 ans. L'insertion (87insT) modifie le cadre de lecture à l'acide aminé 30 et en résulte plus de 29 acides aminés faux-sens et un codon d'arrêt, ainsi que l'ablation de la majorité de la protéine gamma-sarcoglycane (McNally et al., 1996a). La même mutation a été identifiée dans le gène SGCG comme une cause de la LGMD2C chez 6 familles non apparentées du nord de l'Italie. Beaucoup de patients étaient homozygotes, même s'ils provenaient de mariages non consanguins. Les auteurs de cette étude suggèrent que l'allèle muté est une mutation «privé» dans cette région géographique (Fanin et al., 2000).

➤ **La mutation p.E263K**

En 2006, une transition homozygote 787G-A dans l'exon 8 du gène SGCG a été identifiée chez 2 patients atteints de LGMD2C portoricains non apparentés à l'état homozygote (Duncan et al., 2006), cette mutation résulte en une substitution de glu263-à-ys (E263K) dans la région extracellulaire C-Terminale de la protéine γ -sarcoglycane. L'un des patients est né de parents consanguins. Duncan et collaborateurs, ont conclu à un effet fondateur.

En 2015, une étude a été menée afin de confirmer l'hypothèse que la mutation c.787G> A (p.E263K) dans le gène SGCG est une mutation fondatrice chez les portoricains et de caractériser le phénotype clinique et immunohistochimique associé. Les résultats ont révélé que tous les cas index avaient la mutation p.E263K à l'état homozygote et que les membres de la famille non affectés étaient des porteurs hétérozygotes de cette mutation. Cette étude confirme l'effet fondateur de la mutation p.E263K chez la population portoricaine (Al-Zaidy et al., 2015).

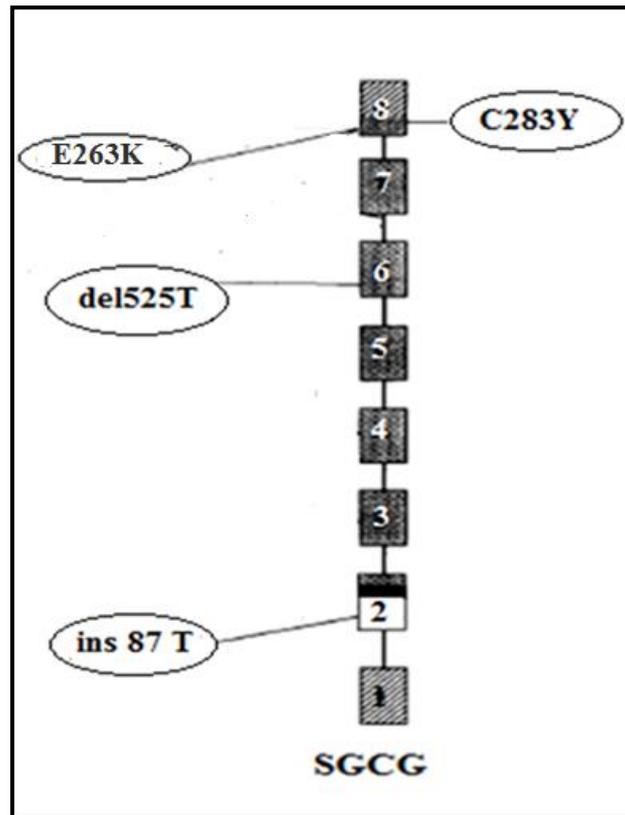


Figure. 8: Mutations récurrentes du gène SGCG (Kaplan et al., 1996).

***En noir** : la séquence correspondent au domaine transmembranaire de la protéine ; **en blanc** : les séquences correspondant au domaine intracellulaire de la protéine ; **en hachure** : la séquence 3' non traduite.

VI. Présentation clinique de la LGMD2C

Peu de rapports de patients atteints de LGMD2C génétiquement confirmés sont disponibles. Les examens cliniques des dystrophies musculaires autosomiques récessives dans les populations Nord-Africaine ont été rapportés par (Ben Hamida et al., 1996), avec une hétérogénéité génétique connue pour exister dans cette population et des mutations identifiées dans différents gènes des sarcoglycanes, ces rapports ne sont pas supposés décrire une population de LGMD2C génétiquement confirmée.

Dans l'ensemble, le spectre clinique est généralement moins étendu que celui de l'alpha-sarcoglycanopathie. La LGMD2C est plus proche de la myopathie de Duchenne que de la myopathie de Becker. Les signes de début, la date d'apparition des symptômes et l'évolution en diffèrent peu. Le tableau clinique associe, une atteinte proximale, bilatérale, symétrique et rapidement invalidante, avec une perte de la marche vers l'âge de 14 ans en moyenne, une

pseudohypertrophie des mollets, une tendance rétractile marquée et des complications orthopédiques (rétractions tendineuses, scoliose), une variabilité de la gravité du phénotype interfamiliale mais aussi intrafamiliale, avec une prédominance de l'apparition à l'enfance (Bushby, 1999).

Il semblerait qu'un nombre non négligeable de patients présentent à terme des complications cardiaques (cardiomyopathie dilatée) et respiratoires (syndrome restrictif nécessitant une ventilation assistée). L'intelligence des patients atteints de gamma-sarcoglycanopathie est normale (Bushby, 1999).

Le pronostic de la LGMD2C est en général moins bon que celui de l'alpha-sarcoglycanopathie avec une grande variabilité inter et intra-familiales. L'existence de groupes génétiquement homogènes de patients fait apparaître une plus grande sévérité et un phénotype plus proche de la DMD que la BMD. La question actuellement posée est celle d'une possible cardiomyopathie associée (Solé, 2010).

VII. Diagnostic différentiel des LGMD2C

Le diagnostic différentiel des dystrophies musculaires des ceintures est réalisé grâce à une approche multidisciplinaire en prenant compte de l'histoire personnelle et familiale des patients ainsi que l'examen clinique et paraclinique.

Concernant la LGMD2C, le diagnostic différentiel inclus les dystrophinopathies (DMD / BMD), il est impossible de faire la différence entre ces formes uniquement en se basant sur des critères cliniques. Par conséquent, la coloration immunohistochimique des biopsies musculaires et l'analyse génétique moléculaire sont obligatoires pour un diagnostic correct (Diniz et al., 2014).

❖ Les dystrophinopathies

La DMD est la plus grave et la plus fréquente des myopathies de l'enfant avec une évolution inexorable, progressive conduisant au décès dans la troisième décennie. La BMD est sa forme bénigne (moins sévère avec une évolution plus lente), ces deux formes sont regroupées sous le terme de « dystrophinopathies » (Sbiti et al., 2002).

Le diagnostic clinique est basé sur l'âge de début qui est généralement précoce chez les DMD et plus tardif chez les BMD. L'évolution de la maladie se traduit par une perte de la marche avant l'âge de 13 ans chez les DMD et après 16 chez les BMD, des déformations rachidiennes, une insuffisance respiratoire et cardiaque et un retard mental. Dans les

dystrophinopathies, l'atteinte cardiaque est quasi constante dès l'adolescence. Elle conditionne le pronostic vital même si elle est parfois masquée par la sévérité clinique de l'atteinte musculaire ou respiratoire. Des anomalies électrophysiologiques et une dysfonction ventriculaire gauche sont observées, respectivement en rapport avec une fibrose du tissu de conduction et du muscle myocardique (Masson, 2010).

Les dystrophinopathies se transmettent par un mode autosomique récessif lié à l'X et sont causées par des mutations affectant le gène de la dystrophine localisé en Xp21 codant pour la protéine dystrophine. Ce gène est organisé en 79 exons séparés par des introns de taille très variable allant de 107 pb (intron 14) à plus de 200 000 pb (intron 44). Il est transcrit en un ARNm de 14 000 pb dont 11 000 pb d'ADNc codent pour une protéine de 427 kilodaltons (kDa) comportant 3685 acides aminés : la dystrophine (Koenig et al., 1987).

Dans la DMD, l'absence de dystrophine est due à une mutation dans le gène codant pour cette protéine. Il existe en fait plus de 4700 mutations différentes regroupées en 3 principales catégories : délétion d'un ou plusieurs exons, duplication d'un ou plusieurs d'exons et les mutations ponctuelles. On estime que les mutations sont réparties entre 60 et 80 % pour les délétions, entre 7 et 11 % pour les duplications et qu'il y a entre 10 et 30 % de mutations ponctuelles dont la moitié de ces dernières serait non-sens (Pichavant, 2010). Les délétions peuvent se situées partout dans le gène , mais il existe clairement deux points chauds « hotspots » ; dans la partie centrale du gène entre l'exon 45 et 55 avec un point de cassure dans l'intron 44 et l'autre dans la partie proximale en 5' entre l'exon 2 et 19 avec un point de cassure dans l'intron 2 et 7 (Muntoni et al., 2005).

Les petits réarrangements géniques représentent environ 22 % des altérations génétiques observées dans les dystrophinopathies. Il s'agit le plus souvent de mutation non-sens (39 % des cas), de mutations décalant le cadre de lecture (31 % des cas) ou de mutations d'un site d'épissage (26 % des cas), et très rarement de mutations faux-sens (1 % des cas). Les mutations décalant le cadre de lecture correspondent à de petites délétions, insertions ou duplications touchant quelques nucléotides. Chez les patients atteints de DMD, il s'agit le plus souvent de mutations nulles, aboutissant à une protéine absente ou tronquée, tandis que chez les patients atteints de BMD ce sont les mutations affectant un site d'épissage qui sont les plus fréquentes (Masson, 2010).

Le traitement des dystrophinopathies est avant tout palliatif : prévention des rétractions, apport des aides techniques, kinésithérapie, surveillance cardiaque, orthopédie. Cette prise en charge pluridisciplinaire est indispensable : elle permet à l'enfant de conserver sa qualité de

vie en limitant les conséquences de la maladie. Les corticostéroïdes sont administrés au moment où le développement moteur de l'enfant commence à ralentir, ce qui correspond généralement à l'âge de 5-7 ans. Les complications dues à l'utilisation de stéroïdes doivent être prises en charge et incluent la prise en charge du surpoids.

Un premier médicament efficace contre la DMD (Ataluren) est autorisé sur le marché Européen. Il est destiné aux enfants âgés de 5 ans, capables de marcher. Ce médicament n'est efficace que chez 13 % des myopathes de Duchenne, ceux qui sont porteurs d'une mutation spécifique, dite "mutation stop". Grâce à l'administration de l'Ataluren, ce codon « STOP » est ignoré lors du processus de production des protéines ce qui permet la production d'une protéine fonctionnelle (Bushby et al., 2014).

VIII. Diagnostic positif de la LGMD2C

VIII.1 Anamnèse

La description la plus précise possible de l'arbre généalogique et des antécédents familiaux occupe une place importante dans le diagnostic étiologique des pathologies musculaires. En établissant un arbre généalogique détaillé, on précise le mode de transmission (autosomique dominant ou récessif, lié à l'X ou encore la transmission maternelle dans les maladies mitochondriales) et de rechercher une notion éventuelle de consanguinité.

L'origine ethnique peut aussi avoir son importance car certaines de ces myopathies sont associées à des isolats géographiques ou génétiques (Île de la Réunion, Pays Basque, tziganes...) (Petiot and Andoni Urtizbera, 2004).

VIII.2 Examen neuromusculaire

VIII.2.1 Syndrome myogène

Il se définit classiquement par l'association d'un déficit moteur pur, sans troubles sensitifs ni aréflexie ostéotendineuse, et d'une atrophie musculaire plus ou moins marquée. De nombreuses variantes rendent la reconnaissance de ce syndrome élémentaire parfois difficile. La capacité à courir, monter les escaliers, soulever des charges lourdes, se raser ou se coiffer, se relever d'une position accroupie sont autant d'indices fonctionnels qui peuvent traduire la présence d'un authentique déficit musculaire (Petiot and Andoni Urtizbera, 2004).

VIII.2.2 Analyse topographique

Il est important de noter d'abord si l'atteinte musculaire est symétrique ou non. Il faut ensuite préciser la répartition topographique du déficit moteur et/ou de l'atrophie afin

d'inclure la présentation clinique dans un cadre ou une formule syndromique aussi précise que possible. Cette analyse topographique permettra dans certains cas de faire d'emblée un diagnostic comme pour la dystrophie facio-scapulo-humérale (FSH), alors que dans d'autres observations, elle gardera souvent une forte valeur d'orientation comme pour la myopathie de Miyoshi. Parfois, elle ne permet que d'ouvrir un arbre diagnostique décisionnel comme pour les dystrophies des ceintures (Petiot and Andoni Urtizbera, 2004).

➤ **Signe de Gowers**

Le signe de Gowers est un signe clinique indiquant une parésie de la musculature proximale des membres inférieurs. Il désigne un patient qui est obligé de se servir, en plusieurs étapes, de ses mains et de ses bras pour passer de la position agenouillée à la position debout, en raison du manque de force des muscles des hanches et des cuisses (Figure 9). Il a été décrit chez les enfants myopathes par le neurologue et pédiatre William Gowers (Gowers, 1886).

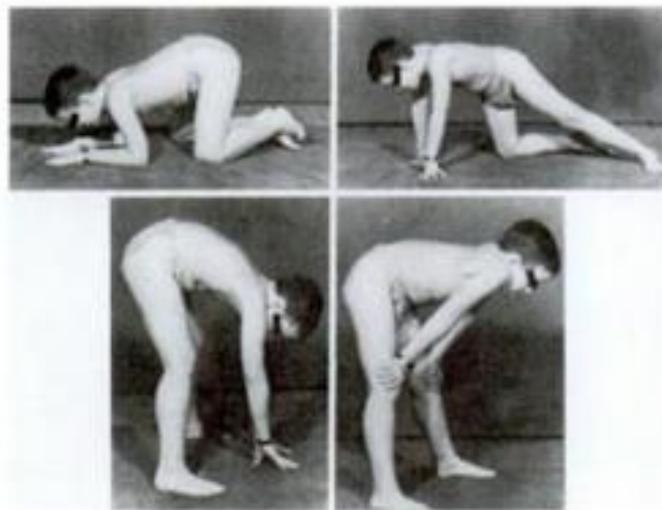


Figure. 9: Signe de Gowers chez un enfant DMD.

*Cette série de manœuvres est nécessaire pour atteindre une position verticale, et il se produit avec tous les types de faiblesse des muscles du bassin et du tronc (Rang et al., 1986).

L'évaluation des activités fonctionnelles représentent des points importants dans le suivi de la progression de la maladie (Tecklin, 2008). Les grades attribués aux bras ont été développés par (Brooke et al., 1989) (Tableau 3), alors que les grades attribués aux jambes sont basés sur une échelle proposée par (Vignos et al., 1963)(Tableau. 4).

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau. 3: Grades fonctionnels (Score de Brook): bras et épaules (Brooke et al., 1989).

Grade	Capacité fonctionnelle
1	Partant de la position bras le long du corps, le sujet peut pratiquer une abduction des membres supérieurs afin que les mains se rejoignent au-dessus de la tête à la verticale.
2	Le sujet peut joindre les deux sur la tête en fléchissant les coudes ou en utilisant des compensations musculaires.*
3	Ne peut mettre les mains sur la tête, mais peut porter un verre d'eau à la bouche (à deux mains si nécessaire).
4	Le sujet peut porter les mains à la bouche, mais ne peut y porter un verre d'eau.
5	Le sujet ne peut pas porter les mains à la bouche, mais peut tenir un crayon ou ramasser une pièce de monnaie sur la table.
6	Aucune fonction usuelle des mains

Tableau. 4: Grades fonctionnels de Vignos: hanches et jambes (Vignos et al., 1963).

Grades	Capacité fonctionnelle
1	Marche et monte les escaliers sans aide.
2	Marche et monte les escaliers à l'aide d'une rampe.
3	Marche et monte les escaliers lentement à l'aide d'une rampe (plus de 12 secondes pour 4 marches standard).
4	Marche sans aide technique et se lève d'une chaise, mais ne peut pas monter les escaliers.
5	Marche sans aide technique ne peut pas monter les escaliers ni se lever d'une chaise.
6	Marche avec une aide technique ou marche indépendamment avec des orthèses longues.
7	Marche avec des orthèses longues mais a aussi besoin d'une aide technique pour préserver son équilibre.
8	Se tient debout avec des orthèses mais ne peut pas marcher même avec aide technique.
9	Est astreint au fauteuil roulant
10	Est confiné au lit.

VIII.2.3 Signes associés

Les signes cliniques associés sont d'un grand intérêt pour le clinicien et doivent être systématiquement recherchés lors de l'examen d'un patient présentant une maladie musculaire :

➤ **Rétractions**

Elles sont présentes dans de nombreuses affections neuromusculaires. Elles sont responsables de déformations articulaires parfois irréversibles et différents secteurs anatomiques peuvent être concernés (coudes, hanches, genoux, rachis...)(McDonald, 2012).

➤ **Hypertrophie des mollets**

Il s'agit d'une pseudohypertrophie musculaire (transformation fibreuse hypertrophique du muscle). Ces hypertrophies musculaires au niveau des mollets sont classiquement évocatrices de dystrophinopathies ou de sarcoglycanopathies (Figure 10) (Petiot and Andoni Urtizbera, 2004).



Figure. 10: Hypertrophie des mollets chez un patient Algérien atteint de LGMD2C.

➤ **Macroglossie**

La macroglossie est recherchée lors de l'examen clinique, elle est caractérisée par une augmentation de taille de la langue (Figure 11). La cause de la macroglossie dans les sarcoglycanopathies est l'hypertrophie musculaire (Malhotra et al., 2011).



Figure. 11: Macroglossie chez une patiente Algérienne atteinte de LGMD2C.

➤ Scoliose

La scoliose est une complication fréquente chez les patients atteints de LGMD ou de dystrophinopathies ayant perdus la marche (Figure. 12) (Hsu and Quinlivan, 2013).

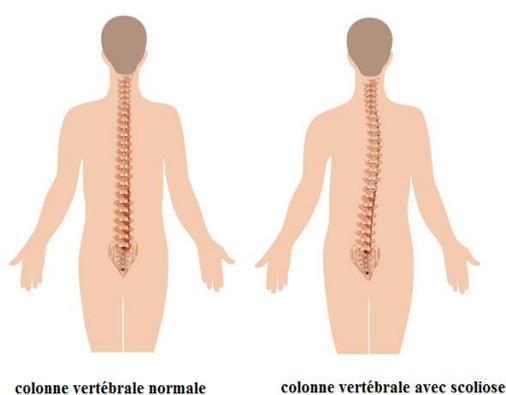


Figure. 12: Colonne vertébrale normale et avec scoliose (Alila Medical Media/Shutterstock.com).

➤ Atteinte cardiaque

Une cardiopathie doit systématiquement être recherchée et évaluée par des bilans répétés. Elle conditionne souvent le pronostic vital et a en outre une valeur indicative pour le diagnostic étiologique de certaines myopathies, elle affecte surtout les formes gamma et delta sarcoglycanopathies. Dans le travail de (Calvo et al., 2000) portant sur 10 patients, un tiers des enfants atteints de LGMD2C présentaient des anomalies électriques avec un aspect évocateur d'hypertrophie du ventricule droit. Quatre patients sur dix présentaient une dilatation du ventricule droit. Un patient sur dix présentait une dysfonction systolique du

ventricule gauche. Cette étude concluait à une fréquente atteinte myocardique infraclinique chez les patients atteints de gamma-sarcoglycanopathies et à une fréquence non négligeable d'hypertrophies du ventricule droit (Fayssoil et al., 2012).

➤ **Atteinte respiratoire**

L'insuffisance respiratoire est une cause majeure de morbi-mortalité dans les maladies neuromusculaires et a été la principale cause de décès chez les patients DMD il y a quelques décennies (Fayssoil et al., 2016).

Une atteinte respiratoire doit être dépistée précocement chez les patients atteints de LGMD2C grâce à l'exploration fonctionnelle respiratoire (EFR). Elle est secondaire à l'atteinte du diaphragme et/ou des muscles intercostaux (Petiot and Andoni Urtizberea, 2004).

VIII.3 Examens complémentaires

VIII.3.1 Electroneuromyogramme (ENMG)

Il n'est pas systématique dans l'exploration initiale d'une myopathie mais sert surtout dans les cas où l'examen clinique ne permet pas de différencier de manière formelle une atteinte neurogène d'une atteinte myogène (Petiot and Andoni Urtizberea, 2004).

VIII.3.2 Enzymes musculaires

Le dosage des CPK sérique sera le plus important parmi les autres enzymes musculaires (aldolases, lactico-déshydrogénases [LDH] ou transaminases). Le dosage des enzymes musculaires peut se normaliser à un stade évolué d'une myopathie. Enfin, d'une manière générale, leur normalité ne doit pas remettre en cause le diagnostic de myopathie même si elle pourra apparaître surprenante dans certains cadres étiologiques. Leur élévation est en rapport avec une nécrose musculaire plus ou moins sévère qui doit orienter de prime abord vers une dystrophie. Une élévation très importante des CPK, à plus de 50 fois la normale, se voit tout particulièrement dans les dystrophinopathies et les sarcoglycanopathies (Petiot and Andoni Urtizberea, 2004).

VIII.3.3 Biopsie musculaire

La biopsie chirurgicale est la technique de référence. Le fragment musculaire sera étudié selon plusieurs techniques, d'abord avec des explorations histo-chimiques standard réagissant

avec différents composants musculaires comme le glycogène ou les lipides. D'autre part, des immunomarquages seront réalisés sur certaines protéines en particulier la dystrophine ou les sarcoglycanes. On peut aller même jusqu'à une étude en Western Blot afin d'étudier précisément un déficit protéique ou enzymatique.

Le plus souvent, la biopsie permet le diagnostic définitif de myopathie. Dans certaines situations, cet examen peut être pris en défaut. La biopsie musculaire n'est pas réalisée en première intention si l'origine géographique ou ethnique fait suspecter une mutation à effet fondateur facilement analysable, comme pour les LGMD2C dans des familles maghrébine ou tsigane (Campana-Salort et al., 2008).

IX. Analyse moléculaires de la LGMD2C

IX.1 Etude immunohistochimique et western blot

L'analyse immunohistochimique des composants du complexe sarcoglycane dans une biopsie musculaire est une étape importante dans l'évaluation diagnostique d'un patient avec une LGMD2. Parfois les changements d'expression protéique sont plus subtils et l'immunohistochimie seule peut conduire à un diagnostic incertain, le western blot est alors essentiel, car il permet de visualiser la présence d'une protéine spécifique sur une biopsie musculaire. Même si une mutation primaire dans l'un des quatre gènes sarcoglycanes (α -, β -, γ -, δ -sarcoglycanes) peut entraîner des carences secondaires dans toutes les autres protéines sarcoglycanes, des modèles immunohistochimique plus spécifiques sont apparues avec un potentiel pour guider et abrégé les investigations génétiques nécessaires.

Pour les mutations de la γ -sarcoglycane, le model consiste en une immunoréactivité réduite, absente ou bien présente de la γ -sarcoglycane en combinaison avec une immunoréactivité réduite mais détectable pour les autres sarcoglycanes, en particulier l' α - et la δ -sarcoglycane, C'est dans l'étude menée par Bonnemann et collaborateurs, que ce modèle a été en mesure de prédire les mutations de gamma-sarcoglycane primaires chez cinq patients consécutifs. Cinq mutations différentes ont été trouvées, y compris une nouvelle mutation d'épissage récurrente, une grande délétion du gène entier et une mutation nouvelle faux-sens (Leu90Ser). La mutation Cys283Tyr, auparavant réservée aux populations tsiganes a été trouvée à l'état hétérozygote avec la mutation c.525delT, commune en Afrique du Nord (Bönnemann et al., 2002). Les différentes mutations déjà connues et nouvellement décrites dans l'étude, indiquent que le profil immunohistochimique de la γ -sarcoglycane mutée ne se

limite pas à un type de mutation particulière, mais plutôt sur l'effet des mutations de la γ -sarcoglycane sur la composition du complexe sarcoglycane.

L'analyse immunohistochimique complétée par le western blot avec tous les anticorps des sarcoglycanes disponibles est donc un outil utile pour guider les investigations génétiques qui sont nécessaires pour arriver au diagnostic génétique correct dans un cas donné (Bönnemann et al., 2002).

IX.2 Tests génétiques

L'analyse génétique est indispensable au diagnostic final d'une LGMD2C, elle est également nécessaire pour détecter les porteurs de mutations dans les familles des patients atteints afin d'offrir un conseil génétique approprié, y compris le diagnostic prénatal.

Habituellement, le diagnostic définitif d'une myopathie nécessite une biopsie musculaire qui reste l'examen clé dans la plupart des cas. Cependant, dans certaines situations, le clinicien peut s'en affranchir et passer directement à l'étape suivante à savoir l'analyse génétique (Petiot et Andoni Urtizbera, 2004). Dans la LGMD2C, l'origine ethnique oriente parfois vers une des deux mutations privées, méditerranéenne (c.525delT) ou tzigane (C283Y), lesquelles sont facilement détectables par analyse génétique de l'exon incriminé. À défaut, un screening complet du gène SGCG est souvent nécessaire.

Si la mutation identifiée est à l'état homozygote, c'est la confirmation du diagnostic de la gamma-sarcoglycanopathie (LGMD2C) (Petiot and Andoni Urtizbera, 2004). Cependant, si la mutation identifiée est à l'état hétérozygote ou il n'y a pas de mutation détectée, un séquençage direct des exons codants (2 à 8) du gène SGCG sera effectué afin de cribler les mutations dans le gène (Urtizbera et Cobo, 2011).

D'autres techniques peuvent être utilisées afin de détecter des anomalies dans le gène SGCG, comme l'analyse de délétion ou duplication dans le gène par la technique MLPA (multiplexe ligation-dependant probe amplification) (Diniz et al., 2014). La PCR Transcriptase inverse (RT-PCR) peut également être utilisée pour analyser l'ARNm du gène SGCG exprimé dans des lymphocytes ou les muscles squelettiques (Okizuka et al., 2010).

En générale, le diagnostic définitif d'une personne atteinte d'une LGMD repose sur des examens cliniques, des tests complémentaires parfois invasifs comme des biopsies et le décodage de l'ADN des patients gène par gène, jusqu'à trouver celui en cause dans la maladie. Ensuite seulement, les médecins peuvent appliquer les traitements les plus adaptés. Mais cette technique de "gène par gène" est très longue, et s'avère infructueuse pour la moitié

des patients. A ce titre, une équipe de l'Inserm a testé le séquençage à haut débit pour accélérer et améliorer le diagnostic moléculaire. Les chercheurs ont constitué deux groupes de patients atteints de maladies neuromusculaires diverses. Pour l'un des deux, les mutations en cause étaient déjà connues et pas pour l'autre. A partir d'un échantillon sanguin, les 267 gènes connus à ce jour ont été analysés simultanément avec une machine de séquençage à haut débit. Les résultats ont permis de retrouver toutes les mutations connues pour le premier groupe et d'identifier celles en cause pour la moitié des patients du second groupe, soit un résultat tout à fait satisfaisant selon les auteurs. Le tout, en deux mois à peine et pour un coût bien inférieur à celui de la technique actuelle du gène par gène (Vasli et al., 2012). Plus récemment, dans un article publié en décembre 2015 (Ghaoui et al., 2015), des chercheurs australiens rapportent leur expérience dans l'application des techniques de séquençage nouvelle génération pour le diagnostic des LGMDs, soixante familles atteintes de LGMD ont ainsi été étudiées. Chez 27 d'entre elles, une anomalie dans un gène connu comme étant impliqué dans les LGMD a été identifiée, ce qui constitue un rendement très honorable de 45%.

Le séquençage à haut débit permet aux patients atteints de LGMD d'accéder à un conseil génétique auprès de leurs familles ou encore l'intégration de groupes de patients dans des essais cliniques (Vasli et al., 2012).

X. Modèles animaux

En marge des modèles naturels et grâce aux progrès de la biologie moléculaire, les chercheurs ont également pu développer un grand nombre de modèles murins transgéniques de dystrophies musculaires, obtenus par invalidation de gène au moyen d'une technique réalisée chez la souris qui permet de supprimer un gène (KO) ou de remplacer un gène sauvage par un gène porteur d'une mutation identifiée chez l'Homme (mutagenèse dirigée) afin d'obtenir une lignée de souris modélisant la pathologie humaine (Serosé, 2007).

Suite à l'identification des différents gènes responsables des sarcoglycanopathies et des dystrophinopathies humaines, les chercheurs ont généré des modèles animaux transgéniques à la fin des années 1990. Ainsi, des lignées de souris porteuses de mutations nulles pour chacun des sarcoglycanes ont été développées. Tous ces modèles murins manifestent des dystrophies musculaires progressives plus sévères que celle retrouvée chez la souris *mdx*, avec de larges foyers de myofibres en dégénérescence – régénération (Ng et al., 2012).

Le premier modèle transgénique de sarcoglycanopathie disponible a été la lignée murine *gsg*^{-/-} invalidée pour le gène SGCG. Les souris *gsg*^{-/-} développent une dystrophie musculaire comparable à celle retrouvée chez les patients LGMD-2C, qui touche à la fois les muscles squelettiques et le cœur. La cardiomyopathie des souris *gsg*^{-/-} est d'abord hypertrophique et évolue éventuellement ensuite vers la dilatation (Heydemann et al., 2001).

Les souris dépourvues de la protéine gamma-sarcoglycane développent une dystrophie musculaire progressive similaire à la dystrophie musculaire humaine, sans gamma-sarcoglycane, la bêta et la delta-sarcoglycane sont instables au niveau de la membrane musculaire et l'alpha-sarcoglycane est fortement réduit. L'expression et la localisation de la dystrophine, de la dystroglycane et de la laminine-alpha-2, une liaison mécanique entre le cytosquelette d'actine et la matrice extracellulaire, semblent ne pas être affectées par la perte des sarcoglycane. Hack et collaborateurs ont évalué l'intégrité fonctionnelle de cette liaison mécanique et ont constaté que les muscles isolés dépourvus de gamma-sarcoglycane présentaient une résistance normale à la contrainte mécanique induite par la contraction du muscle excentrique. Les muscles déficients en sarcoglycane ont également montré une force isométrique normale et une force de force tétanique. En outre, il n'y avait aucune preuve de la contraction induite de blessures chez les souris dépourvues de gamma-sarcoglycane quand ils ont été soumis à un régime d'exercice prolongé et rigoureux. Ces résultats ont démontré que la faiblesse mécanique et les lésions musculaires induites par la contraction ne sont pas nécessaires pour la dégénérescence musculaire et le processus dystrophique. Ainsi, les auteurs ont conclu qu'un mécanisme non mécanique, impliquant peut-être une fonction de signalisation inconnue, est susceptible d'être impliqué dans les cas de dystrophie musculaire dans lesquels le sarcoglycane est déficient (Hack et al., 1999).

Dans un modèle de souris préclinique basé sur la perturbation du gène SGCG (Hack et al., 1998), les animaux auxquels on a injecté un vecteur de virus adéno associé (AAV) ont exprimé SGCG dans le sarcolemme des fibres musculaires et ont montré une amélioration globale de leur profil histologique dystrophique (Cordier et al., 2000). Ces résultats, prouvent l'efficacité des études chez la souris (Herson et al., 2012).

Shelton et collaborateurs, ont déclaré que des modèles canins de sarcoglycanopathies avaient été signalés dans les races Boston terrier « Cocker spaniel et Chihuahua ». Bien que des mutations spécifiques dans les gènes des sarcoglycane n'avaient pas encore été caractérisées, tous les 3 modèles ont montré l'absence de la gamma-sarcoglycane dans le tissu musculaire (Shelton and Engvall, 2005).

XI. Traitement et perspectives thérapeutiques

XI.1 Traitement

Il n'existe Pas de traitement définitif pour LGMD2C ainsi que pour les autres dystrophies musculaires qui existent (Diana et al., 2011). La prise en charge pluridisciplinaire de la maladie reste le seul moyen actuel pour prolonger la survie et améliorer la qualité de vie des patients, elle comprend :

-Le suivi neuromusculaire (Evaluation de la fonction motrice) :

Les contrôles réguliers chez un spécialiste pour suivre l'évolution de la maladie et comprendre si certains signes ou symptômes nécessitent des contrôles plus approfondis sont important afin de pouvoir prendre une décision concernant les nouveaux traitements au moment voulu et d'anticiper et prévenir autant que possible les éventuelles complications.

Le plus important, c'est d'avoir un suivi régulier de façon à ce que les divers actes puissent être supervisés de manière adéquate. Le suivi régulier doit inclure des examens de plusieurs paramètres aptes à montrer l'évolution de la maladie (Manzur and Muntoni, 2009).

-Le suivi de la rééducation (kinésithérapie et ergothérapie)

Les personnes atteintes de LGMD2C doivent suivre différents types de rééducation pendant leur existence. La plupart de ces actes seront pratiqués par des kinésithérapeutes et des ergothérapeutes, mais d'autres spécialistes peuvent également intervenir, tels que des prothésistes, des fournisseurs de fauteuils roulants et d'autres types de sièges; des chirurgiens orthopédiques peuvent également être consultés (Narayanaswami et al., 2014).

-Le suivi orthopédique

Les personnes atteintes de LGMD2C peuvent développés une scoliose. Le suivi orthopédique doit comporter une surveillance de la scoliose par une observation clinique tout au long de la phase ambulatoire et par une radio de la colonne uniquement si une scoliose est constatée. Pendant la phase non ambulatoire, un contrôle clinique de la scoliose est requis à chaque visite clinique (Narayanaswami et al., 2014).

-Le suivi respiratoire (évaluation de la fonction des muscles respiratoires)

Pendant la phase ambulatoire, une surveillance minimale de la fonction pulmonaire (telle que la mesure de la capacité vitale forcée, au moins une fois par an) permet à l'enfant de se familiariser avec les équipements et à l'équipe soignante d'évaluer la fonction respiratoire maximale du patient (Manzur and Muntoni, 2009).

-Le suivi cardiaque (évaluation de la fonction du muscle cardiaque)

Le but du suivi cardiaque dans le cadre de la DMD est de détecter et de traiter rapidement la détérioration de la fonction cardiaque (généralement il s'agit de cardiomyopathie secondaire à un affaiblissement du muscle cardiaque, ou de problèmes de rythme cardiaque donnant lieu, entre autres, à des palpitations) qui accompagne, généralement, la progression de la maladie.

-Le contrôle du poids pour éviter l'obésité et la participation et le soutien affectif sont également nécessaires (Diniz et al., 2014).

XI.2 Perspectives thérapeutiques

XI.2.1 Blocage de la myostatine chez la souris modèle de la gamma sarcoglycanopathie

La myostatine est une protéine produite à l'état naturel par l'organisme, destinée à limiter la croissance musculaire. De nombreuses études ont montré les effets bénéfiques d'un blocage de la myostatine chez différents modèles animaux de maladies musculaires dont la souris *mdx* (modèle de la DMD). Des études récentes suggèrent que ce blocage de la myostatine serait plus efficace dans des dystrophies musculaires modérément sévères (la BMD et certaines formes de myopathies des ceintures) ou à un stade précoce de la maladie pour des pathologies plus sévères.

Dans une étude publiée en mars 2008 (Bogdanovich et al., 2008), une équipe américaine a testé l'effet d'un blocage de la myostatine chez la souris *sgcg*^{-/-}, modèle de la LGMD2C.

Les chercheurs ont traité les souris pendant 3 mois avec des anticorps spécifiques capables de neutraliser la myostatine. Le blocage de la myostatine a entraîné une augmentation significative de la taille des fibres musculaires, de la masse et de la force musculaires. Par contre, le traitement n'a pas amélioré la dystrophie habituellement notée au niveau du tissu musculaire. Il est important de noter que les souris *sgcg*^{-/-} ont une maladie plus grave que les souris *mdx* et qu'elles étaient âgées de 1 mois au début de l'expérience c'est-à-dire à un âge où la maladie est déjà bien installée. La discordance entre l'amélioration clinique et l'absence d'amélioration histologique pourrait refléter des mécanismes physiopathologiques (Bogdanovich et al., 2008).

XI.2.2 Approche pharmacologique

Aux États-Unis, au Canada et au Japon, se déroule un essai de phase II/III, randomisé, en ouvert, ayant pour but d'évaluer l'innocuité et l'efficacité sur les performances cardiaques, d'un antioxydant, le coenzyme Q10, et d'un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II (IEC), administrés séparément ou ensemble.

Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine ou inhibiteurs de l'enzyme de conversion, sont des médicaments d'utilisation récente, qui entraînent une dilatation des vaisseaux sanguins. Ils sont utilisés notamment dans le traitement de l'hypertension artérielle et de l'insuffisance cardiaque (Myoinfo, 2016).

XI.2.3 Thérapie génique

La thérapie génique pourrait être une option dans l'avenir pour le traitement de la gamma-sarcoglycanopathie. Un essai français de thérapie génique de phase I pour la gamma-sarcoglycanopathie a débuté en décembre 2006. L'essai a été mené à l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière (AP-HP. Paris. France).

L'objectif principal de cet essai est d'évaluer la tolérance clinique à l'injection intramusculaire du produit de thérapie génique, c'est-à-dire le vecteur AAV1 contenant le gène de la gamma-sarcoglycane (AAV1-SGCG). D'autres paramètres seront également évalués :

- La réaction immunitaire locale et systémique contre le vecteur et le transgène
- La qualité du transfert de gène dans les muscles injectés en termes d'efficacité, d'expression et de distribution.

Neuf patients atteints de LGMD2C [3 hommes, 6 femmes, âge moyen de 26ans (extrêmes 16 à 38 ans)], ayant la mutation homozygote c.525delT sur le gène SGCG et une absence de marquage pour la protéine γ -sarcoglycane sur la biopsie musculaire, ont été inclus. Ils étaient tous en fauteuil roulant. Une escalade de dose a été appliquée, aux neuf patients inclus, divisés en trois cohortes.

La construction injectée comporte un vecteur AAV1 exprimant le gène humain SGCG, sous le contrôle d'un promoteur de la desmine (expression musculaire quasi exclusive). L'injection AAV1-desm- SGCG a été faite en intramusculaire, lors d'une biopsie à ciel ouvert dans le muscle carpi radialis (extenseur du poignet), de l'avant-bras non dominant. Le premier groupe a reçu une dose de 3×10^9 vg dans 100 μ L, le second $1,5 \times 10^{10}$ vg dans 100 μ L et le troisième $4,5 \times 10^{10}$ vg dans 300 μ L. L'analyse histologique a été réalisée avec une double

lecture en aveugle, par deux anatomopathologistes indépendants, comparant la première biopsie musculaire à j-30 avant injection, à la deuxième à j+ 30 au site d'injection. Aucun effet secondaire sérieux n'a été observé. Tous les patients sont devenus séropositifs pour l'AAV1. Dans la biopsie réalisée 30 jours après l'injection (et comparativement à celle réalisée 30 jours avant), l'AAV1-desm-SGCG était détecté par PCR chez tous les patients sauf un. L'ARNm de SGCG était détecté (par RT-PCR) chez les trois patients de la troisième cohorte qui ont reçu la plus forte dose d'AAV1-desm-SGCG.

L'étude immuno-histochimique montrait une expression de SGCG chez cinq patients sur neuf, avec pour les trois qui ont reçu la plus forte dose, une expression de la néo protéine à la surface de quelques fibres (4,7 à 10,5 %).

La protéine γ -sarcoglycane est devenue également détectable par Western blot chez le dernier patient.

L'expression de néo SGCG exogène peut être obtenue chez des patients LGMD2C après transfert du gène par un AAV1, sans effet secondaire notable. Cette approche de thérapie génique ouvre la voie d'un traitement générale pour ce type de myopathie après d'autres essais. Généthon a d'ailleurs initié de nouvelles études précliniques dans l'objectif de réaliser un second essai I/IIa de thérapie génique visant à corriger la pathologie dans un membre entier, par perfusion intraveineuse locorégionale (Herson et al., 2012).

XII. Pathologie associée à la LGMD2C

En 2009, une étude a été menée sur une patiente présentant une démarche anormale et une hypertrophie des mollets à l'âge de 10 ans. Elle a été diagnostiquée myosite à éosinophiles après l'étude de la biopsie musculaire. Une deuxième biopsie musculaire à l'âge de 20 ans et des tests génétiques ont révélé une gamma-sarcoglycanopathie primaire. C'est le premier patient LGMD2C qui a présenté initialement une myosite à éosinophiles. L'éosinophilie a été signalée précédemment chez les patients atteints de calpainopathie et de la dystrophie musculaire de Becker et pourrait être une caractéristique précoce mais transitoire d'un éventail plus large de dystrophies musculaires (Baumeister et al., 2009).

En 2010, des chercheurs ont démontré qu'un déficit en δ -sarcoglycane chez la souris conduisait à un déficit secondaire de la γ -sarcoglycane et le microspand avec une altération du bon fonctionnement de la pompe calcique (Solares-Pérez et al., 2010).

XIII. Conseil génétique et diagnostic prénatal

❖ Conseil génétique

Une fois le diagnostic précis de la LGMD2C est posé chez le patient index, le conseil génétique doit être organisé, avec des tests appropriés pour les membres de la famille qui sont à risque d'être porteurs de la maladie.

Le conseil génétique fournit des informations sur le mode de transmission, les risques pour les autres membres de la famille, et le pronostic vital. Les membres de la famille porteurs de la maladie peuvent discuter avec un conseiller en génétique des options de planification familiale pour réduire le risque de transmission de la maladie aux futurs enfants (Pegoraro and Hoffman, 1993).

***Mode de transmission**

Les difficultés dans le diagnostic précis de la LGMD2C est la détermination du mode de transmission dans une famille individuelle rendent le conseil génétique particulièrement compliqué.

***Risque pour les membres de la famille atteints de LGMD2C**

Parents du patient index :

-Les parents sont des hétérozygotes obligés et portent donc une seule copie d'une mutation pathogène.

-Les hétérozygotes (porteurs) sont asymptomatiques.

Fratrie du patient index :

-À la conception, chaque frère ou sœur de l'individu atteint à 25% de chance d'être affecté, 50% de chance d'être un porteur asymptomatique et 25% de chances d'être non affecté et non porteur.

-Une fois qu'un membre de la fratrie à risque est connu pour être non affecté, la chance qu'il ou elle soit porteur de la maladie est de 2/3.

-Les hétérozygotes (porteurs) sont asymptomatiques.

-La sévérité clinique et le phénotype de la maladie diffèrent souvent entre les individus ayant les mêmes mutations; ainsi, l'âge d'apparition et / ou la progression de la maladie chez les membres atteints ne peuvent pas être prédits.

Progéniture d'un patient index :

-Tous les descendants sont porteurs obligés.

-Dans les populations consanguines présentant un trouble autosomique récessif, les risques

pour la progéniture d'un patient index doivent être calculés en fonction de la fréquence porteuse dans la population.

*Identification des porteurs de mutation

-Si les mutations causant la LGMD2C chez le patient index ont été identifiées, les tests génétiques de porteurs de mutation chez les membres de la famille à risque est alors possible.

❖ **Diagnostic prénatal**

Le diagnostic prénatal répond à un besoin d'identifier tôt durant la grossesse un certain nombre d'anomalies fœtales ou maladies génétiques. Réalisable depuis les années soixante, le diagnostic prénatal des maladies génétiques n'est devenu pratique courante de l'évaluation des grossesses à risque qu'au cours des trois dernières décennies. Dès 1976 trois études multi-sites, réalisées en Amérique et en Europe, ont confirmé que le prélèvement de liquide amniotique au second trimestre de la grossesse, en vue d'une étude des cellules fœtales (amniocytes), était une technique fiable et peu risquée pour la mère et le fœtus (Pegoraro and Hoffman, 2012).

Le choix du test prénatal dépend évidemment d'un diagnostic correct du cas index et sur une identification précise du mode de transmission. Une évaluation systématique des diagnostics prénataux chez les médecins est nécessaire pour des conseils si la maladie est confirmée, mais également pour des soins postnatals appropriés et un suivi des nouveau-nés.

En 2008, une étude a été publiée sur le premier diagnostic prénatal réussi de LGMD2C en Tunisie et dans les pays africains (Siala et al., 2008). C'est également la deuxième étude de diagnostic prénatal de LGMD2C dans le monde après l'étude de (Dinçer et al., 1998) chez une famille turque. L'étude a concerné une seule famille présentant deux garçons avec un phénotype LGMD2. Un seul diagnostic prénatal a été réalisé chez cette famille. Le protocole utilisé dans l'étude était le suivant:

- Extraction d'ADN

Le liquide amniotique a d'abord été prélevé par amniocentèse sous guidage échographique entre les 14 et 18 semaines de gestation.

L'ADN génomique total a été extrait de cellules du fluide amniotique. L'extraction d'ADN à partir des leucocytes sanguins des nouveau-nés a également été réalisée selon le protocole standard (Kawasaki, 2012).

- Exclusion de la contamination cellulaire maternelle:

La contamination des cellules maternelles a été exclue en utilisant des marqueurs polymorphes à répétition courte en tandem (STR) génotypés par PCR quantitative

fluorescente chez tous les fœtus et leurs parents (Diego-Alvarez et al., 2005). Les amorces ont été marquées par fluorescence au préalable. Les produits de PCR ont tous ensuite été séquencés.

- Séquençage de l'ADN et dépistage des mutations:

L'amplification des huit exons du gène SGCG et leurs introns ont été réalisées sur l'ADN extrait des parents et du fœtus avec des amorces déjà publiées dans la base de données « Leiden Muscular Dystrophy Pages » et dans des conditions de PCR optimisées. Le séquençage direct des produits PCR a été réalisé.

Les résultats du séquençage des huit exons du gène SGCG ont montré que les deux patients étaient homozygotes pour la mutation c.525delT dans l'exon 6 du gène SGCG. Contrairement au fœtus qui a montré une absence de la mutation. Le fœtus a ainsi été suivi normalement et dépisté une fois née pour la mutation c.525delT, le résultat du dépistage était en concordance avec le diagnostic prénatal.

- Examens postnatals

Des examens cliniques ont été réalisés chez le nouveau-né et ont confirmé les résultats prénataux.

Cette étude montre l'importance du diagnostic prénatal dans le conseil génétiques, et l'importance du suivi postnatale des nouveau-nés.

CHAPITRE. II

PATIENTS ET MÉTHODES

Patients et méthodes

I. Type et période d'étude

Notre travail a comporté 2 parties :

1-Une étude rétrospective réalisée à partir de dossiers de patients avec un phénotype LGMD2C probable ayant consultés au service de neurologie du CHU de Constantine et diagnostiqués uniquement sur des bases phénotypiques.

2-Une étude prospective réalisée à partir de cas nouvellement recrutés.

I.1 Etude rétrospective

Une étude des dossiers de malades et des fiches de consultation archivés a été entreprise de Mars à Juin 2013, au service de neurologie du CHU de Constantine, à afin de rechercher d'anciens patients qui répondaient aux critères d'inclusion de notre étude et ayant eu ou pas de diagnostic génétique précis auparavant.

En l'absence d'adresse complète dans certains cas, nous avons retenu uniquement 9 dossiers (10 patients appartenant à 9 familles).

Les patients étaient convoqués, réinterrogés et prélevés après consentement éclairé pour l'étude génétique.

Les informations étaient recueillies à partir des dossiers et des fiches de consultation lorsque les patients étaient réinterrogés.

I.2 Etude prospective

Il s'agit d'une étude descriptive transversale.

Soixante-six patients appartenant à 56 familles étaient recrutés de manière prospective lors de la consultation externe des maladies neuromusculaires entre Mars 2013 et Avril 2015.

II. Patients

II.1 Description de la population d'étude

Notre étude est une étude clinique et génétique ayant porté sur une série de 76 patients de l'Est Algérien appartenant à 65 familles non apparentées avec un ou plusieurs membres atteints. Les 76 patients présentaient un phénotype LGMD R (autosomique récessif et récessif lié à l'X).

- Les patients étaient examinés et interrogés.
- L'enquête familiale à été réalisée à partir du cas index ou propositus défini comme le premier cas malade dans sa famille.
- Les frères et sœurs malades du patient index ont été examinés et inclus dans cette étude.
- Un arbre généalogique a été établi pour chaque famille (Annexe 2).
- La consanguinité des parents a été recherchée systématiquement.
- Tous les patients ont bénéficié d'un prélèvement sanguin après consentement éclairé et signé (Annexe 3), afin de réaliser l'étude génétique.

La biopsie musculaire a été réalisée seulement chez 5 patients (3 familles), dont les résultats avaient montrés un déficit en γ -sarcoglycane. Tous les autres patients n'ont pas bénéficié de biopsie musculaire par manque de structures spécialisées en neuropathologie dans notre région.

II.2 Critères d'inclusion

Les critères d'inclusions des patients basés sur l'histoire de la maladie et l'examen clinique étaient les suivants :

- patients des deux sexes (cas sporadiques ou familiaux).
- un mode de transmission récessif (autosomique récessif ou récessif lié à l'X).
- une faiblesse musculaire symétrique du tronc et des membres.
- une faiblesse musculaire progressive proximale plus importante que distale.
- un aspect myogène révélé par électromyogramme.
- une élévation du taux de CPK.

II.3 Critères d'exclusion

Étaient exclus de notre étude les patients avec :

- un taux de CPK et LDH normal.
- un mode de transmission autosomique dominant.
- un début néonatal.
- un déficit moteur distal isolé.
- une atteinte faciale, une faiblesse musculaire oculaire ou une atteinte d'autres organes.

III. Analyse clinique

Tous nos patients (cas index et secondaire) étaient soumis à un interrogatoire minutieux et à un examen clinique complet selon un questionnaire préalablement établi pour cette étude (Annexe 4) et qui a comporté :

- les données anamnestiques essentielles (antécédents personnels et familiaux des patients et l'histoire de leur maladie).
- les données de l'examen clinique.
- les critères de diagnostic.
- l'évolution de la maladie.
- les examens complémentaires.
- l'arbre généalogique pour chaque famille à la recherche d'autres membres atteints et pour définir le mode de transmission de la maladie.

III.1 Détermination de la sévérité du phénotype des patients

L'âge de la perte de la marche était le principal paramètre clinique utilisé pour classer les patients selon la sévérité du phénotype comme précédemment rapporté par (Merlini et al., 2000).

Le phénotype était considéré :

- Sévère (Duchenne-like) lorsque la perte de la marche survenait avant l'âge de 13 ans.
- Intermédiaire (BMD/DMD) si la perte de la marche a eu lieu entre 13 et 16 ans.
- Modéré (Becker-like) si la personne marchait encore après l'âge de 16 ans.

La sévérité du phénotype chez les patients trop jeunes n'ayant pas encore atteints l'âge de la perte de la marche, n'a pas pu être déterminé.

III.2 Examens complémentaires

L'examen clinique était accompagné d'examens complémentaires, tels que le bilan biochimique (CPK, LDH sériques), un ENMG, une EFR, un ECG et une échographie du cœur.

III.2.1 Etude biochimique

Les enzymes musculaires sériques à savoir la CPK et la LDH ont été dosés systématiquement chez tous les patients. Ils étaient exclus de l'étude les patients avec des taux de CPK et LDH normaux.

Le dosage des enzymes a été réalisé en majorité au laboratoire de biochimie du CHU de Constantine, les valeurs normales des enzymes étaient comprises entre 25 et 170 UI/L pour les CPK et entre 320 et 440 UI/L pour les LDH.

III.2.2 ENMG

L'ENMG a été réalisé chez tous les patients. Il a été effectué chez la plupart des cas au laboratoire de physiologie du CHU de Constantine.

III.2.3 EFR, ECG et échographie du cœur

L'EFR, l'ECG et l'échographie du cœur ont été réalisés chaque année pour tous les patients à la recherche d'une atteinte cardiaque ou respiratoire.

IV. Analyse génétique

IV.1 Méthode de prélèvement sanguin et mode d'acheminement

Tous les prélèvements sanguins étaient réalisés au cours des consultations externes des maladies neuromusculaires, dans des tubes stériles EDTA vacutainer de 10 ml.

Le sang prélevé était acheminé au laboratoire de biologie et de génétique moléculaire de la faculté de médecine, université Constantine 3, à température ambiante.

L'extraction de l'ADN était généralement réalisée le jour même selon un protocole standard (Miller et al., 1988), en cas de contrainte, les prélèvements étaient conservés pendant 24 heures à 4°C pour être extrait le lendemain.

Les ADNs extraits étaient conservés à -20°C, avant d'être transportés par nous-même au laboratoire Généthon en France. Des autorisations de transport d'échantillons ont été délivrées par le laboratoire de biologie et génétique moléculaire (Université Constantine 3) et par le département de biochimie et biologie cellulaire et moléculaire (Université Constantine 1).

Les techniques de PCR classique, spécifique d'allèle, multiplexe et séquençage de Sanger selon (Sanger et al., 1977), ont été réalisées dans le laboratoire Généthon à Evry (France).

IV.2 Stratégie de diagnostic adoptée

Compte tenu de la fréquence élevée de la mutation c.525delT du gène SGCG en Afrique du Nord (El Kerch et al., 2014) et du fait que l'analyse de l'ensemble de nos arbres généalogiques a révélé une transmission autosomique récessive accompagné d'un niveau

élevé de consanguinité, cette mutation a donc été recherchée en premier lieu chez tous les patients.

Dans un 2^{ème} temps, une recherche de délétions d'exons au niveau des points chauds connus dans le gène DMD a été réalisée chez les familles comportant uniquement des garçons atteints et non porteurs de la mutation c.525delT.

Enfin, Les familles négatives aux deux tests précédents avaient bénéficié d'une analyse de mutations supplémentaires des 6 autres exons codant du gène SGCG (exons 2, 3, 4, 5, 7, 8). L'exon 1 du gène n'a pas été analysé car il représente une région non codante (5' UTR) du gène SGCG (McNally et al., 1996b).

Une PCR spécifique d'allèle a été mise au point, afin de faciliter la recherche de la mutation c.525delT dans notre population, cette PCR spécifique d'allèle peut être considérée comme test diagnostique de routine devant un tableau clinique d'une LGMD2C probable.

IV.2.1 Extraction de l'ADN génomique total

L'ADN génomique était extrait à partir des leucocytes du sang périphérique des patients par la technique au NaCl selon le protocole standard (Miller et al., 1988) au laboratoire de biochimie et génétique moléculaire du CHU de Constantine.

IV.2.1.1 Principe

Les 10 ml de sang prélevés des patients étaient utilisés pour l'extraction de l'ADN génomique qui représente une matrice d'amplification pour les réactions PCR. La méthode employée dans notre étude est une méthode utilisant un solvant inorganique, le NaCl. Le sang doit être initialement mélangé à une solution hypotonique TE 20:5 (Tris 20mM Ph 7.5/MgCl₂ mM SDS à 10%). Le lysa est centrifugé, et après élimination du surnageant, le culot cellulaire contenant les leucocytes est traité par une solution de lyse (Na cl 400 Mm, EDTA 2mM, Tris 10mM, pH 8.2) et une solution de protéinase. La protéinase K digère les protéines cellulaires, ces dernières seront par la suite reléguées par l'intermédiaire d'une force ionique du NaCl (4M). Enfin, la précipitation de l'ADN génomique est effectuée en utilisant une solution d'éthanol absolu à froid (-20°C). L'extraction est faite selon le protocole expérimental suivant :

IV.2.1.2 Lyse des globules rouges

Après avoir enlevé le plasma sanguin, on complète le tube Falcon à 50ml avec le TE20 :5 pour faire éclater les globules rouges. La lyse est réalisée à 4°C pendant 10 à 15 minutes. Le lysat est centrifugé pendant 15 minutes à 3000 tours/ minutes à température ambiante.

Après élimination avec précaution du surnageant, on répète l'opération précédente 2 fois. S'il y'a des hématies qui persistent dans le culot, on effectue un lavage supplémentaire jusqu'à avoir un culot de blanc dépourvus de globules rouges.

IV.2.1.3 Lyse des leucocytes

Au culot des blancs, on rajoute 3ml de tampon de lyse (NaCl 400 mM, EDTA 2mM, Tris 10 mM, pH 8.2) et 200µl de SDS 10% (100 g SDS +100ml H₂O) afin de solubiliser les membranes des leucocytes, ensuite on rajoute 100µl de protéinase K à 10mg/ml, la suspension obtenue est placée sur une roue à 37°C pendant une nuit. Après refroidissement dans la glace, on rajoute à l'extrait 1ml de NaCl 4M tout en agitant vigoureusement.

IV.2.1.4 Précipitation des protéines

La suspension obtenue est remise à 5 minutes dans la glace jusqu'à avoir un aspect laiteux. Cette dernière est par la suite centrifugée 10 minutes à 2500 tours/minutes afin de précipiter les protéines. On obtient ainsi un culot au fond du tube contenant les débris (protéines, lipides,...), un surnageant contenant de l'ADN et l'interface contenant en majorité des protéines et peu d'ADN. Le surnageant contenant l'ADN dispersé, est récupéré dans un tube de 50ml.

IV.2.1.5 Précipitation de l'ADN

On transvase le surnageant dans un tube Falcon de 15 ml, on lui rajoute 2 fois son volume d'éthanol absolu (100%) préalablement refroidi. On laisse l'ADN se précipiter par agitation en retournant délicatement le tube jusqu'à ce que les filaments d'ADN forment une méduse visible à l'œil nu (laisser éventuellement 30 minutes à -20°C si la pelote d'ADN ne se forme pas). L'ADN est récupéré dans un tube Eppendorf (0.5 ml), la méduse d'ADN ainsi condensée est lavée 2 fois à l'éthanol 70% afin d'éliminer les traces de sels et séchée dans un lyophilisateur pendant 30 minutes.

VI.2.1.6 Quantification et contrôle de la pureté de l'ADN

Tous les l'ADN extraits des patients étaient contrôlés grâce au rapport A260 / A280 en utilisant un spectrophotomètre Nanodrop (ND-8000 8-échantillon spectrophotomètre).

L'acide nucléique et la plus part des macromolécules biologiques étant incolores, elles ne manifestent aucune absorption dans la gamme visible du spectre. En revanche, l'ADN montre une absorbance aux rayons ultraviolets (UV) spécifique, avec un maximum à 260 nm et un minimum à 230 nm, tandis que le maximum d'absorbance des protéines se situe à 280 nm.

Le rapport $R = A_{260}/A_{280}$ constitue un bon indicateur de la pureté de l'ADN (Barbas et al., 2007). Ce rapport doit être compris entre 1.6 et 2. Une valeur inférieure à 1.6 témoigne d'une contamination protéique et une valeur supérieure à 2 indique une contamination par l'ARN.

La quantification de l'ADN est réalisée à 260 nm avec une unité d'absorbance qui correspond à 50µg/ml. D'après ce principe, la concentration d'ADN peut être calculée à partir de la formule suivante :

$$[\text{ADN}] \text{ en ng/}\mu\text{l} = A_{260} \times 50 \times \text{facteur de dilution.}$$

IV.2.2 Amplification de l'ADN génomique par PCR classique et PCR spécifique d'allèle

Toutes les étapes de la mise au point de ces techniques de biologie moléculaire et l'analyse de l'ensemble des échantillons d'ADN des patients étaient réalisées par nous-même au laboratoire Généthon d'Evry (France).

IV.2.2.1 Amplification de l'ADN par PCR classique

Pour l'analyse des sept exons codants du gène SGCG (NM_000231.2), 200 ng d'ADN génomique étaient amplifiés par une PCR classique en utilisant des amorces décrites dans le tableau 5, dans un volume total de 50 µl de PCR.

Tableau. 5: Séquences des amorces des sept exons codants du gène SGCG.

Target	Upper sequence	Lower sequence	PCR product size (in bp)
Exon 2	gtattaacaagttgctccctc	caaaacaagaacatgcttaccag	309
Exon 3	ggcaatatatggaaatacatgtgtg	gcacatgtatgcgcttataaa	311
Exon 4	ccaggatctgtaacaatggataa	tggacaacatgcatgcaaag	249
Exon 5	cagaatcaatcaataccactaatgg	gcttgaaagattccacataaacttg	360
Exon 6	agaaaagtagggaaagagttggg	gatgaaataagaaacagtcaggaag	354
Exon 7	gttaccattgagaatgacttgaag	actcaggaatatcatcaggacatac	313
Exon 8	acgaaatgagttacataaagtcagg	tcaccagtaactggggaaaa	1017

A/ Préparation du milieu réactionnel de la PCR

Sept Mix de PCR étaient préparés pour chacun des exons 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 8 du gène SGCG, en ajoutant les réactifs suivants dans un tube Eppendorf de 1.5 ml pour chaque échantillon d'ADN:

- 17 µl d'eau distillée stérile
- 10µl de tampon 5X Phusion HF (contenant 1.5mM MgCl₂)
- 10µl de dNTP (1 mM)
- 0.5µl de taq phusion (Thermo-scientific US)
- 1.25µl d'amorce Xa (10 µM)
- 1.25µl d'amorce Xm (10 µM)
- 10µl d'ADN (20 ng)

B/ Déroulement des cycles de la PCR

Dans une plaque destinée au thermocycleur, chaque puit correspond au mix d'un exon spécifique, dans ces puits 45µl de mix est ajouté avec 5 µl d'ADN du patient.

Le programme utilisé était le suivant :

- | | |
|---|-------------|
| -dénaturation à 98°C pendant 01 minute | } 30 cycles |
| -hybridation à 98°C pendant 10 secondes | |
| -élongation à 59°C pendant 30 secondes | |
| -dénaturation à 72°C pendant 01 minute | |
| -extension finale à 72°C pendant 10 minutes | |

C/ Préparation du gel d'agarose pour le contrôle de PCR

Le contrôle de la taille des fragments amplifiés était effectué par électrophorèse sur un gel d'agarose à 2% (2g d'agarose+100ml TBE 1X) additionné à 4.5µl de SYBR Safe qui est un réactif intercalant qui se fixe entre les bases nucléiques à l'intérieur de la double hélice et qui rendra les ADN fluorescents par expositions aux UV, le gel est ensuite coulé sur la plaque d'une cuve horizontale).

D/ Contrôle des produits PCR

Les produits de PCR étaient soumis à une électrophorèse sur un gel d'agarose à 2% afin de confirmer leur amplification et leur taille correcte (Figures 14 et 15) en passant par les étapes suivantes :

- additionner à 10 μ l du produit PCR, 5 μ l de 2X Orange.
- déposer 5 μ l du marqueur de taille dans le premier puit du gel.
- déposer 15 μ l de chaque échantillon de patient dans chaque puit du gel.
- faire migrer les échantillons à 90 volts pendant 20 minutes.
- examiner et photographier le gel sous UV.

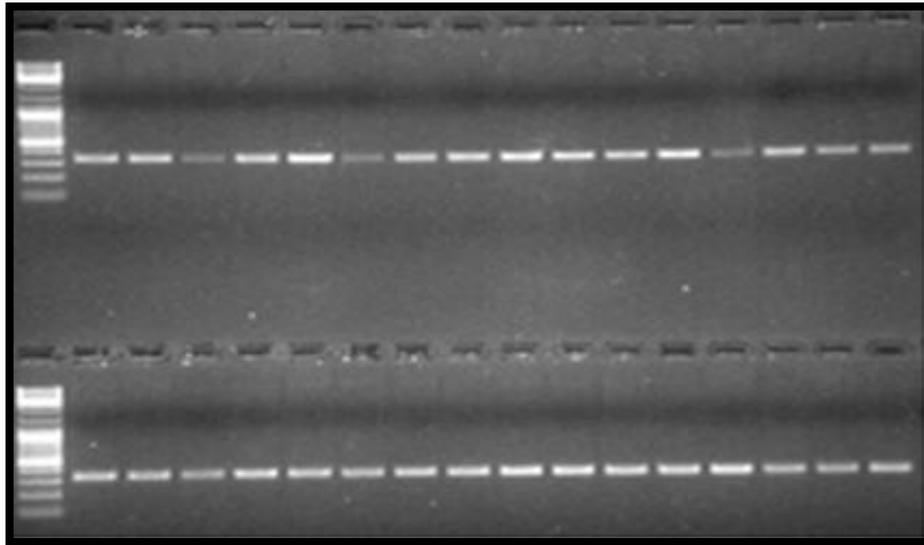


Figure. 14: Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose à 2% des fragments amplifiés par PCR de l'exon 6 du gène SGCG.

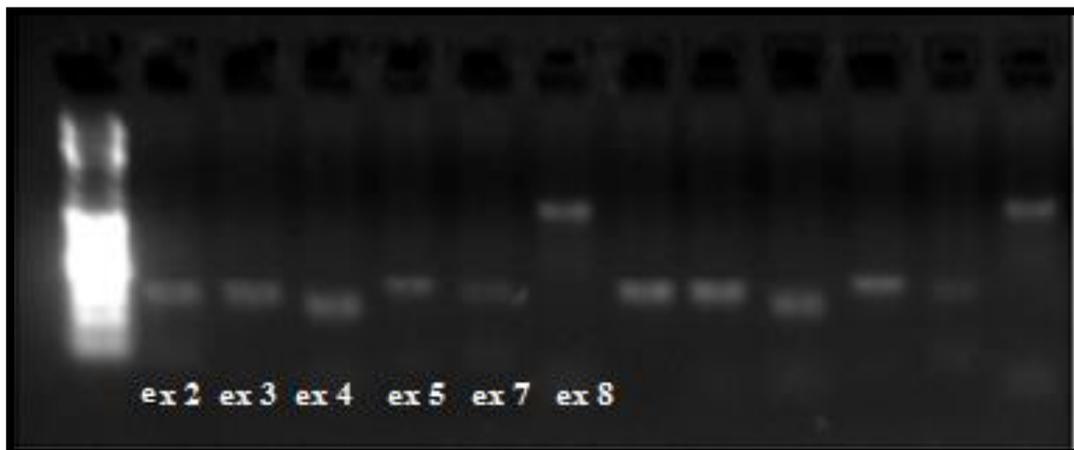


Figure. 15: Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose à 2% des fragments amplifiés par PCR des exons 2, 3, 4, 5, 7 et 8 du gène SGCG.

IV.2.2.2 PCR spécifique d'allèle

A/ Principe

La PCR spécifique d'allèle est employée très souvent afin d'identifier rapidement une mutation génique connue. L'amplification spécifique ne peut être obtenue que si l'amorce spécifique correspond à l'allèle muté et donc ne correspond pas à l'allèle normal (sauvage).

L'ADN génomique est amplifié de manière sélective avec l'amorce sens et anti sens de la mutation spécifique (Figure 16).

Afin d'identifier spécifiquement la mutation c.525delT, les échantillons d'ADN des patients étaient amplifiés par deux types d'amorces:

Pour l'allèle normal, l'ADN était amplifié avec les amorces suivantes:

- amorce sens (5'-AAGCCTGCTAATTTGTAATTGC-3')
- amorce anti-sens (5'-TGTCTCCACTGAATGTTCAAAA-3').

Pour l'allèle muté (c.525delT), l'ADN était amplifié avec une amorce anti-sens spécifique à la mutation:

- amorce sens (5'-AAGCCTGCTAATTTGTAATTGC-3').
- amorce anti sens (5'-TGTCTCCACTGAATGTTCAAAAAG-3').

B/ Préparation du milieu réactionnel de la PCR

Deux mix de PCR étaient préparés, l'un correspondant à l'allèle muté et l'autre à l'allèle normal en utilisant les amorces spécifiques pour chaque allèle. Les réactifs suivants étaient rajoutés pour chaque échantillon d'ADN:

- 22µl d'EAU
- 5µl de tampon applied
- 10µl de dNTP 1mM
- 1.25 µl d'amorce Ex6 normal-a à 10µM
- 1.25 µl d'amorce Ex6 muté-m/normal-m à 10µM
- 0.5 µl Taq applied
- 10 µl DNA 20ng/µl

C/ Déroulement des cycles de la PCR

Le programme utilisé pour amplifier la PCR était le suivant:

- dénaturation à 95°C pendant 2 minutes
 - hybridation à 95°C pendant 15 secondes
 - élongation à 63°C pendant 30 secondes
 - dénaturation à 72°C pendant 20 secondes
 - extension finale à 72°C pendant 5 minutes
- } 35 cycles

Les produits de PCR étaient séparés sur un gel d'agarose à 2% (même procédé que pour la PCR classique).

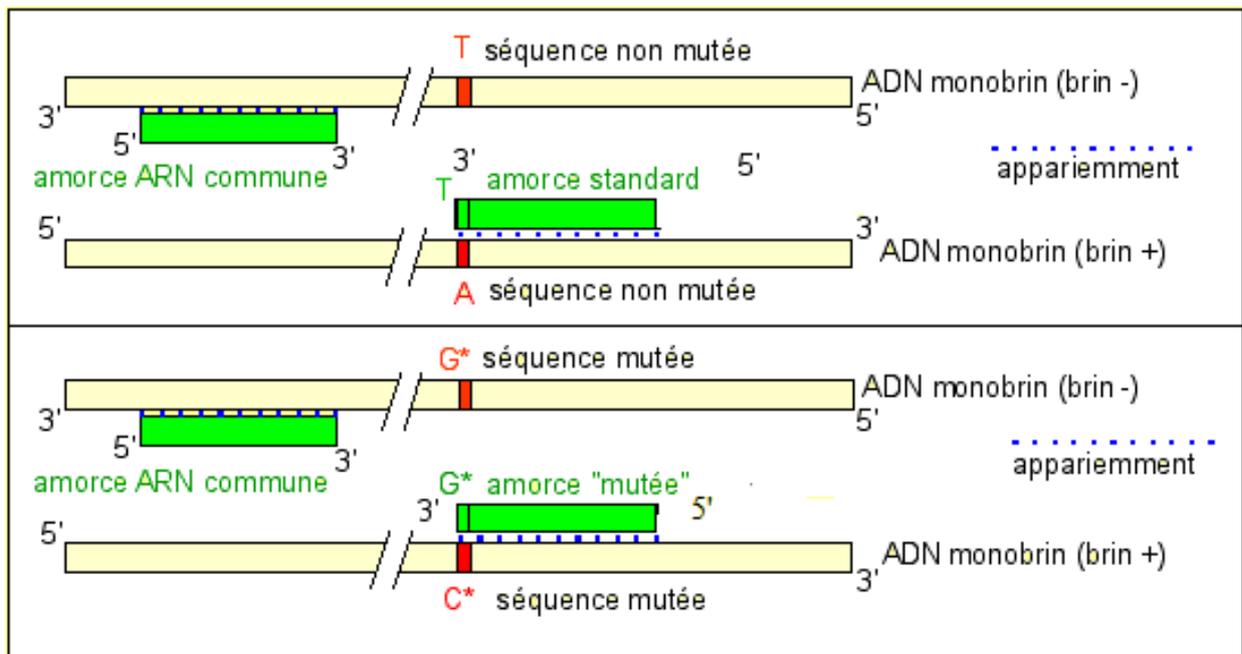


Figure. 16: Principe d'une PCR spécifique d'allèle (<http://pst.chez-alice.fr/tsp2.htm>).

IV.2.3 Séquençage (Sanger) des produits de PCR des sept exons du gène SGCG

IV.2.3.1 Principe

Le recopiage d'un brin matrice par une ADN polymérase ADN dépendante est initiée par la fixation d'un oligonucléotide spécifique (amorce), complémentaire du brin matrice. Cette ADN polymérase va permettre l'élongation d'un nouveau brin complémentaire du brin matrice dans le sens 5' _ 3'. L'ADN polymérase permet l'incorporation de nucléotides (dNTP: déoxynucléotides) libres présents dans le milieu réactionnel par la formation d'un pont phosphodiester entre le 3'OH de la chaîne et le 5' phosphate du dNTP suivant.

La réaction de Sanger repose sur l'incorporation aléatoire par cette ADN polymérase de didéoxynucléotides interrupteurs de chaîne (ddNTP) eux aussi présents dans le milieu réactionnel. Ces ddNTP diffèrent des dNTP par leur extrémité 3'. L'extrémité 3'OH des dNTP est remplacée par une extrémité 3'H. Cette modification empêche la formation de la liaison phosphodiester entre le ddNTP incorporé dans la chaîne et le nucléotide suivant, l'allongement de la chaîne est alors interrompu.

Dans le milieu réactionnel il y a compétition entre les dNTP et les ddNTP. Le rapport spécifique ddNTP/dNTP et l'affinité de la taq pour chaque nucléotide sont optimisés de telle façon qu'un ddNTP soit statistiquement incorporé à toutes les positions possibles.

Une migration électrophorétique du produit de cette réaction de séquence sur un gel très résolutif (polyacrylamide) va séparer tous les fragments présents en fonction de leur masse moléculaire (taille). Les plus petits fragments vont migrer plus rapidement que les grands. La grande résolution de ce gel permet de distinguer des fragments différents entre eux d'une paire de base.

L'identification du ddNTP présent à l'extrémité 3' de chaque fragment déterminera la séquence nucléotidique du brin matrice initial.

