

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie

N° d'ordre.....

N° de série.....

Mémoire

Présenté pour obtenir le Diplôme de Magister

Spécialité : Génétique moléculaire

Par : BENSEGHIER Salima

Thème

*Diagnostic moléculaire des dystrophinopathies
(étude phénotypique et génotypique)*

Soutenu-le : 26/09/2006

Devant le jury :

M^{elle} BENLATRECHE C.	Prof. C. H. U. de Constantine	Président
M^f ABADI N.	Prof. C. H. U. de Constantine	Rapporteur
M^f HAMRI A.	Prof. C. H. U. de Constantine	Examineur
M^mc SATTI D.	Prof. Université de Constantine	Examineur

Année Universitaire : 2005/2006

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à la mémoire de mon frère : MOULOUD

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Mes très chers parents Mohamed et Yamina qui se sont dévoués corps et âmes pour me voir réussir dans ma vie que dieu les garde,

Mes frères Samir et Tahar,

Mes sœurs Assia, Hayet, Soumia, Amira,

Ma sœur Mounira et son mari Rachid,

Ma nièce Amina,

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

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à exprimer mes profonds remerciements à monsieur le professeur ABADI Nouredine, mon promoteur, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Merci pour les précieux conseils scientifiques, pour m'avoir appris de nombreuses expériences, son aide sans limite, sa générosité et sa disponibilité, et surtout sa patience pendant la rédaction de ce travail.

Je remercie le professeur BENLATRECHE Cherifa, Professeur au C. H. U. de Constantine, de me faire l'honneur de présider ce jury.

Merci aux membres du jury, le Professeur HAMRI Abdelmadjid, Professeur au C. H. U. de Constantine et le Professeur SATTA Dalila, Professeur à l'Université de Constantine.

Je tiens à exprimer mes profonds remerciements à docteur SIFI Karima pour ses conseils, son aide et sa générosité.

Je voudrais ensuite remercier docteur SIFI Yamina pour sa disponibilité, sa gentillesse et son aide.

Un grand merci à tous mes enseignants de l'Université Mentouri de Constantine en particulier Madame NAIMI, Monsieur et Madame ROUABAH et Monsieur BENGUEDOUAR.

Je remercie également mes amis, mes collègues en particulier : Sana, Hadia, Razika, Sana, Mourad et Larbi pour les inoubliables moments pour leurs encouragements et leur soutien moral.

Je remercie aussi tous les membres de mon laboratoire pour leurs conseils, leur soutien et la chaleur familiale avec laquelle ils m'ont entouré, en particulier : Docteurs HANNACHI S., BENMEBAREK K. et BENACHOUR N., Manel, Abla, Zoubida, Yasmina, Messaouda, Akila.

Enfin, j'adresse mes remerciements à tous mes amis à JIJEL.

Sommaire

Introduction.....	1
<i>Revue Bibliographique</i>	
I- Les dystrophies musculaire de Duchenne et Becker.....	3
I-1- Historique.....	3
I-2- Cadre nosologique.....	3
I-3- Clinique des dystrophies musculaire de Duchenne et Becker.....	4
I-3-1- Phénotype Duchenne.....	4
I-3-1- Phénotype Becker et intermédiaires.....	5
I-4- Diagnostic	6
I-4-1- Biochimiques.....	7
I-4-2- Electromyographiques.....	8
I-4-3- Technique d'imagerie médicale.....	8
I-4-4- Histologiques.....	8
I-4-5- Moléculaire.....	10
I-4-5-1- Délétions et duplications	10
I-4-5-2- Mutations ponctuelles	10
I-5- Diagnostic différentiel.....	11
II- Le gène de la dystrophine.....	12
II-1- Les stratégies de clonage et les premiers sondes intragéniques.....	12
II-2- Localisation du gène de la dystrophine.....	13
II-3- Structure et organisation du gène de la dystrophine.....	17
III- La dystrophine.....	18
III- 1- Localisation de la dystrophine.....	18
III-2- Structure de la dystrophine.....	18
III-3- Isoformes de la dystrophine.....	20
III-3-1- Isoformes longues de 427 kD.....	20

III-3-2- Isoformes de plus faible poids moléculaire.....	20
III-4- Epissages alternatifs du gène de la dystrophine.....	21
III-5- Rôle de la dystrophine.....	22
III-5-1- Les hypothèses d'un rôle structural.....	22
III-5-1-1- Maintien de la stabilité membranaire.....	22
III-5-1-2- Fonctions particulières dans des zones spécialisées.....	23
III-5-2- Les hypothèses d'un rôle métabolique (un rôle dans métabolisme calcique ?).....	23
III-6- Le complexe dystrophine, glycoprotéique et protéines associées.....	23
III-7- Dysfonctionnement de la dystrophine et le complexe protéique associé	24
IV- Pathologie moléculaire du gène de la dystrophine.....	26
IV-1- Un seul gène pour deux maladies.....	26
IV-2- Les mutations responsables de l'apparition des dystrophinopathies.....	26
IV-2-1- Les délétions.....	27
IV-2-2- Les duplications.....	28
IV-2-3- Les mutations ponctuelles.....	28
IV-2-4- Les autres types mutationnelles.....	28
V- Corrélation entre le génotype et le phénotype dans les dystrophinopathies.....	29
VI- Les dystrophinopathies et gémellités.....	32
VII- Conseil génétique et diagnostique prénatal.....	33
VII-1- Etude familiale et arbre généalogique.....	33
VII-2- Analyse de l'ADN chez les femmes à risque.....	33
VII-3- Diagnostique des femmes transmettrices.....	34
VII-3- 1- Diagnostique femmes transmettrices symptomatiques.....	34
VII-3- 2- Diagnostique des transmettrices asymptomatiques.....	35
VII-4- Diagnostique prénatal.....	36
VIII- Intérêt des modèles animaux.....	38
VIII-1- La souris mdx.....	38

VIII-2- Le chien Golden Retriever.....	39
VIII-3- Le modèle félin.....	39
VIII-4- Autres modèles animales.....	40
IX- Possibilité thérapeutique.....	41
IX-1- La thérapie médicamenteuse.....	41
IX-2- La thérapie cellulaire.....	42
IX-2-1-Transplantation de myoblastes normaux.....	42
IX-2-2- Thérapie par l'utilisation de cellules souches.....	43
IX-3- La thérapie génique.....	43
<i>Partie Pratique</i>	
Méthodologie	
I- Patients.....	48
II- Méthodes.....	50
II-1- L'enquête familiale.....	50
II-2- Les examens complémentaires.....	50
II-3- L'analyse moléculaire.....	50
Résultats	
I- Dosage des CPK.....	52
II- Répartition des dystrophinopathies en fonction de la perte de l'autonomie de marche et du caractère sporadique ou familial.....	52
III- Recherche des signes associés.....	55
IV- Immunohistochimie.....	55
V- Analyse de l'ADN par PCR multiplex.....	55
VI- Localisation des délétions dans le recrutement de malades.....	61
VII- La recherche de corrélation entre la taille de délétion et le phénotype clinique.....	61
Discussion.....	63
Conclusion.....	69
Références bibliographiques.....	71
Annexes	

Abréviations

AAV	Adeno Associated Virus
AD	Autosomique Dominante
AR	Autosomique Récessive
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
ADP	Adénsine DiPhosphate
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ATP	Adénsine TriPhosphate
BMD	Dystrophies Musculaires de Becker
CAH	Hypoplasie Congénitale des surrénales
CMT	Charcot Marie Tooth
CPK	Créatine PhosphoKinase
CPTII	Carnitine Palmitoyl Transférase de type II
Db	Dystrobrevine
DGGE	Direct Gradient Gel Electrophoresis
DMD	Dystrophies Musculaires de Duchenne
DMOP	Dystrophie musculaire oculopharyngée
DMED	Dystrophie Musculaire d'Emery-Dreifuss
DMSO	Dimethyle Sulfoxyde
DO	Densité Optique
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétracétique.
eGFP	enhanced Green Fluorescent Protein
ECG	Electrocardiogramme
EMG	Electromyographie
FKRP	Fukutin-Related Protein

FOP	Fibrodysplasie Ossifiante Progressive
FSH	Dystrophie musculaire Facio-Scapulo-Humérale
GKD	Glycérolkinase
GRMD	Golden Retriever Muscular Dystrophy
HLA	Human Leukocyte Antigen
LDH	Lactate déshydrogénase
LGMD	Limb-Girdle Muscular Dystrophy
HPRT	Hypoxanthine phosphorybosyl transférase
HTF	HplI Tiny Fragment
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
kb	kilobase
kDa	kiloDalton
MAPH	Multiplex amplification and Probe Hybridization
MAST205	Microtubule Associated Serine/Threonine kinase 205 Kd
MEB	Muscle-Eye-Brain
mdx	muscular dystrophy X-linked
MLPA	Multiplex Ligation dependent Probe Amplification
NOs	Nitric Oxyde synthase
pb	paire de base
PCR	Polymerase Chain Reaction
P_M	Promoteur Musculaire
P_P	promoteur des cellules de Purkije
PTT	Protein Truncation Test
QI	Quotient Intellectuel
RACH	Récepteur de l' Acétylcholine
RT-PCR	Real Time-PCR

SCARMMD	Severe Childhood Autosomal Recessive Muscular Dystrophy
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SH	Src Homology Domains
SMA	Spinal Muscular Amyotrophy
SP	Sarcospan
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
SYN	Syntrophine
TBE	Tris Buffered EDTA
TE	Tris EDTA
XLDC	Linked Dilated cardiomyopathie
XR	Récessive liée à X
YAC	Yeast Artificial Chromosome

Introduction

Par le terme de la dystrophie musculaire on définit un ensemble d'affection souvent à transmission héréditaire qui touchent de manière primitive les muscles squelettiques, cardiaques et lisses.

Avant l'ère de la biologie moléculaire, ces maladies ont été classées selon la présentation clinique et le mode de transmission.

Les dystrophinopathies représentées essentiellement par la dystrophie musculaire de Duchenne de Boulogne (DMD) et de Becker (BMD), constituent la cause la plus fréquente des myopathies de l'enfant de sexe masculin.

La DMD est la plus grave et la plus fréquente des myopathies de l'enfant (1/3500 nouveau-nés masculins), entraînant un lourd handicap. A côté de cette forme très sévère, La BMD (10 fois moindre que la DMD) est une forme à évolution plus tardive et plus lente, elle devient invalidante au cours de la vie adulte et n'empêche pas la procréation et une certaine vie socioprofessionnelle.

La DMD et la BMD se caractérisent par une dégénérescence lente des fibres musculaires

Le diagnostic est basé sur l'âge de début qui est toujours avant 3 ans chez les DMD et plus tardif chez les BMD (entre 5 et 15 ans). Les signes de début sont des difficultés à courir ou à monter les escaliers, des chutes fréquentes, une hypertrophie des mollets.

Déficit musculaire est prédominant à la racine des membres inférieurs

Le signe de Gowers est présent à partir de l'âge de 5 ans

L'évolution de la maladie se traduit par une perte de la marche avant 13 ans chez les DMD et après 16 chez les BMD, des déformations rachidiennes, une insuffisance respiratoire et cardiaque et un retard mental (30%)

Le décès est avant 25 ans chez les DMD et après 30 ans chez les BMD.

Ces deux affections se transmettent sur le mode gonosomique récessif et sont consécutives à des mutations affectant le gène de la dystrophine localisé en Xp21. Ce gène s'étend sur environ 2,4 Mb, sa région codante est répartie en 79 exons, transcrite en un ARN messager

de 14kb codant pour une protéine impliquée dans l'ancrage des protéines du sarcolemme aux protéines cytosquelettiques de 427 kDa composée de 3685 acides aminés.

Le gène de la dystrophine est l'objet de mutations variables classées en deux catégories:

- Les grands réarrangements par délétions ou par duplications (2/3)
- Les mutations ponctuelles (1/3).