IV.2.3.2 Préparation des produits de PCR

Les produits de PCR des 7 exons étudiés du gène SGCG étaient directement envoyés pour séquençage à la compagnie Beckman Coulter Genomics, Takeley, Royaume-Uni.

Les étapes précédant l'envoi des produits de PCR étaient les suivantes:

- Les produits PCR étaient placés dans des tubes eppendorf à 1.5ml sur lesquels étaient indiquées les informations de chaque patient (numéro du patient et le numéro de l'exon), en sachant que le volume du produit PCR envoyé était de 30 µl.

- Les produits PCR de l'ADN du témoin ainsi que les amorces à 5 μ M de chaque exon étaient également envoyés.

IV.2.3.3 Analyse des séquences

Une fois les résultats du séquençage des amplicons nous étaient renvoyés par la compagnie Beckman Coulter Genomics, chaque séquence d'exon d'un patient était analysée et comparée à celle d'un témoin par le logiciel Sequencher 4.10.1 (Gene Codes Corporation).

Tous les résultats étaient ensuite groupés dans un fichier Excel pour faciliter l'exploitation de ces données lors de l'analyse statistique.

IV.2.4 Amplification de l'ADN par PCR multiplex à la recherche de macro-délétions du gène DMD

La PCR multiplexe est une technique limitée, car elle ne peut pas détecter toutes les mutations, mais l'énorme avantage c'est qu'elle est simple et facile à mettre au point pour un criblage initial, en particulier dans les pays où l'élaboration des technologies est difficile.

Les délétions des dix-neuf exons les plus fréquemment touchés du gène DMD (séquence NG_012232.1) étaient examinés par PCR multiplexe en utilisant des amorces précédemment publiées (Beggs et al., 1990; Chamberlain et al., 1988) (Tableau 6). Les petits fragments de gène ainsi obtenus étaient séparés par électrophorèse car ils migraient à différentes distances dans une couche de gel. Chaque bande correspondait à un des 19 exons amplifiés (une délétion se manifeste par l'absence d'une ou plusieurs de ces bandes).

Afin de bien observer l'amplification simultanée de 19 exons du gène de la dystrophine trois mix d'amorces étaient préparés:

- mix I (exons 4, 8, 12, 17, 19, 44 et 45).
- mix II (DP427m promotor, exons 3, 6, 43, 50, 52 et 60).
- mix III (exons 13, 46, 47, 48 et 51).

L'exon 46 était également amplifié seul chez quelques patients pour une meilleure lecture sur gel.

Les mélanges d'amorces étaient choisis de telle façon que les différents produits d'amplification obtenus au sein d'une seule réaction aient des tailles différentes et soient donc facilement individualisés.

IV.2.4.1 Préparation du milieu réactionnel de la PCR

Dans trois tubes Ependorff de 0,5 ml correspondant aux trois Mix de PCR, ajouter successivement pour chaque individu les solutions suivantes (pour un volume total de 50 μ l) :

- 3 μ l d'eau distillée stérile
- 10 μ l de tampon 5X Phusion HF (contenant 1.5mM MgCl₂)
- 10 μ l de dNTPs 1 mM
- 1.5 μ l de DMSO (3%)
- 0.5 μ l de Taq phusion (Thermo-scientific US)
- 20 μ l de mélange d'amorces (10 μ M)
- 5 μ l ADN (20 ng)

Pour l'amplification de l'exon 46, ajouter dans un quatrième tube Eppendorf de 0.5 ml, pour chaque individu les solutions suivantes :

- 21 μ l d'Eau distillée stérile
- 10 μ l de tampon 5X Phusion HF (contenant 1.5mM MgCl₂)
- 10 μ l de dNTPs (1 mM)
- 1.5 μ l de DMSO (3%)
- 0.5 μ l de Taq phusion (Thermo-scientific US)
- 1 μ l d'amorce ex46a (10 μ M)
- 1 μ l d'amorce ex46m (10 μ M)
- 5 μ l d'ADN (20 ng)

Tableau. 6: Séquences d’amorces de 19 exons du gène DMD (Beggs et al, 1990; Chamberlain et al, 1988).

Exons amplifiés	Reference	Longueur (en bp)	Amorces sens / anti-sens	Nom
exon 45	<u>Chamberlain 1990</u>	547	aaacatggaacatccttgtggggac / cattcctattagatctgtcgcctac	ex45-F/R
exon 48	<u>Chamberlain 1990</u>	506	ttgaatacattggtaaaccacaacatg / cctgaataaagcttcctaccacac	ex48-F/R
exon 19	<u>Chamberlain 1990</u>	459	gatggcaaaagtgttgagaaaaagtc / ttaccacatccccattttctcca	ex19-F/R
exon 17	<u>Chamberlain 1990</u>	416	gactttc gatgttgagattcttccc / aagcttgagatgctctcacCTTTTCC	ex17-F/R
exon 51	<u>Chamberlain 1990</u>	388	gaaattggctctttagcttggtttc / ggagagtaaagtgttggtggaaaatc	ex51-F/R
exon 8	<u>Chamberlain 1990</u>	360	ggcctcattctcatgttctaattag / gtcctttacacactttacCTGTTGAG	ex8-F/R
exon 12	<u>Chamberlain 1990</u>	331	gatagtgggcttacttacatccttc / gaaagcacgcaacataagatacacct	ex12-F/R
exon 44	<u>Chamberlain 1990</u>	268	cttgatccatagcttttacctgca / tccatcacccttcagaacctgatct	ex44-F/R
exon 4	<u>Chamberlain 1990</u>	196	ttgtcggctctctgctggctcagtg / caaagccctcactcaaacatgaagc	ex4-F/R
Exons amplifiés	Reference	Longueur (en bp)	Amorces sens / anti-sens	Nom
Dp427m exon 1	<u>Beggs 1990</u>	535	GAAGATCtagacagtggatacataacaaatgcatg / ttctccgaaggtaattgcctcccagatctgagtc	PmF/R
exon 3	<u>Beggs 1990</u>	410	tcatcc a tcatcttcggcagattaab / caggcggtagagtatgccaatgaaatca	ex3-F/R
exon 43	<u>Beggs 1990</u>	357	gaacatgtcaaagtcactggacttcatgg / atatatgtgttacctacCCTTGTCGGTCC	ex43-F/R
exon 50	<u>Beggs 1990</u>	271	caccaaattggattaagatgttcatgaat / tctctcaccagctcatcaactcatag	ex50-F/R
exon 13	<u>Beggs 1990</u>	238	aataggagtacctgagatgtagcagaaat / ctgacCTTAAGTTGTTCTTCCAAAGCAG	ex13-F/R
exon 6	<u>Beggs 1990</u>	202	ccacatgtagGTCAAAAATGTAATGAA / gtctcagtaatctcttacCTATGACTATGG	ex6-F/R
exon 47	<u>Beggs 1990</u>	181	cgttgtgcattgtctgtttcagTTAC / gtctaacCTTTATCCACTGGAGATTTG	ex47-F/R
exon 60	<u>Beggs 1990</u>	139	AGGAGAAATTGCGCCTCTGAAAGAGAACG / CTGCAGAAGCTTCCATCTGGTGTTCAGG	ex60-F/R
exon 52	<u>Beggs 1990</u>	113	AATGCAGGATTTGGAACAGAGGCCGTCC / TTCGATCCGTAATGATTGTTCTAGCCTC	ex52-F/R

IV.2.4.2 Déroulement des cycles de la PCR

Dans une plaque destinée au thermocycleur, étaient ajoutés séparément dans chaque puit correspondant à chaque patient, 45µl de mix I, mix II, mix III et mix exon 46, ensuite 5 µl d'ADN de chaque patient était déposé dans chacun des 4 puits.

Le programme utilisé était un Touch-down: dénaturation à 98°C pendant 1 minute, hybridation à 98°C pendant 10 secondes, élongation à 64-56°C pendant 30 secondes (La température diminue de 2°C tous les 2 cycles de 64°C à 56°C), Ces étapes sont suivies par 20 cycles à 98°C pendant 10 seconde; 56°C pendant 30 secondes; 72°C pendant 20 secondes et une extension finale à 72°C pendant 5 minutes.

IV.2.4.3 Préparation du gel NuSieve/agarose à 3%

Les produits PCR étaient séparés sur un gel NuSieve/agarose à 3% (2g de NuSieve+1g d'agarose + 100ml du tampon TAE 1X, additionner 4.5µl de SYBR Safe).

IV.2.4.4 Contrôle des produits PCR

Les produits de PCR étaient soumis à une électrophorèse sur un gel NuSieve /agarose à 3% (Figure 17) afin de détecter les éventuelles délétions d'exons (absence de bande amplifiée) en passant par les étapes suivantes :

- Additionner à 10µl du produit PCR 5µl de 2X orange.
- Déposer 5µl du marqueur de taille dans le premier puit du gel.
- Déposer 15µl de chaque échantillon de patient dans chaque puit du gel.
- Placer les électrodes de façon que la cathode se trouve du côté opposé du dépôt des échantillons en raison de la charge négative de l'ADN.
- Brancher le générateur et sélectionner le voltage à 80 volts puis à 100 volts pendant 3 heures jusqu'à la séparation des bandes, ensuite, examiner et photographier le gel sous UV.

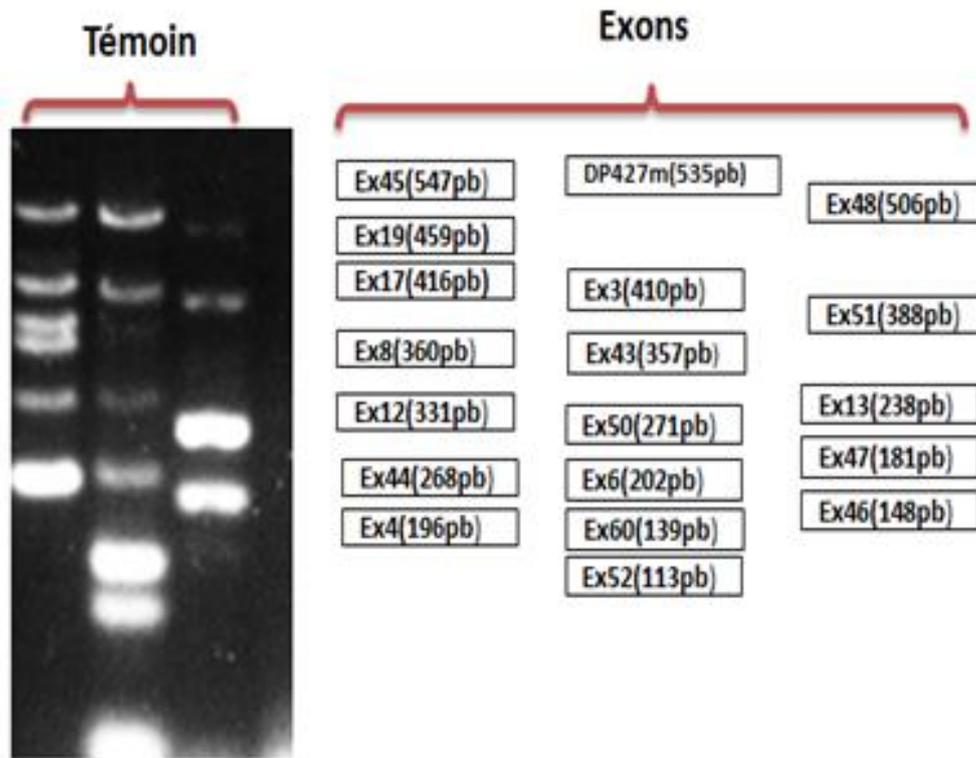


Figure. 17: Profil d'électrophorèse sur gel NuSieve/agarose à 3% des fragments amplifiés par PCR multiplexe des 19 exons du gène DMD.

V. Analyse statistique des données

Des tests non paramétriques étaient utilisés pour la comparaison des données statistiques obtenus. De nombreux tests non paramétriques permettent de travailler avec de petits échantillons (<30). Ceci est particulièrement utile aux chercheurs travaillant sur des maladies rares (Gupta, 2004).

V.1 Analyses uni-variées

Les variables qualitatives étaient obtenues par estimation de la fréquence en pourcentage (%) tandis que les variables quantitatives ont été exprimées en moyennes et médianes.

V.2 Analyses bi-variées

Les données étaient analysées en utilisant le test exact de Fisher et le test de Wilcoxon-Mann-Whitney via le programme statistique en ligne Biosta TGV.

Test exact de Fisher :

Pour la comparaison des pourcentages nous avons appliqué le test exact de Fisher. Le test des probabilités exactes de Fisher est une approche non paramétrique permettant de tester si deux variables qualitatives (nominales ou ordinales) distinctes (X^1, X^2) à deux modalités sont indépendantes. Ce test est une alternative au test de Chi-deux lorsque les échantillons sont petits.

Test de Wilcoxon-Mann-Whitney:

La comparaison des moyennes était réalisée à partir d'un test non paramétrique, il s'agit du test de Wilcoxon-Mann-Whitney (aussi appelé test de la somme des rangs de Wilcoxon ou plus simplement test de Wilcoxon).

CHAPITRE. III

RÉSULTATS

Résultats

I. Analyse phénotypique de l'ensemble des patients

Soixante-seize patients appartenant à 65 familles de phénotype LGMD R originaires de l'Est de l'Algérie, ont été retenus pour étude.

Les paramètres cliniques enregistrés étaient : l'âge, le sexe, la consanguinité des parents, les antécédents familiaux, l'âge de début, les signes associés (hypertrophie des mollets, macroglossie,...), les complications cardiaques et respiratoires.

-Les patients étaient repartis en 23 femmes (30%) et 53 hommes (70%) âgés au moment de l'étude en moyenne de 14.7 ans (extrêmes 2 - 34 ans).

-L'âge moyen de début de la maladie était de 6.3 ans (extrêmes 1-17 ans). Vingt-neuf patients (38%) ont perdus la marche à un âge moyen de 14.2 ans (extrêmes 8 -25 ans).

-L'âge de la perte de la marche était le paramètre clinique principal utilisé pour définir la sévérité du phénotype des patients. Les patients étaient classés comme suit :

- Douze patients (16%) avaient un phénotype sévère (perte de la marche avant l'âge de 13 ans).
- Neuf patients (12%) avaient un phénotype intermédiaire (perte de la marche entre 13 et 16 ans).
- Seize patients (21%) avaient un phénotype modéré (marchaient encore après l'âge de 16 ans).
- la sévérité du phénotype n'a pas été déterminée chez 39 patients (51%) car il s'agissait d'enfants jeunes n'ayant pas encore atteints l'âge de la perte de la marche.

-L'histoire familiale a révélé des cas secondaires chez 21 familles et le mariage consanguin a été observé chez 38 familles.

-La répartition des patients selon les résultats de l'examen neurologique est résumée dans la figure 18.

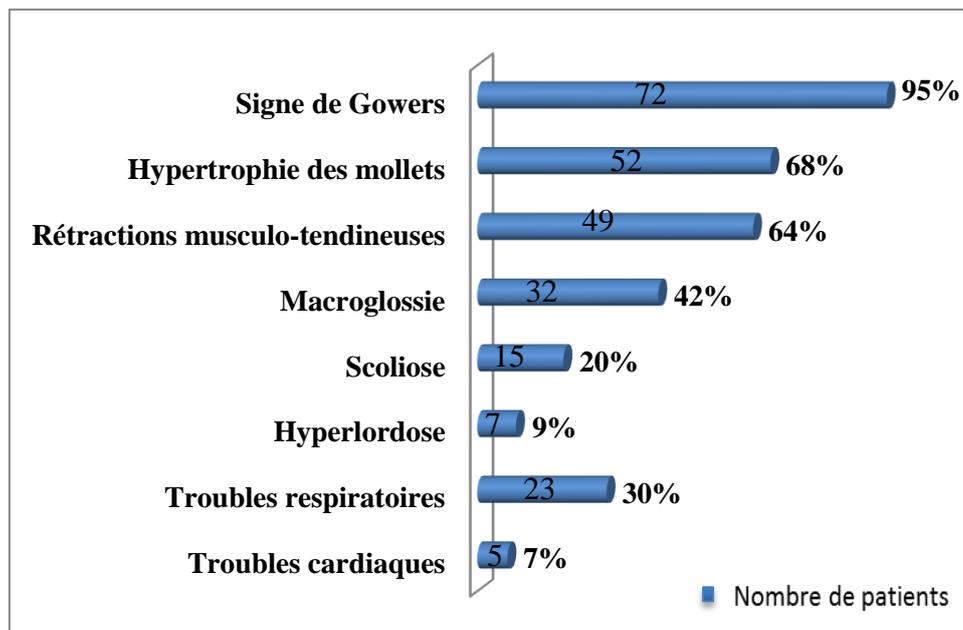


Figure 18: Répartition des patients selon les résultats de l'examen neurologique.

Quarante-neuf patients présentaient des rétractions musculotendineuses. La répartition des patients en fonction de ces rétractions était la suivante :

- Vingt-trois patients (47%) avaient des rétractions du tendon d'Achille.
- Treize patients (27%) avaient des rétractions au niveau des genoux.
- Sept patients (14%) avaient des rétractions au niveau des chevilles.
- Six patients (12%) avaient des rétractions au niveau des coudes.

Les troubles respiratoires étaient présents chez 23 patients. L'âge moyen du début de ces troubles était de 13,04 ans (extrêmes 7-22 ans). Parmi les 23 patients :

- Dix-neuf patients (83%) avaient des troubles ventilatoires restrictifs.
- Trois patients (9%) avaient un trouble ventilatoire mixte (restrictif/obstructif) à prédominance restrictif.
- Un patient avait un syndrome obstructif.

Les troubles cardiaques étaient présents chez 5 patients. L'âge moyen de ces troubles était de 13,4 ans (extrêmes 7-20 ans). Il s'agissait de :

- cardiomyopathie dilatée chez 2 patients.
- d'insuffisance mitrale chez 2 patients.
- d'insuffisance tricuspидienne chez 1 patient.

II. Recherche de la mutation c.525delT

La recherche de la mutation c.525delT par amplification, séquençage direct de l'exon 6 du gène SGCG chez l'ensemble des patients a permis d'identifier la mutation c.525delT chez 15 patients correspondant à un total de 11 familles (Figure 19) :

- Douze patients (9 familles) étaient homozygotes pour la mutation c.525delT.
- Trois patients (2 familles) étaient hétérozygotes pour cette même mutation.

Chez les trois patients hétérozygotes, une analyse plus approfondie du gène SGCG a été effectuée afin de rechercher d'autres mutations causales par séquençage direct des 6 autres exons codant du gène SGCG (exons 2, 3, 4, 5, 7 et 8).

Après l'identification de la mutation c.525delT chez 15 patients (20%) de notre population d'étude, nous avons décidé de mettre au point une PCR spécifique d'allèle dans le but de faciliter la recherche pratique de cette mutation et d'inclure cette technique dans la démarche diagnostique de routine dans notre laboratoire.

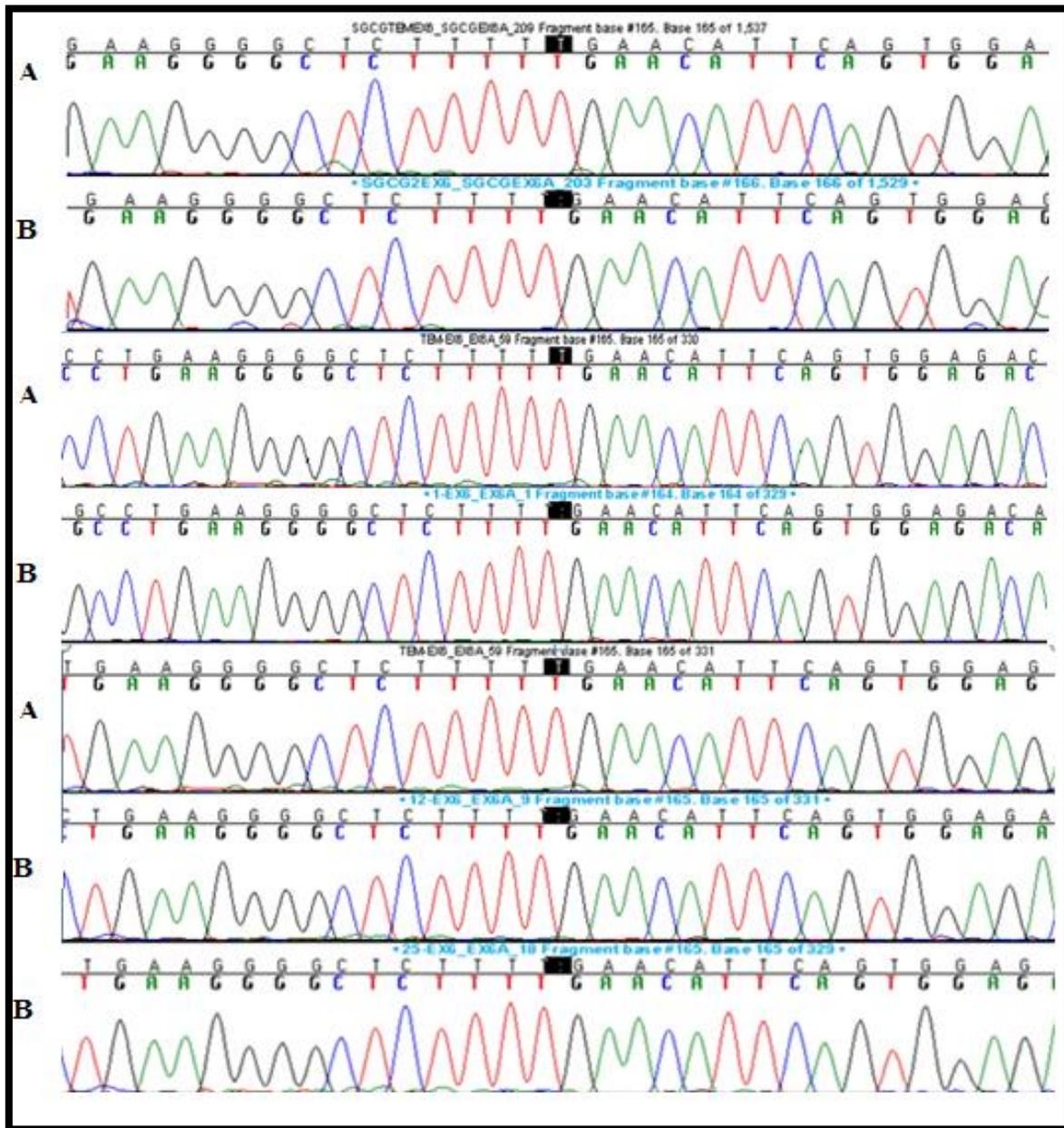


Figure 19: Electrophérogamme de la mutation c.525delT.

(A) Séquence normale. (B) Séquence mutée.

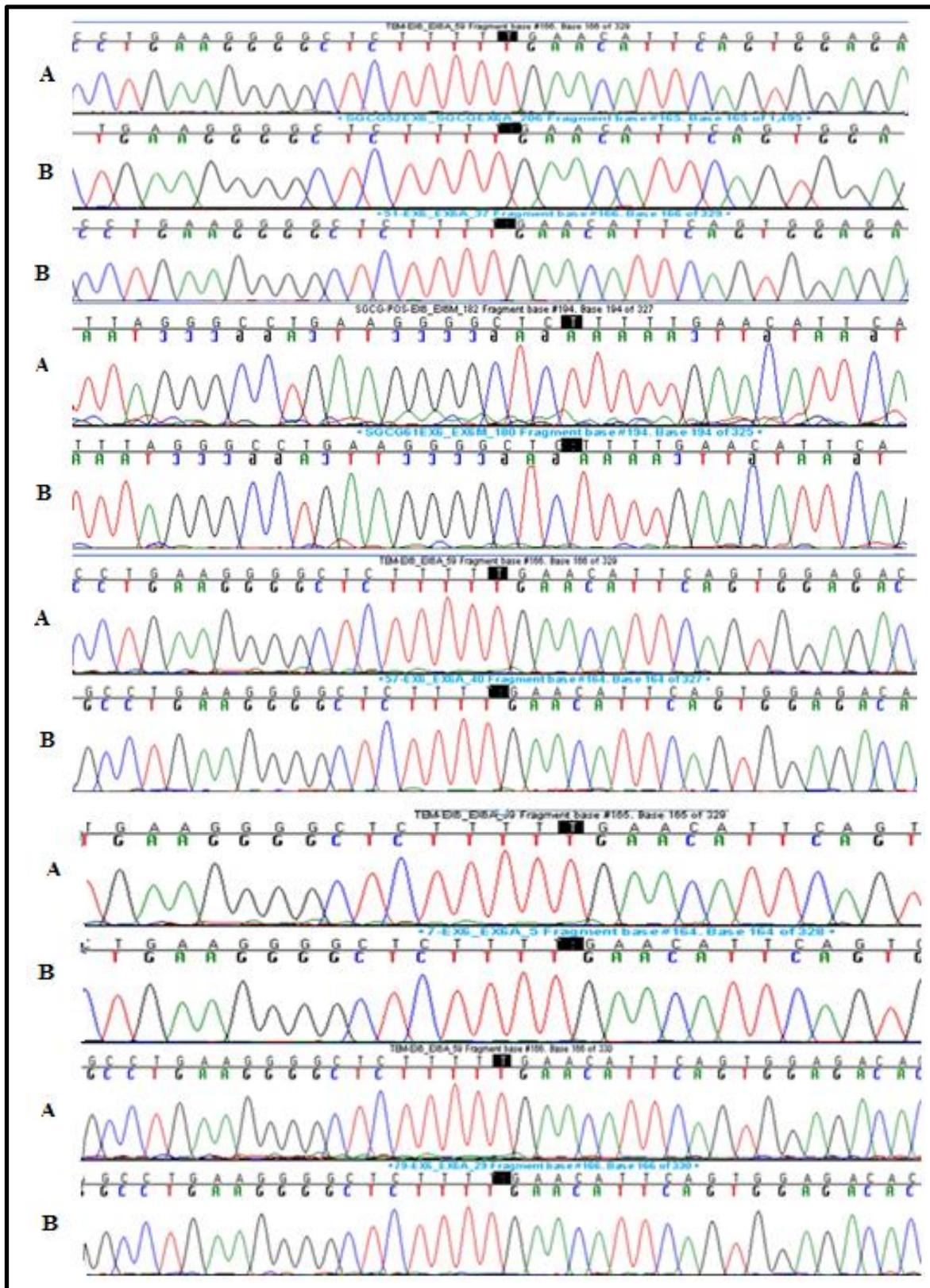


Figure 19: Electrophérogamme de la mutation c.525delT (suite).

(A) Séquence normale. (B) Séquence mutée.

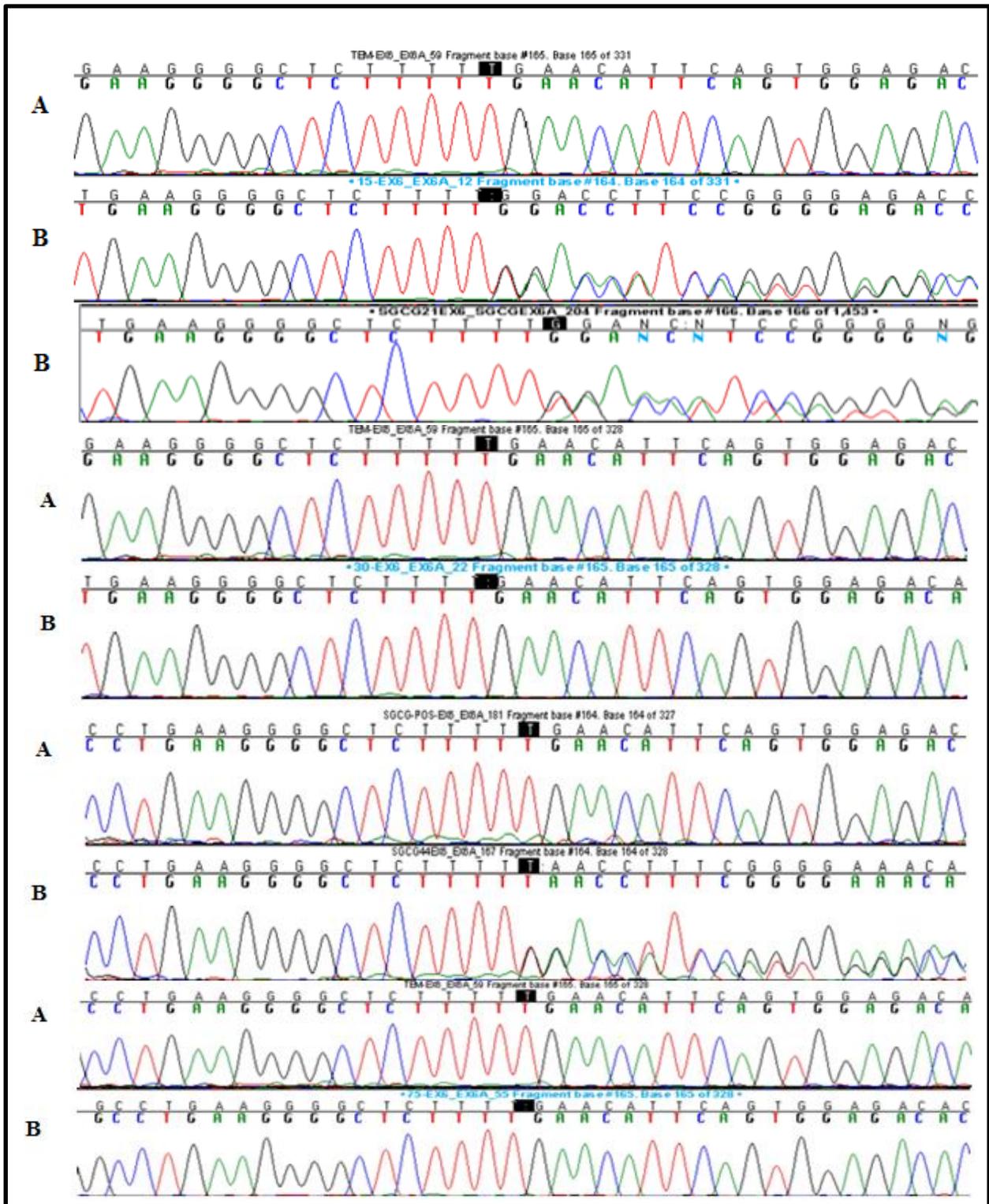


Figure 19: Electrophérogamme de la mutation c.525delT (suite).

(A) Séquence normale. (B) Séquence mutée.

II.1 Mise au point de la PCR spécifique d'allèle

Deux jeux d'amorces, un spécifique de l'allèle de type sauvage et un spécifique de l'allèle mutant ont été testés en utilisant l'ADN des échantillons homozygotes (c.525delT/c.525delT) et hétérozygotes (c.525delT/c.87dupT) identifiés par séquençage direct en plus d'un contrôle de type sauvage.

Les résultats montrent que les amorces et les conditions de PCR spécifiques d'allèles ont permis de distinguer précisément l'allèle sauvage de l'allèle mutant (Figure 20).

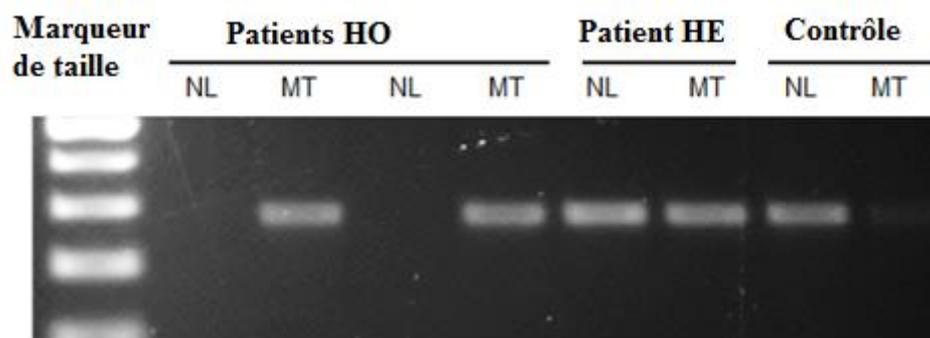


Figure 20: Analyse de la mutation c.525delT par PCR spécifique d'allèle.

*Chaque échantillon a été analysé en utilisant les deux types d'amorces, pour l'allèle normal (NL) et l'allèle muté (MT). Chez les patients homozygotes (HO), seule la bande mutée a été observée. Chez l'échantillon de patient hétérozygote (HE), les bandes normales et mutées ont été observées. Chez le témoin, seule la bande normale a été observée.

II.2 Analyse phénotypique des patients LGMD2C porteurs de la mutation c.525delT à l'état homozygote

II.1.1 Analyse clinique des patients

-Les 12 patients (9 familles) homozygotes pour la mutation c.525delT étaient répartis en 4 filles et 8 garçons âgés au moment de l'étude en moyenne de 15.4 ans (extrêmes 8-25 ans) avec un âge moyen de début de la maladie de 5.2 ans (extrêmes 2-8 ans). Huit patients ont perdus la marche à un âge moyen de 13.6 ans.

-La notion de consanguinité a été retrouvée chez 6 familles et quatre familles avaient une histoire familiale de cas similaires.

-Parmi les signes cliniques associés à la LGMD2C chez ces patients, l'hypertrophie des mollets était observée dans tous les cas.

- La macroglossie a été observée chez 10 patients (83%)
- Les rétractions musculotendineuses ont été présentes chez 10 patients (83%)
- La scoliose a été observée chez deux patients (17%).
- L'hyperlordose a été observée chez deux patients (17%).
- Trois patients ont eu un syndrome respiratoire restrictif (25%).
- Aucune cardiomyopathie n'a été observée chez ces patients.

II.1.2 Répartition des patients selon la sévérité du phénotype

Trois types de phénotype (sévère, intermédiaire et modéré) ont été distingués selon l'âge de la perte de la marche (Merlini et al., 2000) (Tableau 7).

Tableau. 7: Répartition des patients LGMD2C (c.525delT/c.525delT) selon la sévérité du phénotype.

N° famille (numéro du patient)	Age de la perte de la marche	Phénotype clinique
1(1)	14	Intermédiaire
1(2)	Marchait encore	ND
5(7)	13	Intermédiaire
8(12)	12	Sévère
8(25)	17	Modéré
20(30)	Marchait encore	ND
39(51)	Marchait encore	ND
39(52)	14	Intermédiaire
44(57)	14	Intermédiaire
48(61)	13	Intermédiaire
61(75)	12	Sévère
65(79)	Marchait encore	ND

ND: non déterminé

La répartition des patients homozygotes pour la mutation c.525delT selon la sévérité du phénotype a révélé que 5 patients avaient un phénotype intermédiaire, 2 avaient un phénotype sévère et 1 patient avait un phénotype modéré.

La sévérité du phénotype n'a pas pu être déterminée chez 4 patients car il s'agissait d'enfants jeunes n'ayant pas encore atteints l'âge de la perte de la marche.

III. Recherche de délétion dans le gène DMD

Nous avons analysé 37 familles comportant uniquement des garçons atteints (42 patients) et non porteurs de la mutation c.525delT à la recherche des délétions dans le gène DMD par PCR multiplex.

La PCR multiplexe est une technique avec des limites, car elle ne peut pas détecter toutes les mutations, mais a un avantage énorme d'être facile à mettre au point. Nous avons réalisé trois combinaisons d'amorces (précédemment décrites) selon les différentes tailles des produits de PCR, afin de rechercher des délétions dans les points chauds du gène DMD représentant par 19 exons. Les combinaisons des amorces utilisées étaient les suivantes: mix I (exons 4, 8, 12, 17, 19, 44 and 45), mix II (DP427m promotor and exons 3, 6, 43, 50, 52 and 60), mix III (exons 13, 46, 47, 48 and 51). L'exon 46 a également été amplifié seul pour une meilleure lecture sur gel.

Les résultats ont montré que 20 patients (26%) appartenant à 19 familles avaient des délétions dans le gène DMD (Figure 21). Douze types de délétions ont été observés, comportant des délétions d'exons uniques et multiples, dont deux étaient très grandes.

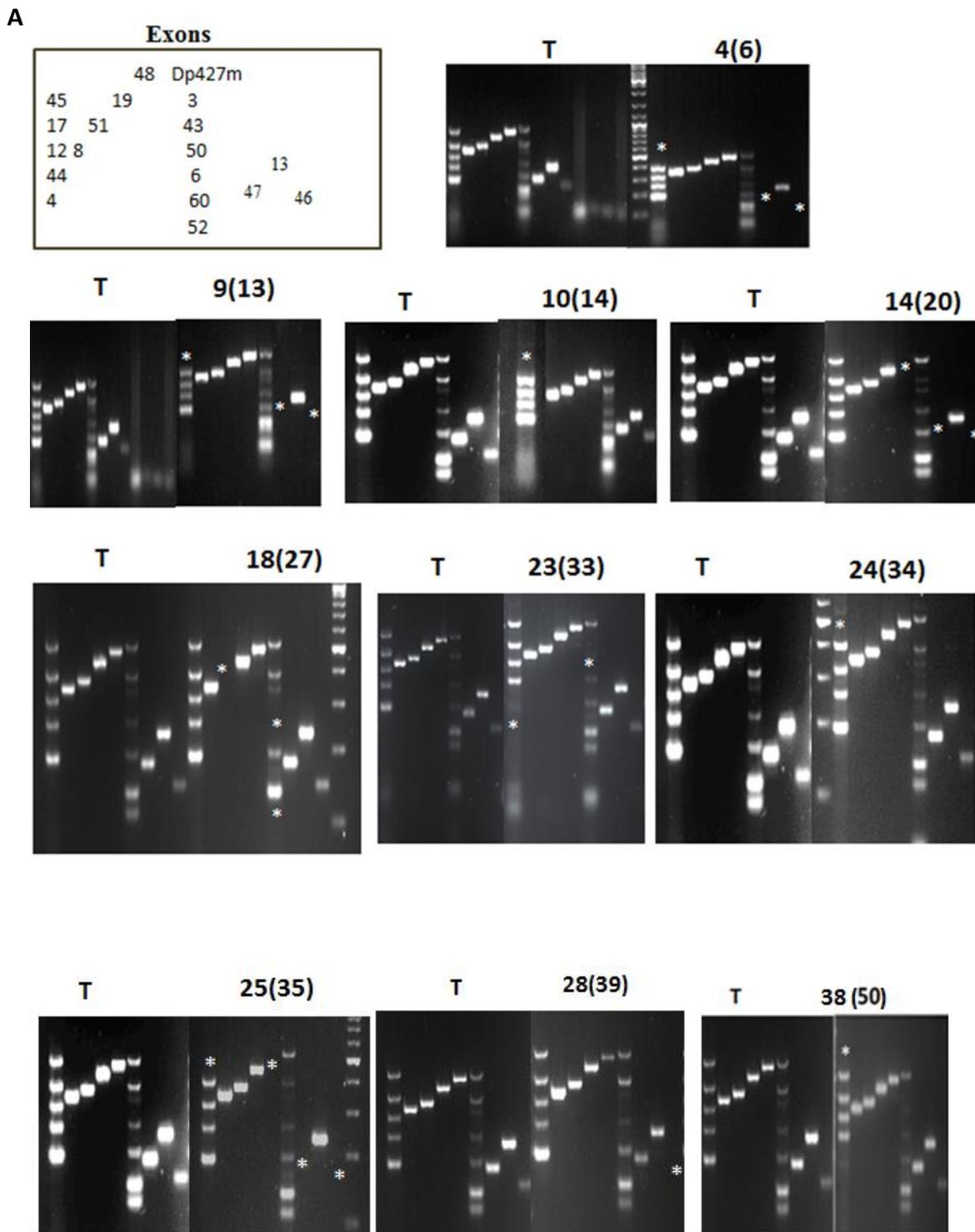


Figure 21: Identification des délétions dans le gène DMD par PCR multiplexe.

A/ Résultats de la PCR multiplexe chez les 20 patients atteints de dystrophinopathies.

* T représente le témoin, les chiffres en haut de l'image indiquent le numéro de famille (numéro de patients). L'absence de bandes spécifiques est indiquée par des étoiles. Les nombres sur la gauche de l'image indiquent les exons amplifiés correspondant à une combinaison spécifique d'amorces.

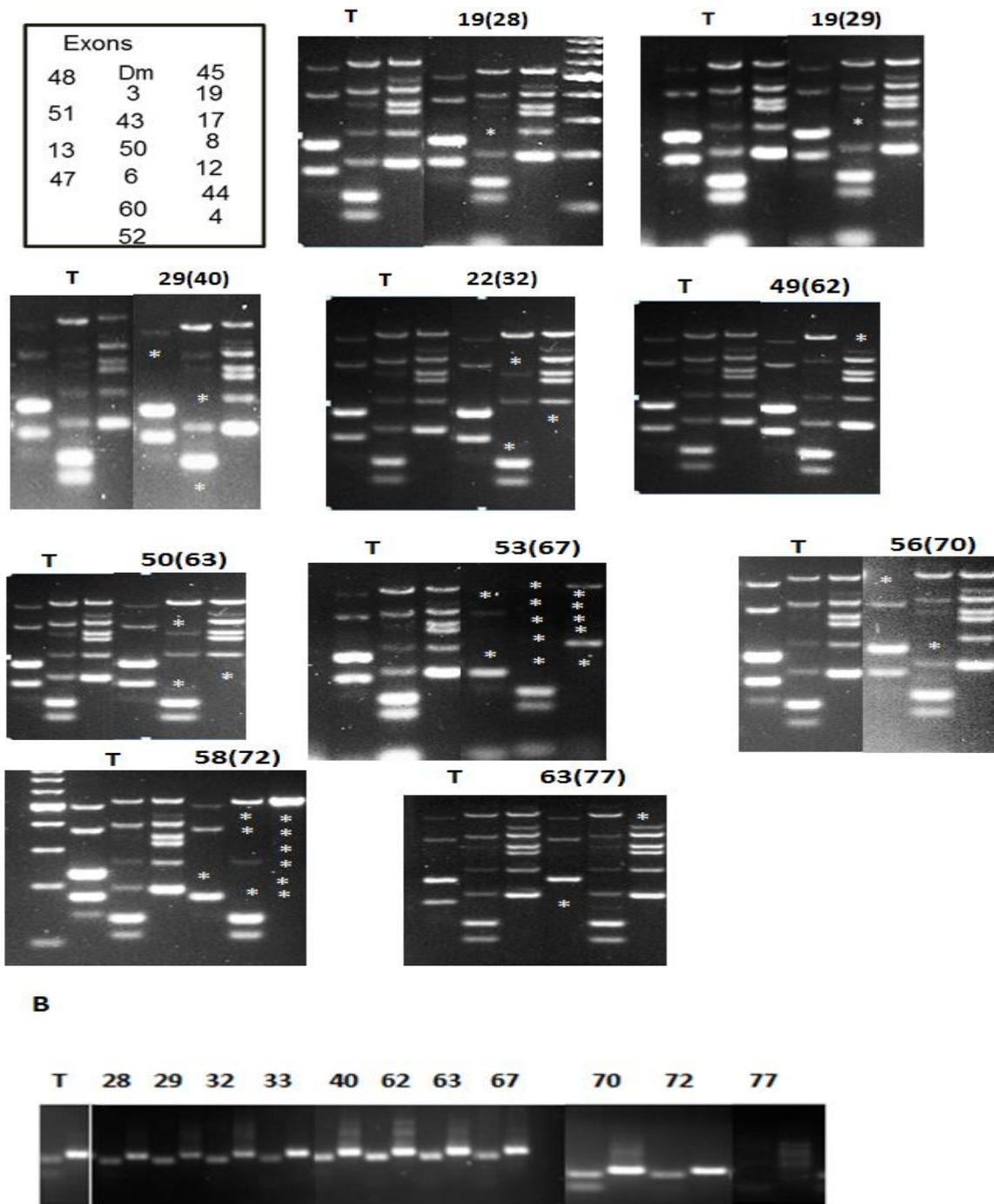


Figure 21: Identification des délétions dans le gène DMD par PCR multiplexe (suite).

A/ Résultats de la PCR multiplexe chez les 20 patients atteints de dystrophinopathies (suite).

B/ Analyse spécifique des exons 46 et 47 chez 11 patients.

Les délétions uniques et multiples étaient réparties comme suit:

- délétions multiples d'exons présentent chez 13 patients (65%) dont 23% avaient des délétions des exons 45, 46 et 47. Les deux grandes délétions retrouvées chez deux patients souffrant de dystrophinopathies couvraient les deux points chauds du gène DMD: délétions des exons 3, 4, 6, 8, 12, 13, 17, 19, 43 et 44 et les exons 3, 4, 6, 8, 12, 13, 17, 19, 43, 48, 50 et Dp427m promoteur (Figure 22).
- délétions d'exon unique présentent chez 5 patients (25%) dont 80 % avaient une délétion de l'exon 45. La délétion de l'exon 50 représentait 10%, elle n'a pas été considérée comme délétion d'exon unique car l'exon 49 n'a pas été analysé et donc l'extension de la délétion n'a pas été déterminée.

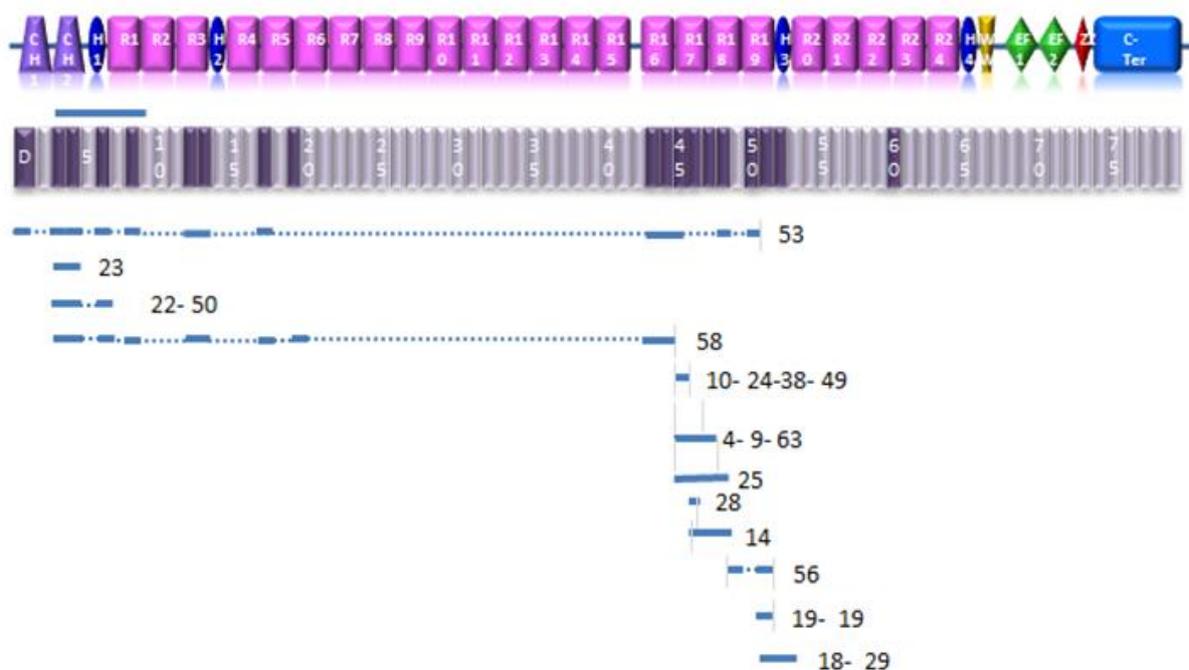


Figure 22: Représentation schématique de la protéine dystrophine avec ses différents domaines et les exons correspondants.

*D signifie DP427m. Les exons qui ont été étudiés sont indiqués en violet foncé. L'absence de l'amplification des exons est représentée par des traits continus. Les traits discontinus indiquent la probable extension de la délétion. Les chiffres à droite de la bande de délétion indiquent les numéros de familles et le nombre de patients.

Il a été possible de prédire la conséquence des délétions sur le cadre de lecture dans le cas où les exons adjacents à la délétion ont été analysés, ou en raison de la continuité du cadre de lecture des exon (s) ambigus, comme c'est le cas pour le cadre de lecture de l'exon 49 qui est une continuité des exons 48 et 50, en utilisant l'option frame shift checker sur le site internet de Leiden Muscular Dystrophy.

Neuf des délétions étaient hors-phase (c'est-à-dire qu'il existe un décalage de cadre de lecture « out-of-frame »); 4 étaient en phase (pas de décalage de cadre de lecture « in-frame ») et 7 n'ont pas eu de cadre défini (Tableau 8). La grande délétion présente dans la famille 53 touche le promoteur, donc elle devrait conduire à l'absence du produit protéique, elle représente dans ce cas une délétion nulle.

Règle de Monaco

Nous avons classé les patients en DMD ou BMD selon (Monaco et al., 1988), lesquels ont émis une hypothèse pour expliquer que la différence entre DMD et BMD dépend du cadre de lecture ; les délétions et les duplications maintenant le cadre de lecture et dites « in-frame » permettent la synthèse d'une dystrophine anormale mais généralement partiellement fonctionnelle et sont associées à un phénotype BMD. En revanche, les délétions et les duplications décalant le cadre de lecture, appelées « out-of-frame », ne permettent que la synthèse à un taux très faible d'une protéine tronquée instable et non fonctionnelle et aboutissent à un phénotype DMD (in or out frame).

Selon cette règle : 4 patients (4 familles) de notre étude étaient des BMD (in-frame), 10 patients (9 familles) étaient des DMD (out-of-frame/null) et 6 patients (6 familles) n'avaient pas de cadre défini.

Tableau. 8: Délétions des exons du gène DMD observées chez les 20 patients atteints de dystrophinopathies.

No. Famille (No.de patients)	Exon(s) supprimés	Frameshift
4 (6)	45, 46 et 47	Délétion in-frame
9 (13)	45, 46 et 47	Délétion in-frame
10 (14)	45	Délétion out-of-frame
14 (20)	46, 47 et 48	Délétion out-of-frame
18 (27)	50, 51 et 52	-
19 (28 and 29)	50	Délétion out of frame
22 (32)	3, 4 et 6	-
23 (33)	3 et 4	-
24 (34)	45	Délétion out-of-frame
25 (35)	45, 46, 47 et 48	Délétion in-frame
28 (39)	46	Délétion out-of-frame
29 (40)	50, 51 et 52	-
38 (50)	45	Délétion out-of-frame
49 (62)	45	Délétion out-of-frame
50 (63)	3, 4 et 6	-
53 (67)	DP427m,3,4,6,8,12,13,17,19,43,48 et 50	Délétion nulle
56 (70)	48 et 50	Délétion out-of-frame
58 (72)	3, 4, 6, 8, 12, 13, 17, 19, 43 et 44	-
63 (77)	45, 46 et 47	Délétion in-frame

III.1 Corrélations phénotype/génotype des DMD/BMD.

Afin de confirmer s’il existe une corrélation entre le phénotype BMD ou DMD et la conservation ou non du cadre de lecture, une comparaison des données cliniques des deux groupes est essentielle (Tableau 9).

Tableau. 9: Corrélations phénotype/génotype des DMD/BMD.

	DMD (out-of frame/null)	BMD (in-frame)	P-value
Nombre de patients	10	4	-
Sexe masculin %	100	100	-
Age moyen de début (années)	4.9 (2-8)	6.5 (5-9)	-
Perte de la marche % (n)	20 (n = 2)	50 (n = 2)	0.3
Age (années)	9.5 (9-10)	16.5 (16-20)	
Hypertrophie des mollets % (n)	100	100	-
Macroglossie % (n)	30 (n = 3)	50 (n = 2)	0.5
Scoliose % (n)	20 (n = 2)	0	1
Hyperlordose % (n)	10 (n=1)	0	1
Rétractions musculo- tendineuses % (n)	60 (n = 6)	75 (n = 3)	1
Troubles respiratoires % (n)	30 (n = 3)	25 (n = 1)	1
Troubles cardiaques % (n)	50 (n = 5)	0	0.2

% (n): pourcentage suivi de l’effectif.

La comparaison clinique entre les deux groupes de patients DMD et BMD n’a montré aucune différence significative pour tous les paramètres cliniques ($P > 0.05$).

On remarque cependant, que l’âge de la perte de la marche était plus précoce dans le groupe DMD et que la scoliose, l’hyperlordose et les troubles cardiaques étaient observées uniquement dans le groupe DMD.

IV. Recherche d'autres mutations dans le gène SGCG

Les 11 familles LGMD2C et les 19 familles de dystrophinopathies représentaient ensemble 30 familles avec un diagnostic génétique précis. Parmi les 65 familles de notre cohorte, il restait donc 35 familles sans diagnostic.

Les six exons codants restants du gène SGCG ont été amplifiés, ensuite, séquencés dans les deux familles porteuses de la mutation c.525delT à l'état hétérozygote et chez les 35 familles (41 patients) négatives aux analyses génétiques de la mutation c.525delT du gène SGCG et des délétions du gène DMD.

L'analyse des séquences des exons amplifiés a révélé une seconde mutation la c.87dupT, dans l'exon 2 du gène SGCG, elle a été identifiée chez deux patients hétérozygotes appartenant à la même famille (c.87dupT /c.525delT) et a été retrouvé à l'état homozygote chez 5 patients supplémentaires (4 familles) (Figure 23).

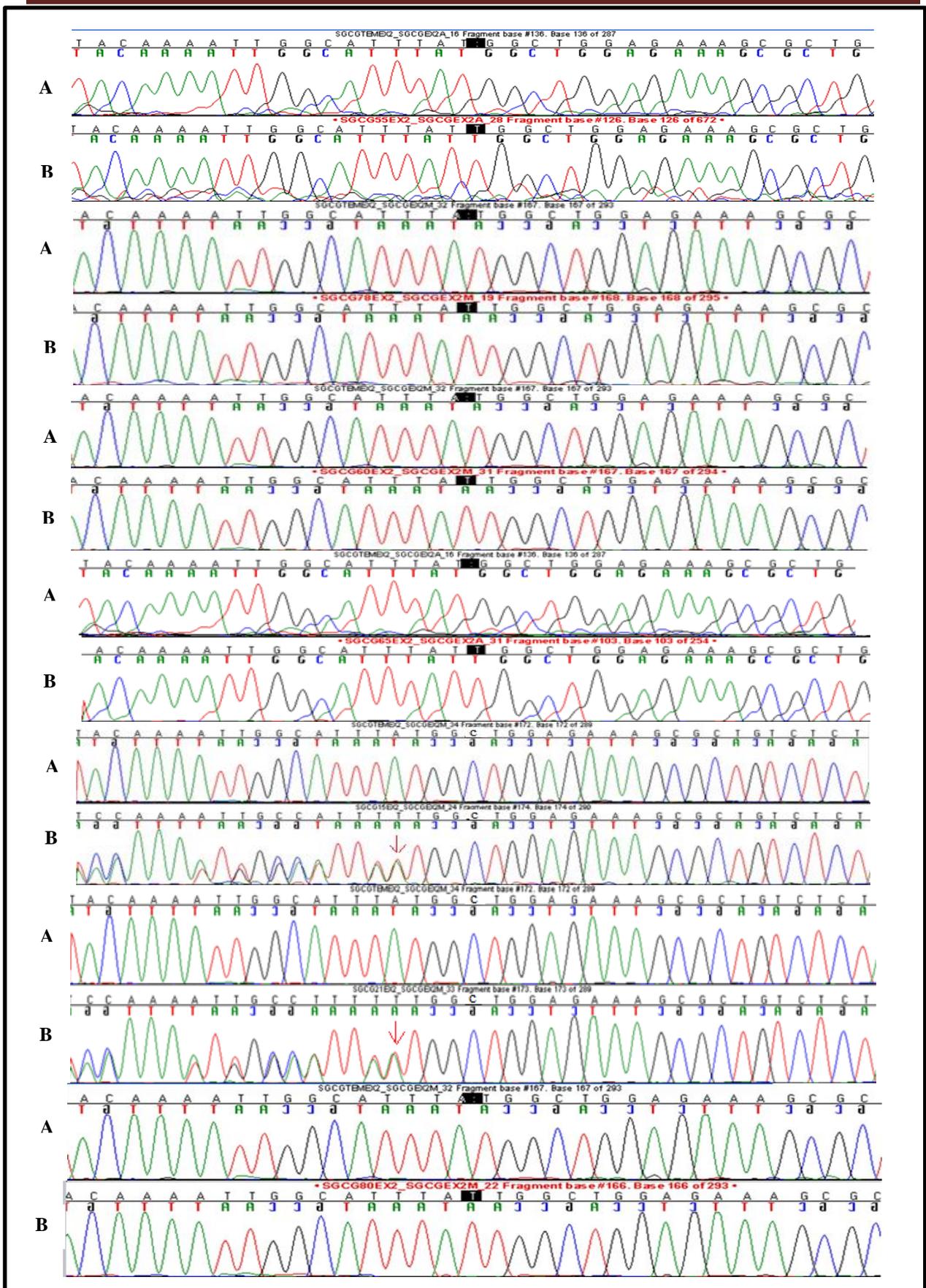


Figure 23: Electrophérogamme de la mutation c.87dupT du gène SGCG.

(A) Séquence normale. (B) Séquence mutée.

Deux polymorphismes connus c.347G> A (exon 4; rs17314986) et c.806G> A (exon 8; rs1800354), qui aboutissent à des changements d'acides aminés (p.R116H pour rs17314986 et p.S287N pour rs1800354) ont également été identifiés à l'intérieur de la région codante du gène de la SGCG chez 5 patients (Figure 24).

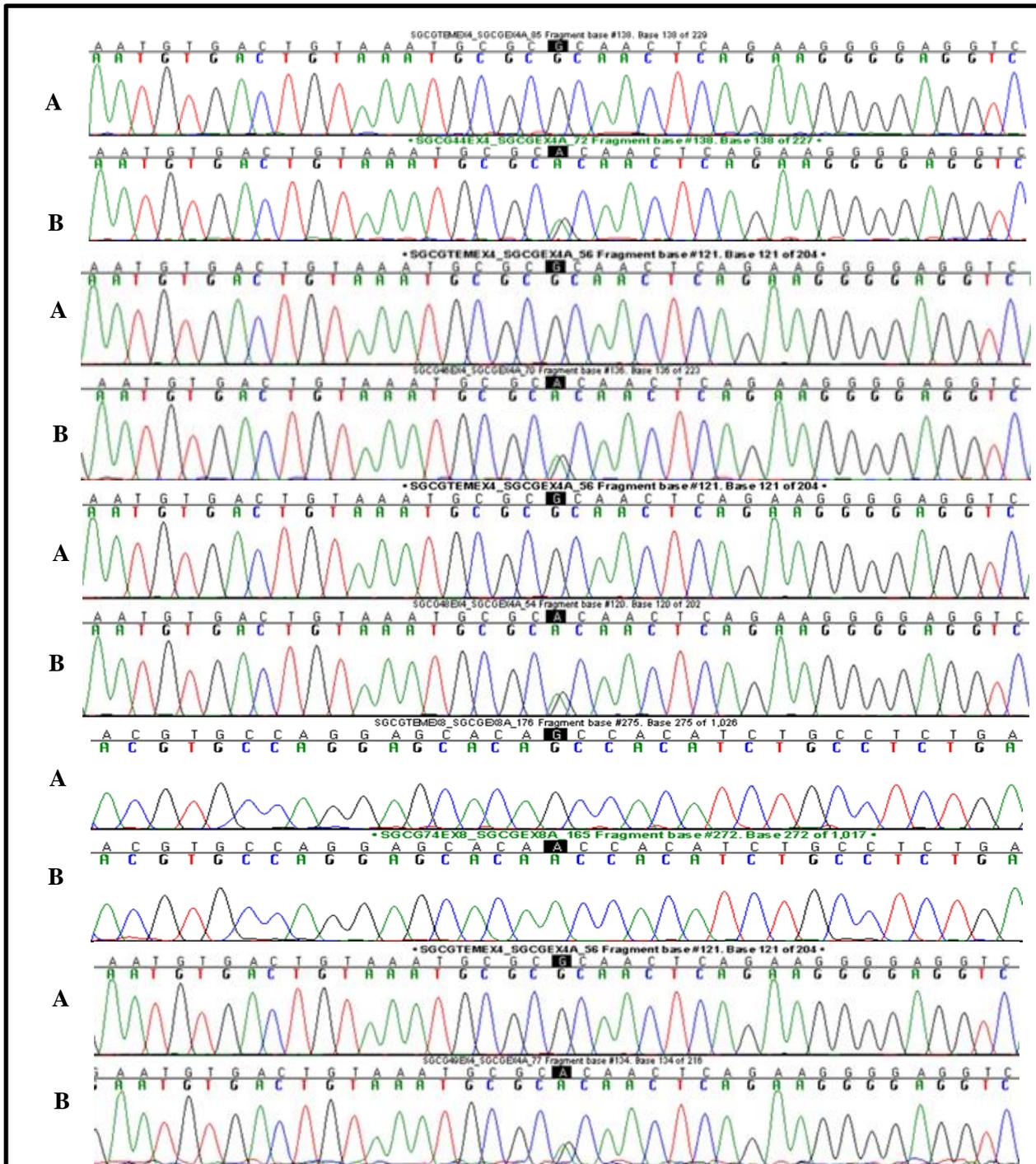


Figure. 24: Electrophérogamme des deux polymorphismes c.347G> A et c.806G> A dans des régions codantes du gène SGCG chez 5 patients.

(A) Séquence normale. (B) Séquence mutée.

Le polymorphisme c.806G> A a été retrouvé chez un patient à l'état homozygote, aucune autre mutation du gène SGCG n'a été retrouvé chez ce patient.

Le polymorphisme c.347G> A a été rapporté chez 3 patients à l'état homozygote et chez 1 patient porteur de la mutation c.525delT à l'état hétérozygote. Nous avons vérifié la pathogénicité du polymorphisme c.347G> A sur le site Human Splicing Finder, le résultat était que ce polymorphisme pouvait altérer un site d'épissage et jouer certains rôles subtiles chez les patients atteints de dystrophie musculaire (Figure 25).

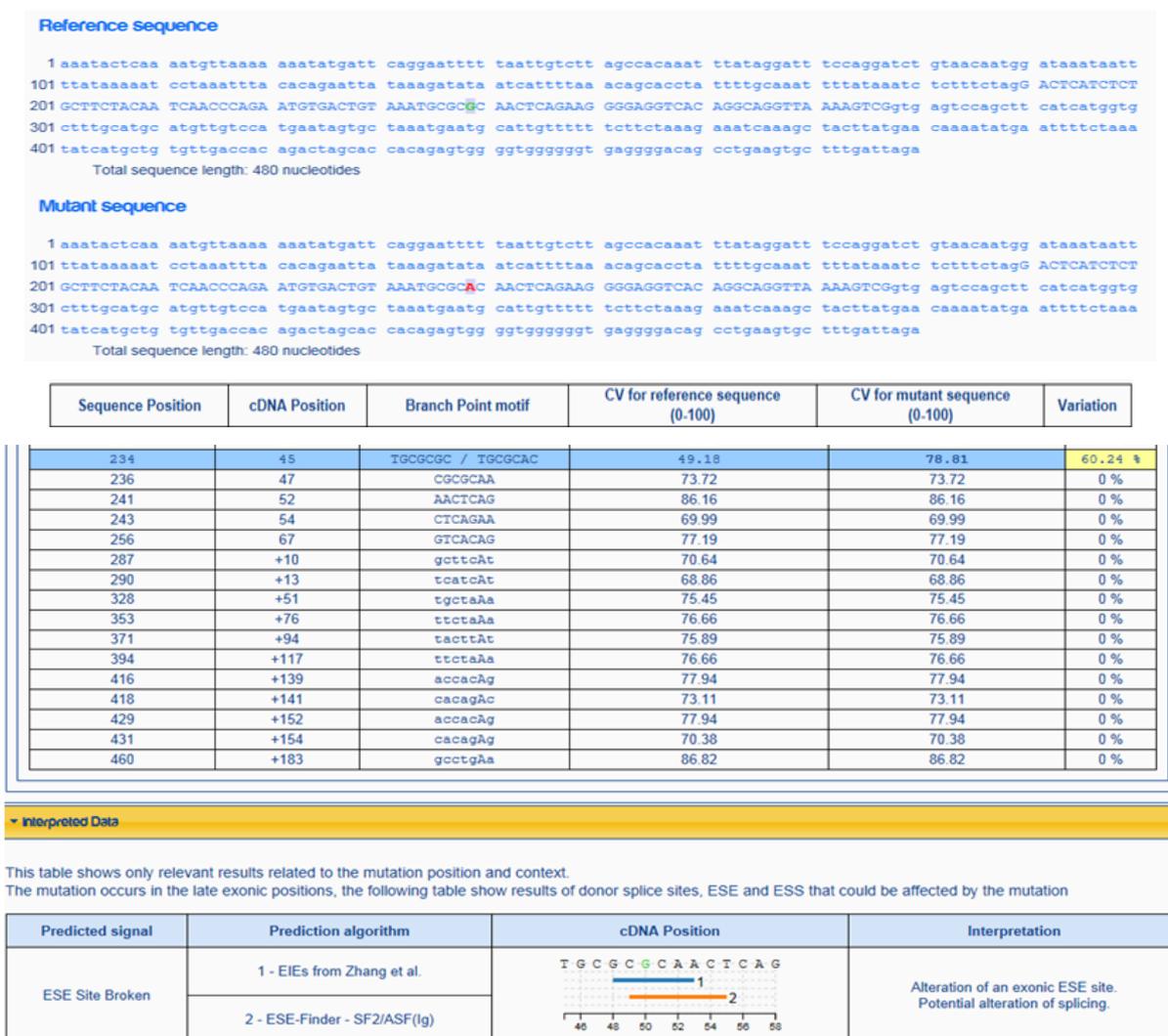


Figure. 25: Evaluation de la pathogénicité du polymorphisme c.343G>A.

(<http://www.umd.be/HSF3/HSF.html>).

Au total, le diagnostic de LGMD2C a été confirmé chez 19 patients (14 familles) (Tableau 10 et Figure 26), 12 patients (9 familles) portaient la mutation c.525delT à l'état homozygote, 5 (4 familles) avaient la mutation c.87dupT à l'état homozygote et 2 patients de la même famille avaient la mutation hétérozygote composite c.525delT/c.87dupT.

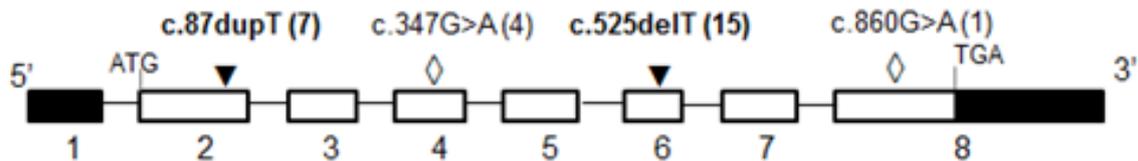


Figure. 26: Schéma du gène SGCG et emplacement des mutations et polymorphismes.

*Les régions exoniques foncées représentent les séquences non codantes. ▼, ◇ représentent respectivement les mutations (caractère gras) et les polymorphismes (police normale). Les chiffres entre parenthèses indiquent, pour chaque mutation, le nombre de patients observés.

Tableau. 10: Répartition des patients LGMD2C selon les variations observées dans le gène SGCG (NM_000231.2).

No. Famille (nombre de patients)	Mutations		Polymorphismes	
	c.525delT p.Phe175Leufs*20	c.87dupT p.Gly30Trpfs*28	c.347G>A p.R116H	c.860G>A p.S287N
1 (1 et 2)	xx			
5 (7)	xx			
8 (12 et 25)	xx			
20 (30)	xx			
39 (51 et 52)	xx			
44 (57)	xx			
48 (61)	xx			
61 (75)	xx			
65 (79)	xx			
42 (55)		xx		
47 (60)		xx		
52 (80 et 65)		xx		
64 (78)		xx		
11 (15 et 21)	x	x		
32 (44)	x		x	
34 (46)			xx	
36 (48)			xx	
37 (49)			xx	
60 (74)				xx

x : un allèle muté ; xx : deux allèles mutés

IV.1 Analyse phénotypique des patients LGMD2C porteurs de la mutation c.87dupT à l'état homozygote

IV.1.1 Critères cliniques des patients

-Les 5 patients (4 familles) homozygotes pour la mutation c.87dupT étaient répartis en 3 filles et 2 garçons âgés au moment de l'étude en moyenne de 16.2 ans (extrêmes 20-19 ans), l'âge moyen de début était de 8 ans (extrêmes 6-9 ans). Trois patients ont perdus la marche à un âge moyen de 13 ans.

La notion de consanguinité a été retrouvée chez 2 familles et trois familles avaient une histoire familiale de cas similaires.

Le signe de Gowers a été retrouvé chez tous les patients, l'hypertrophie des mollets a été observée chez 4 patients, la macroglossie a été retrouvée chez un seul patient. La scoliose et les rétractions musculotendineuses ont été retrouvées chez 3 patients, l'hyperlordose n'a pas été observée chez ces patients. Un seul patient avait développé un syndrome respiratoire restrictif et aucune cardiomyopathie n'a été observée chez ces patients.

IV.1.2 Répartition des patients selon la sévérité du phénotype

Deux types de phénotypes (sévère et intermédiaire) étaient distingués selon l'âge de la perte de la marche (Merlini et al., 2000) (Tableau 11).

Tableau. 11: Répartition des patients LGMD2C (c.87dupT/c.87dupT) selon la sévérité du phénotype.

N° famille (n° patient)	Age de la perte de la marche	Phénotype clinique
64(78)	14	Intermédiaire
42(55)	12	Sévère
47(60)	Marchait encore	ND
52(80)	Marchait encore	ND
52(65)	13	Intermédiaire

ND: non déterminé

La classification des patients homozygotes pour la mutation c.87dupT selon la sévérité du phénotype a révélé que 2 patients avaient un phénotype intermédiaire et 1 patient avait un phénotype sévère.

Nous n'avons pas pu classer 2 patients car ils étaient trop jeunes n'ayant pas encore atteints l'âge de la perte de la marche.

IV.2 Analyse phénotypique des patients LGMD2C porteurs de la mutation hétérozygote composite c.525delT/c.87dupT

IV.2.1 Critères cliniques des patients

Les 2 patientes (sœurs) hétérozygotes composites c.525delT/c.87dupT, n'étaient pas issues de mariage consanguin, elles étaient âgées au moment de l'étude en moyenne de 12.5 ans (extrêmes 6-19 ans), l'âge moyen de début de 5 ans (extrêmes 4-6 ans). Une seule patiente a perdue la marche à l'âge de 14 ans.

L'hypertrophie des mollets, la macroglossie et le signe de Gowers ont été observés chez les deux patientes. Tandis-que la scoliose, l'hyperlordose, les rétractions musculotendineuses, et le syndrome respiratoire restrictif ont été observés chez la patiente âgée de 19 ans.

IV.2.2 Répartition des patientes selon la sévérité du phénotype

Chez la famille hétérozygote composite (2 patientes) c.525delT/c.87dupT, une patiente avait un phénotype intermédiaire tandis-que chez l'autre patiente la sévérité du phénotype n'a pas été déterminé en raison de son jeune âge.

V. Corrélation phénotype/génotype des LGMD2C

L'existence de deux types de mutations chez les patients LGMD2C de notre étude, suggère qu'une corrélation phénotype/génotype des LGMD2C (Tableau 12) pourrait démontrer une relation plus ou moins étroite entre la présence d'un type de mutation et un phénotype donnée.

Tableau. 12: Corrélation phénotype/génotype des LGMD2C.

	Mutations		P-value
	c.525delT/c.525delT	c.87dupT/c.87dupT	
Nombre de patients	12	5	-
Sexe % (n)			
Homme	67 (n = 8)	40 (n = 2)	-
Femme	33 (n = 4)	60 (n =3)	
Age (années)	15.4 (8-25)	6.2 (11-20)	-
Age moyen de début (années)	5.2 (2-8)	8 (6-9)	0.01
Perte de la marche % (n)	67 (n = 8)	60 (n = 3)	
Age moyen (années)	13.6 (12-17)	13 (12-14)	0.4
Nombre de patients selon la sévérité	Sévère: 2 Intermédiaire: 5 Modéré: 1 ND:4	Sévère: 1 Intermédiaire: 2 Modéré: 0 ND:2	-
Hypertrophie des mollets % (n)	100 (n =12)	80 (n = 4)	0.2
Macroglossie % (n)	83 (n = 10)	20 (n = 1)	0.02
Troubles respiratoires % (n)	25 (3)	20 (1)	1
Troubles cardiaques %	0	0	-

% (n): pourcentage suivi de l'effectif ; * Résultats significatif P<0.05

Les deux groupes de patients LGMD2C avaient une variabilité de la sévérité du phénotype, une fréquence élevée d'hypertrophie des mollets, des troubles respiratoires, mais pas d'atteinte cardiaque (avec aucune différence significative).