Si l'expression clinique des dystrophinopathies et leur profil évolutif sont souvent évocateurs, leur identification sur des bases moléculaires demeure indispensable à un diagnostic précis et à une meilleure prise en charge (conseil génétique, diagnostic prénatal).

L'étude des dystrophinopathies portera sur l'exploration du gène de la dystrophine sur des patients admis au C. H. U. de Constantine, en cherchant en priorité les macrodélétions les plus fréquentes (représentent deux tiers des cas) par la technique PCR multiplex. Elle permet d'amplifier et d'examiner les 19 exons figurant dans les points chauds de mutation en deux réactions. Cette technique permettant de détecter 98% des macrodélétions retrouvées dans 2/3 des cas des DMD et BMD.

Dans ce contexte, les objectifs de ce travail étaient de :

- Rechercher les grands réarrangements chromosomiques en particulier les macrodélétions au sein du gène de la dystrophine par PCR multiplex,
- Déterminer la fréquence, la localisation et la taille de ces macrodélétions,
- Rechercher certaines corrélations entre l'anomalie moléculaire et le phénotype clinique.

Revue bibliographique

I- Les dystrophies de Duchenne et Becker :

Les dystrophies musculaires, désignent un ensemble d'affections musculaires à transmission héréditaire.

La dystrophie musculaire de Duchenne de Boulogne (DMD) décrite en 1868 (Duchenne, 1868) ainsi que sa forme moins sévère rapportée par Becker (BMD) en 1955 (Becker et Kiener, 1955), se caractérisent par un début durant l'enfance ou l'adolescence et une transmission récessive, liée au chromosome X (Gowers, 1879).

I-1- Historique :

Cette maladie est décrite en 1868 par Duchenne de Boulogne (ou Guillaume Benjamin Amand Duchenne, 1806-1875). Bien que, William Little (1810-1894) et Edward Meyron (1807-1880) l'aient caractérisée avant cette date (Camirand, 2004). Duchenne, en 1868, découvrit que ce trouble était relié aux muscles. Il proposa alors des critères diagnostiques basés sur des observations anatomiques et des stimulations électriques. Il décrivit aussi le remplacement du tissu musculaire par le tissu fibreux ou conjonctif aux biopsies musculaires. Finalement, il observa que l'hydrothérapie et des massages accompagnés de stimulations électriques pouvaient améliorer la condition des patients pendant les phases initiales du développement de la maladie. C'est ainsi que ses travaux plus poussés lui ont valu l'attribution de son nom à cette myopathie (Camirand, 2004).

En 1886, Gowers observa que les cas isolés de dystrophie étaient plus rares que les cas familiaux avec des antécédents du côté de la mère. Il observa même qu'une femme pouvait avoir des enfants dystrophiques dont les pères étaient différents. Il décrivit aussi la manière que ces enfants se levaient d'une position couchée jusqu'à se mettre debout (**annexe 1**) (Dunant, 2003). Son nom a été attribué à cette manoeuvre.

I-2- Cadre nosologique :

Les mesures électrophysiologiques, les données histologiques, les caractéristiques génétiques ou les données de la biologie moléculaire ont permis de parfaire la classification des maladies neuromusculaires. Ces maladies portent donc souvent plusieurs appellations : la maladie de Werdnig-Hoffmann est aussi dite «amyotrophie spinale infantile» ; la maladie de Steinert «dystrophie myotonique», etc.... La classification résulte donc aujourd'hui de plus d'un siècle de découvertes médicales. Les progrès technologiques continuent, et la classification est toujours en évolution (**annexe 2**). Mais l'observation attentive permet peu à

peu d'établir recoupements et différences selon l'âge de début de la maladie, la localisation de la faiblesse musculaire et son évolution.

I-3- Clinique des dystrophies musculaire de Duchenne et Becker :

L'évolution progressive et inexorable de la DMD et de la BMD suit de façon schématique deux périodes : la première décennie pendant laquelle la marche est conservée et la seconde au cours de laquelle la station debout est impossible, et qui se termine par la mort (Serratrice *et al.*, 1997).

La définition du phénotype ne fait pas appel à la connaissance du génotype, auquel il n'est qu'incomplètement corrélé. Le phénotype est divisé en deux catégories :

- l'âge de la perte d'indépendance locomotrice : avant 13 ans pour la DMD, entre 13 et 16 pour les phénotypes intermédiaires, après 16 ans pour la BMD ;
- et la quantité de dystrophine détectable dans le muscle par Western-Blot : moins de 3% de la quantité normale de dystrophine dans la DMD, 3 à 20% dans les phénotypes intermédiaires, et plus de 20% de la quantité normale de la dystrophine dans la BMD. Ce deuxième critère permet de définir le phénotype d'un individu dystrophinopathe âgé de moins de 16 ans (Hoffman *et al.*, 1989).

Le phénotype Duchenne ne présente pas de variation individuelle majeure probablement parce que, chez tous les patients, aucune dystrophine fonctionnelle n'est présente dans le muscle. Par contre le phénotype Becker est très variable car la dystrophine est de taille, de stabilité et de capacité fonctionnelle différente en fonction des individus.

I-3-1- Phénotype Duchenne :

Le caractère pathologique de la dystrophie musculaire de Duchenne se traduit par une dégénérescence progressive du tissu musculaire. Durant la première année de vie, les nourrissons ne présentent pas de symptômes évidents, mis à part un léger retard de croissance. Durant leur tendre enfance, les malades ne présentent que rarement des symptômes, même si certains signes cliniques démontrent que le processus dégénératif est déjà amorcé haut taux de créatine phosphokinase (CPK) sérique et nécrose des fibres musculaires (Prelle *et al.*, 1992). Les premiers signes se traduisent par une stature plus courte, une difficulté à courir ou à monter les escaliers, des chutes fréquentes et une hypertrophie des mollets (Brooke *et al.*, 1981 ; Marques, 2004). Le signe de Gowers, très évocateur, est présent à partir de l'âge de 5

ans et se manifeste par l'utilisation des mains en appui sur les genoux et les cuisses pour obtenir la station debout (Blake *et al.*, 2002).

La dégénérescence affecte les muscles proximaux, plus que les muscles distaux, ainsi que les muscles des membres inférieurs et dorsaux, plus que les muscles des membres supérieurs. La régression de la force musculaire est constante et presque de manière linéaire entre l'âge de 6 et 11 ans, avec une prépondérance pour les muscles proximaux (Camirand, 2004).

Le décès des patients, causé par l'affaiblissement des muscles respiratoires, survient par rétention du monoxyde de carbone et anoxémie accompagnées d'une infection respiratoire (Mukoyama *et al.*, 1987).

L'atteinte simultanée des muscles squelettiques et cardiaques n'est pas rare, entre 65% et 95% des cas après 21 ans (Angelini *et al.*, 1996).

Deux types de symptômes cardiaques peuvent exister en phase d'état. Les premiers sont liés à une dilatation du ventricule gauche : anomalie morphologique du tracé électrocardiographique, trouble du rythme cardiaque et trouble de la conduction (Bonne *et al.*, 1998), dilatation du ventricule gauche avec réduction de la fraction d'éjection, corrélées avec l'âge (cardiopathies progressives) et présentant une valeur pronostique (Bonne *et al.*, 1998).

Les secondes plus rare sont liés à une cardiomyopathie dilatée responsable avant 20 ans d'une insuffisance congestive fatale (Towbin, 1998).

30 % des patients environ présentent un retard mental, objectivé par un quotient intellectuel moyen de 80 (Boyce *et al.*, 1991).

Certains signes relevant d'un trouble musculaire lisse digestif sont également reportés (dysphasique, vomissement, constipation chronique, dilatations gastriques aiguës) (Camirand, 2004).

I-3-2- Phénotypes Becker et intermédiaires :

La distinction des phénotypes «Duchenne» et «Becker» est basée sur l'âge de la perte d'indépendance de la marche. Les phénotypes intermédiaires, avec une perte de la locomotion entre 13 et 16 ans peuvent être classés aussi comme une «maladie de Becker sévère» ou une «maladie de Duchenne modérée» (Dubowitz, 1992).

La dystrophie musculaire de Becker est caractérisée par un grand polymorphisme clinique, l'incapacité locomotrice pouvant survenir tôt dans l'adolescence ou ne jamais se

manifester, parfois les seuls signes cliniques sont des crampes et douleurs musculaires (Hofmann, 1993).

Les signes les plus constants de BMD sont une élévation des taux de créatine kinase sérique et une hypertrophie précoce des muscles des mollets (Emery et Skinner, 1976).

La plus préoccupante des complications pouvant survenir au cours de la dystrophie musculaire de Becker est une cardiomyopathie (Perloff *et al.*, 1992), très proche de celle du phénotype Duchenne. Un phénotype particulier est la «cardiomyopathie dilatée liée à l’X» ou XLDC (X-Linked Dilated cardiomyopathie) phénotype restreint soit associé à un phénotype Becker léger (Van Bogaert, 2005).

L’atteinte myocardique isolée s’observe lorsque la mutation du gène DMD (de type Becker) entraîne la dissociation du complexe protéique associé à la dystrophine dans le myocarde mais pas dans le muscle squelettique (Franz *et al.*, 2000).

La BMD peut parfois être restreinte à une symptomatologie neuropsychiatrique, c’est-à-dire à un retard mental (QI inférieur à 80), les lésions musculaires ne s’exprimant cliniquement que par une élévation de la créatine kinase sérique (Nudel *et al.*, 1989).

I-4- Diagnostic :

Le premier diagnostic est souvent associé aux premiers signes cliniques, ou bien il est la conséquence d’un dépistage intervenu chez un enfant à risque.

Ainsi le diagnostic est fait rarement avant l’apparition des premiers signes cliniques. Lors de l’apparition de ces premiers signes cliniques différents tests sont entrepris pour confirmer ou non si l’enfant est affectivement atteint.

On recherche ici contrairement au dépistage, non pas si l’enfant sera atteint par la maladie ou bien s’il est (dans le cas d’une fille) porteur de la maladie, mais si le diagnostic apporté par l’analyse du phénotype macroscopique et les autres signes cliniques est confirmé ou non par l’observation du phénotype biologique (dosage d’enzyme), cellulaire (analyse de la structure des cellules musculaires), moléculaire (étude des anomalies du gène) ou par d’autres types d’analyses (électromyogramme, imagerie musculaire).

Les principaux tests pratiqués à cet effet sont :

I-4-1- Biochimiques :

Des lésions musculaires importantes provoquent le plus souvent un relargage dans le sang de certaines enzymes, principalement la créatine phosphokinase (CPK), pyruvate kinase, lactico-déshydrogénase, aldolase anhydase carbonique (Ghozlane, 2001) dont le dosage sérique révèle une augmentation dans la dystrophie musculaire de Duchenne et de Becker comme dans toute souffrance musculaire, une mention toute particulière doit être portée à l'isoenzyme M de la créatine phosphokinase (CPK) dont l'augmentation explosive est caractéristique de cette dystrophie (**annexe 3**).

Elle reflète l'état du muscle. Quand le muscle est abîmé, il libère des CPK et le taux de ces enzymes est donc très fortement augmenté dans le sang. Son augmentation en cas de DMD est présente dès la naissance, de l'ordre de 20 à 50 fois le taux normale a cet âge de la vie ce qui permet un dépistage néonatal de cette affection (Shield, 2003). L'activité enzymatique croît ensuite considérablement pendant la première année de la vie pour atteindre entre 1 et 5 ans une activité 100 à 300 fois supérieure à la normale du même âge. Ce taux diminuera par la suite progressivement et en fin d'évolution. Seules deux autres atteintes musculaires peuvent conduire à une élévation aussi importante de la CPK : la forme mineure de la dystrophie musculaire de Becker et la forme autosomale récessive de la dystrophie musculaire des ceintures. Le diagnostic différentiel peut signaler la faible augmentation de la CPK en cas de myopathie des ceintures ou d'atteinte fascio-scapulo-humérale. L'augmentation des autres enzymes musculaires déjà mentionnée, est moins caractéristique que celle de la CPK, en dehors du pyruvate kinase dont le dosage a été préconisé par certains au vu de son élévation précoce. De nombreux paramètres (température, hémolyse, dilution...) modifient considérablement les résultats du dosage sérique de la CPK ce qui oblige les laboratoires à standardiser les méthodes de mesure.