L'âge moyen de la perte de la marche était de 13 à 14 ans dans les deux groupes. Cependant, chez les patients homozygotes pour la mutation c.dup87T, l'âge moyen de début était significativement plus tardif que chez les autres patients ($P=0.01$). En effet, la macroglossie était significativement plus fréquente chez les patients porteurs de la mutation c.525delT à l'état homozygote ($P=0.02$).

VI. Comparaison des données cliniques de l'ensemble des patients atteints de LGMD2C et de dystrophinopathies

VI.1 Critères cliniques de l'ensemble des patients LGMD2C

Dix-neuf patients (25%) parmi les 76 avaient un diagnostic précis de LGMD2C. Ils étaient 10 hommes et 9 femmes. L'âge moyen des patients à l'inclusion à l'étude était de 15,3 ans (extrêmes 6-25 ans) et l'âge moyen d'apparition de la maladie était de 5.9 ans (extrêmes 2-9 ans). Douze des patients (63%) ont perdus la marche à un âge moyen de 13,5 ans (extrêmes 12-17 ans).

VI.1.1 Répartition des patients LGMD2C selon la consanguinité et les cas secondaires

Dix patients (57%) étaient issus de mariage consanguin. L'histoire familiale de 13 patients a révélé des cas secondaires.

VI.1.2 Répartition des patients LGMD2C selon les signes cliniques associés

A l'examen clinique, tous les patients LGMD2C avaient le signe de Gowers. L'hypertrophie des mollets a été retrouvée chez 19 patients (95%). D'autres paramètres cliniques comme, les rétractions musculotendineuses, la macroglossie, la scoliose, et l'hyperlordose ont été observés chez ces patients (Figure 27).

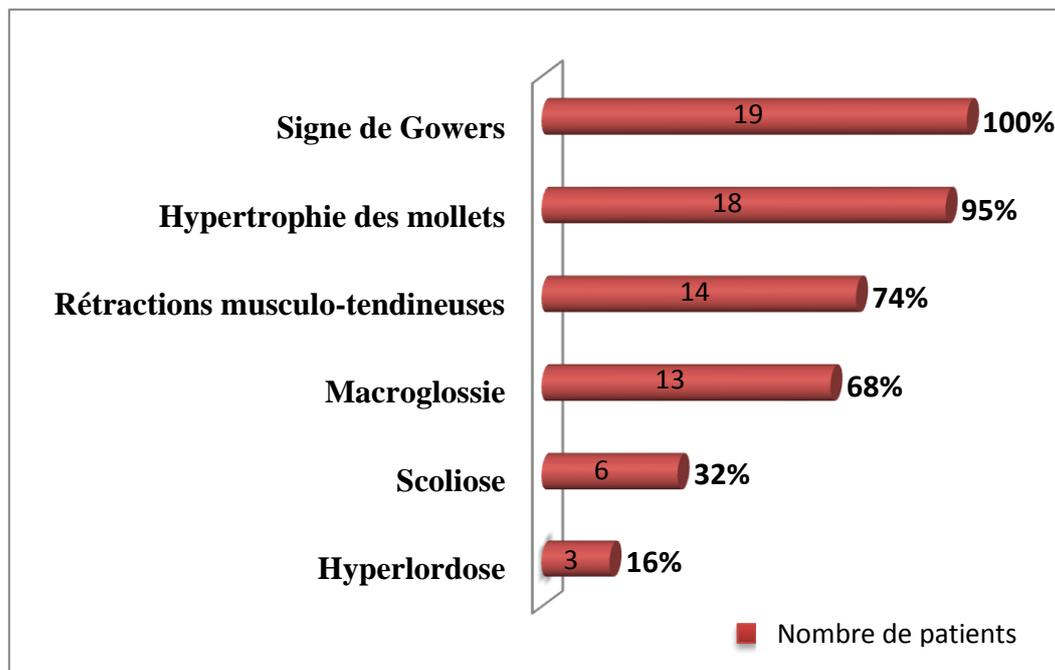


Figure. 27: Répartition des patients LGMD2C selon les signes cliniques associés.

VI.1.3 Statuts cardiaque et respiratoire des patients LGMD2C

Les examens complémentaires ont révélé des troubles respiratoires (syndrome ventilatoire restrictif) chez 5 patients. Cependant, aucun patient LGMD2C n'a présenté de troubles cardiaques.

VI.2 Critères cliniques de l'ensemble des patients atteints de dystrophinopathies.

Vingt patients de sexe masculin (26%) avaient la dystrophie musculaire de Duchenne. Leurs caractéristiques cliniques sont résumées dans le tableau 15. L'âge moyen à l'inclusion à l'étude était de 11,8 ans (extrêmes 5-37 ans) et l'âge moyen d'apparition de la maladie était de 4,8 ans (extrêmes 1-9 ans). Quatre des patients (20%) ont perdus la marche à un âge moyen de 14 ans.

VI.2.1 Répartition des patients selon la consanguinité et les cas secondaires

Deux patients (10%) étaient issus de mariage consanguin. L'histoire familiale de 5 patients (25%) a révélé des cas secondaires masculins.

VI.2.2 Caractéristiques cliniques générales

A l'examen clinique, tous les patients atteints de dystrophinopathies avaient le signe de Gowers et une hypertrophie des mollets. Comme pour les patients LGMD2C, les rétractions musculotendineuses, la macroglossie, la scoliose, et l'hyperlordose ont été rapportés chez ces patients (Figure 28).

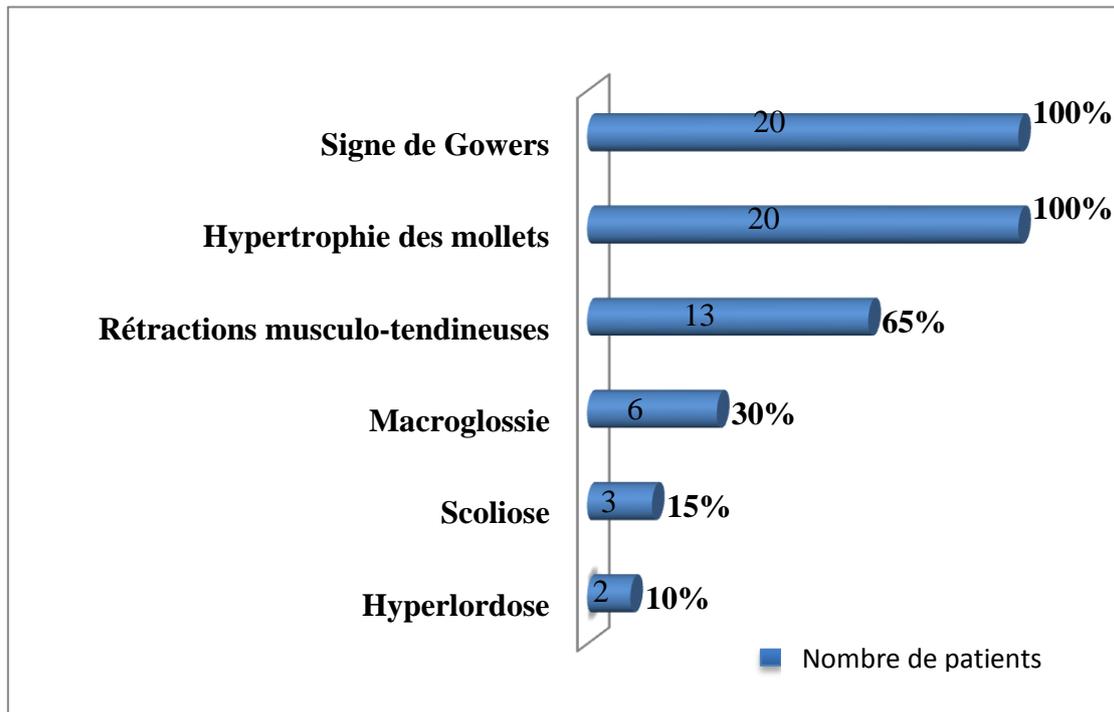


Figure. 28: Caractéristiques générales des patients atteints de dystrophinopathies.

VI.2.3 Statuts cardiaque et respiratoire des patients atteints de dystrophinopathies

Deux patients atteints de dystrophinopathies ont présentés des troubles cardiaques : un patient avait une cardiomyopathie dilaté et l'autre patient avait une insuffisance mitrale.

Six patients ont rencontrés des troubles respiratoires : 5 patients ont présentés un trouble ventilatoire restrictif et 1 patient avait un trouble ventilatoire mixe.

VI.3 Comparaison des principaux signes cliniques des deux groupes LGMD2C et dystrophinopathies.

La différenciation entre les LGMD2C et les dystrophinopathies est considérée comme un problème majeur dans la pratique clinique actuelle. Nous avons comparé les données cliniques des 2 groupes de patients diagnostiqués génétiquement, dans une tentative d'identifier des critères qui peuvent orienter le diagnostic clinique vers un diagnostic génétique adéquat (Tableau 13).

Tableau. 13: Comparaison clinique des patients atteints de dystrophinopathies et de LGMD2C.

	LGMD2C	dystrophinopathies	P-value
Nombre de patient	19	20	-
Sexe (%)			
Masculin	53 (n = 10)	100 (n = 20)	-
Féminin	47 (n = 9)	0	
Age (années)	15.3 (6-25)	10.9 (5-23)	-
Consanguinité % (n)	53 (n = 10)	10 (n = 2)	0.005
Age moyen du début (années)	5.9 (2-9) Médiane: 6	4.8 (1-9) Médiane: 5	0.1
Perte de la marche			
Patients % (n)	63 (n = 12)	20 (n = 4)	0.1
Age (années)	13.5 (12-17) Médiane: 13.5	12 (9-17) Médiane: 11	
Hypertrophie des mollets % (n)	95 (n = 18)	100 (n = 20)	0.4
Macroglossie % (n)	68 (n = 13)	30 (n = 6)	0.02
Scoliose % (n)	32 (n = 6)	15 (n = 3)	0.2
Hyperlordose % (n)	16 (n = 3)	10 (n = 2)	0.6
Rétraction musculo-tendineuses % (n)	74 (n = 14)	65 (n = 13)	0.7
Signe de Gowers (%)	100 (n = 19)	100 (n = 20)	-
Troubles respiratoires (%)	26 (n = 5)	30 (n = 6)	1
Troubles cardiaques (%)	0	10 (n = 2)	0.4
% (n): pourcentage suivi de l'effectif ; * Résultats significatif P<0.05			

La comparaison clinique a révélé que l'âge moyen du début de la maladie était dans la première décennie dans les 2 groupes, bien qu'il était légèrement plus précoce dans le groupe dystrophinopathies.

L'âge de la perte de la marche dans les LGMD2C et les dystrophinopathies était respectivement de 13.5 ans et 12 ans.

La consanguinité était significativement plus fréquente dans le groupe LGMD2C ($P=0.005$). La macroglossie a été observée dans les 2 groupes, mais avec une fréquence significativement plus élevée dans le groupe LGMD2C ($P=0.02$).

Les autres paramètres cliniques n'ont pas montré de différence significative entre les 2 groupes.

CHAPITRE. IV

DISCUSSION

Discussion

Les sarcoglycanopathies (LGMD2C-F) représentent un sous-groupe des LGMD2, la gamma-sarcoglycanopathie (LGMD2C) représente la forme la plus fréquente dans les populations d'Afrique du Nord, en raison de l'effet fondateur de la mutation c.525delT dans l'exon 6 du gène SGCG (El Kerch et al., 2014). La LGMD2C ressemble cliniquement à la DMD, la différenciation clinique entre les deux formes est considérée comme un problème majeur pour le clinicien.

Nous rapportons une étude génétique portant sur 76 patients appartenant à 65 familles avec un phénotype LGMD R tous issus de l'Est Algérien.

Dix-neuf patients (25%) étaient des LGMD2C, deux mutations causales ont été identifiées dans notre population, majoritairement à l'état homozygote: la mutation c.525delT déjà connue et la c.87dupT qui n'a jamais été décrite auparavant en Afrique du Nord.

L'analyse du gène DMD nous a révélé que 20 patients (26%) étaient atteints de dystrophinopathies avec 12 types de délétions.

I. Analyse du gène SGCG

L'analyse moléculaire du gène SGCG par PCR classique et séquençage direct des 7 exons codants a révélé un diagnostic de LGMD2C positif chez 25% des patients de l'étude (14 familles).

I.1 Identification de la mutation c.525delT

En Algérie, la rareté des centres spécialisés en neuropathologie et les difficultés qui peuvent empêcher les patients de profiter d'une analyse immunohistochimique compliquent le diagnostic, la prise en charge de la maladie et l'établissement d'un conseil génétique approprié.

Pour contourner ces difficultés, nous avons donc procédé à un criblage moléculaire initial à la recherche de la mutation c.525delT la plus fréquente chez les patients LGMD2C en Afrique du Nord (El Kerch et al., 2014). La mutation c.525delT à l'état homozygote engendre un changement du cadre de lecture au niveau du codon 175 (Figure 29), et un changement d'acide aminé à cette position de la phénylalanine à la leucine (phe175-à-leu) ce qui crée un signal d'arrêt prématuré au niveau du codon 194 et la perte d'un amas de résidus de cystéines dans la région extracellulaire de la protéine gamma-sarcoglycane (Crosbie et al., 2000).

La mutation c.525delT également identifiée comme c.521delT constitue une grande proportion d'allèles mutants dans les familles consanguines de la région Maghrébine (El Kerch et al., 2014; Kefi et al., 2003). Elle a également été rapportée chez les patients Brésiliens d'origine Africaine (LEAL and DA-SILVA, 1999; McNally et al., 1996b, 1996a), en Espagne (Vorgerd et al., 2001), et en Inde (Khadilkar et al., 2009).

Les résultats de l'amplification et le séquençage de l'exon 6 du gène SGCG chez l'ensemble de notre population d'étude, ont révélé la présence de la mutation c.525delT chez 15 patients (11 familles), cette mutation a été donc retrouvée chez 20% des patients de l'étude et 79% des patients LGMD2C.

Douze patients (9 familles) présentaient la mutation c.525delT à l'état homozygote. Parmi ces 12 patients, huit (6 familles) étaient issus d'un mariage consanguin. Le pool génétique est souvent restreint lorsqu'il s'agit d'une petite région (McNally et al., 1996b).

Deux patientes appartenant à la même famille étaient hétérozygotes pour la mutation c.525delT, ce qui suggère la présence d'autres mutations dans notre population. Les deux patients n'étaient pas issus de mariage consanguin.

Un patient faisant partie de notre population d'étude avait présenté également la mutation c.525delT à l'état hétérozygote accompagnée du polymorphisme c.347G>A au niveau de l'exon 4 du gène SGCG. Aucune autre mutation n'a été rapportée chez ce patient.

La fréquence élevée de la mutation c.525delT (20%) dans notre étude, confirme l'effet fondateur précédemment rapporté dans les populations Maghrébine (El Kerch et al., 2014). Une étude menée par Nouioua et collaborateurs (Nouioua, 2013) chez une population Algérienne, a révélé la présence de la mutation c.525delT chez 30 % des patients présentant une dystrophie musculaire progressive.

Une étude Tunisienne (Kefi et al., 2003) a révélé que 100% des patients de l'étude avec un phénotype LGMD2 ont présenté la mutation c.525delT à l'état homozygote.

Une étude marocaine (El Kerch et al., 2014) rapporte également une fréquence élevée de la mutation c.525delT, elle était présente chez 65% des patients de l'étude présentant une LGMD2.

L'effet fondateur de la mutation c.525delT en Afrique du Nord peut s'expliquer par un taux élevé d'endogamie, car dans de nombreux pays arabes, il y a une forte préférence pour les unions entre parents. Les coutumes locales, l'isolement social et géographique, ainsi que l'hétérogénéité ethnique des populations, ont contribué à une augmentation du niveau de mariage consanguin et par conséquent une fréquence élevée des maladies autosomiques

récessives. En Algérie le mariage consanguin est estimé à 38.08% (Kefi et al., 2015), au Maroc à 59.09% (Jaouad et al., 2009) et en Tunisie à 57.3% (Ben Halim et al., 2013).

L'origine de la c.525delT n'est pas encore connue mais la fréquence élevée au Maghreb implique l'hypothèse d'un lien existant arabo-berbère. L'observation de cas porteurs de cette mutation dans les régions méditerranéennes peut s'expliquer par les flux migratoires dans ces pays. Un lien entre Touaregs et arabo-berbères a également été établi (Moumouni et al., 2012).

- **Description du phénotype des patients LGMD2C porteurs de la mutation c.525delT à l'état homozygote**

Le phénotype des 12 patients (9 familles) homozygotes pour la mutation c.525delT était différent et classé selon l'âge de la perte de la marche (Merlini et al., 2000) comme suit :

-5 patients avaient un phénotype intermédiaire.

-2 avaient un phénotype sévère.

-1 patient avait un phénotype modéré.

-La sévérité du phénotype n'a pas pu être déterminée chez 4 patients car il s'agissait d'enfants jeunes n'ayant pas encore atteints l'âge de la perte de la marche.

L'identification de la mutation c.525delT chez des patients appartenant à la même famille (famille n°8) et qui présentaient deux phénotypes différents sévère et modéré, indique une variabilité intrafamiliale dans notre population d'étude.

Les variabilités phénotypiques interfamiliale et intrafamiliale chez des patients atteints de LGMD2C porteurs de la mutation c.525delT ont été bien défini dans la description clinique originale du phénotype Duchenne-like en Tunisie (Al-Zaidy et al., 2015), ainsi, des patients Tunisiens tous homozygotes pour la mutation c.525delT ont présenté soit un phénotype sévère, intermédiaire ou bien modéré (Kefi et al., 2003). Des patients Brésiliens d'origine Africaine porteurs de la mutation c.525delT ont également présenté des variabilités phénotypiques intrafamiliale (McNally et al., 1996b).

Cette variabilité implique probablement d'autres loci ou facteurs environnementaux agissant en tant que médiateurs du processus dystrophique (McNally et al., 1996b).

En 2012, des chercheurs ont étudié l'impact des polymorphismes potentiellement fonctionnels dans les gènes impliqués dans la voie apoptotique mitochondriale et qui pourraient moduler la capacité apoptotique contribuant à une variabilité phénotypique intrafamilial et interfamilial chez des patients LGMD2C porteurs d'une même mutation, la c.525delT. Dix polymorphismes d'un seul nucléotide (SNP) ont été génotypés dans les gènes

TP53, BCL-2 et BAX impliqués dans la voie apoptotique mitochondriale. Les résultats de cette étude ont suggéré que l'augmentation de l'expression accrue de la protéine P53 dans les cellules musculaires portant le génotype « TP53-R72R » pouvait induire l'apoptose par activation de l'expression génique pro-apoptotique et donc augmenter la perte musculaire, tandis que l'expression accrue de la protéine Bcl-2 dans les cellules musculaires portant le génotype « BCL2-938 AA », pouvait bloquer les voies pro-apoptotiques et ainsi réduire la perte musculaire (Hadj Salem et al., 2012).

I.2 Identification de la mutation c.87dupT

Une analyse supplémentaire du gène SGCG par séquençage complet des 6 autres exons codants a révélé une mutation dans l'exon 2 du gène, il s'agit de la mutation c.87dupT, Cette duplication modifie le cadre de lecture dans la région intracellulaire de la gamma-sarcoglycane au niveau de l'acide aminé 30 (Figure 29) et conduit à un codon d'arrêt prématuré après 29 acides aminés, le résultat est l'ablation de la majorité de la protéine γ -sarcoglycane (McNally et al., 1996a).

La mutation c.87dupT était présente chez 7 de nos patients (9%). Elle a été identifiée à l'état homozygote chez 5 patients (4 familles) et à l'état hétérozygote chez 2 patientes (appartenant à la même famille) déjà porteuses de la mutation c.525delT.

La mutation c.87dupT n'a jamais été décrite en Afrique du Nord (White, 1973), mais elle a été décrite comme mutation à effet fondateur au Nord de l'Italie (Fanin et al., 2000; Boito et al., 2003), ce qui suggère que l'environnement montagneux des régions du Nord de l'Italie a contribué à l'isolement génétique de cette mutation. En revanche, il est probable que des villages dans le sud de l'Italie avaient plus de contacts avec d'autres régions via les voyages à travers la mer. Il n'est donc pas surprenant qu'une mutation dans cette région se propage à travers la méditerranée (White, 1973).

Une étude Indienne portant sur 68 patients (Khadilkar et al., 2009), a révélé la mutation c.87dupT chez un patient, dont l'origine géographique de sa famille n'a pas été précisée.

Il semblerait que cette seconde mutation soit fréquente après la mutation c.525delT dans notre population, ce qui suggère que le dépistage de ces 2 mutations pourrait être suffisant pour une stratégie de diagnostic dans la population algérienne.

- **Description du phénotype des patients porteurs de la mutation c.87dupT à l'état homozygote**

Le phénotype des 5 patients homozygotes pour la mutation c.87dupT était différent, ils étaient toujours classés selon l'âge de la perte de la marche (Merlini et al., 2000):

-2 patients avaient un phénotype intermédiaire.

-1 patient avait un phénotype sévère.

La sévérité du phénotype n'a pas été déterminée chez 2 patients car trop jeunes n'ayant pas encore atteints l'âge de la perte de la marche.

Les résultats de l'évaluation de la sévérité du phénotype des patients porteurs de la mutation c.87dupT à l'état homozygote, ont montré que la mutation c.87dupT peut conduire à un phénotype sévère et intermédiaire dans différentes familles (variabilité interfamiliale).

I.3 Identification de la mutation hétérozygote composite c.525delT/c.87dupT

La mutation c.525delT/c.87dupT observée dans notre série n'a jamais été rapportée dans la littérature. Selon plusieurs hypothèses, le foyer originel de la mutation c.525delT est berbère (Urtizbera and Cobo, 2011). Tandis que plusieurs études rapportent, que l'origine de la mutation c.87dupT est du Nord de l'Italie (Boito et al., 2003; Fanin et al., 2009), Ceci peut être le fruit d'un mélange d'ascendance et pourrait s'expliquer dans les modèles de migration humaine (Valérian, 2013), car depuis le moyen âge des relations amicales et commerciales se sont développées entre les Italiens et les habitants de l'Afrique du Nord. C'est ainsi qu'en 1864 les Italiens constituaient la majorité de la population maritime de l'Algérie (Crespo, 2011).

I.4 Identification des polymorphismes c.347G>A et c.860G>A

Polymorphisme c.347G>A :

Le polymorphisme c.347G>A de l'exon 4 du gène SGCG a été rapporté chez 3 patients à l'état homozygote et chez 1 patient porteur de la mutation c.525delT à l'état hétérozygote (c.525delT/c.347G>A), aucune autre mutation du gène SGCG n'a été retrouvée chez ce patient.

Le polymorphisme c.347G>A, a été décrit comme probablement neutre en 1996 par McNally et collaborateurs. Il entraîne un changement d'acide aminé dans la partie extracellulaire de la protéine γ -sarcoglycane (R116H) (Figure 29) et sa fréquence a déjà été estimée de 14% chez une population normale qui n'était pas atteinte de dystrophie musculaire (McNally et al., 1996b).

Par conséquent, la présence de la mutation c.525delT chez le patient porteur du polymorphisme c.347G>A à l'état hétérozygote (c.525delT/ c.347G>A) serait en raison de la fréquence élevée de cet allèle dans notre population. La manifestation de la maladie chez ce patient serait due à des mutations dans des gènes responsables d'autres formes de sarcoglycanopathies.

De ce fait, le patient n'était pas inclut dans les cas de LGMD2C confirmés. Il a donc bénéficié d'une recherche de délétions dans le gène DMD par PCR multiplexe, le résultat était qu'aucune délétion n'a été retrouvée dans ce gène. D'autres analyses génétiques doivent être menées pour établir un diagnostic précis.

Polymorphisme c.860G>A :

Un autre polymorphisme entraînant un changement d'acide aminé dans la partie extracellulaire de la protéine γ -sarcoglycane (S287N) a été rapporté chez un patient de notre série, c'est le c.806G>A dans l'exon 8 du gène SGCG. Comme pour le c.347G>A, le c.806G>A est probablement neutre (McNally et al., 1996b).

Cependant, toujours selon McNally et collaborateurs, Les polymorphismes c.347G>A et 806G>A pourraient jouer un rôle subtil qui n'est pas encore connu chez les patients atteints de dystrophie musculaire.

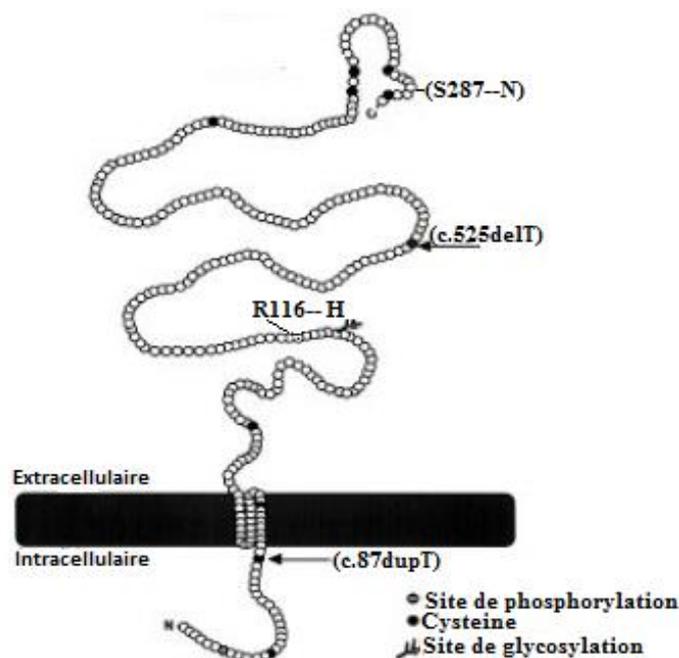


Figure. 29: Mutations de la γ -sarcoglycane identifiées chez nos patients LGMD2C (McNally et al., 1996b).

II. Corrélations phénotype/génotype des patients LGMD2C

Les corrélations phénotype/génotype ont montré que la présentation clinique était très similaire quel que soit le génotype, avec aucune différence significative pour la plus part des paramètres cliniques ($P > 0.05$).

En effet l'âge moyen du début de la maladie était significativement plus tardif chez le groupe porteur de la mutation c.87dupT à l'état homozygote (valeur $p = 0,01$), suggérant comme conséquence un phénotype modéré.

Ces résultats s'accordent avec ceux de (McNally et al., 1996a) qui ont identifié la mutation c.dup87T à l'état homozygote chez 4 patients et la mutation c.525delT chez un patient. L'âge d'apparition de la maladie dans cette étude était plus tardif pour les patients porteurs de la mutation homozygote c.87dupT (McNally et al., 1996a) que pour le patient porteur de la mutation c.525delT.

L'âge moyen de la perte de la marche était de 13 à 14 ans chez tous les groupes.

Dans notre série, une variabilité de la sévérité du phénotype était observée chez les patients porteurs de la mutation c.525delT à l'état homozygote ainsi que chez les patients porteurs de la mutation c.87dupT à l'état homozygote.

La variabilité interfamiliale due aux mutations c.525delT et c.87dupT a déjà été rapporté par (Boito et al., 2003; Kefi et al., 2003; McNally et al., 1996b).

Dans notre série, la fréquence de l'hypertrophie des mollets était élevée dans le groupe porteur de la mutation c.525delT à l'état homozygote.

L'hypertrophie des mollets a déjà été décrite chez 100% des patients LGMD2C Tunisiens, porteurs de la mutation c.525delT à l'état homozygote (Kefi et al., 2003) ainsi que chez des patients Brésiliens porteurs de la même mutation (McNally et al., 1996b).

Dans notre série, La fréquence de la macroglossie était majoritaire dans le groupe c.525delT/c.525delT avec une différence significative ($p\text{-value}=0,02$).

La macroglossie a été également rapporté par des études Tunisiennes, chez des patients LGMD2C porteurs de la mutation c.525delT à l'état homozygote (Ben Hamida et al., 1996; Kefi et al., 2003).

Les troubles respiratoires étaient présents chez nos patients LGMD2C quel que soit le type de mutation.

L'atteinte respiratoire avec insuffisance restrictive est très souvent observée chez les patients LGMD2C (Faysoil et al., 2016; Politano et al., 2001). Selon une étude Italienne

(Politano et al., 2001), Les patients atteints de LGMD2C, présentent très souvent un syndrome ventilatoire restrictif sévère semblable à celui observé chez les patients atteints de DMD.

Aucun trouble cardiaque n'a été rapporté chez nos patients LGMD2C. Selon les données de la littérature (Calvo et al., 2000), le γ -Sarcoglycane est fortement exprimé dans le muscle cardiaque normal, il est très probable que le déficit de cette protéine entraîne des altérations de la fonction cardiaque. Chez les patients atteints de LGMD2C les troubles cardiaques ne sont pas très fréquents en comparaison avec la DMD, mais ça n'empêche pas qu'ils soient observée chez certains patients(Boito et al., 2003; Melacini et al., 1999).

Une étude Hollandaise réalisée sur une large série de patients atteints de sarcoglycanopathies, n'a révélé aucune corrélation phénotype/génotypique évidente (Ginjaar et al., 2000). L'absence de cette corrélation peut compliquer le conseil génétique, en particulier en cas de diagnostic prénatal.

III. Analyse génétique du gène DMD

Trente-sept familles dans lesquelles seuls les garçons sont atteints et négatifs à la mutation c.525delT ont été analysés pour la recherche de délétions dans le gène DMD par PCR multiplex.

Douze différentes délétions ont été identifiées chez 20 patients de notre étude (26%), soulignant ainsi la fréquence élevée de ce type de mutations chez nos patients.

Dans une étude Algérienne menée par (Nouioua, 2013) sur les dystrophinopathies, la fréquence des délétions du gène DMD était estimée à 46.7% . Nos résultats confirment la fréquence élevée de la DMD en Algérie et sont en accord avec les fréquences élevées des délétions du gène DMD rapportées dans des études Marocaine (51%) (Sbiti et al., 2002), Egyptienne avec la même fréquence (51%) (Elhawary Nasser et al., 2004) et Saoudienne (40%) (Tayeb, 2010).

La majorité des délétions retrouvées chez les 20 patients (75%) ont eu lieu dans la région centrale du gène DMD, tandis que les délétions au niveau de la région proximale représentaient 15%. Les délétions qui avaient touché à la fois la région centrale et proximale étaient de 10%.

Ces résultats montrent que l'emplacement majoritaire des délétions dans la région centrale du gène DMD chez notre population semble comparable aux résultats d'études des populations Marocaine (Sbiti et al., 2002) et Egyptienne (El Sherif et al., 2007) ainsi que ceux des populations asiatiques (Lai et al., 2002) qui en plus ont utilisé les mêmes ensembles d'amorces (Chamberlin et Beggs). Tandis qu'une étude d'une population philippine a montré que la majorité des délétions se produisaient plus fréquemment au point chaud proximal qu'au point central (Lai et al., 2002). Les résultats de ces études confirment qu'il n'y a pas de différences ethniques dans la distribution des délétions de gène de la dystrophine (Sbiti et al., 2002)

L'application de la règle du cadre de lecture sur les 20 patients atteints de dystrophinopathies nous a révélé, 4 BMD (délétions in-frame), 10 DMD (délétions out-of-frame/null). Six patients n'ont pas pu avoir de cadre défini car les bornes des délétions n'ont pas été étudiées par PCR multiplexe.

L'étude des délétions des patients atteints de dystrophinopathies avec un cadre défini n'a pas montré de corrélation entre la taille de la délétion et le phénotype clinique. Par exemple, la délétion unique de l'exon 45 conduit à un phénotype DMD. Tandis que, les délétions des exons 45, 46, 47 et 48 conduit à un phénotype BMD.

Fernandez et al., 2010, ont rapporté dans leur étude, qu'une délétion d'exon unique comme l'exon 44 résulte en un phénotype classique DMD, alors que de larges délétions pouvant atteindre 50 % du gène ont été décrites chez des patients BMD, confirmant ainsi, qu'il n'existe pas de corrélation entre la taille de la délétion et le phénotype des patients (Masson et al., 2017).

IV. Corrélations phénotype/génotype des DMD/BMD

La comparaison des manifestations cliniques entre les groupes BMD (in-frame) et DMD (out-of-frame/null) n'a pas montré de différence significative. Cependant une différence dans l'âge de la perte de la marche a été observée, avec une moyenne de 14.5 ans pour les patients BMD et 9.5 ans pour les patients DMD. L'hypertrophie des mollets a été observée dans les 2 groupes. La scoliose, l'hyperlordose et les problèmes cardiaques ont été observés seulement chez les patients DMD. Ces observations indiquent que les délétions engendrant un décalage de cadre de lecture « (out-of-frame/null » sont responsables d'un phénotype sévère (DMD), alors que les délétions conservant le cadre de lecture sont responsables d'un phénotype plus modéré (BMD). Selon nos résultats, une corrélation entre le phénotype BMD ou DMD et la conservation ou non du cadre de lecture semble en accord avec l'hypothèse du cadre de lecture (Monaco et al., 1988).

La grande étude de Tuffery-Giraud et al. retrouve une altération génétique en accord avec l'hypothèse du cadre de lecture chez 96 % des patients atteints de DMD et 93 % de ceux atteints de BMD (Tuffery-Giraud et al., 2009).

V. Comparaison des principaux signes cliniques des groupes LGMD2C et dystrophinopathies

En raison de la fréquence élevée des LGMD2C et des dystrophinopathies dans notre pays (Nouioua, 2013), confirmé par notre étude, dans laquelle on a trouvé 26% de dystrophinopathies et 25% de LGMD2C, le diagnostic génétique reste indispensable pour différencier les deux formes.

En 2010, une étude rapporte la description de incidence de la LGMD2C par une analyse génétique chez des patients Japonais diagnostiqués cliniquement DMD (Okizuka et al., 2010).

La comparaison des signes cliniques des patients atteints de dystrophinopathies et de LGMD2C, dans le but d'identifier des critères qui peuvent orienter le diagnostic clinique vers un diagnostic génétique adéquat, a révélé que dans l'ensemble certaines caractéristiques

cliniques semblent augmenter la probabilité d'un diagnostic de LGMD2C ou de dystrophinopathies.

Un début précoce et des manifestations cardiaques peuvent orienter vers une dystrophinopathie avec une mutation out-of-frame (DMD).

Nos observations s'accordent avec les données de la littérature selon lesquelles, une atteinte musculaire squelettique chez les patients DMD, est constamment associée à une atteinte cardiaque progressive marquée avant tout par une cardiomyopathie dilatée (Meune et al., 2005).

Tandis que la présence de consanguinité et / ou de macroglossie et/ ou de scoliose oriente vers une LGMD2C. Nos résultats rejoignent ceux de (Merlini et al., 2000), lesquels ont observé chez des patients gitans atteints de LGMD2C , une macroglossie, une hyperlordose et un taux élevé de consanguinité.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

La LGMD 2C est une forme grave de LGMD2, elle est la plus fréquente des sarcoglycanopathies en Afrique du Nord et qui ressemble étroitement par ses caractéristiques cliniques à la DMD. Le mode de transmission est considéré comme un critère important de différenciation entre la DMD et la LGMD2C. Toutefois, chez les cas sporadiques masculins n'ayant pas d'histoire familiale avec la maladie, il est impossible de déterminer ces deux formes en se basant seulement sur le mode de transmission ou les critères cliniques. Ce n'est qu'un diagnostic génétique exact qui fournira l'accès à un conseil génétique adéquat et à une thérapie causale à l'avenir.

Nous rapportons dans cette étude l'analyse d'une cohorte de 76 patients (65 familles) issus de l'Est Algérien et atteints de LGMD R (autosomique récessif ou récessif lié à l'X). Les objectifs de notre étude ont été atteints.

Un diagnostic moléculaire précis a été établi chez 51% des patients de l'étude (39 patients appartenant à 33 familles). Trente-sept patients (49%) étaient sans diagnostic génétique.

La LGMD2C a été retrouvée chez 19 patients (14 familles), parmi eux 14 patients (74%) étaient porteurs de la mutation fondatrice c.525delT et 7 patients (37%) étaient porteurs de la mutation c.87dupT.