Généralement trois mesures sont préconisées en cas d'activité augmentée ou dans les limites supérieures à la normale au cours de la première mesure (Plauchu *et al.*, 1982).

Le prélèvement est pratiqué après une demi-heure de repos total et suivant deux jours d'activité physique normale sans activité sportive inhabituelle. L'achèvement sérique de la CPK est augmentée dans une proportion significative des conductrices et constitue le meilleur et le plus simple, sinon le plus constant, des critères du conseil génétique (Gilgenkrantz, 1990).

L'étude en Western blot des différentes protéines musculaires permet une évaluation quantitative et qualitative de la dystrophine (poids moléculaire) (Pélissier et Urtizbera, 1996). Cette étude est indispensable pour préciser le type de déficit protéique (absence de la dystrophine dans la dystrophie musculaire de Duchenne) (**fig. 1**).

La sévérité du phénotype est corrélée à la quantité résiduelle de la dystrophine présente mais aussi à la taille de celle-ci (Hoffman et Kunkel, 1989).

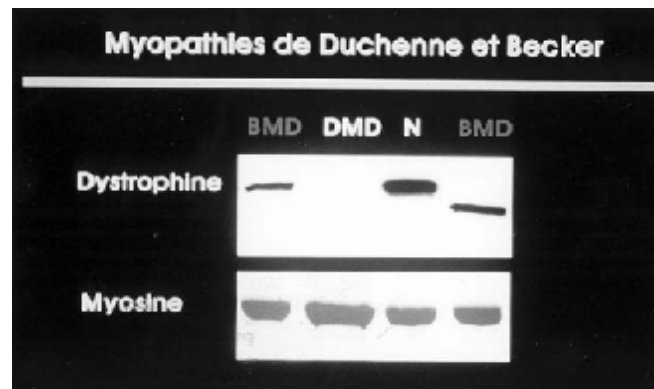


Fig. 1 : Technique de Western-blot pour l'étude de la dystrophine sur muscle solubilisé.

- En cas de Duchenne, la bande dystrophine est absente.
- En cas de Becker, la dystrophine est en quantité réduite et de longueur diminuée : bande fine, de migration différente (Fardeau *et al.*, 1996).

I-4-2- Electromyographiques:

L'électromyogramme (EMG) permet de recueillir et d'analyser des signaux électriques par l'intermédiaire de fines aiguilles- électrodes implantées dans le muscle étudié (Ghozlane, 2001). Il permet d'affirmer devant des troubles moteurs une origine neuropathique (dites aussi neurogène ou myogène).

Dans la mesure où cet examen n'est pas discriminatif, il n'est indiqué que lors d'une suspicion d'atteinte neurogène ou devant un tableau atypique.

I-4-3- Technique d'imagerie médicale :

Echographie quantitative, scanner et imagerie par résonance magnétique (IRM) ont été proposés par certains auteurs pour améliorer le dépistage des conductrices. Encore peu

employées dans un but diagnostic, ces technologies sont essentiellement utilisées au cours de l'appréciation de l'extension des lésions (Rott *et al.*, 1985).

I-4-4- Histologiques :

La biopsie musculaire confirmera dans tous les cas le diagnostic. Elle consiste à prélever un petit fragment dans une zone où le muscle n'est pas trop altéré. L'examen clinique et les images obtenues au scanner ou à l'IRM permettent de s'assurer de la qualité du muscle : le prélèvement se fait habituellement au niveau du muscle deltoïde (épaule) ou du quadriceps (cuisse), sans anesthésie locale (Ghozlane, 2001).

Deux types d'études diagnostiques sont réalisés à partir des fragments de tissus musculaires prélevés, et en fonction du contexte clinique.

- Les études histologiques classiques permettent de visualiser la morphologie et la structure des fibres musculaires à l'aide d'une batterie de coloration standard (Hématine- éosine, Tricome de Gomori, NADH, ATPase, etc). Dès cette étape, la mise en évidence de certaines anomalies va orienter le diagnostic : fibres nécrosés et/ou en régénération dans les dystrophies progressives.

- l'immunofluorescence qui est une technique qualitative. L'étude de la fixation sur muscle congelé de différents anticorps correspondant à différentes régions de la dystrophine est un apport intéressant pour caractériser une dystrophine tronquée et sa répartition au sein du muscle (**fig. 2**) (Pélissier et Urtizbera, 1996).

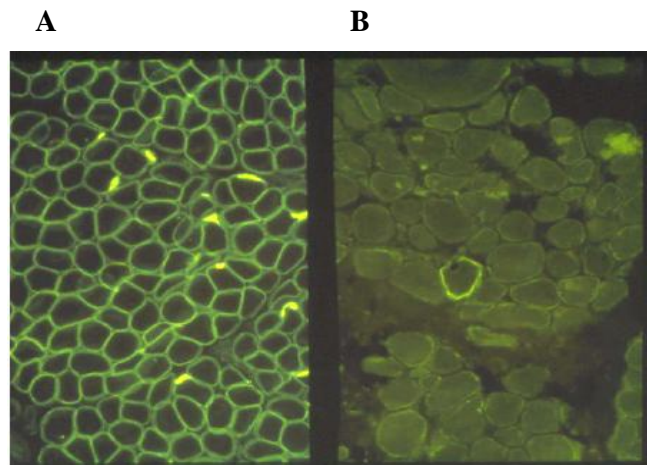


Fig. 2 : A : expression membranaire normale de la dystrophine ; B : Absence de dystrophine sauf sur quelques fibres, dans le cas de la dystrophie musculaire de Duchenne (marquage en Immunofluorescence) (Bouvagnet, 2005).

I-4-5- Moléculaire:

L'étude moléculaire du gène de la dystrophine permet de confirmer le diagnostic clinique de la dystrophie musculaire de Duchenne et Becker. Le gène de la dystrophine peut être altéré par deux types de lésions. Les plus fréquentes sont des délétions (65% des patients) ou des duplication (5%). Les mutations ponctuelles sont suspectées dans les 30% restants.

I-4-5-1- Délétions et duplications :

Les délétions et les duplications peuvent être détectées par deux techniques :

- Par PCR multiplex (la technique utilisée dans notre étude), méthode de criblage rapide, permet d'amplifier et de visualiser certains exons judicieusement choisis : elle détecte 98% des délétions (pour 18 exons testés) (**fig. 3**) (Chamberlain *et al.*, 1988 et Beggs *et al.*, 1990).
- Le Southern blot, technique classique, est complémentaire de la précédente car elle permet d'explorer l'ensemble de la séquence codante de façon qualitative et quantitative : elle précise les régions délétées, détecte les 2% restants des délétions et l'ensemble des duplications (Barois *et al.*, 1998).

I-4-5-2- Mutations ponctuelles :

Une mutation ponctuelle est suspectée lorsque aucune anomalie de grande taille n'a été détectée. Les méthodes de détection sont nombreuses mais aucune n'est réellement à la portée de ce gène géant :

- Les méthodes de détection analysent l'ADN génomique par SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism), DGGE (Denaturant Gradient Gel Electrophoresis) ou hétéroduplex. L'ARN exprimé dans le muscle peut être étudié par PCR après transcriptase réversion et PTT (Protein Truncation Test). Ces dernières techniques nécessitent une biopsie musculaire.
- Le séquençage direct peut concerner l'ensemble de la séquence codante ou la région suspecte repérée par une des méthodes précédente (Barois *et al.*, 1998).

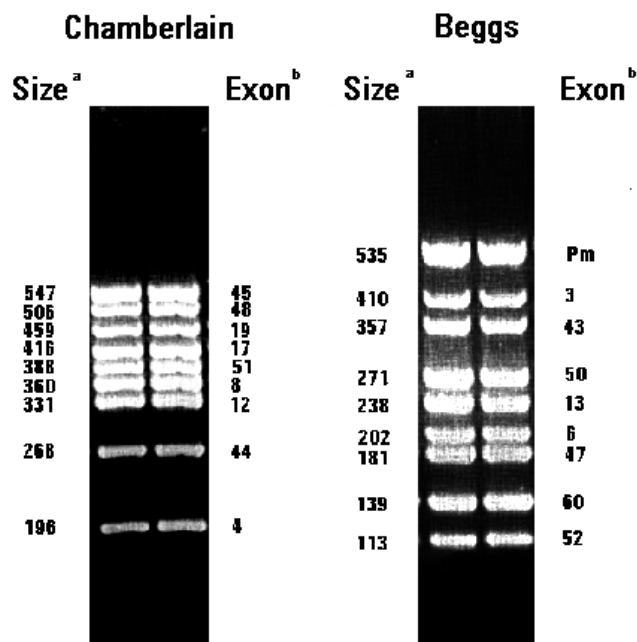


Fig. 3 : Les exons fréquemment délétés amplifiés par PCR multiplex selon Chamberlain et Beggs dans le diagnostic de DMD/BMD (Chamberlain *et al.*, 1988 ; Beggs *et al.*, 1990).

- Exon (a) et taille (b) du gène de la dystrophine présent dans le produit PCR.

I-5- Diagnostic différentiel :

Reconnaître une maladie musculaire est en règle générale facile, le patient consulte pour une perte progressive de la force musculaire associé souvent à une amyotrophie. L'examen clinique va conforter le diagnostic en mettant en évidence un déficit moteur, amyotrophant, bilatéral, parfois asymétrique, prédominant habituellement au niveau des racines ou dans les territoires bien particuliers comme les muscles sterno- cleido- mastoïdiens, les muscles de la face, les muscles oculomoteurs (Warte, 2003).

Une difficulté de diagnostic différentiel avec les autres affections musculaires, essentiellement l'amyotrophie spinale infantile, l'amyotrophie des ceintures et la myopathie d'Emery- Dreifuss ne peut se poser qu'en cas de formes très atypiques. Il faut signaler en effet que des cas d'amyotrophie spinale infantile associée à une hypertrophie des mollets et des taux élevé de CPK ont été rapportés (Gilgenkrantz, 1990).

II- Le gène de la dystrophine :

La mise en évidence de la dystrophine constitue le premier succès de la génétique inverse, démarche qui consiste à localiser, isoler et cloner le gène impliqué dans une maladie génétique puis d'identifier la ou les protéine(s) pour la (les) quelle(s) il code (Dubowitz, 1992). L'analyse du produit protéique chez les patients permet enfin d'élucider la physiopathologie moléculaire de la maladie.

II-1- Les stratégies de clonage et les premiers sondes intragéniques :

Deux stratégies menées par deux équipes différentes ont permis, à partir de patients porteurs des deux principaux remaniements chromosomiques rencontrés, de s'approcher et même d'atteindre le gène DMD. La première visait à cloner le point de jonction d'une translocation et la seconde à cloner une délétion.

- Les clones XJ :

La première stratégie due à Worton, a consisté à cloner le fragment de jonction d'une translocation (X ; 21), situé au niveau du point de cassure, comportant sur le versant du chromosome 21 des gènes codant pour l'ARN ribosomal. Les clones obtenus (XJ) contenaient des fragments d'ADN qui se révélèrent, grâce à des RFLP, être génétiquement liés au locus DMD. Ces fragments contiennent 600 pb d'ADN ribosomal et 11000 pb de séquences liées à l'X.

- Les clones pERT (Phenol Enhanced Reassociation Technique) :

La seconde stratégie, due à Kunkel, a consisté à mettre à profit une microdélétion cytogénétique interstitielle en Xp21 (**fig. 4**), observé chez un garçon présentant l'association de la dystrophie musculaire de Duchenne + granulomatose chronique + rétinite pigmentaire + syndrome de McLeod (malade BB de la figure 4). Grâce à une méthode très ingénieuse d'hybridation soustractive, des séquences d'ADN absentes chez le malade ont été clonées. La mini-banque obtenue contenait des fragments d'ADN ne s'hybridant pas avec le génome du malade, donc nécessairement inclus dans la délétion. Certains d'entre eux se révélèrent génétiquement très proches -par analyse du linkage- du locus DMD. Mais c'est surtout leur utilisation pour la recherche systématique chez des myopathes de délétions moléculaires, et non plus cytogénétique, qui s'avéra fructueuse. Le pari engagé par Kunkel était que, par analogie avec la pathologie moléculaire du gène HPRT (Hypoxanthine phosphoribosyl transférase) dans la maladie de Lesch-Nyhan une autre maladie liée au chromosome X, une

proportion significative de cas de myopathie était due à une pathologie délétionnelle. Si les sondes étudiées étaient proches du gène, elle devait pouvoir la révéler. Cette prédiction fut pleinement confirmée pour les sondes de la série pERT87 qui détectèrent 5 délétions sur les 57 premiers cas explorés.

L'utilisation de cette technique d'hybridation compétitive en émulsion phénolique n'a pas été fréquemment rapportée dans la littérature. Toutefois, une approche semblable au principe pERT mais utilisant le phosphate inorganique pour augmenter la réassociation a permis par la suite au groupe de Davis d'isoler une nouvelle sonde, HIP25 (Gilgenkrantz, 1993).

Cette observation suggérait que le transcrit de 14 kb provenait effectivement de locus DMD, même si du travail était encore nécessaire pour caractériser complètement le gène, déterminer la nature et la fonction de la protéine DMD (Pasternak, 2003).

Les deux équipes ont entrepris une marche bidirectionnelle sur le chromosome aboutissant au clonage d'une région de 220 kb (locus DXS164), et à l'isolement de nouvelles sondes reconnaissant d'autres séquences uniques, dont certaines polymorphes (Kaplan et Delpech, 1995).

Les analyses familiales, pratiqués à l'aide de ces différentes sondes, révélèrent un pourcentage de recombinaisons entre ces deux régions. Ce résultat, surprenant quand il s'agit de marqueurs intragéniques, laissait présager la taille inhabituelle de ce gène ; 160 kb séparent le marqueur pERT87.1 et le marqueur initial XJ.1. Par la suite, le séquençage du point de translocation XJ a montré que 20 pb du chromosome 21 et 70 pb du chromosome X avaient été emportées au cours du remaniement complexe suggère là encore une localisation intragénique du domaine XJ (Gilgenkrantz, 1993).

II-2- Localisation du gène de la dystrophine :

La transmission mendélienne récessive et liée au sexe favorisait une localisation sur le chromosome X. La seule manière de découvrir le gène DMD était de procéder au clonage positionnel. La localisation du gène DMD dans une région précise du chromosome X s'est appuyée sur trois sortes d'information génétique :

1- L'analyse des chromosomes de filles souffrant de DMD et porteuses chacune d'une translocation équilibrée entre un X et un autosome, a démontré que le point de cassure du chromosome X était toujours situé en Xp21.2. Plusieurs autosomes participaient à ces translocations équilibrées [par exemple, t(X ; 1) (p21.2 ; p34), (X ; 5) (p21.2 ; p35.3), (X ; 21) (p21.2 ; p12) et (X ; 9) (p21.2 ; p21.3)]. Il a donc été conclu qu'une cassure dans un gène

localisé dans la région Xp21.2 était à l'origine de la DMD. Cette proposition a été étayée lorsque l'on a remarqué que, chez chacune de ces filles DMD, le chromosome X transloqué était actif du point de vue de la transcription tandis que le chromosome X normal ne l'était pas. Au cours des stades précoces de l'embryogenèse du sexe féminin, une inactivation aléatoire de la transcription de l'un des deux chromosomes X se met en place. La plupart des gènes du chromosome X inactivé ne sont pas transcrits dans les types cellulaires issus des cellules où a lieu l'inactivation, tandis que les gènes de l'autre chromosome sont exprimés. Donc chaque fille DMD dont le chromosome X transloqué est activé ne pourra fournir un produit fonctionnel du gène DMD, car le point de cassure en Xp21.2 détruit le gène DMD et le gène normal, porté par le chromosome X inactivé reste silencieux (Pasternak, 2003).

2- Observation de microdélétion cytogénétique interstitielle en Xp21, observée chez un garçon présentant l'association myopathie de Duchenne + granulomatose chronique + rétinite pigmentaire + syndrome de McLeod (Kaplan et Delpech, 1995). Toutefois, il a été observé de manière constante l'association du phénotype DMD avec une délétion de la région Xp21.2, quelque soit la taille de la délétion (Pasternak, 2003).

3- Des sondes spécifiques de locus polymorphes du chromosome X se sont toujours révélées liées à (ou à proximité de) la région Xp21.2 dans des translocations Xp21.2 et avec de l'ADN de garçons porteurs de petites délétions (des microdélétions). En prenant appui sur ces analyses ainsi que d'autres, il a été conclu que l'un de ces clones pERT87, contenait selon toute vraisemblance de l'ADN du gène DMD ou d'une séquence très proche.

Neuf enchaînement de marche sur le chromosome ont conduit à assembler 220 kb d'ADN génomique à la suite de l'isolement du clone initial pERT87 (**fig. 5**). L'un de ces clones contenait une séquence conservée au cours de l'évolution et détectait un transcrit d'ARNm de grand taille (~14 kb) dans les cellules de muscle. Ce clone a servi à isoler des clones d'ADNc englobant la totalité du transcrit ont été isolés et caractérisés. La séquence a permis d'établir que cet ARNm codait une protéine de très grande taille 3685 acides aminés. De plus, les expériences d'hybridation ont montré qu'un transcrit complet était présent dans les cellules de muscle normal mais non pas dans les cellules de muscle des patients DMD qui avait une délétion en Xp21.2.

A l'issue de marche sur le chromosome supplémentaire, le locus DMD était disponible dans sa totalité pour l'analyse. Le gène DMD est l'un des plus grands gènes connus. Il occupe 2400 kb sur le chromosome et possède 79 exons (Bernard, 1999).

Différentes banques génomique de patients atteint de DMD ont été construites et ont permis, par saut délétionnelle d'isoler quatre loci distincts et distants du domaine pERT : deux entres eux J-MD et J-47 (Monaco *et al.*, 1988) sont proximaux au domaine pERT et les deux autres en sont distaux J-BIR (Monaco et Kunkel, 1987) et J-66 (Van Ommen *et al.*, 1987). Une nouvelle marche sur le chromosome a permis de porter le total des régions clonées à plus de 450 kb. Enfin, le clone P20 a été isolé à partir d'un sous clonage d'une banque de cosmide humains issue de deux hybrides somatiques. Il détecte à lui seul 16% de délétions dans des échantillons sanguins de DMD et 20% dans des prélèvements de BMD (Gilgenkrantz, 1993).

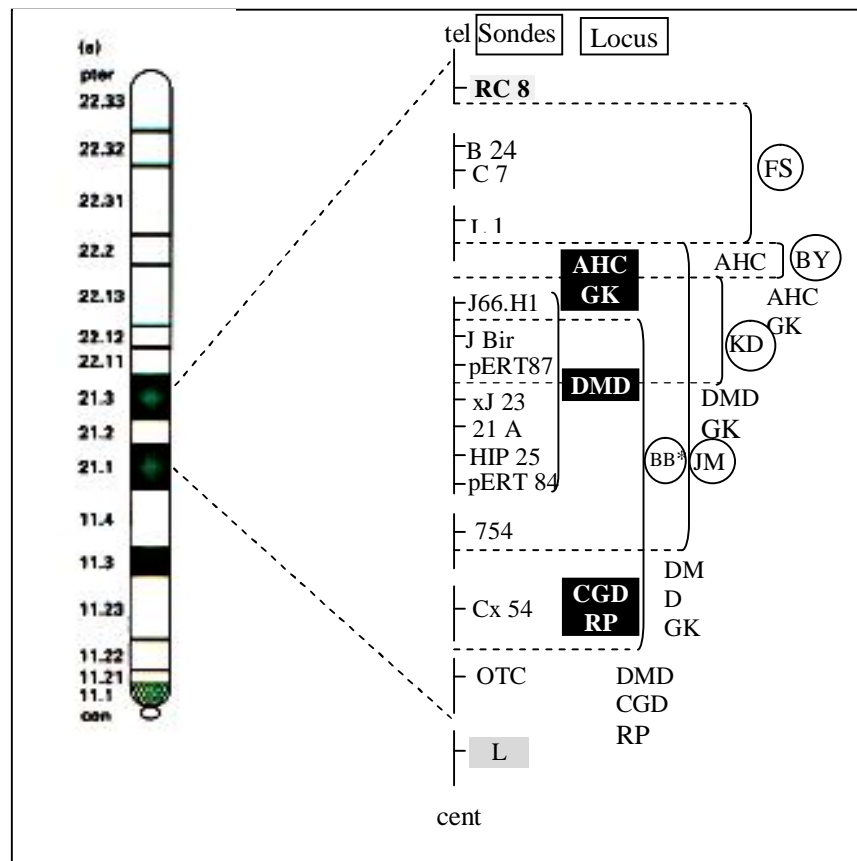


Fig. 4 : Localisation ordonnée des différents marqueurs de l'ADN et carte morbide de la région Xp21.2 (Kaplan et Delpech, 1995).

AHC : hypoplasie congénitale des surrénales,

GK : déficit en glycérol kinase,

CGD : granulomatose chronique,

RP : rétinite pigmentaire,

OTC : ornithine transcarbamylyase.

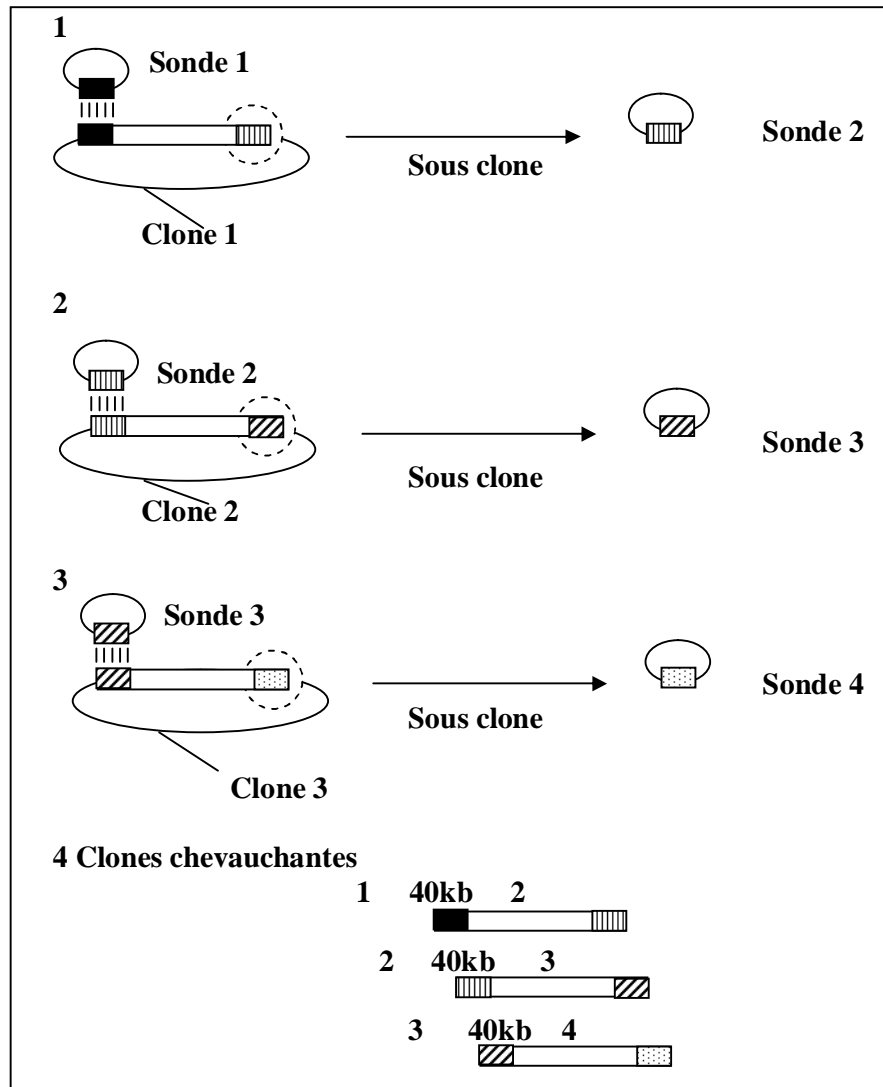


Fig. 5 : Marche sur le chromosome (Pasternak, 2003).