La fréquence de la mutation c.525delT (20%) dans notre population confirme son effet fondateur en Algérie et l'intérêt de sa recherche en première intention devant un phénotype LGMD2C probable. L'identification d'une autre mutation « la c.87dupT » dans l'exon 2 du gène SGCG de nos patients suggère qu'elle serait la seconde mutation aussi fréquente en Algérie, ce qui impliquerait sa recherche génétique chez les patients avec un phénotype LGMD2C probable et négatifs pour la mutation c.525delT.

Nous rapportons également deux types de polymorphismes dans des régions codantes du gène SGCG déjà décrits dans la littérature, le c.347G>A et le c.860G>A. La pathogénicité de ces deux polymorphismes n'a pas été prouvée dans notre étude ni dans d'autres études auparavant. Il serait intéressant de réaliser une étude cas témoins, sur des patients présentant un tableau clinique de LGMD2C afin d'évaluer la fréquence de ces deux polymorphismes chez la population normale et atteinte ce qui renseignera sur l'impact de ces polymorphismes sur la LGMD2C.

L'analyse du gène DMD par PCR multiplexe a révélé des délétions d'exons dans les points chauds du gène chez 20 patients (19 familles). La majorité des délétions étaient survenues dans la région centrale du gène avec une fréquence de 75%, tandis que dans la région

proximale la fréquence des délétions étaient de 15%. Les délétions affectant les deux régions étaient de 10%.

Même si nos moyens étaient restreints en matière de biopsie musculaire, nos résultats ont montré que les LGMD2C et les dystrophinopathies représentaient ensemble la moitié de notre population d'étude (51%), cela confirme les résultats d'une étude Algérienne menée par Nouioua et collaborateurs, et dans laquelle une fréquence élevée de ces deux formes a été rapportée.

Les caractéristiques cliniques des patients atteints de dystrophinopathies et des patients LGMD2C sont très proches en termes de présentation clinique, cependant, un début précoce et des manifestations cardiaques peuvent orienter vers une dystrophinopathie avec une mutation hors cadre de lecture tandis-que la présence, par exemple, de consanguinité peut orienter vers une LGMD2C.

Selon les résultats génétiques obtenus, nous proposons une stratégie de diagnostic adaptée à notre population de patients ayant un phénotype compatible avec un tableau de LGMD2C, cette stratégie vise un criblage initial et rapide concentré sur la recherche des mutations c.525delT et c.87dupT par la technique de la PCR spécifique d'allèle, en l'absence de ces deux mutations, un séquençage des autres exons du gène SGCG sera nécessaire.

Toutefois, pour la mutation c.87dupT de l'exon 2 du gène SGCG d'autres études supplémentaires sont nécessaires afin d'évaluer la fréquence de la mutation c.87dupT dans notre pays et mettre en pratique son identification.

Concernant le diagnostic de la DMD, la technique de PCR multiplexe classique, permet de poser chez une grande proportion de patients le diagnostic de dystrophinopathies. Cependant, elle ne permet pas toujours de caractériser les bornes de délétions car elle ne teste pas tous les exons. D'autres approches de diagnostic, permettant une analyse plus approfondie des délétions et insertions dans le gène DMD dans la population algérienne sera nécessaire. Dans le cas échéant des mutations ponctuelles seront recherchées par séquençage complet du gène DMD.

Les 37 patients sans diagnostic génétique, peuvent être porteurs de duplications ou de mutations ponctuelles dans le gène DMD, car notre analyse était centrée que sur les délétions. Comme il peut s'agir d'un autre type de LGMD.

La biopsie musculaire avec l'examen immunohistochimique reste un moyen efficace d'orientation vers le diagnostic génétique adéquat. Le recours à un laboratoire de neuropathologie spécialisé pour l'étude des biopsies musculaires dans notre pays reste nécessaire.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Récemment des techniques de séquençage nouvelle génération permettent de séquencer simultanément des centaines de gènes, elles permettent ainsi d'identifier les anomalies moléculaires en cause chez des personnes présentant des dystrophies musculaires non étiquetées.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Al-Zaidy, S.A., Malik, V., Kneile, K., Rosales, X.Q., Gomez, A.M., Lewis, S., Hashimoto, S., Gastier-Foster, J., Kang, P., Darras, B., Kunkel, L., Carlo, J., Sahenk, Z., Moore, S.A., Pyatt, R., Mendell, J.R., 2015.** A slowly progressive form of limb-girdle muscular dystrophy type 2C associated with founder mutation in the SGCG gene in Puerto Rican Hispanics. *Mol. Genet. Genomic Med.* 3, 92–98.
- Angelini, C., Fanin, M., 2016.** Pathogenesis, clinical features and diagnosis of sarcoglycanopathies. *Expert Opin. Orphan Drugs* 4, 1239–1251.
- Award, S.H., 2010.** Centre for Arab Genomic Studies A Division of Sheikh Hamdan Award for Medical Sciences: Muscular Dystrophy, Limb-Girdle, Type 2C. OMIM: 253700.
- Azibi, K., Bachner, L., Beckmann, J.S., Matsumura, K., Hamouda, E., Chaouch, M., Chaouch, A., Ait-Ouarab, R., Vignal, A., Weissenbach, J., 1993.** Severe childhood autosomal recessive muscular-dystrophy with the deficiency of the 50 kDa dystrophin-associated glycoprotein maps to chromosome-13q12. *ResearchGate* 2, 1423–8.
- Barbas, C.F., Burton, D.R., Scott, J.K., Silverman, G.J., 2007.** Quantitation of DNA and RNA. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2007.
- Baumeister, S.K., Todorovic, S., Milić-Rasić, V., Dekomien, G., Lochmüller, H., Walter, M.C., 2009.** Eosinophilic myositis as presenting symptom in gamma-sarcoglycanopathy. *Neuromuscul. Disord. NMD* 19, 167–171.
- Beggs, A.H., Koenig, M., Boyce, F.M., Kunkel, L.M., 1990.** Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum. Genet.* 86, 45–48.
- Ben Halim, N., Ben Alaya Bouafif, N., Romdhane, L., Kefi Ben Atig, R., Chouchane, I., Bouyacoub, Y., Arfa, I., Cherif, W., Nouira, S., Talmoudi, F., Lasram, K., Hsouna, S., Ghazouani, W., Azaiez, H., El Matri, L., Abid, A., Tebib, N., Ben Dridi, M.-F., Kachboura, S., Amouri, A., Mokni, M., Ben Arab, S., Dellagi, K., Abdelhak, S., 2013.** Consanguinity, endogamy, and genetic disorders in Tunisia. *J. Community Genet.* 4, 273–284.
- Ben Hamida, M., Ben Hamida, C., Zouari, M., Belal, S., Hentati, F., 1996.** Limb-girdle muscular dystrophy 2C: clinical aspects. *Neuromuscul. Disord. NMD* 6, 493–494.
- Ben Hamida, M., Fardeau, M., Attia, N., 1983.** Severe childhood muscular dystrophy affecting both sexes and frequent in Tunisia. *Muscle Nerve* 6, 469–480.
- Ben Othmane, K., Ben Hamida, M., Pericak-Vance, M.A., Ben Hamida, C., Blel, S., Carter, S.C., Bowcock, A.M., Petruhkin, K., Gilliam, T.C., Roses, A.D., Hentati,**

- F., Vance, J.M.**, 1992. Linkage of Tunisian autosomal recessive Duchenne-like muscular dystrophy to the pericentromeric region of chromosome 13q. *Nature Genetics* 2, 315–317.
- Ben Othmane, K., Speer, M.C., Stauffer, J., Blel, S., Middleton, L., Ben Hamida, C., Etribi, A., Loeb, D., Hentati, F., Roses, A.D.**, 1995. Evidence for linkage disequilibrium in chromosome 13-linked Duchenne-like muscular dystrophy (LGMD2C). *Am. J. Hum. Genet.* 57, 732–734.
- Bogdanovich, S., McNally, E.M., Khurana, T.S.**, 2008. Myostatin blockade improves function but not histopathology in a murine model of limb-girdle muscular dystrophy 2C. *Muscle Nerve* 37, 308–316.
- Boito, C., Fanin, M., Siciliano, G., Angelini, C., Pegoraro, E.**, 2003. Novel sarcoglycan gene mutations in a large cohort of Italian patients. *J. Med. Genet.* 40, e67–e67.
- Bönnemann, C.G., Modi, R., Noguchi, S., Mizuno, Y., Yoshida, M., Gussoni, E., McNally, E.M., Duggan, D.J., Angelini, C., Hoffman, E.P.**, 1995. Beta-sarcoglycan (A3b) mutations cause autosomal recessive muscular dystrophy with loss of the sarcoglycan complex. *Nat. Genet.* 11, 266–273.
- Bönnemann, C.G., Wong, J., Jones, K.J., Lidov, H.G.W., Feener, C.A., Shapiro, F., Darras, B.T., Kunkel, L.M., North, K.N.**, 2002. Primary γ -sarcoglycanopathy (LGMD 2C): broadening of the mutational spectrum guided by the immunohistochemical profile. *Neuromuscul. Disord.* 12, 273–280.
- Boyden, S.E., Salih, M.A., Duncan, A.R., White, A.J., Estrella, E.A., Burgess, S.L., Seidahmed, M.Z., Al-Jarallah, A.S., Alkhalidi, H.M.S., Al-Maneea, W.M., Bennett, R.R., Alshemmari, S.H., Kunkel, L.M., Kang, P.B.**, 2010. Efficient identification of novel mutations in patients with limb girdle muscular dystrophy. *Neurogenetics* 11, 449–455.
- Brooke, M.H., Fenichel, G.M., Griggs, R.C., Mendell, J.R., Moxley, R., Florence, J., King, W.M., Pandya, S., Robison, J., Schierbecker, J.**, 1989. Duchenne muscular dystrophy: patterns of clinical progression and effects of supportive therapy. *Neurology* 39, 475–481.
- Bueno, M.R., Moreira, E.S., Vainzof, M., Chamberlain, J., Marie, S.K., Pereira, L., Akiyama, J., Roberds, S.L., Campbell, K.P., Zatz, M.**, 1995. A common missense mutation in the adhalin gene in three unrelated Brazilian families with a relatively mild form of autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 4, 1163–1167.

- Bushby, K., Finkel, R., Wong, B., Barohn, R., Campbell, C., Comi, G.P., Connolly, A.M., Day, J.W., Flanigan, K.M., Goemans, N., Jones, K.J., Mercuri, E., Quinlivan, R., Renfroe, J.B., Russman, B., Ryan, M.M., Tulinius, M., Voit, T., Moore, S.A., Lee Sweeney, H., Abresch, R.T., Coleman, K.L., Eagle, M., Florence, J., Gappmaier, E., Glanzman, A.M., Henricson, E., Barth, J., Elfring, G.L., Reha, A., Spiegel, R.J., O'donnell, M.W., Peltz, S.W., Mcdonald, C.M., 2014.** Ataluren treatment of patients with nonsense mutation dystrophinopathy. *Muscle Nerve* 50, 477–487.
- Bushby, K.M., 1999.** Making sense of the limb-girdle muscular dystrophies. *Brain J. Neurol.* 122 (Pt 8), 1403–1420.
- Bushby, K.M.D., Anderson, L.V.B., 2010.** *Muscular dystrophy: Methods and Protocols.* Humana Press, p. 458.
- Buzzini, S.R., Macmilan, C., 2001.** gamma-Sarcoglycanopathy in two Palestinian-American siblings. *Clin. Pediatr. (Phila.)* 40, 115–117.
- Calvo, F., Teijeira, S., Fernandez, J.M., Teijeiro, A., Fernandez-Hojas, R., Fernandez-Lopez, X.A., Martin, E., Navarro, C., 2000.** Evaluation of heart involvement in gamma-sarcoglycanopathy (LGMD2C). A study of ten patients. *Neuromuscul. Disord.* NMD 10, 560–566.
- Campana-Salort, E., Krahn, M., Bartoli, M., Richard, I., Pouget, J., Levy, N., 2008.** Dystrophies musculaires des ceintures : stratégie diagnostique, bases moléculaires. *Rev. Rhum.* 75, 142–150.
- Campbell, K.P., Kahl, S.D., 1989.** Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature* 338, 259–262.
- Chamberlain, J.S., Gibbs, R.A., Rainer, J.E., Nguyen, P.N., Thomas, C., 1988.** Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res.* 16, 11141–11156.
- Chen, J., Shi, W., Zhang, Y., Sokol, R., Cai, H., Lun, M., Moore, B.F., Farber, M.J., Stepanchick, J.S., Bönnemann, C.G., Chan, Y.M., 2006.** Identification of functional domains in sarcoglycans essential for their interaction and plasma membrane targeting. *Exp. Cell Res.* 312, 1610–1625.
- Cleveland Clinic, 2015.** *Diseases and conditions: Muscular Dystrophy.*
- Crespo, G., 2011.** *Les Italiens au Maghreb. Mémoire de notre temps.*
- Crosbie, R.H., Lebakken, C.S., Holt, K.H., Venzke, D.P., Straub, V., Lee, J.C., Grady, R.M., Chamberlain, J.S., Sanes, J.R., Campbell, K.P., 1999.** Membrane targeting

- and stabilization of sarcospan is mediated by the sarcoglycan subcomplex. *J. Cell Biol.* 145, 153–165.
- Crosbie, R.H., Lim, L.E., Moore, S.A., Hirano, M., Hays, A.P., Maybaum, S.W., Collin, H., Dovico, S.A., Stolle, M.F., Tomé, F.M., Campbell, K.P., 2000.** Molecular and genetic characterization of sarcospan: insights into sarcoglycan–sarcospan interactions. *Hum. Mol. Genet.* 9, 2019–2027.
- De Salman, S.Á., Taratuto, A.L., Dekomien, G., Carrero–Valenzuela, R., 2007.** Alpha vs. gamma sarcoglycanopathy: DNA tests solve a case from Argentina. *Acta Myol.* 26, 115.
- Diana, M., Escolar, M., Peter O’Carroll, M., Robert Leshner, M., 2011.** Treatment and Management of Muscular Dystrophies. *Neuromuscular Disorders* 19, 343–372.
- Diego-Alvarez, D., Garcia-Hoyos, M., Trujillo, M.J., Gonzalez-Gonzalez, C., Rodriguez de Alba, M., Ayuso, C., Ramos-Corrales, C., Lorda-Sanchez, I., 2005.** Application of quantitative fluorescent PCR with short tandem repeat markers to the study of aneuploidies in spontaneous miscarriages. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 20, 1235–1243.
- Dinçer, P., Piccolo, F., Leturcq, F., Kaplan, J.C., Jeanpierre, M., Topaloğlu, H., 1998.** Prenatal diagnosis of limb-girdle muscular dystrophy type 2C. *Prenat. Diagn.* 18, 1300–1303.
- Diniz, G., Hazan, F., Yildirim, H.T., Unalp, A., Polat, M., Serdaroglu, G., Guzel, O., Bag, O., Secil, Y., Ozgonul, F., Ture, S., Akhan, G., Tukun, A., 2014.** Histopathological and genetic features of patients with limb girdle muscular dystrophy type 2c. *Turk. J. Pathol.*
- Dos Santos, M.R., Vieira, E.M., Reis Lima, M., 2001.** Molecular diagnosis and counseling in a family presenting compound heterozygosity for autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy. *Genet. Couns. Geneva Switz.* 12, 223–229.
- Duncan, D.R., Kang, P.B., Rabbat, J.C., Briggs, C.E., Lidov, H.G.W., Darras, B.T., Kunkel, L.M., 2006.** A novel mutation in two families with limb-girdle muscular dystrophy type 2C. *Neurology* 67, 167–169.
- El Kerch, F. el, Sefiani, A., Azibi, K., Boutaleb, N., Yahyaoui, M., Bentahila, A., Vinet, M.C., Leturcq, F., Bachner, L., Beckmann, J., 1994.** Linkage analysis of families with severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy in Morocco indicates genetic homogeneity of the disease in north Africa. *J. Med. Genet.* 31, 342–343.
- El Kerch, F., Ratbi, I., Sbiti, A., Laarabi, F.-Z., Barkat, A., Sefiani, A., 2014.** Carrier Frequency of the c.525delT Mutation in the *SGCG* Gene and Estimated Prevalence of

- Limb Girdle Muscular Dystrophy Type 2C Among the Moroccan Population. *Genet. Test. Mol. Biomark.* 18, 253–256.
- El Sherif, R.M., Fahmy, N.A., Nonaka, I., Etribi, M.A.,** 2007. Patterns of dystrophin gene deletion in Egyptian Duchenne/Becker muscular dystrophy patients. *Acta Myol.* 26, 147.
- Elhawary Nasser, A., Shawky, R.M., Hashem, N.,** 2004. Frame shift deletion mechanisms in Egyptian Duchenne and Becker muscular dystrophy families. *Mol Cells* 18, 141–9.
- Ervasti, J.M., Ohlendieck, K., Kahl, S.D., Gaver, M.G., Campbell, K.P.,** 1990. Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature* 345, 315–319.
- Ettinger, A.J., Feng, G., Sanes, J.R.,** 1997. epsilon-Sarcoglycan, a broadly expressed homologue of the gene mutated in limb-girdle muscular dystrophy 2D. *J. Biol. Chem.* 272, 32534–32538.
- Fanin, M., Duggan, D.J., Mostacciolo, M.L., Martinello, F., Freda, M.P., Sorarù, G., Trevisan, C.P., Hoffman, E.P., Angelini, C.,** 1997. Genetic epidemiology of muscular dystrophies resulting from sarcoglycan gene mutations. *J. Med. Genet.* 34, 973–977.
- Fanin, M., Hoffman, E.P., Angelini, C., Pegoraro, E.,** 2000. Private β - and γ -sarcoglycan gene mutations: Evidence of a founder effect in Northern Italy. *Hum. Mutat.* 16, 13–17.
- Fanin, M., Tasca, E., Nascimbeni, A.C., Angelini, C.,** 2009. Sarcolemmal neuronal nitric oxide synthase defect in limb-girdle muscular dystrophy: an adverse modulating factor in the disease course *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 68, 383–390.
- Fardeau, M., Hillaire, D., Mignard, C., Feingold, N., Feingold, J., Mignard, D., de Ubeda, B., Collin, H., Tome, F.M., Richard, I., Beckmann, J.,** 1996. Juvenile limb-girdle muscular dystrophy. Clinical, histopathological and genetic data from a small community living in the Reunion Island. *Brain J. Neurol.* 119 (Pt 1), 295–308.
- Fayssoil, A., Drouet, T., Luis, D., Orlikowski, D., Alamowitch, S., Annane, D.,** 2013. Acute ischemic stroke in gamma-sarcoglycanopathy. *Presse Médicale Paris Fr.* 1983 42, 484–486.
- Fayssoil, A., Nardi, O., Orlikowski, D., Annane, D.,** 2012. Heart involvement in sarcoglycanopathies. *Revue neurologique* 168, 779–782.
- Fayssoil, A., Ognà, A., Chaffaut, C., Chevret, S., Guimarães-Costa, R., Leturcq, F., Wahbi, K., Prigent, H., Lofaso, F., Nardi, O., Clair, B., Behin, A., Stojkovic, T.,**

- Laforet, P., Orlikowski, D., Annane, D.,** 2016. Natural History of Cardiac and Respiratory Involvement, Prognosis and Predictive Factors for Long-Term Survival in Adult Patients with Limb Girdle Muscular Dystrophies Type 2C and 2D. *PLOS ONE* 11, e0153095.
- Fernandez, C., Halbert, C., Maues de Paula, A., Figarella-Branger, D., Chabrol, B., Pellissier, J.-F.,** 2010. Dystrophies musculaires liées au gène DMD : myopathie de Becker, formes féminine et atypiques. *EMC - Neurologie*.
- Georgieva, B., Todorova, A., Tournev, I., Mitev, V., Kremensky, I.,** 2004. C283Y gamma-sarcoglycan gene mutation in the Bulgarian Roma (Gypsy) population: prevalence study and carrier screening in a high-risk community. *Clin. Genet.* 66, 467–472.
- Ghaoui, R., Cooper, S.T., Lek, M., Jones, K., Corbett, A., Reddel, S.W., Needham, M., Liang, C., Waddell, L.B., Nicholson, G., O’Grady, G., Kaur, S., Ong, R., Davis, M., Sue, C.M., Laing, N.G., North, K.N., MacArthur, D.G., Clarke, N.F.,** 2015. Use of Whole-Exome Sequencing for Diagnosis of Limb-Girdle Muscular Dystrophy: Outcomes and Lessons Learned. *JAMA Neurol.* 72, 1424–1432.
- Ginjaar, H.B., van der Kooi, A.J., Ceelie, H., Kneppers, A.L., van Meegen, M., Barth, P.G., Busch, H.F., Wokke, J.H., Anderson, L.V., Bönnemann, C.G., Jeanpierre, M., Bolhuis, P.A., Moorman, A.F., de Visser, M., Bakker, E., Ommen, G.J.,** 2000. Sarcoglycanopathies in Dutch patients with autosomal recessive limb girdle muscular dystrophy. *J. Neurol.* 247, 524–529.
- Goldman, J.S.,** 2014. Genetic Counseling for Adult Neurogenetic Disease: A Casebook for Clinicians. Springer.
- Gowers, W.R., William R.,** 1886. A manual of diseases of the nervous system. London : J. & A. Churchill.
- Gulati, S., Leekha, S., Sharma, M.C., Kalra, V.,** 2003. Gamma-sarcoglycanopathy. *Indian Pediatr.* 40, 1077–1081.
- Gupta, S.L.,** 2004. Marketing Research. Excel Books India.
- Hack, A.A., Cordier, L., Shoturma, D.I., Lam, M.Y., Sweeney, H.L., McNally, E.M.,** 1999. Muscle degeneration without mechanical injury in sarcoglycan deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 10723–10728.
- Hadj Salem, I., Kamoun, F., Louhichi, N., Trigui, M., Triki, C., Fakhfakh, F.,** 2012. Impact of single-nucleotide polymorphisms at the TP53-binding and responsive promoter region of BCL2 gene in modulating the phenotypic variability of LGMD2C patients. *Mol. Biol. Rep.* 39, 7479–7486.

- Herson, S., Hentati, F., Rigolet, A., Behin, A., Romero, N.B., Leturcq, F., Laforêt, P., Maisonobe, T., Amouri, R., Haddad, H., Audit, M., Montus, M., Masurier, C., Gjata, B., Georger, C., Cherai, M., Carlier, P., Hogrel, J.-Y., Herson, A., Allenbach, Y., Lemoine, F.M., Klatzmann, D., Sweeney, H.L., Mulligan, R.C., Eymard, B., Caizergues, D., Voït, T., Benveniste, O., 2012.** A phase I trial of adeno-associated virus serotype 1- γ -sarcoglycan gene therapy for limb girdle muscular dystrophy type 2C. *Brain J. Neurol.* 135, 483–492.
- Heydemann, A., Wheeler, M.T., McNally, E.M., 2001.** Cardiomyopathy in animal models of muscular dystrophy. *Curr. Opin. Cardiol.* 16, 211–217.
- Hoffman, Brown, R.H., Jr., Louis, M.K., 1987.** Dystrophin: The Protein Product of the Duchenne Muscular Dystrophy Locus. *Cell Press* 51.
- Holt, K.H., Campbell, K.P., 1998.** Assembly of the sarcoglycan complex. Insights for muscular dystrophy. *J. Biol. Chem.* 273, 34667–34670.
- Hsu, J.D., Quinlivan, R., 2013.** Scoliosis in Duchenne muscular dystrophy (DMD). *Neuromuscul. Disord. NMD* 23, 611–617.
- J De Recondo, AM De Recondo., 2001.** Pathologie du muscle strié: De la biologie cellulaire à la thérapie. *Medecine-science (Flammarion), Flammarion* 331–379.
- Jaouad, I.C., Elalaoui, S.C., Sbiti, A., Elkerh, F., Belmahi, L., Sefiani, A., 2009.** CONSANGUINEOUS MARRIAGES IN MOROCCO AND THE CONSEQUENCE FOR THE INCIDENCE OF AUTOSOMAL RECESSIVE DISORDERS. *J. Biosoc. Sci.* 41, 575–581.
- Jung, D., Leturcq, F., Sunada, Y., Duclos, F., Tomé, F.M., Moomaw, C., Merlini, L., Azibi, K., Chaouch, M., Slaughter, C., Fardeau, M., Kaplan, J.C., Campbell, K.P., 1996.** Absence of gamma-sarcoglycan (35 DAG) in autosomal recessive muscular dystrophy linked to chromosome 13q12. *FEBS Lett.* 381, 15–20.
- Kaplan, J., 1992.** Deux percées sur le front des maladies neuro-musculaires : la myopathie facio-scapulo-humérale et la myopathie autosomique récessive maghrébine. *médecine/sciences* 8, 985.
- Kaplan, J.-C., 2011.** The 2012 version of the gene table of monogenic neuromuscular disorders. *Neuromuscul. Disord.* 21, 833–861.
- Kaplan, J.-C., Jeanpierre, M., Urtizbera, J.-A., Beckmann, J.S., 1996.** Bases moléculaires des dystrophies musculaires progressives transmission autosomique récessive. *ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR/ actualités* 3, 157–171.

- Kawasaki, E.S.**, 2012. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press.
- Kefi, M., Amouri, R., Driss, A., Ben Hamida, C., Ben Hamida, M., Kunkel, L., Hentati, F.**, 2003. Phenotype and sarcoglycan expression in Tunisian LGMD 2C patients sharing the same del521-T mutation. *Neuromuscul. Disord.* 13, 779–787.
- Kefi, R., Bouzlama, Z., Mona, G.**, 2015. Consanguinity and endogamy of a Northeastern algerian population (population of El-kala).
- Khadilkar, S., Singh, R., Hegde, M., Urtizbera, A., Love, D., Chong, B.**, 2009. Spectrum of mutations in sarcoglycan genes in the Mumbai region of western India: High prevalence of 525del T. *Neurol. India* 57, 406.
- Kobuke, K., Piccolo, F., Garringer, K.W., Moore, S.A., Sweezer, E., Yang, B., Campbell, K.P.**, 2008. A Common Disease-Associated Missense Mutation in Alpha-Sarcoglycan Fails to Cause Muscular Dystrophy in Mice. *Hum. Mol. Genet.* 17, 1201–1213.
- Koenig, M., Hoffman*, E.P., Bertelson*, C.J., Monaco*, A.F., Feener*, C., Kunkel*, L.M.**, 1987. Complete Cloning of the Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) cDNA and Preliminary Genomic Organization of the DMD Gene in Normal and Affected Individuals. *Cell Press* 50, 509–517.
- Lai, P.-S., Takeshima, Y., Adachi, K., van Tran, K., Nguyen, H.T., Low, P.-S., Matsuo, M.**, 2002. Comparative study on deletions of the dystrophin gene in three Asian populations. *J. Hum. Genet.* 47, 0552–0555.
- Lasa, A., Piccolo, F., de Diego, C., Jeanpierre, M., Colomer, J., Rodríguez, M.J., Urtizbera, J.A., Baiget, M., Kaplan, J., Gallano, P.**, 1998. Severe limb girdle muscular dystrophy in Spanish gypsies: further evidence for a founder mutation in the gamma-sarcoglycan gene. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 6, 396–399.
- LEAL, G., DA-SILVA, E.**, 1999. Limb-girdle muscular dystrophy with apparently different clinical courses within sexes in a large inbred kindred. *J. Med. Genet.* 36, 714–718.
- Leiden Muscular Dystrophy pages**, 2005. gamma-Sarcoglycan (SGCG) (LGMD-2C).
- Leturcq, F., Kalpan, J.**, 2000. Le diagnostic étiologique des dystrophies musculaires récessives. *La Lettre du Neurologue* IV.
- Lim, L.E., Campbell, K.P.**, 1998. The sarcoglycan complex in limb-girdle muscular dystrophy. *Curr. Opin. Neurol.* 11, 443–452.
- Lim, L.E., Duclos, F., Broux, O., Bourg, N., Sunada, Y., Allamand, V., Meyer, J., Richard, I., Moomaw, C., Slaughter, C.**, 1995. Beta-sarcoglycan: characterization and role in limb-girdle muscular dystrophy linked to 4q12. *Nat. Genet.* 11, 257–265.

- Lodish, M.H., Berk, M.A., Matsudaira, P., Darnell, J., 2005.** Biologie moléculaire de la cellule. De Boeck Supérieur.
- Malhotra, H.S., Juyal, R., Malhotra, K.P., Shukla, R., 2011.** Macroglossia associated with 271 bp deletion in exon 50 of dystrophin gene. *Ann. Indian Acad. Neurol.* 14, 47–49.
- Manzur, A.Y., Muntoni, F., 2009.** Diagnosis and new treatments in muscular dystrophies. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 80, 706–714.
- McDonald, C.M., 2012.** Clinical approach to the diagnostic evaluation of hereditary and acquired neuromuscular diseases. *Phys. Med. Rehabil. Clin. N. Am.* 23, 495–563.
- McNally, E.M., 2013.** The Sarcoglycans. Landes Bioscience.
- McNally, E.M., Duggan, D., Gorospe, J.R., Bönnemann, C.G., Fanin, M., Pegoraro, E., Lidov, H.G., Noguchi, S., Ozawa, E., Finkel, R.S., others, 1996a.** Mutations that disrupt the carboxyl-terminus of γ -sarcoglycan cause muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 5, 1841–1847.
- McNally, E.M., Passos-Bueno, M.R., Bönnemann, C.G., Vainzof, M., de Sa Moreira, E., Lidov, H.G., Othmane, K.B., Denton, P.H., Vance, J.M., Zatz, M., 1996b.** Mild and severe muscular dystrophy caused by a single gamma-sarcoglycan mutation. *Am. J. Hum. Genet.* 59, 1040.
- Melacini, P., Fanin, M., Duggan, D.J., Freda, M.P., Berardinelli, A., Danieli, G.A., Barchitta, A., Hoffman, E.P., Dalla Volta, S., Angelini, C., 1999.** Heart involvement in muscular dystrophies due to sarcoglycan gene mutations. *Muscle Nerve* 22, 473–479.
- Merlini, L., Kaplan, J.-C., Navarro, C., Barois, A., Bonneau, D., Brasa, J., Echenne, B., Gallano, P., Jarre, L., Jeanpierre, M., Kalaydjieva, L., Leturcq, F., Levi-Gomes, A., Toutain, A., Tournev, I., Urtizbera, A., Vallat, J.-M., Voit, T., Warter, J.-M., 2000.** Homogeneous phenotype of the gypsy limb-girdle MD with the γ -sarcoglycan C283Y mutation. *Neurology* 54, 1075–1079.
- Meune, C., Wahbi, K., Duboc, D., 2005.** Atteinte cardiaque dans les dystrophies de Duchenne et de Becker. *MT Cardio* 1, 461–466.
- Miller, S.A., Dykes, D.D., Polesky, H.F., 1988.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16, 1215.
- Monaco, A.P., Bertelson, C.J., Liechti-Gallati, S., Moser, H., Kunkel, L.M., 1988.** An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics* 2, 90–95.

- Morar, B., Gresham, D., Angelicheva, D., Tournev, I., Gooding, R., Guergueltcheva, V., Schmidt, C., Abicht, A., Lochmüller, H., Tordai, A., Kalmár, L., Nagy, M., Karcagi, V., Jeanpierre, M., Herczegfalvi, A., Beeson, D., Venkataraman, V., Warwick Carter, K., Reeve, J., de Pablo, R., Kučinskas, V., Kalaydjieva, L., 2004.** Mutation History of the Roma/Gypsies. *Am. J. Hum. Genet.* 75, 596–609.
- Moreira, E.S., Vainzof, M., Suzuki, O.T., Pavanello, R.C.M., Passos-Bueno, M.R., 2003.** Genotype-phenotype correlations in 35 Brazilian families with sarcoglycanopathies including the description of three novel mutations. *J Med Genet* 40.
- Moumouni, H., Assadeck, H., Guida, S., Souna, B., Adal, R., Urtizbera, J., Leturcq, F., Darboux, B., 2012.** Gamma-sarcoglycanopathy (LGMD 2C) with Del 525T mutation: Report of the first familial case in Niger. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 5.
- Muntoni, F., Bushby, K., van Ommen, G., 2005.** 128th ENMC International Workshop on “Preclinical optimization and Phase I/II Clinical Trials Using Antisense Oligonucleotides in Duchenne Muscular Dystrophy” 22-24 October 2004, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul. Disord.* NMD 15, 450–457.
- Murphy, A.P., Straub, V., 2015.** The Classification, Natural History and Treatment of the Limb Girdle Muscular Dystrophies. *J. Neuromuscul. Dis.* 2, S7–S19.
- Myoinfo, 2016.** Avancées dans les myopathies des ceintures 13.
- Narayanaswami, P., Weiss, M., Selcen, D., David, W., Raynor, E., Carter, G., Wicklund, M., Barohn, R.J., Ensrud, E., Griggs, R.C., Gronseth, G., Amato, A.A., 2014.** Evidence-based guideline summary: Diagnosis and treatment of limb-girdle and distal dystrophies. *Neurology* 83, 1453–1463.
- Ng, R., Banks, G.B., Hall, J.K., Muir, L.A., Ramos, J.N., Wicki, J., Odom, G.L., Konieczny, P., Seto, J., Chamberlain, J.R., Chamberlain, J.S., 2012.** Animal models of muscular dystrophy. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 105, 83–111.
- Nigro, V., de Sá Moreira, E., Piluso, G., Vainzof, M., Belsito, A., Politano, L., Puca, A.A., Passos-Bueno, M.R., Zatz, M., 1996.** Autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy, LGMD2F, is caused by a mutation in the delta-sarcoglycan gene. *Nat. Genet.* 14, 195–198.
- Noguchi, S., McNally, E.M., Ben Othmane, K., Hagiwara, Y., Mizuno, Y., Yoshida, M., Yamamoto, H., Bönnemann, C.G., Gussoni, E., Denton, P.H., Kyriakides, T., Middleton, L., Hentati, F., Ben Hamida, M., Nonaka, I., Vance, J.M., Kunkel, L.M., Ozawa, E., 1995.** Mutations in the dystrophin-associated protein gamma-sarcoglycan in chromosome 13 muscular dystrophy. *Science* 270, 819–822.

- Nouioua, S.**, 2013. Les dystrophinopathies et les dystrophies musculaires des ceintures de transmission autosomique récessive ou limb girdle muscular dystrophies 2 (LGMD2): étude clinique, histologique, génétique et prise en charge thérapeutique. Thèse de doctorat.
- Nowak, K.J., Walsh, P., Jacob, R.L., Johnsen, R.D., Peverall, J., McNally, E.M., Wilton, S.D., Kakulas, B.A., Laing, N.G.**, 2000. Severe gamma-sarcoglycanopathy caused by a novel missense mutation and a large deletion. *Neuromuscul. Disord.* NMD 10, 100–107.
- Okizuka, Y., Takeshima, Y., Itoh, K., Zhang, Z., Awano, H., Maruyama, K., Kumagai, T., Yagi, M., Matsuo, M.**, 2010. Low incidence of limb-girdle muscular dystrophy type 2C revealed by a mutation study in Japanese patients clinically diagnosed with DMD. *BMC Med. Genet.* 11, 49.
- Ozawa, E., Noguchi, S., Mizuno, Y., Hagiwara, Y., Yoshida, M.**, 1998. From dystrophinopathy to sarcoglycanopathy: Evolution of a concept of muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 21, 421–438.
- Pegoraro, E., Hoffman, E.P.**, 2012. Limb-Girdle Muscular Dystrophy Overview, GeneReviews® [Internet].
- Pegoraro, E., Hoffman, E.P.**, 1993. Limb-Girdle Muscular Dystrophy Overview, GeneReviews(®). University of Washington, Seattle, Seattle (WA).
- Petiot, P., Andoni Urtizbera, J.**, 2004. Diagnostic des maladies musculaires. *EMC - Neurologie* 1, 137–155.
- Piccolo, F., Jeanpierre, M., Leturcq, F., Dodé, C., Azibi, K., Toutain, A., Merlini, L., Jarre, L., Navarro, C., Krishnamoorthy, R., Tomé, F.M.S., Urtizbera, J.A., Beckmann, J.S., Campbell, K.P., Kaplan, J.-C.**, 1996. A Founder Mutation in the γ -Sarcoglycan Gene of Gypsies Possibly Predating Their Migration Out of India. *Hum. Mol. Genet.* 5, 2019–2022.
- Pichavant, C.**, 2010. THÉRAPIE GÉNIQUE DE LA DYSTROPHIE MUSCULAIRE DE DUCHENNE Utilisation de transgènes de la dystrophine chez le modèle canin. Thèse de doctorat.
- Politano, L., Nigro, V., Passamano, L., Petretta, V., Comi, L.I., Papparella, S., Nigro, G., Rambaldi, P.F., Raia, P., Pini, A., Mora, M., Giugliano, M.A., Esposito, M.G., Nigro, G.**, 2001. Evaluation of cardiac and respiratory involvement in sarcoglycanopathies. *Neuromuscul. Disord.* NMD 11, 178–185.