II-3- Structure et organisation du gène de la dystrophine :

La cartographie du gène de la dystrophine et l'établissement de son organisation ont été rendus possible par l'isolement successif de sondes introniques, intragéniques et des sous clones d'ADN complémentaire.

- La taille de ce gène est estimée à 2,4 mégabases, taille record d'un gène à ce jour, soit 1500 fois la taille du gène de la β globine et 12 fois celle du facteur VIII. Cette singularité lui a valu la dénomination du gène mammouth.

- La pathologie de contiguïté a permis de localiser et d'ordonner les loci adjacents, déficit en glycérolkinase (GKD) et hypoplasie congénitale des surrénales (CAH), dans le sens centromère-télomère, comme suit : DMD- GKD- CAH (Gilgenkrantz, 1993).

L'organisation du gène a été établie grâce aux premiers ADNc obtenus. Le clonage dans la levure a permis de reconstituer un contig de 3,2 mégabases correspondant à 7 YAC chevauchants et contenant la totalité du gène DMD (Monaco *et al.*, 1992). Le gigantisme du gène n'est pas donc dû à une myriade de petits exons (79 exons) mais à la taille impressionnante de certains introns (78 introns) (**fig. 6**). Cette taille est étonnamment conservée au cours de l'évolution puisque le locus DMD occupe une place similaire dans le génome de la souris ou dans celui du poulet (Gilgenkrantz, 1993).

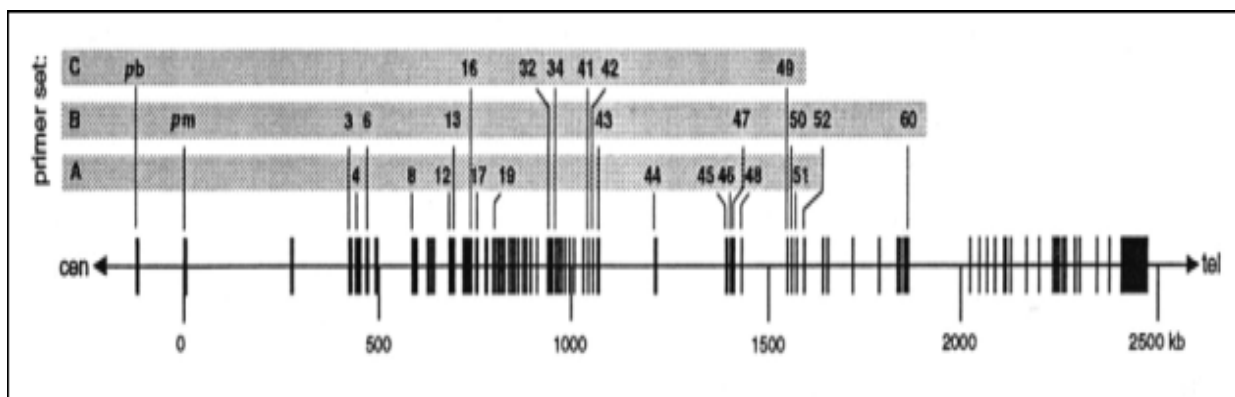


Fig. 6 : Structure du gène de la dystrophine (Wang *et al.*, 1998).

III- La dystrophine :

III- 1- Localisation de la dystrophine :

C'est une protéine qui est localisée sous le sarcolemme où elle forme un réseau cytosquelettique dans le muscle normal. Elle constitue 2% du sarcolemme et 50% du cytosquelette sarcolemmale. Cette protéine est impliquée dans l'ancrage des protéines du sarcolemme aux protéines cytosquelettiques (Brown et Hoffman, 1988).

Cette protéine a été découverte en 1987 grâce à la génétique inverse (Koenig *et al.*, 1987) qui constitue une des approches pour l'étude des maladies héréditaires. La dystrophine peut être détectée au niveau de la membrane plasmique de la fibre musculaire par les techniques d'immunofluorescence, à l'aide d'anticorps anti-dystrophine (Hoffman *et al.*, 1987).

III-2- Structure de la dystrophine :

La structure de la dystrophine est relativement bien conservée entre les espèces humains, rongeurs et poulet (Lemaire *et al.*, 1988). Sa structure primaire a été déduite des nucléotides de l'ARN messager de 14 kb transcrit à partir du gène DMD (Leger *et al.*, 1991). Elle possède un poids moléculaire de 427 KDa (Marques, 2004) de forme allongée et articulée composée de 3685 acides aminés (Sadoulet- Puccio *et al.*, 1997).

La dystrophine est constituée de 4 domaines fonctionnels (Koenig *et al.*, 1988) et de 4 régions charnières riches en proline qui la rendent plus flexible (**fig. 7**) (Hoffman, 1999)

- Le domaine N-terminal est composé de plus de 240 acides aminés et se lie à l'actine. Ce domaine comporte 3 régions distinctes ABS1, 2 et 3 (Ahn et Kunkel, 1993 ; Sadoulet- Puccio *et al.*, 1996) et permettrait à chacune l'interaction avec la γ - actine cytosquelettique qui, à son tour, joue un rôle dans l'ancrage de la dystrophine à la région sous sarcolemmale (Stromer, 1998).
- Le domaine central est le plus gros fragment, suit celui de la liaison à l'actine, il est composé de 2840 acides aminés, répartis en 24 séquences répétées similaires aux éléments hélicoïdaux de la spectrine, comporte 4 régions charnières, riches en résidus proline conférant à la dystrophine sa flexibilité (Koenig et Kunkel, 1990). La quatrième zone charnière comporte en outre un domaine nommé WW, impliqué dans les interactions entre protéines notamment entre dystrophine et la β -dystroglycane (Rentshler *et al.*, 1999), protéine transmembranaire appartenant au complexe protéique associé à la dystrophine (Sadoulet- Puccio *et al.*, 1997).

- Le domaine riche en cystéine, composé de plus de 280 acides aminés, comporte deux sites potentiels de fixation au calcium, EF1 et EF2 (Koenig *et al.*, 1988), sites également impliqués dans l'interaction avec la β - dystroglycane (Rentshler *et al.*, 1999), et un site de fixation potentiel du zinc, le domaine ZZ (Ponting *et al.*, 1996).
- le domaine C- terminal est composé de 320 acides aminés et contient le site de liaison à la dystrobrevine et aux syntrophines, protéines cytoplasmiques sous sarcolemmales (Blake *et al.*, 1998). Cette partie de la molécule interagit avec la membrane plasmique par l'intermédiaire d'une des glycoprotéines associées à la dystrophine, la β - dystroglycane (Towbin, 1998). Il contient également un site CC de fixation à l'actine (Hance *et al.*, 1999).

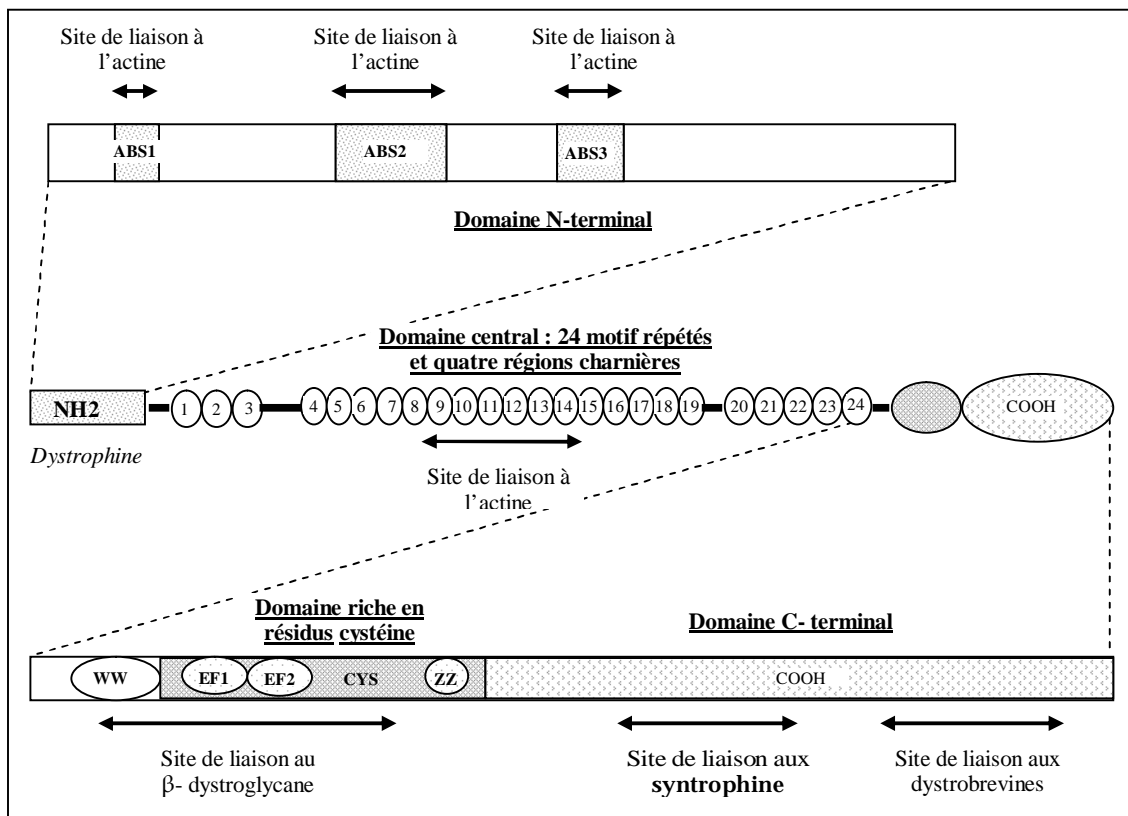


Fig. 7 : Représentation schématique de la dystrophine (Koenig et Kunkel, 1990 ; Nguyen, 2001; Blake *et al.*, 2002).

III-2- Isoformes de la dystrophine :

Il existe deux types d'isoformes :

III-2-1- Isoformes longues de 427 kDa :

Quatre promoteurs spécifiques de tissu, situés à l'extrémité 5' du gène DMD produisent un ARN messager de longueur totale (14kb), à l'origine de quatre isoformes de 427kDa dont la dystrophine musculaire (**tableau 1**) :

- Isoforme cérébrale ou C- dystrophine ou B- dystrophine (Dp427-B) ; issue du promoteur P_B (B pour brain), actif dans le cortex et de l'hippocampe (Olive *et al.*, 1997).
- Isoforme musculaire ou M- dystrophine (Dp427-M) ; issue du promoteur P_M (M pour muscle), actif principalement dans le muscle, et faiblement dans les cellules gliales (Culligan *et al.*, 1998).
- Isoforme des cellules de Purkinje cérébelleuses ou P- dystrophine (Dp427-P) ; issue du promoteur P_P (P pour Purkinje cell) (Towbin, 1998).
- Isoforme lymphocytaire ou L- dystrophine (Dp427-L) (Culligan *et al.*, 1998).

III-2-2- Isoformes de plus faible poids moléculaire :

Quatre autres promoteurs, également spécifique de tissu, sont à l'origine d'ARN messager incomplets et d'isoformes de la dystrophine de plus faible poids moléculaire (**fig. 8**). Ces isoformes de faible poids moléculaire sont : Dp71, Dp 116, Dp 140 et Dp260 (**tableau 1**).

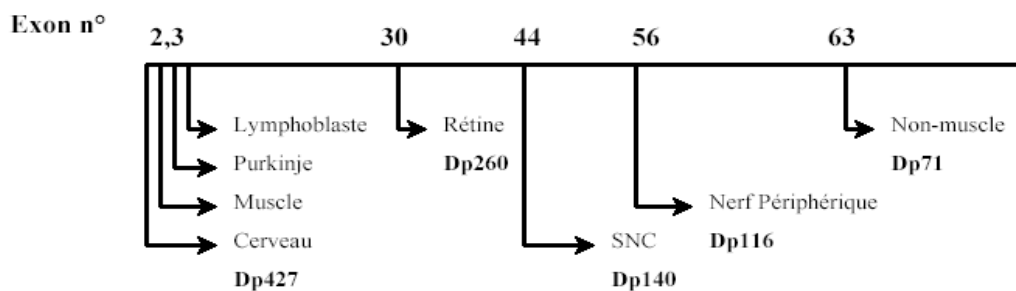


Fig. 8 : Localisation génomique des promoteurs des différents produits du gène DMD (Blake et Kröger, 2000).

Tableau 1 : les isoforme de la dystrophine (Amann *et al.*, 1999 ; Blake *et al.*, 1999).

Nom de l'isoforme	Poids moléculaire en (kDa)	Taille du transcrit (kb)	Exons du gène DMD	Promoteur	Distribution tissulaire chez l'adulte
Isoformes longues					
M- dystrophine	427	14	1-79	P _M (M : muscle)	Muscle (lisse, squelettique, cardiaque)
B- dystrophine	427	14	1-79	P _B (B : brain)	Encéphale
P- dystrophine	427	14	1-79	P _P (Purkinje cell)	Cervelet
L- dystrophine	427	14	1-79		Lymphocytes
Isoformes courtes					
Dp260	260		30-79		Rétine
Dp140	140	7,5	51-79	Dans l'intron 44 du gène DMD	Encéphale et rein
Dp116	116	5,2	56-79	Entre les exons 55 et 56 du gène DMD	Ubiquitaire
Dp71	71	4,5	63-79	Entre les exons 62 et 63 du gène DMD	Lymphocytes

III-3- Epissages alternatifs du gène de la dystrophine :

La région 3' du gène de la dystrophine est soumis à des épissages alternatifs générant de nombreuses isoformes exprimées de façon différentielle en fonction du tissu ou du stade de développement (Feener *et al.*, 1989). L'équipe de Kunkel fut la première à utiliser la technique RT-PCR à la recherche d'épissage alternatif par amplification de fragments chevauchants de 1kb couvrant la totalité de la partie codante du transcrit de la dystrophine a partir d'échantillons d'ARN de muscle squelettique, de muscle lisse et de cerveau fœtal humain. Ces épissages n'affectent pas seulement la dystrophine mais aussi les produits courts du gène DMD tels que la Dp140 et la Dp71 (Gilgenkrantz, 1993).

Il a été mis en évidence l'existence d'épissages alternatifs générant divers isoformes de la Dp140 dans le cerveau et les reins. En particulier, la Dp140 pourrait subir l'épissage des exons 71-74 et de l'exon 78.

La Dp71 est soumise à de nombreux épissages alternatifs. Dans la partie C-terminale, l'épissage de l'exon 78 permet la traduction de l'exon 79 générant ainsi une séquence originale de 31 acides aminés qui remplace les 13 acides aminés normalement issus de l'exon 78. Cette séquence spécifique est nommée founder séquence, la Dp71 épissée pour l'exon 78 est appelée Dp71f. Cette séquence de 31 acides aminés est hydrophobe contrairement à la séquence de 13 acides aminés qu'elle remplace.

De plus, des épissages des exons 71, 71-74 et 72-74 ont été décrits respectivement dans les tissus adultes et au cours du développement. Chez le poisson zèbre, trois transcrits issus de l'épissage alternatif des exons 66-68, 71 et 73 s'expriment de façon tissu spécifique dans le muscle, le cœur ou le cerveau (Bordais, 2004).

Ces différents épissages réguleraient la liaison des dystrophines à leurs protéines membranaires associées. En effet, il a été observé que la région essentielle d'accrochage des syntrophines $\alpha 1$ et $\beta 1$ correspond à la séquence encodée par les exons 73 et 74 (Ahn et Kunkel, 1995).

III-4- Rôle de la dystrophine :

De nouvelles mutations affectant le gène de la dystrophine sont constamment répertoriées, ceci amène à une meilleure connaissance de la structure de la dystrophine, son expression, ses associations moléculaires, ses isoformes et ses homologues sont mieux connus, il est frappant de noter que les rôles exacts de la dystrophine demeurent hypothétiques. Des effets de son absence et des analogies structurales qu'elle peut présenter avec d'autres protéines, découlent les principales suppositions concernant les fonctions de la dystrophine.

III-4-1- Les hypothèses d'un rôle structural :

III-4-1-1- Maintien de la stabilité membranaire :

Dans le muscle squelettique, l'association de la dystrophine à la membrane sarcolemmale est supposée maintenir la stabilité membranaire, essentielle notamment lors de la contraction musculaire (Towbin, 1998). Cette hypothèse découle notamment de l'analogie structurale que présente le domaine central de la dystrophine avec la spectrine (Koenig *et al.*, 1988). L'activité mécanique augmente la proportion de fibres dégénératives (incorporant un colorant vital), suggérant que la dystrophine apporte au sarcolemme une résistance mécanique aux «stress» subits pendant l'alternance contraction / relaxation musculaire (Petrof *et al.*, 1993).

III-4-1-2- Fonctions particulières dans des zones spécialisées :

Au niveau des jonctions neuromusculaires, la dystrophine est exprimée dans les «creux» membranaires, riche en canaux sodiques voltages dépendent, et absente des «crêtes», ou se situent les récepteurs de l'acétylcholine. La relative abondance de la dystrophine dans ces régions spécialisées suggère qu'elle pourrait participer à leur organisation topographique (Ahn et Kunkel, 1993).

III-4-2- Les hypothèses d'un rôle métabolique (un rôle dans le métabolisme calcique ?) :

L'observation dans le muscle de l'homme et de souris déficient en dystrophine de concentrations intracellulaires élevées en calcium, d'une augmentation de l'activité des canaux ioniques calciques et de modifications de l'activité des protéases sensibles au calcium, suggère que la dystrophine pourrait jouer un rôle dans le métabolisme calcique. Toute fois ce rôle pourrait être indirect, via la stabilisation du sarcolemme, les lésions membranaires dues à l'absence de dystrophine entraînent secondairement un afflux anormal de calcium dans la cellule (Ahn et Kunkel, 1993).

III-5- Le complexe dystrophine, glycoprotéique et protéines associées :

Le complexe établit un lien entre la dystrophine et le composante majeure de la matrice extracellulaire : la laminine (Yoshida *et al.*, 1994). A ce jour, le complexe associé à la dystrophine (CAD) compte 18 protéines : la laminine- $\alpha 2$ (Ehrig *et al.*, 1990), les dystroglycanes (α , β) (Smalheiser *et al.*, 1995), les sarcoglycanes (α , β , δ , ϵ , γ) (Crosbie *et al.*, 2000), la sarcospan (Crosbie *et al.*, 1997), la dystrobrevine (Suzuki *et al.*, 1995), les syntrophines ($\alpha 1$, $\beta 1$ et $\beta 2$) (Ahn *et al.*, 1996), la NOs (nitric oxyde synthase) (Kobzik *et al.*, 1994), la MAST205 (microtubule associated serine/threonine kinase 205 Kd) (Lumeng *et al.*, 1999), la syncoiline (Newey *et al.*, 2001), la calvéoline-3 (Galbiati *et al.*, 2001) et la Grb2 (**fig. 9**) (Schlaepfer *et al.*, 1994).

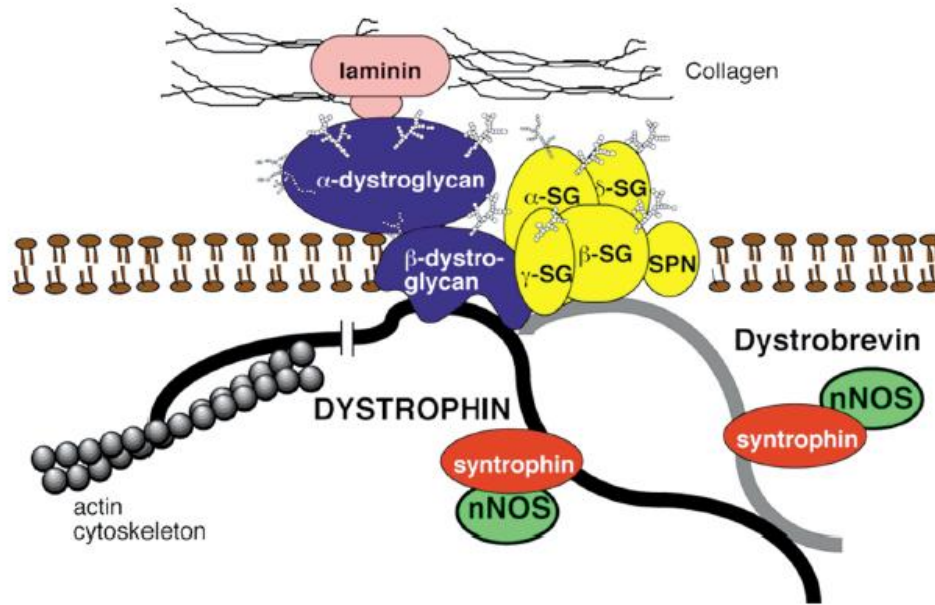


Fig. 9 : Schéma du complexe glycoprotéique associé à la dystrophine (Jeffrey et Chamberlain, 2002).

SPN : Sarcospan, SYN : Syntrophine, Db : Dystrobrevine, NOs : «Nitric oxyde synthase».

III-6- Dysfonctionnement de la dystrophine et du complexe protéique associé :

La mutation du gène DMD a pour conséquence soit l'absence de production de dystrophine, soit la production d'une dystrophine anormale conformément à l'hypothèse du cadre de lecture. Cette absence conduit à l'instabilité de la membrane plasmique (sarcolemme) et à une augmentation de la perméabilité sarcolemmale ce qui a pour conséquence une libération dans le sérum de créatine phosphokinase et l'entrée massive et incontrôlée de calcium dans les myofibrilles déficientes en dystrophine. Ce dernier est un événement conduisant à la nécrose cellulaire via divers mécanismes, notamment l'activation des protéases, l'hypercontraction de certains sarcomères, ou l'entrée active de calcium dans les mitochondries responsable d'une déplétion en ATP (**fig. 10**) (Nguyen, 2001).

Les protéines associées à la dystrophine sont produites, mais en l'absence de dystrophine elles ne sont pas correctement associées au sarcolemme et sont dégradées, ce qui explique leur diminution en particulier celle de l'α-sarcoglycane (De Recondo *et al.*, 2001). L'étude de l'α et la β-dystroglycane par Western Blot chez le modèle animal de souris

dystrophique a montré une diminution de 85% de ces protéines, alors que l'ARNm de ces deux protéines est normale (De La Porte *et al.*, 1999).