- Potnis-Lele, M.**, 2012. Genetic etiology and Diagnostic strategies for Duchenne and Becker Muscular Dystrophy: A 2012 update.
- Rang, M., Silver, R., De La Garza, J.**, 1986. Cerebral palsy. *Pediatric Orthopaedics*. Philadelphia: JB Lippincott, 1.
- Roberds, S.L., Leturcq, F., Allamand, V., Piccolo, F., Jeanpierre, M., Anderson, R.D., Lim, L.E., Lee, J.C., Tomé, F.M., Romero, N.B.**, 1994. Missense mutations in the adhalin gene linked to autosomal recessive muscular dystrophy. *Cell* 78, 625–633.
- Romero, N.B., Tomé, F.M., Leturcq, F., el Kerch, F.E., Azibi, K., Bachner, L., Anderson, R.D., Roberds, S.L., Campbell, K.P., Fardeau, M.**, 1994. Genetic heterogeneity of severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy with adhalin (50 kDa dystrophin-associated glycoprotein) deficiency. *Comptes Rendus Académie Sci. Sér. III Sci. Vie* 317, 70–76.
- Royden Jones, H., De Vivo, D.C., Darras, B.T.**, 2003. *Neuromuscular Disorders of Infancy, Childhood, and Adolescence: A Clinician's Approach*. Butterworth-Heinemann.
- Salih, M.A.M., Omer, M.I.A., Bayoumi, R.A., Karrar, O., Johnson, M.**, 1983. Severe Autosomal Recessive Muscular Dystrophy in an Extended Sudanese Kindred. *Dev. Med. Child Neurol.* 25, 43–52.
- Sandona, D., Betto, R.**, 2009. Sarcoglycanopathies: molecular pathogenesis and therapeutic prospects. *Expert Rev. Mol. Med.* 11, e28.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R.**, 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 5463–5467.
- Sbiti, A., El Kerch, F., Sefiani, A.**, 2002. Analysis of dystrophin gene deletions by multiplex PCR in Moroccan patients. *BioMed Res. Int.* 2, 158–160.
- Serose, A.**, 2007. Développement d'une nouvelle approche thérapeutique basée sur IGF-1 pour la cardiomyopathie dilatée dans un modèle de hamster déficient en delta-sarcoglycane. Thèse de doctorat.
- Shelton, G.D., Engvall, E.**, 2005. Canine and feline models of human inherited muscle diseases. *Neuromuscul. Disord.* NMD 15, 127–138. doi:10.1016/j.nmd.2004.10.019
- Shi, W., Chen, Z., Schottenfeld, J., Stahl, R.C., Kunkel, L.M., Chan, Y.-M.**, 2004. Specific assembly pathway of sarcoglycans is dependent on beta- and delta-sarcoglycan. *Muscle Nerve* 29, 409–419.
- Siala, O., Kammoun Feki, F., Louhichi, N., Hadj Salem, I., Gribaa, M., Elghzel, H., Saad, A., Triki, C., Fakhfakh, F.**, 2008. Molecular prenatal diagnosis of muscular dystrophies in Tunisia and postnatal follow-up role. *Genet. Test.* 12, 581–586.

- Solares-Pérez, A., Alvarez, R., Crosbie, R.H., Vega-Moreno, J., Medina-Monares, J., Estrada, F.J., Ortega, A., Coral-Vazquez, R.,** 2010. Altered calcium pump and secondary deficiency of gamma-sarcoglycan and microspan in sarcoplasmic reticulum membranes isolated from delta-sarcoglycan knockout mice. *Cell Calcium* 48, 28–36.
- Solé, G.,** 2010. Myopathies des ceintures. *Neurologie* 1–15.
- SONAN-DOUAYOUA, T., AKANI, F., ASSI, B., COWPLI-BONY, P., AKA-ANGHUI DIARRA, E., DOUMBIA-OUATTARA, M., KOUAME-ASSOUAN, A.-E., BOA YAPO, F., KOUASSI Ernest, B.,** 2007. Myopathie Maghrebine due à une sarcoglycanopathie. *AJNS* 26, 82–86.
- Spinazzola, J.M., Smith, T.C., Liu, M., Luna, E.J., Barton, E.R.,** 2015. Gamma-sarcoglycan is required for the response of archvillin to mechanical stimulation in skeletal muscle. *Hum. Mol. Genet.* 24, 2470–2481.
- Suzuki, A., Yoshida, M., Hayashi, K., Mizuno, Y., Hagiwara, Y., Ozawa, E.,** 1994. Molecular organization at the glycoprotein-complex-binding site of dystrophin. *Eur. J. Biochem.* 220, 283–292.
- Takano, A., Bönnemann, C. g., Honda, H., Sakai, M., Feener, C. a., Kunkel, L. m., Sobue, G.,** 2000. Intrafamilial phenotypic variation in limb-girdle muscular dystrophy type 2C with compound heterozygous mutations. *Muscle Nerve* 23, 807–810.
- Tayeb, M.T.,** 2010. Deletion mutations in Duchenne muscular dystrophy (DMD) in Western Saudi children. *Saudi J. Biol. Sci.* 17, 237–240.
- Tecklin, J.S.,** 2008. *Pediatric Physical Therapy.* Lippincott Williams & Wilkins.
- Teebi, A.S.,** 2010. *Genetic Disorders Among Arab Populations.* Springer Science & Business Media.
- Thompson, T.G., Chan, Y.M., Hack, A.A., Brosius, M., Rajala, M., Lidov, H.G., McNally, E.M., Watkins, S., Kunkel, L.M.,** 2000. Filamin 2 (FLN2): A muscle-specific sarcoglycan interacting protein. *J. Cell Biol.* 148, 115–126.
- Tinsley, J., Blake, D., Davies, K.,** 1993. Apo-dystrophin-3: a 2.2kb transcript from the DMD locus encoding the dystrophin glycoprotein binding site. *Hum Mol Genet* 2, 521–4.
- Todorova, A., Ashikov, A., Beltcheva, O., Tournev, I., Kremensky, I.,** 1999. C283Y mutation and other C-terminal nucleotide changes in the γ -sarcoglycan gene in the Bulgarian gypsy population. *Hum. Mutat.* 14, 40–44.
- TOPALOGLU, H.,** 2013. epidemiology of muscular dystrophies in the Mediterranean area. *Acta Myol.* 32, 138.

- Trabelsi, M., Kavian, N., Daoud, F., Commere, V., Deburgrave, N., Beugnet, C., Llense, S., Barbot, J.C., Vasson, A., Kaplan, J.C.,** 2008. Revised spectrum of mutations in sarcoglycanopathies. *Eur. J. Hum. Genet.* 16, 793–803.
- Tuffery-Giraud, S., Béroud, C., Leturcq, F., Yaou, R.B., Hamroun, D., Michel-Calemard, L., Moizard, M.-P., Bernard, R., Cossée, M., Boisseau, P., Blayau, M., Creveaux, I., Guiochon-Mantel, A., de Martinville, B., Philippe, C., Monnier, N., Bieth, E., Khau Van Kien, P., Desmet, F.-O., Humbertclaude, V., Kaplan, J.-C., Chelly, J., Claustres, M.,** 2009. Genotype-phenotype analysis in 2,405 patients with a dystrophinopathy using the UMD-DMD database: a model of nationwide knowledgebase. *Hum. Mutat.* 30, 934–945.
- Urtizbera, A., Cobo, A.,** 2011. Myologie et Méditerranée : enjeux médico-scientifiques. *Revue méditerranéenne de génétique humaine.*
- Valérian, D.,** 2013. Les relations entre Italie méridionale, Sicile et Maghreb au Moyen Âge : autour de trois ouvrages récents. *Médiév. Lang. Textes Hist.* 64, 173–182.
- Vasli, N., Böhm, J., Gras, S.L., Muller, J., Pizot, C., Jost, B., Echaniz-Laguna, A., Laugel, V., Tranchant, C., Bernard, R., Plewniak, F., Vicaire, S., Levy, N., Chelly, J., Mandel, J.-L., Biancalana, V., Laporte, J.,** 2012. Next generation sequencing for molecular diagnosis of neuromuscular diseases. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 124, 273–283.
- Verdura, E., Gonzalez-Quereda, L., Juan-Mateu, J., Rodriguez, M.J., Cabello, A., Gago, M.C., Coll, J., Colomer, J., Gutierrez-Rivas, E., Hankiewicz, K., Munain, A.L. de, Navarro, C., Pascual, S., Pou, A., Ramos, M.A., Ríos, P.V., Baiget, M., Gallano, P.,** 2011. P2.34 Mutational spectrum of sarcoglycanopathies in Spain. *Neuromuscul. Disord.* 21, 670.
- Vermeer, S., Verrips, A., Willemsen, M.A.A.P., ter Laak, H.J., Ginjaar, I.B., Hamel, B.C.J.,** 2004. Novel mutations in three patients with LGMD2C with phenotypic differences. *Pediatr. Neurol.* 30, 291–294.
- Vignos, P.J., Spencer, G.E., Archibald, K.C.,** 1963. Management of progressive muscular dystrophy in childhood. *JAMA* 184, 89–96.
- Vorgerd, M., Gencik, M., Mortier, J., Epplen, J.T., Malin, J.P., Mortier, W.,** 2001. Isolated loss of gamma-sarcoglycan: diagnostic implications in autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 24, 421–424.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Wang, X., Wang, Z., Yan, M., Huang, S., Chen, T.-J., Zhong, N.,** 2008. Similarity of DMD gene deletion and duplication in the Chinese patients compared to global populations. *Behav. Brain Funct. BBF* 4, 20.
- Wheeler, M.T., Zarnegar, S., McNally, E.M.,** 2002. ζ -Sarcoglycan, a novel component of the sarcoglycan complex, is reduced in muscular dystrophy. *Human Molecular Genetics* 11, 2147–2154.
- White, S.J.,** 1973. Detecting copy number changes in genomic DNA – MAPH and MLPA. PhD thesis.
- White, S.J., de Willige, S.U., Verbove, D., Politano, L., Ginjaar, I., Breuning, M.H., den Dunnen, J.T.,** 2005. Sarcoglycanopathies and the risk of undetected deletion alleles in diagnosis. *Hum. Mutat.* 26, 59–59.
- Yoshida, M., Ozawa, E.,** 1990. Glycoprotein complex anchoring dystrophin to sarcolemma. *J. Biochem. (Tokyo)* 108, 748–752.

ANNEXES

Annexe. 1**A. Séquence du gène SGCG (NM_000231.2).**

```

1 gaaactcgtg agagcccttt ctccagggac agttgctgaa gcttcatcct ttgctctcat
61 tctgtaagtc atagaaaagt ttgaaacatt ctgtctgtgg tagagctcgg gccagctgta
121 gttcattcgc cagtgtgctt ttcttaatat ctaagatggt gcgtgagcag tacactacag
181 ccacagaagg catctgcata gagaggccag agaatcagta tgtctacaaa attggcattt
241 atggctggag aaagcgctgt ctctacttgt ttgttcttct tttactcatc atcctcgttg
301 tgaatthagc tcttacaatt tggattctta aagtgatgtg gttttctcca gcaggaatgg
361 gccacttggt tgtaacaaaa gatggactgc gcttgggaag ggaatcagaa tttttattcc
421 cattgtatgc caaagaaata cactccagag tggactcatc tctgcttcta caatcaacc
481 agaatgtgac tgtaaatgcg cgcaactcag aaggggaggt cacaggcagg ttaaaagtcg
541 gtcccaaaat ggtagaagtc cagaatcaac agtttcagat caactccaac gacggcaagc
601 cactatttac tgtagatgag aaggaagttg tggttggtac agataaactt cgagtaactg
661 ggctgaagg ggctcttttt gaacattcag tggagacacc cttgtcaga gccgaccgt
721 ttcaagacct tagattagaa tccccactc ggagtctaag catggatgcc ccaaggggtg
781 tgcatattca agctcacgct gggaaaattg aggcgctttc tcaaattgat attctttttc
841 atagtagtga tggaatgctt gtgcttgatg ctgaaactgt gtgcttacc aagctggtgc
901 aggggacgtg gggtcctctt ggcagctcac agagcctcta cgaaatctgt gtgtgtccag
961 atgggaagct gtacctgtct gtggcgggtg tgagcaccac gtgccaggag cacagccaca
1021 tctgcctctg agctgcctgc gtcctctcgg tgagctgtgc agtgccggcc ccagatcctc
1081 acaccaggg agcagctgca catcgtgaaa gactgaggca gcgtggatgg gaagtaaacg
1141 cttccagagg aactcagaaa aaattatgtg ccagtgaaag tgtttggaca aaaactacat
1201 gatctcaaaa tgcacgtgga tgtgagacac aaaagttgac aaaatggaaa agcaatgtgt
1261 ttttccactg gattaatttt caccggaaca attgccaatt ctctctgcct cgcctcccc
1321 tatcttgctc gtgtgggcac aactgagtg ttgagttgcc gtgtggagtt aatgtatgac
1381 gctccactgt ggatatctaa tgcctgttg agagtagcct tgctcagtc taaaatgcc
1441 caaagtctta tacagcattt cctttatagc attcaaacct cacatcctcc cttcagttta
1501 atgcaagtaa gtcaggtttc acaagaaaat tttcaagttt tgaagggaaat ttgaggttga
1561 tctggttttc aagatgtagt taaaggaata aatcactcaa aattaaactt tctgtatata
1621 gtcaataagc aataaaaacc tcatttttca gagttaaaaa a

```

B. Séquence de la protéine gamma-sarcoglycane (NM_000231.2).

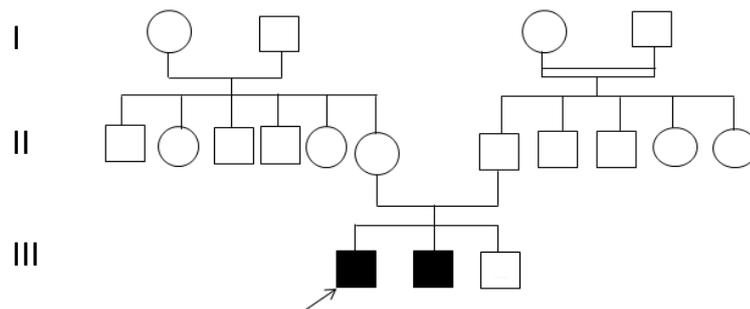
```

<< MVREQYTTATEGICIERPENQYVYKIGIYGWRKRCLYLFVLLLLLIILVVNLALTIWILKV
MWFSPAGMGHLCVTKDGLRLEGESEFLFPLYAKEIHSRVDSSLLLQSTQNVTVNARNSEGE
VTGRLKVGPKMVEVQNQQFQINSNDGKPLFTVDEKEVVVGTDKLRVTGPEGALFEHSVETP
LVRADPFQDLRLESPTRSLSM DAPRGVHIQAHAGKIEALSQMDILFHSSDGMLVLDAETVC
LPKLVQGTWGPSGSSQSLYEICVCPDGKLYLSVAGVSTTCQEHSICL >>

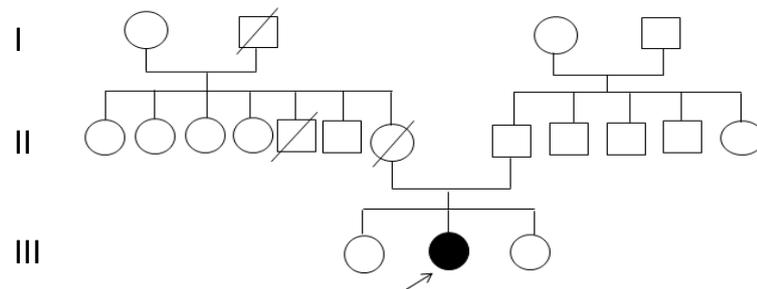
```

Annexe. 2: Arbres généalogiques (avec les numéros des familles de l'étude).**Familles LGMD2C :**

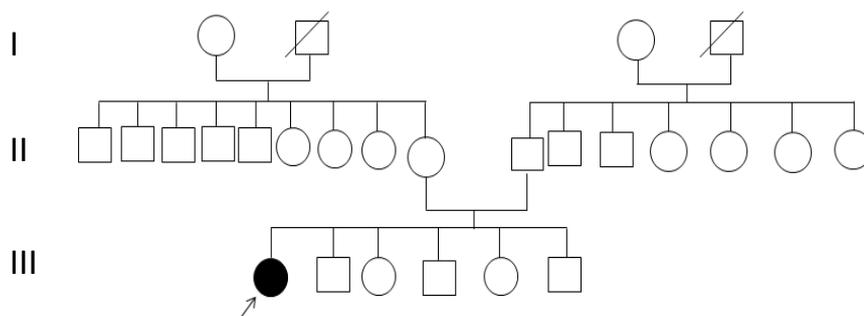
N°1



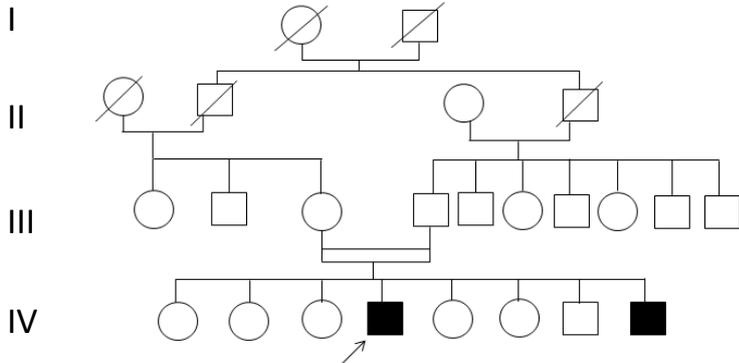
N°5



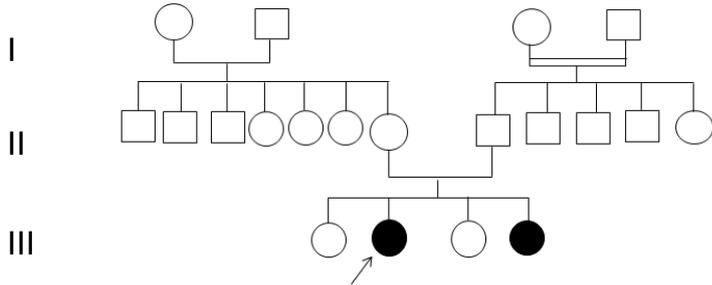
N°64



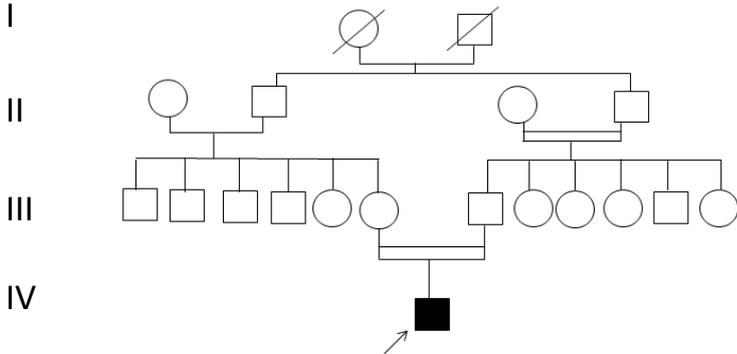
N°8



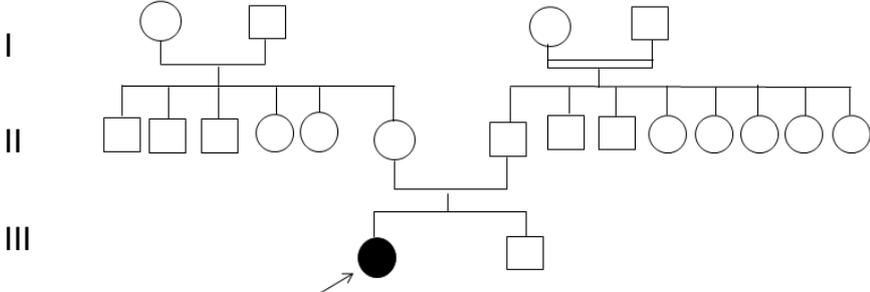
N°11



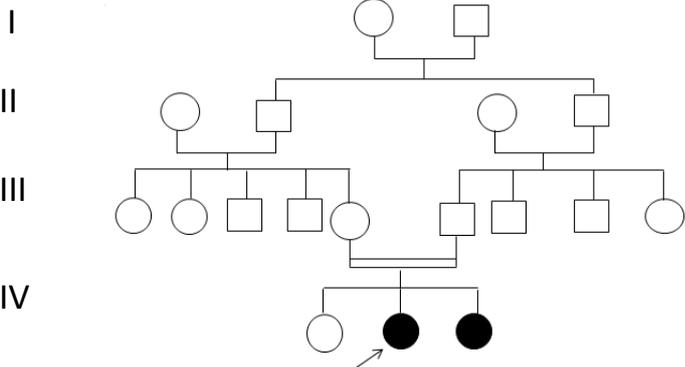
N°20



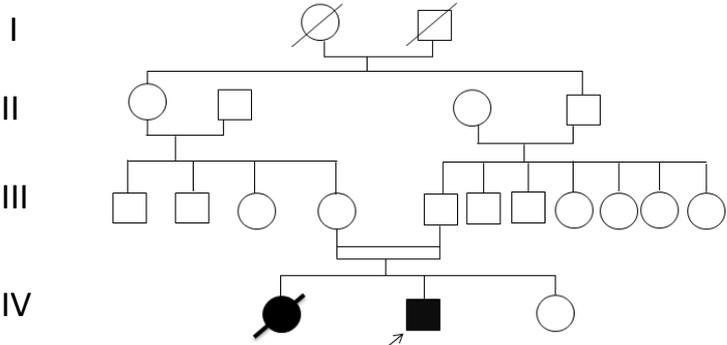
N°65



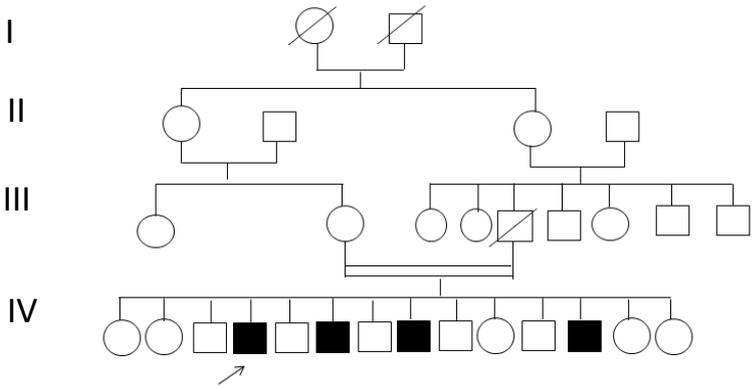
N°39



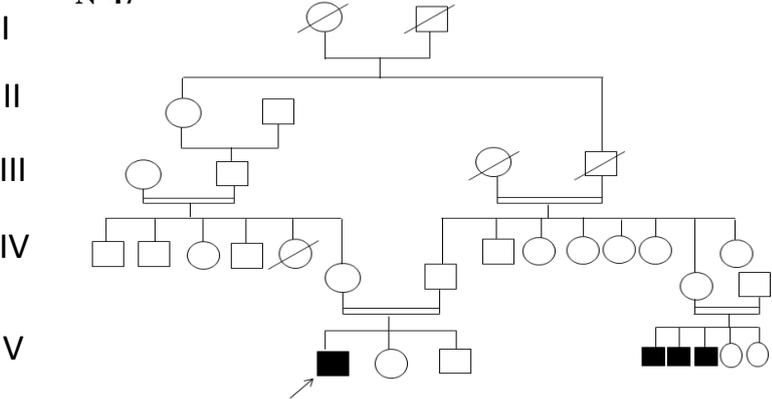
N°42



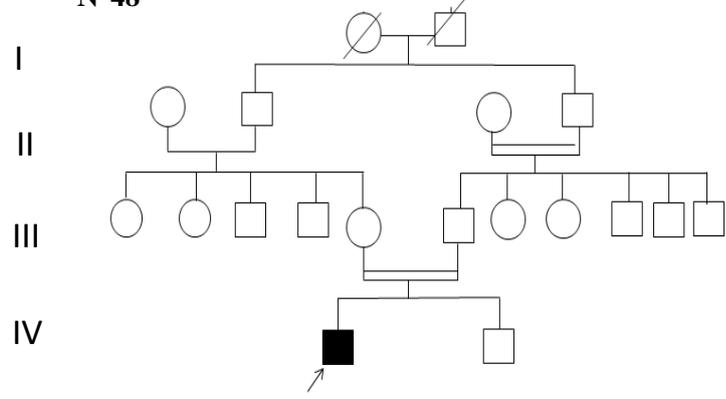
N°44



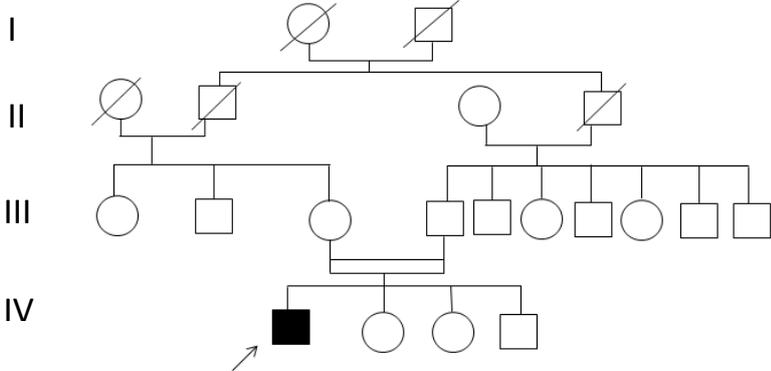
N°47



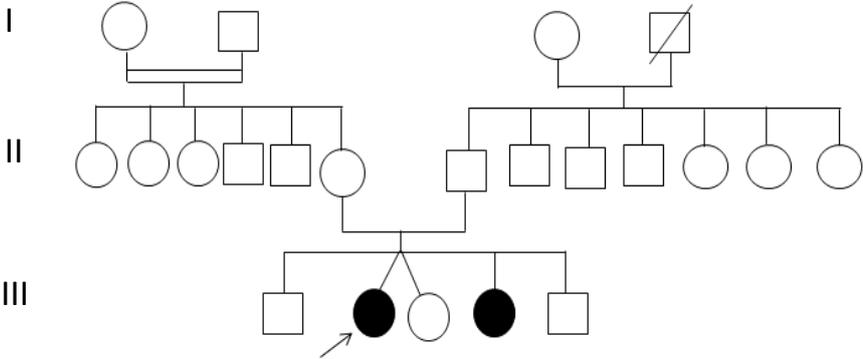
N°48



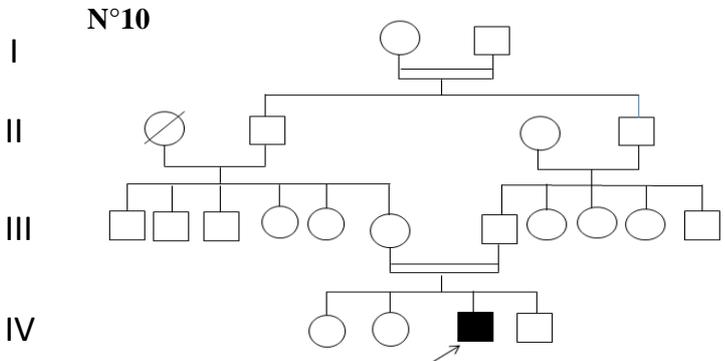
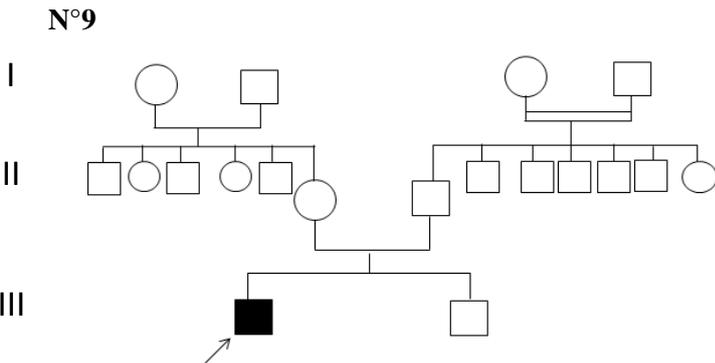
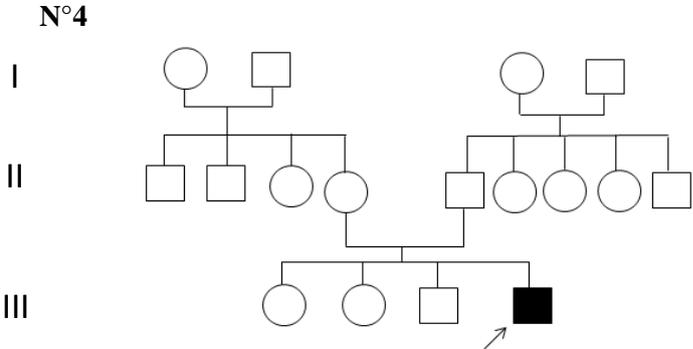
N°61



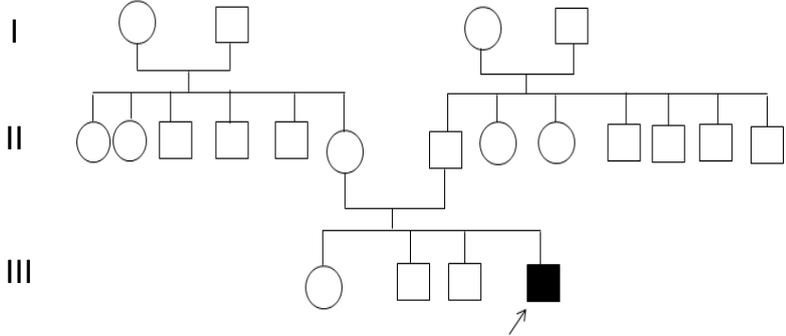
N°52



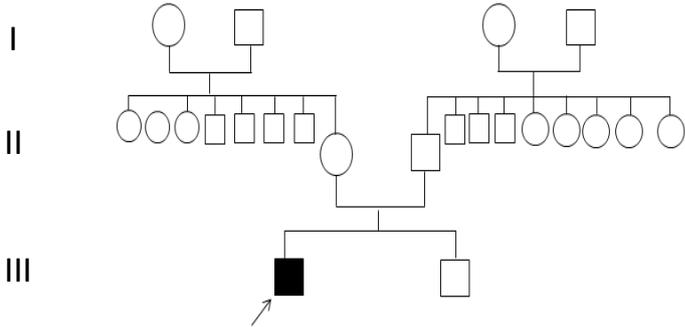
Familles dystrophinopathies :