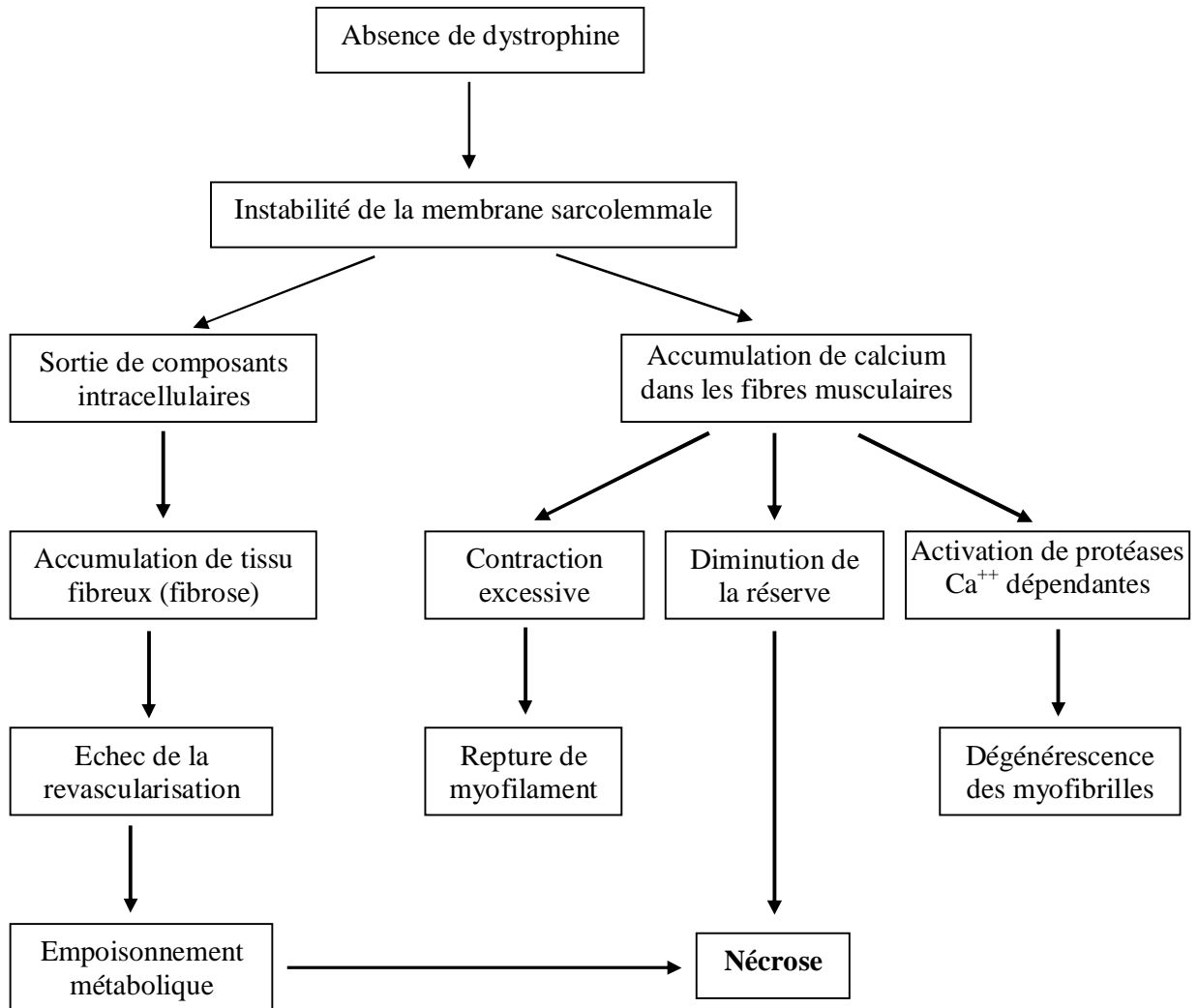


Fig. 10 : Enchaînement des dommages causés aux fibres musculaires chez un patient atteint de la dystrophie musculaire de Duchenne (Bernard, 1999).

IV- Pathologie moléculaire du gène de la dystrophine :

IV-1- Un seul gène pour deux maladies :

La pathologie moléculaire du gène DMD est responsable des maladies de Duchenne et Becker. Trois arguments sont venus, au fil des découvertes, prouver l'identité des deux loci BMD et DMD :

- **Argument d'ordre cytogénétique :** l'analyse des chromosomes de filles porteuses chacune d'une translocation équilibrée Xp21 ; autosome présentent parfois une symptomatologie de type Becker. Ainsi, la translocation t(X ; 21) (p21.2 ; q12), ayant servi au clonage de la région XJ, et avait été décrite par Verllen-Dumoulin et al. en 1984 chez une fille ayant une symptomatologie de dystrophie musculaire de Becker (Gilgenkrantz, 1990).
- **Argument d'ordre cartographique :** la découverte des deux premiers marqueurs flanquant le locus DMD permis de réévaluer l'hypothèse d'un allélisme entre les formes Becker et Duchenne (Kingston *et al.*, 1983).
- **Argument d'ordre moléculaire :** les délétions moléculaires dépistées chez les BMD comme chez les DMD touchent les mêmes régions du gène. Lorsqu'il fut possible d'utiliser les sondes d'ADNc, il a été constaté que certaines des délétions dépistées chez des malades étaient plus petites, voir même comprises dans des délétions incriminant d'avantage d'exons, que celles détectées dans l'ADN de patient BMD. A moins d'imaginer deux gènes particulièrement intriqués, l'identité des gènes DMD et BMD était pratiquement acquise. Les anomalies qualitatives de la dystrophine observées dans le muscle des patients atteints de BMD ont fourni la preuve définitive de l'allélisme des deux maladies (Gilgenkrantz, 1990).

IV-2- Les mutations responsables de l'apparition des dystrophinopathies :

Dans la dystrophie musculaire de Duchenne et Becker, la dystrophine est soit absente par défaut de synthèse soit synthétisée mais instable. Les deux tiers des mutations sont des délétions et un tiers seulement sont des mutations ponctuelles ou des duplications.

Dans un tiers des cas des dystrophinopathies, il s'agit de mutations de novo où la mère n'est pas conductrice (Reymond, 2004). Le tableau 2 regroupe quelques types mutationnels du gène DMD à l'origine des phénotypes Duchenne et Becker chez l'homme.

Tableau 2 : Mutations du gène DMD à l'origine des phénotypes Duchenne et Becker chez l'homme (Roberts *et al.*, 1994).

DMD		BMD
65%	délétions et duplications de grande taille	85%
18%	petites mutations non-sens (à l'origine d'un codon stop)	
8%	petites délétions et insertions (de moins de 52 paires de bases)	
7%	petites mutations d'un site d'épissage	7%
< 2%	petites mutations faux-sens (substitution de nucléotide)	8%

IV-2-1- Les délétions :

L'analyse systématique de l'ADN de sujets atteints de myopathie de Duchenne ou Becker a permis de montrer que des délétions partielles sont la cause majeure de dysfonctionnement du gène DMD.

Les délétions du gène DMD sont retrouvées dans environ 60 à 65% des cas (Koenig *et al.*, 1987). La taille des délétions est très variable : elle va de 0,5 kb à 2000 kb, voir de rares délétions totales du gènes et même de gènes contigus (Serre *et al.*, 2002).

L'étude par PCR des exons 3/8/13/43/44/47/48/50/51 et 52 entraînerait la détection de 98% des délétions et duplications (Koenig *et al.*, 1987).

Les études menées par différentes équipes ont montré que les délétions touchent préférentiellement deux régions du gène, appelées « points chauds » de délétions. Ces deux régions de prédilection sont situées en région médiane 3' et en région 5' du gène. Les points de cassure les plus fréquemment impliqués sont situés dans les deux plus grands introns du gène (intron 7 et 44 = 120 et 170 Kb) (Barois *et al.*, 1998). Le premier point chaud concerne les exons 43 à 52 avec un important point de cassure dans l'intron 44. La fréquence des points de cassure dans cet intron n'est pas encore parfaitement comprise. La grande taille de l'intron n'est pas une raison suffisante pour expliquer une telle proportion (30 à 40% selon les auteurs). La recherche de séquences répétées n'a pas permis non plus d'incriminer une haute probabilité de recombinaisons inégales (Serre *et al.*, 2002). Le deuxième point chaud de délétion est dans la région 5' du gène avec des points de cassure dans l'intron 7 dans 10 à 15%

des cas selon les auteurs. Dans l'ensemble, les délétions détectées dans cette région couvrent un domaine plus large que le précédent. Enfin, il est à noter que les délétions au-delà de l'exon 60 sont très rares (Serre *et al.*, 2002).

IV-2-2- Les duplications :

Des duplications partielles ont aussi été identifiées. La localisation de ces duplications est étendue et variable. Moins d'un tiers des duplications est retrouvé dans les points chauds de délétion et il ne semble pas exister de véritable point chaud de duplications quoiqu'il semble se dégager une concentration dans la région 5' du gène (exons 5-7). La fréquence des duplications est estimée de 6 à 7% suivant les laboratoires (Serre *et al.*, 2002). Leur mise en évidence nécessite le recours au dosage génique. La présence aléatoire en électrophorèse classique d'un fragment de taille anormale parfois transmis de façon mendélienne, ou encore l'observation en électrophorèse pulsée ou Southern blot d'un fragment d'ADN de taille supérieure à celle attendue démontre la présence de la duplication. En résumé, les duplications et les délétions sont le résultat probable d'une recombinaison, homologue ou non. Un tel événement aboutit à la création de deux nouvelles chromatides sœurs l'un portant une délétion, l'autre une duplication (Gilgenkrantz, 1990).

IV-2-3- Les mutations ponctuelles :

Environ un tiers des mutations responsables des dystrophies musculaire de Duchenne et de Becker sont associés à des mutations ponctuelles ou à de très petites altérations du gène de la dystrophine qui ne sont détectable ni par Southern ni par PCR. La base de données internationales (www.dmd.nl) regroupe actuellement 324 mutations ponctuelles. Ces mutations sont essentiellement de type non-sens, rarement récurrentes et localisées dans tout le gène sans point chaud de mutation. Du fait de la taille du gène, la mise en évidence de ces mutations est particulièrement difficile. Néanmoins, ces mutations conduisent presque toutes à des protéines tronquées, leur recherche peut être réalisée par un test particulièrement adapté au contexte mutationnel : le test PTT (Protein Truncation Test) (Serre *et al.*, 2002).

IV-2-4- Les autres types mutationnels :

Une insertion intragénique de 220 kb a été rapportée par Bettecken et Muller (1989). Il ne semble pas s'agir ici d'une duplication exonique dans la mesure où l'intensité des bandes obtenues en Southern blot après hybridation à l'aide de sondes d'ADNc est normale. Un réarrangement intronique perturbant un site d'épissage ou une inversion d'un fragment exonique pourrait être à l'origine du phénotype DMD (Gilgenkrantz, 1990).

V- Corrélation entre le génotype et le phénotype dans les dystrophinopathies :

Les premières corrélations génotype/phénotype ont été recherchées dès que les premières délétions ont été identifiées. Mais à cette époque, la sévérité du phénotype n'était pas expliquée ni par la localisation de la délétion ni par sa taille (Serre *et al.*, 2002).

Cet apparent paradoxe est expliqué par l'analyse détaillée du gène : en 1988, Monaco *et al.* ont montré que, chez les sujets atteints de DMD, les mutations qui entraînent un changement de cadre de lecture conduisent généralement à la synthèse d'une dystrophine tronquée, dont le domaine C-terminal est absent et ne peut donc plus se fixer à la membrane via le complexe DAG. Ce type de mutation entraîne le phénotype des dystrophies sévères de type Duchenne (**fig. 11a**) (De Recondo *et al.*, 2001).