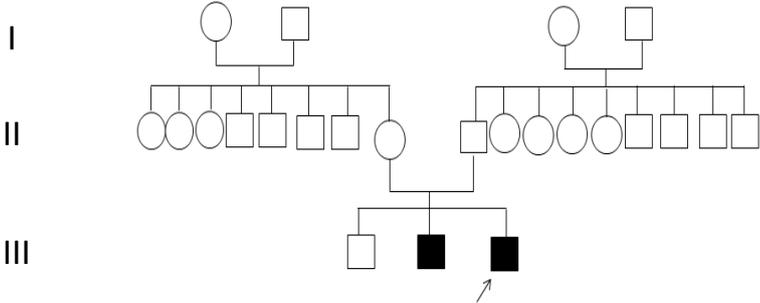
N°14



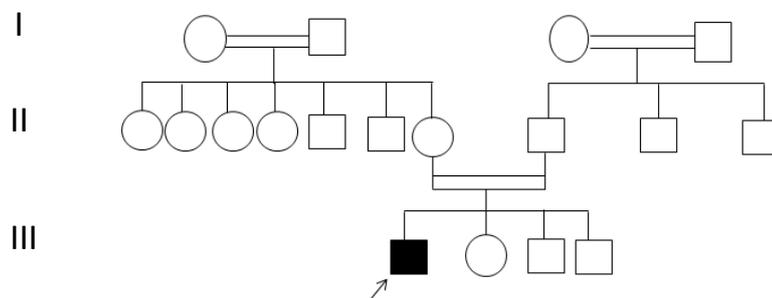
N°18



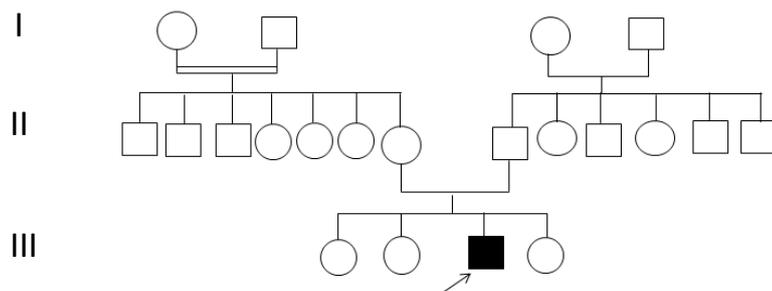
N°19



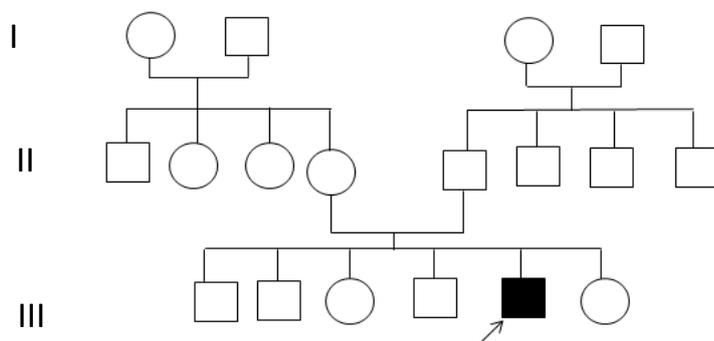
N°20



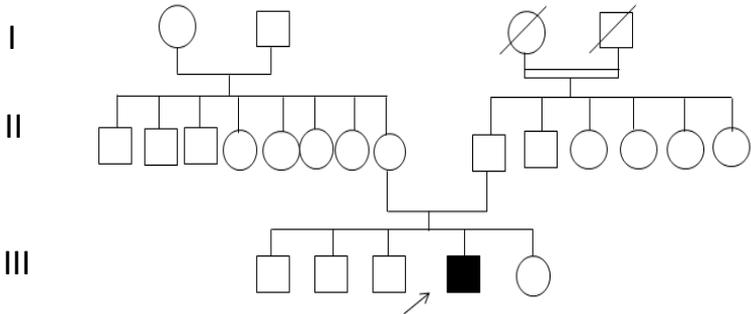
N°24



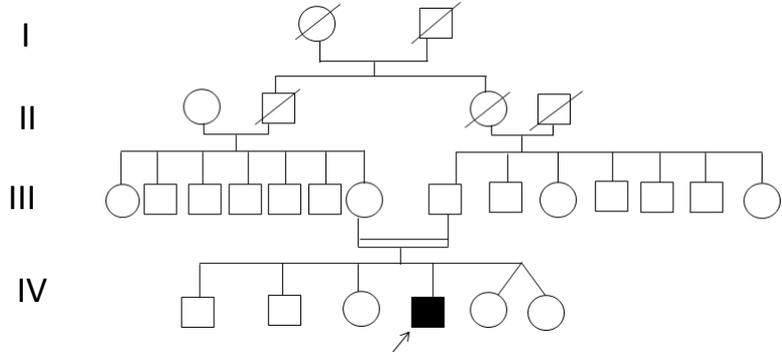
N°25



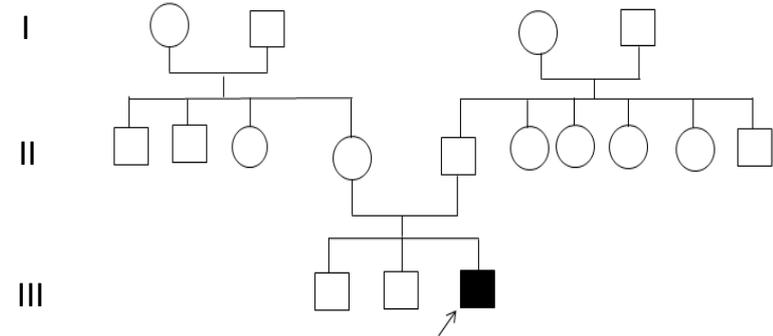
N°28



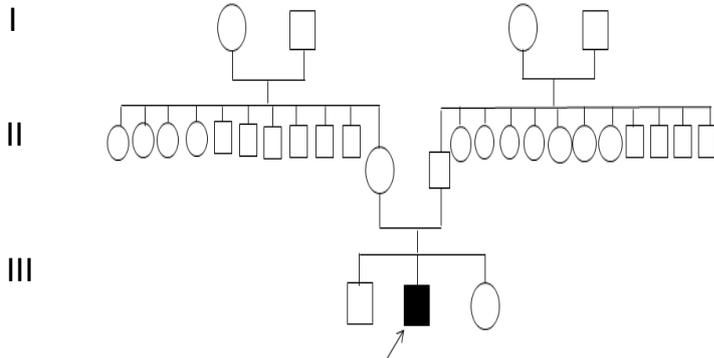
N°29



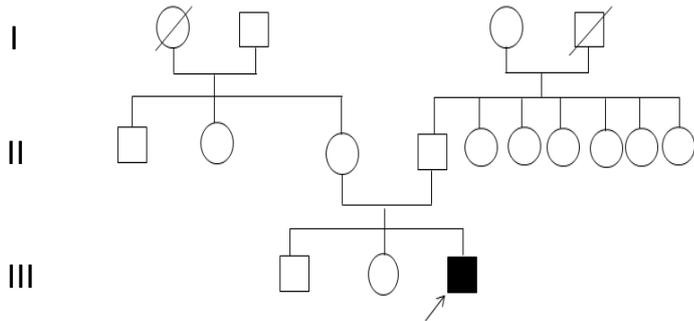
N°38



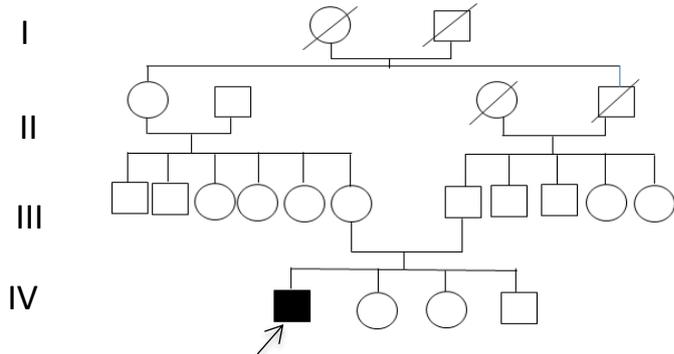
N°49



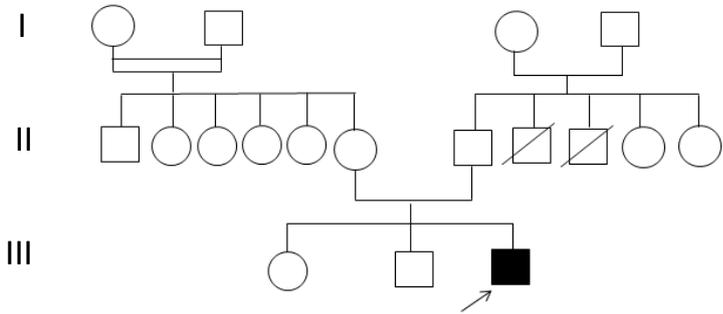
N°50



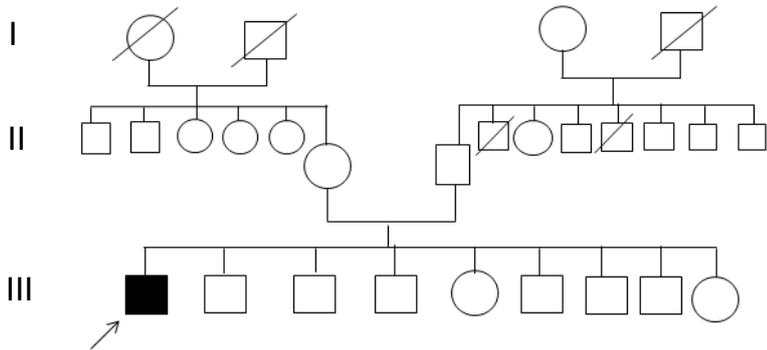
N°53



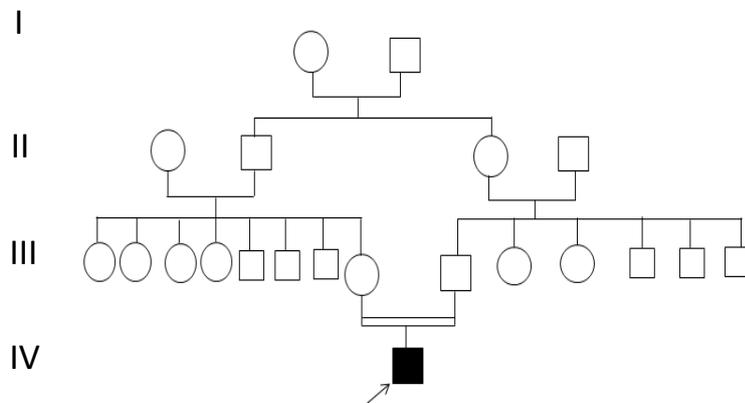
N°56



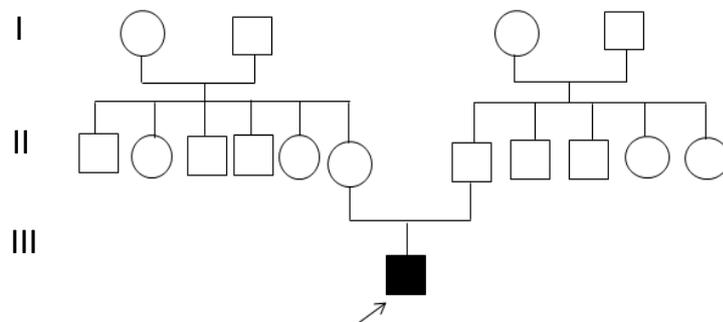
N°58

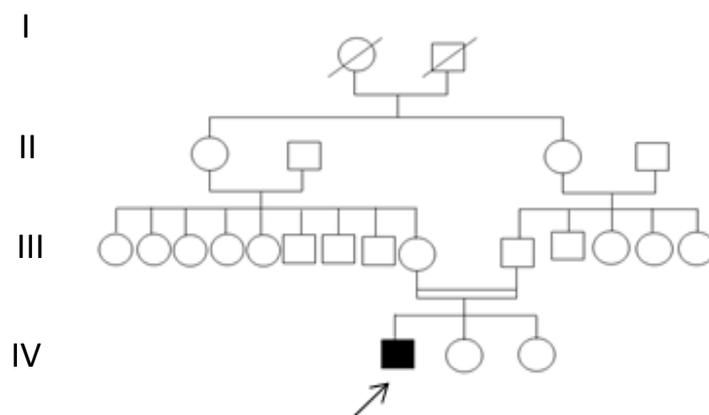
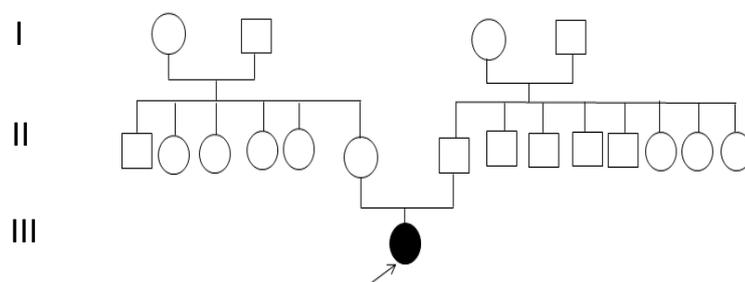
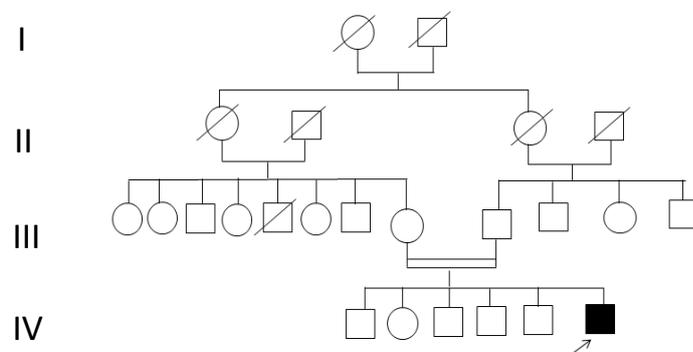


N°22

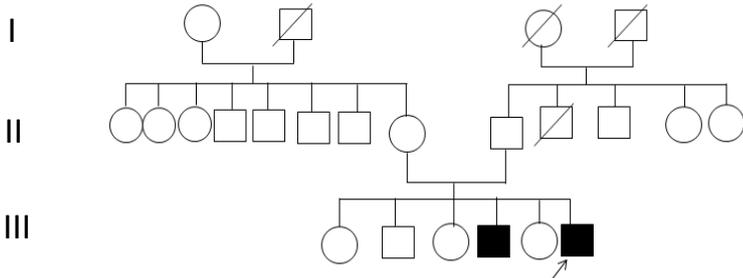


N°63

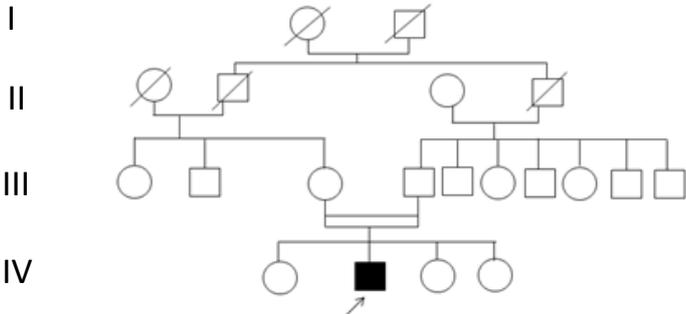


Familles non diagnostiquées :**N°32****N°34****N°36**

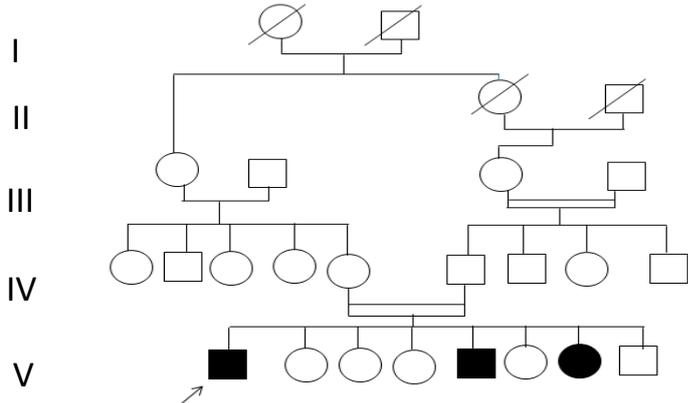
N°37



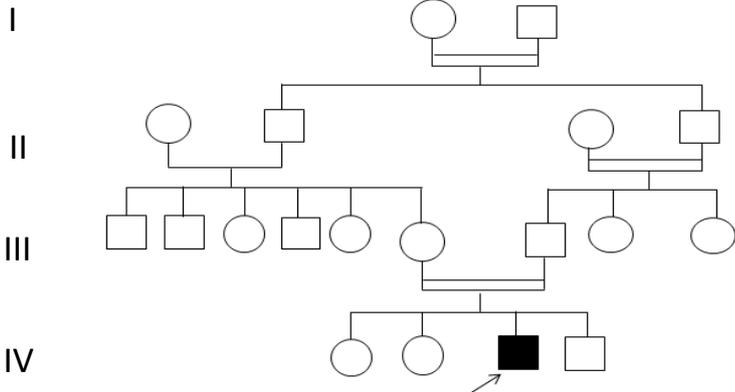
N°60



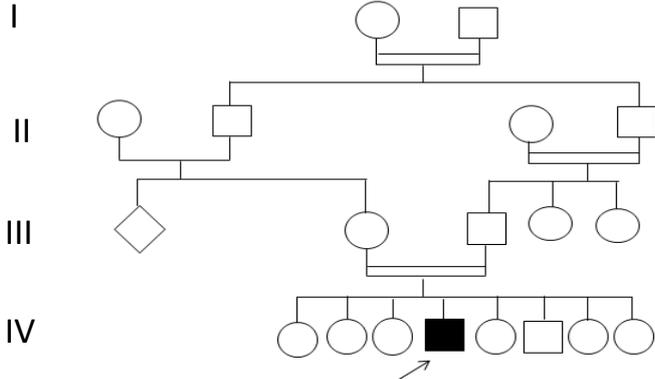
N°2



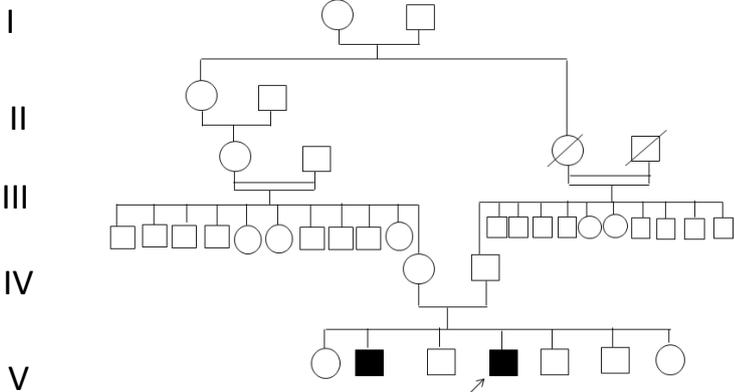
N°3



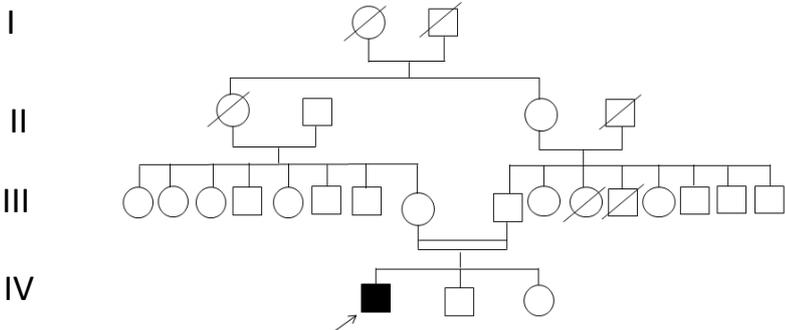
N°6



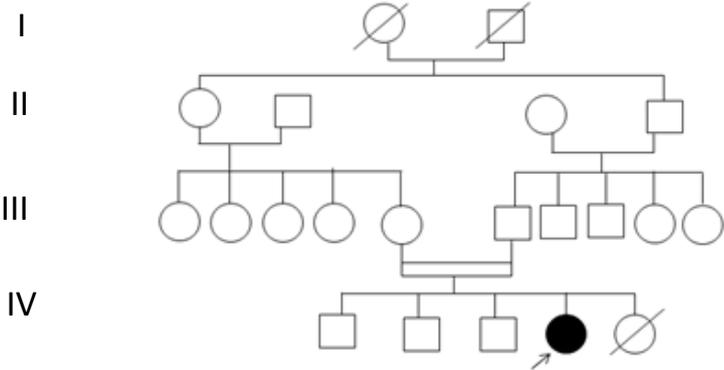
N°7



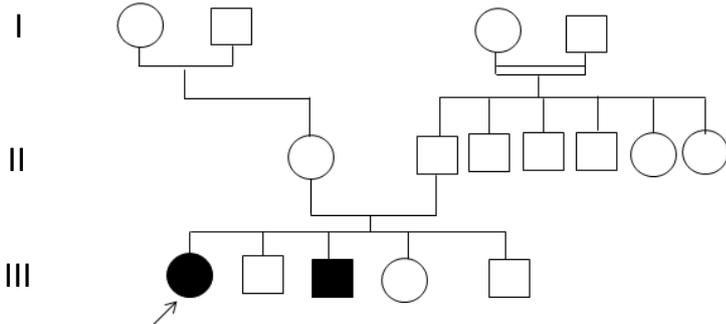
N°13



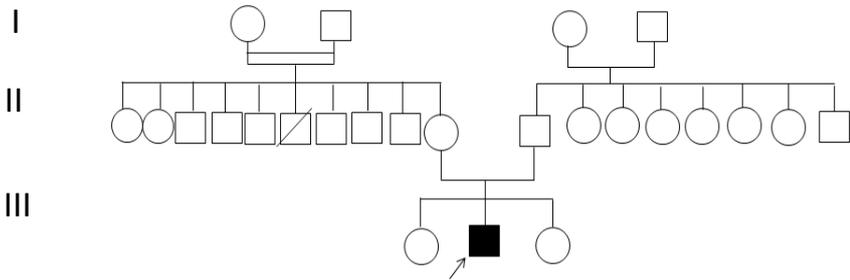
N°12



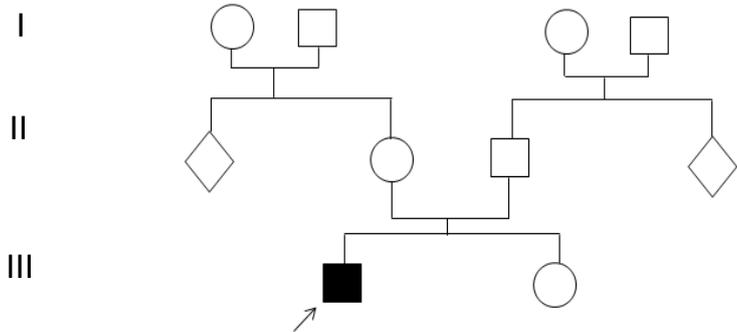
N°15



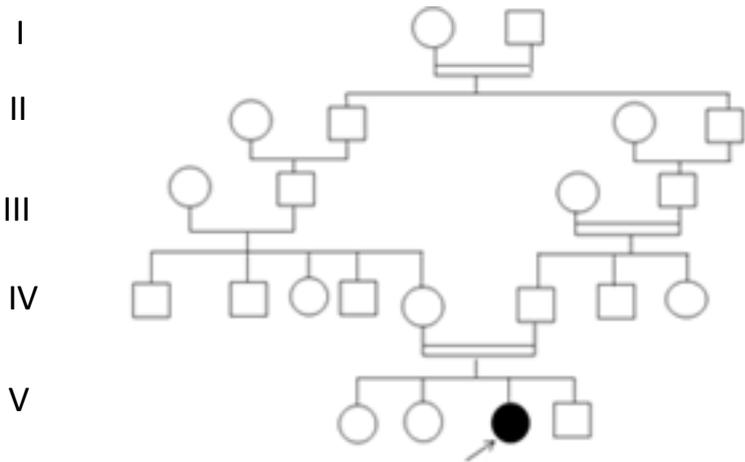
N°16



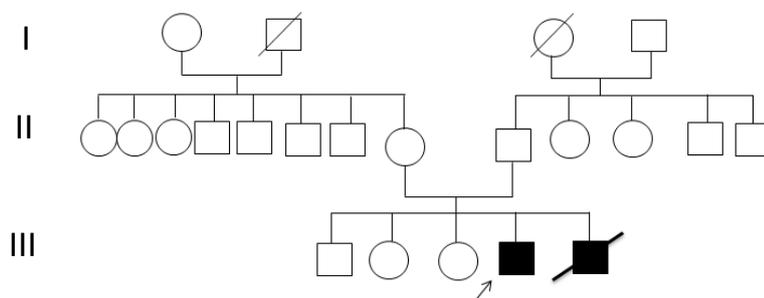
N°17



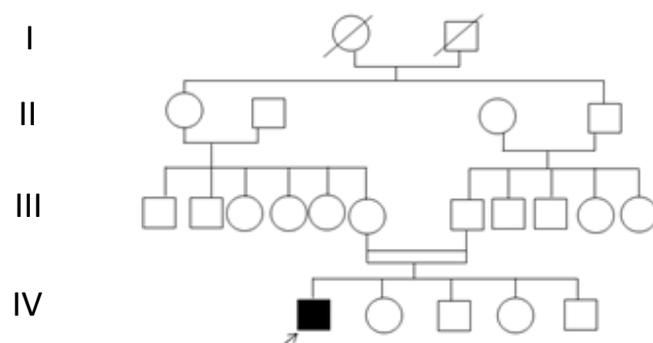
N°21



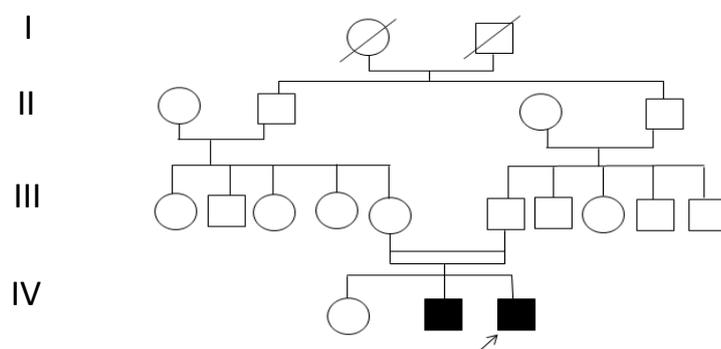
N°26



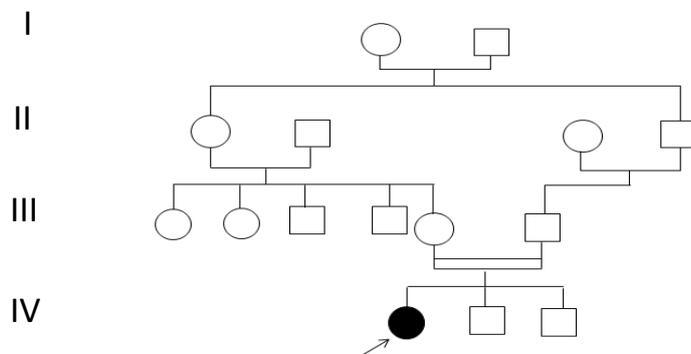
N°27



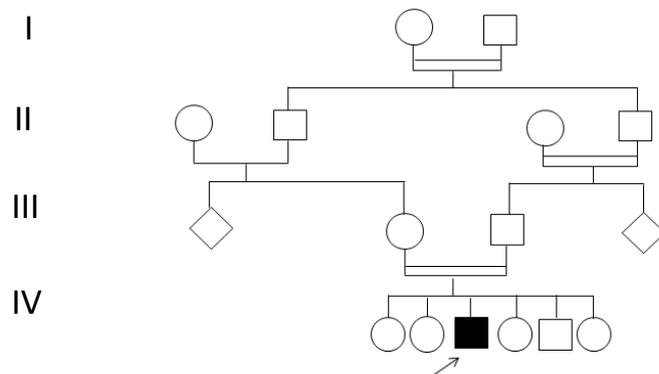
N°31



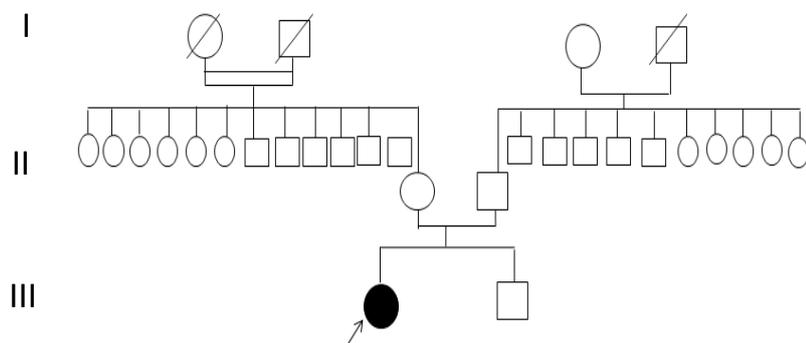
N°33



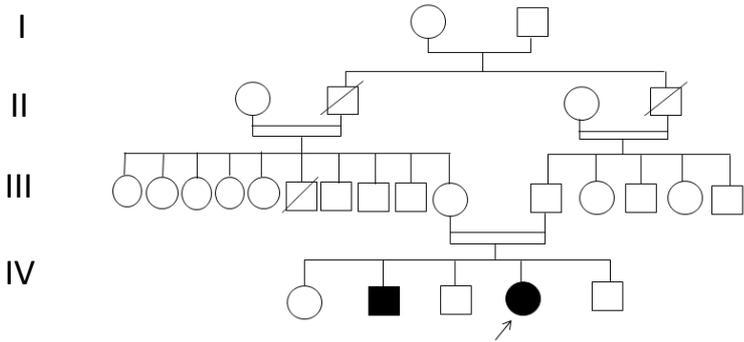
N°53



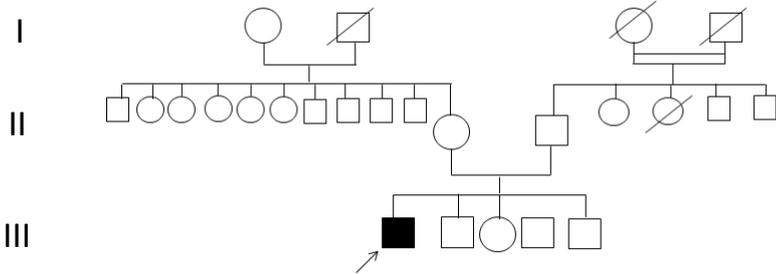
N°54



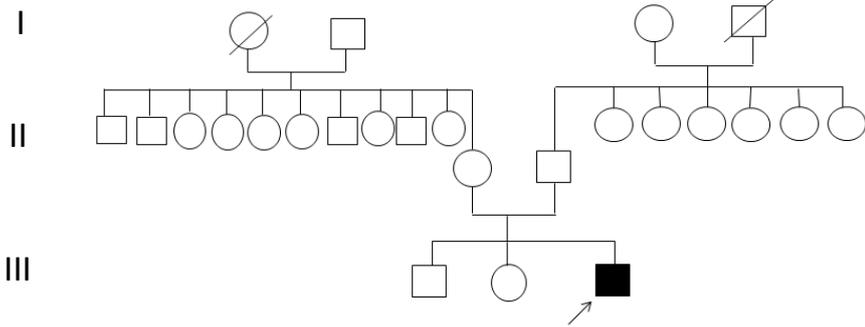
N°45



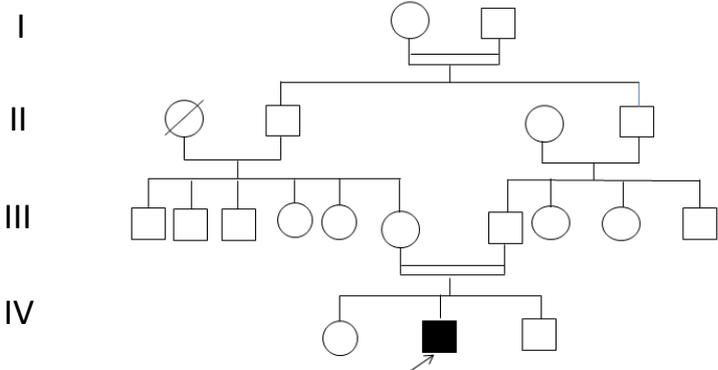
N°46



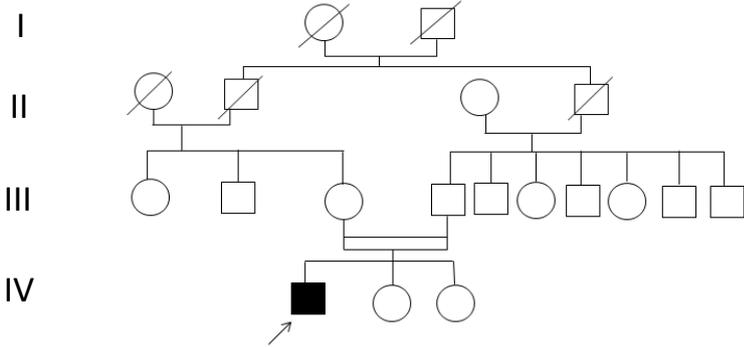
N°51



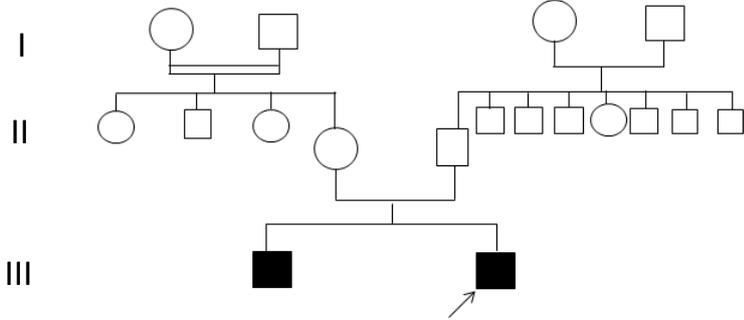
N°57



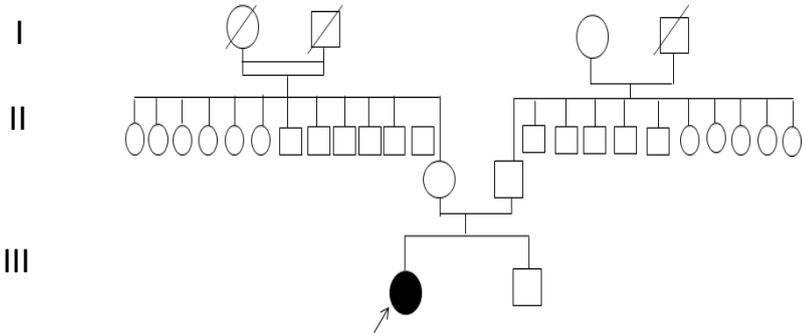
N°59



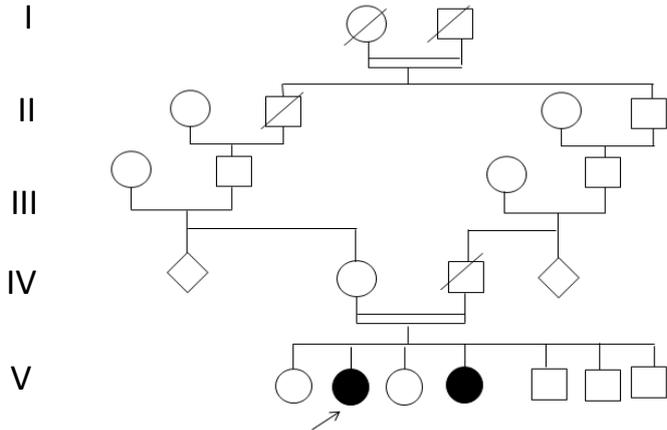
N°62



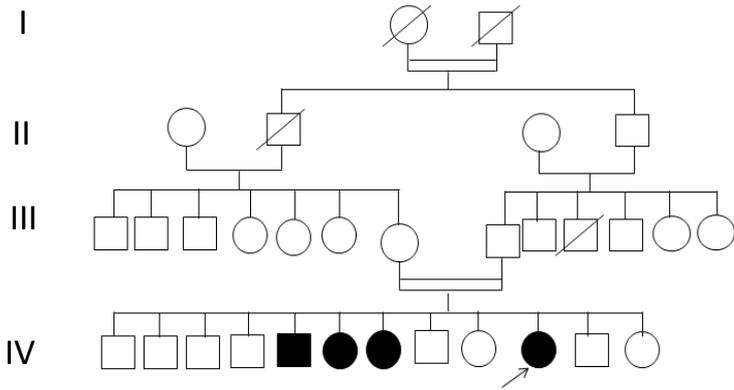
N°54



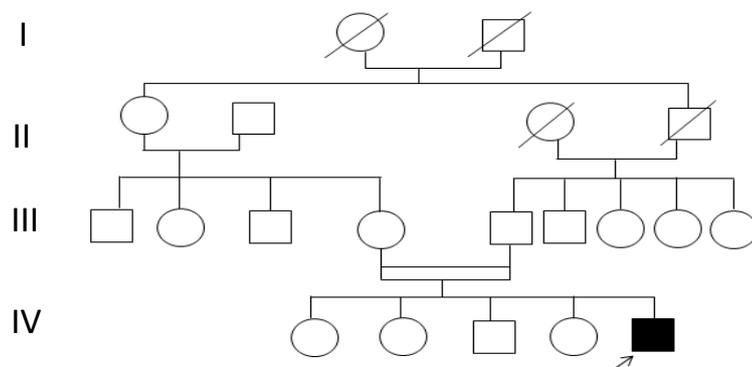
N°35



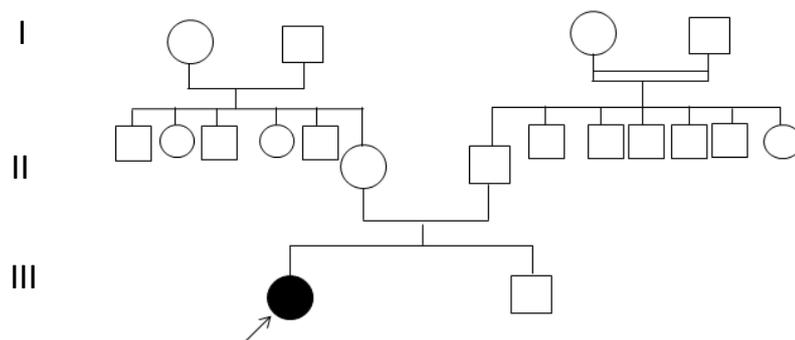
N°30



N°55



N°43



Annexe. 3 : Consentement éclairé.**Centre hospitalier Universitaire BenBadis de Constantine****Laboratoire de biologie et génétique moléculaire****Laboratoire de biochimie**

<u>Identification du patient</u>	N° du prélèvement :
Nom : Prénom :	Adresse :
Date de naissance :	Tel :

CONSENTEMENT :

Je soussigné(e), sus nommé, reconnais avoir été informé(e) par lesur les examens des caractéristiques génétiques qui seront réalisées, dans un but de diagnostic et/ou de recherche, à partir :

- A visée diagnostic
- Du prélèvement qui m'a été effectué A visée de recherche

Pour :

.....

Je donne mon consentement pour ce prélèvement et je reconnais avoir reçu l'ensemble des informations permettant la compréhension de cet acte biologique et sa finalité.

Fait à, le Signature

ATTESTATION

Je certifie avoir informé le(ou la) patient(e) sus nommé(e) sur les caractéristiques de la maladie recherchée, les moyens de la détecter, les possibilités de prévention et de traitement et avoir recueilli le consentement du(ou de la) patient(e)	Signature et cachet
--	---------------------

Le médecin prescripteur doit conserver le consentement écrit, les doubles de la prescription et les comptes rendus d'analyses de biologie médicale commentés et signés.

Annexes. 4 : Questionnaire LGMD2C.**Service de neurologie CHU****De Constantine****Pr :HAMRIA****Questionnaire LGMD2C :****Pr. SIFI**

Date :

Numéro de dossier :

Nom :

Prénom :

Sexe :

Age actuel :

Date de naissance :

Téléphone :

Adresse :

Propositus :

oui non

Diagnostic :

Motif de consultation :

ATCDS :

Mariage consanguin :

oui non

Nombre de cas similaire :

DPM :

Age du début :

Signe du début :

Résultats de l'examen clinique :

Ptosis

oui non

Déficit musculaire :

Son intensité :

Sa Topographie :

Muscles de la face :	oui	<input type="checkbox"/>	non	<input type="checkbox"/>
Déficit moteur proximal M<	oui	<input type="checkbox"/>	non	<input type="checkbox"/>
Déficit moteur proximal M>	oui	<input type="checkbox"/>	non	<input type="checkbox"/>
Déficit moteur proximal distal M<	oui	<input type="checkbox"/>	non	<input type="checkbox"/>
Déficit moteur proximal distal M>	oui	<input type="checkbox"/>	non	<input type="checkbox"/>

Etat du quadriceps :

Amyotrophie :

Topographie :

Hypertrophie musculaire :

Des mollets :

De l'ensemble des muscles :

ROT :

Rotuliens	<input type="checkbox"/>
Bicipitataux	<input type="checkbox"/>

Achilléens

Stylo radiaux

Macroglossie :	oui	<input type="checkbox"/>	non	<input type="checkbox"/>
Rigide spine :	oui	<input type="checkbox"/>	non	<input type="checkbox"/>

Rétractions de membres :

Scoliose :

Age de la perte de la marche :

Résultats de l'examen complémentaire :

CPK

LDH

EMG

Biopsie musculaire :

Résultat de l'étude génétique :

Avis cardiologue :

Date :

Résultats :

Age d'apparition :

EFR :

Date :

Résultat :

Age d'apparition :

Etablir un arbre généalogique :

PUBLICATIONS