En revanche, les mutations qui ne provoquent pas de changement du cadre de lecture conduisent à des dystrophies dont la partie initiale de la molécule est partiellement délétée mais possèdent toujours leur domaine C-terminal et ont ainsi comme conséquence des atteintes beaucoup plus légères de type Becker (**fig. 11b**) (Emard, 1999).

Il n'y a pas de corrélation entre la taille de la délétion et la sévérité de la maladie, cette règle se vérifie dans plus de 95% des cas (**annexe 4**) (Monaco *et al.*, 1988). Les exceptions les plus fréquemment observées sont :

- une délétion d'un seul exon peut suffire à donner un phénotype Duchenne (Gilgenkrantz, 1990).
- les délétions (ou duplications) des exons 3 à 7 ou des exons isolés (44, 45, 51) qui décalent le cadre de lecture mais entraînent seulement une forme intermédiaire ou BMD sévère. Chez ces patients, l'analyse de l'ARNm a permis de mettre en évidence l'existence de plusieurs transcrits correspondant à des épissages alternatifs, tels que des sauts d'exons ou des épissages cryptiques, qui permettent de restaurer le cadre de lecture dans des proportions variables (Barois *et al.*, 1998).
- au delà de 30 exons délétés, le phénotype clinique rencontré est celui d'une dystrophie de Duchenne, mais la récente observation d'un cas Becker âgé de 61 ans, qui marche toujours de façon autonome et dont l'ADN a révélé une délétion de 31 exons du domaine «spectrine like», entraînant un raccourcissement de 48% de la séquence codante constitue une exception à ce principe (Gilgenkrantz, 1990).

- pour les délétions ne modifiant pas le cadre de lecture, la sévérité du phénotype clinique dépend de la position et du rôle fonctionnel de la séquence délétée. Ainsi les délétions impliquant le domaine N-terminal sont associées à de faible taux de dystrophine (10% du taux normal) et conduisent à des phénotypes cliniques sévères (Blake *et al.*, 2002). les délétions touchant les régions riches en cystéine et le domaine C-terminal, nécessaire à l'attachement de la dystrophine au DAG entraîne une maladie de Duchenne. Les larges délétions qui commencent dans le premier tiers du domaine en bâtonnet n'entraînent que des symptômes minimes et celles qui touchent la partie distale de ce domaine (exon 45 à 47 ou 48) sont associées à des taux relativement élevés de dystrophine (40 à 47% du taux normal), ce qui explique qu'elles conduisent à des maladies de type Becker (De Recondo *et al.*, 2001).
- la délétion du premier exon du gène exprimé dans le muscle ainsi que celle de la région promotrice, n'affecte que faiblement le tissu musculaire mais elle entraîne une sévère cardiomyopathie dilatée qui ne s'accompagne pas d'un déficit notable concernant les muscles squelettiques (De Recondo *et al.*, 2001).

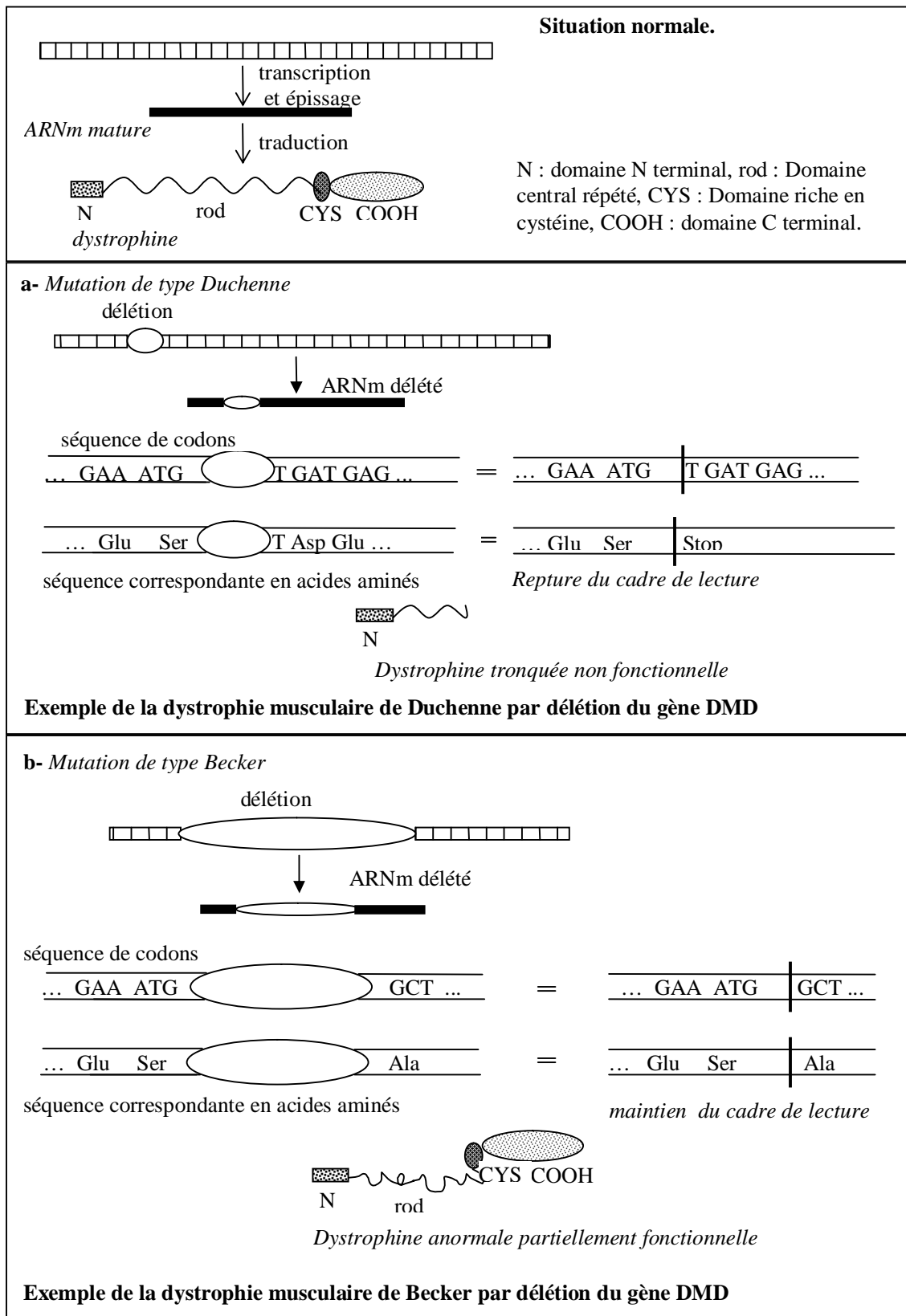


Fig. 11 : L'hypothèse de la rupture du cadre de lecture dans les cas de DMD et de BMD (Partridge, 1993).

VI- Les dystrophinopathies et gémellités :

Un cas très particulier d'une famille où ségrégeait une dystrophie musculaire, cette famille a deux enfants atteints, un garçon et une fille. Il n'existe aucune consanguinité dans la famille, mais le diagnostic de myopathie autosomique récessive ne pouvait pas être éliminé. La fillette atteinte, jumelle d'une petite fille bien portante, présentait un tableau clinique de faiblesse musculaire des ceintures s'aggravant progressivement. A 12 ans, elle pouvait encore marcher mais éprouvait de grandes difficultés à se relever. En outre, une petite taille et un retard intellectuel étaient notés. Différentes investigations complémentaires ont été demandées. Pour éclairer cette observation singulière, le typage HLA a prouvé la monozygotie de cette gémellité. L'hypothèse de syndrome de Turner a été éliminée par le caryotype.

Une hétérozygotie a été mise en évidence par le marqueur pERT87.1, chez le garçon myopathe, dans son ADN une délétion emportant les deux premiers exons du gène DMD ainsi qu'une sonde localisée environ 700 kb en amont du premier exon du gène, présente également chez la fille.

Une des hypothèses pour expliquer l'atteinte d'une seule des deux jumelles monozygotes est une lyonisation non aléatoire de l'X, notamment chez la fillette atteinte : Brun et al. ont démontré que l'inactivation de l'X ne s'est effectivement faite au hasard, non seulement chez la fillette atteinte, mais également chez sa sœur jumelle saine. Ainsi, sur le plan de l'expression des X, ces deux filles sont deux images en miroir, avec une inactivation de l'X normal chez la malade et de l'X muté chez la sœur normale, et ne sont pas le résultat d'une mosaïque (Gilgenkrantz, 1990).

Les deux techniques utilisées (immunofluorescence et étude de la méthylation) convergent donc vers le même résultat, à savoir une inactivation aléatoire chez ces deux jumelles (Gilgenkrantz, 1990).

VII- Conseil génétique et diagnostic prénatal :

Il s'agit de la procédure par laquelle des patients ou des apparentés qui pourraient être porteurs d'anomalies héréditaires sont mis au courant des conséquences de ces anomalies, des risques de les développer et de les transmettre, ainsi que de la façon dont elles pourraient être prévenues, évitées ou améliorées (Schanen-Bergot, 2005).

VII-1- Etude familiale et arbre généalogique :

Pour savoir si une femme est porteuse de l'anomalie génétique, le généticien va faire une étude familiale qui établit l'arbre généalogique, cette dernière montre quelles sont les femmes à risque. Une femme, mère d'un garçon atteint de la dystrophie musculaire de Duchenne ou Becker, sœur, tante et cousine maternelle, est porteuse de l'anomalie, et si elle a deux fils atteints, mais qu'il n'y a pas d'autre sujet atteint dans la famille, il est aussi très probable qu'elle soit porteuse. Puis on lui fera une prise de sang pour doser les CPK. Si le taux de CPK est augmenté, le statut de transmettrice ne fait aucun doute. S'il est normal on ne peut rien conclure, et il faut recourir à une analyse du gène DMD. Si la mutation a été trouvée chez le propositus, il suffit de la rechercher chez la femme à risque, si celle-ci est inconnue chez le propositus, l'analyse indirecte de l'ADN s'impose par des marqueurs moléculaires polymorphes intragéniques (Bussel *et al.*, 2002).

VII-2- Analyse de l'ADN chez les femmes à risque :

Si on connaît avec exactitude la mutation d'un garçon victime de la maladie de Duchenne, on peut rechercher la même mutation chez la mère et dans sa parenté féminine. Techniquement, ceci est plus difficile que chez les garçons parce qu'un seul des deux chromosomes X d'une femme peut porter la mutation. Si elle est porteuse génétique, l'intensité des bandes provenant de l'électrophorèse n'est diminuée que de moitié en présence d'une ou plusieurs délétions.

Cependant, il n'est pas facile de contrôler l'amplification des exons, et il est souvent difficile de détecter avec certitude les différences d'intensité des bandes. C'est pourquoi, l'analyse fait souvent appel à des marqueurs polymorphes. Ce sont des séquences d'ADN situées dans les introns entre les exons, presque toujours disposées différemment sur un chromosome donné et qui ont aussi des longueurs différentes, ce qui permet de distinguer les deux chromosomes. Ces séquences de marquage n'ont rien à voir avec la maladie, elles sont caractéristiques de chaque individu et peuvent aussi être amplifiées par la technique de la PCR et être ensuite identifiées sans équivoque après électrophorèse.

Si un garçon présente une délétion dans le gène de la dystrophine, il ne manque pas seulement un ou plusieurs exons, mais aussi les marqueurs dans les introns entre eux. Chez une femme, on peut vérifier si ces marqueurs manquent aussi sur l'un de ses chromosomes X. Si, comme chez son fils, ces marqueurs sont absents, la probabilité est alors grande qu'elle ait la même délétion que lui sur l'un de ses chromosomes X. Elle est donc une porteuse génétique. Si elle ne l'est pas, elle doit avoir d'autres marqueurs dans cette région.

On peut aussi utiliser les marqueurs d'ADN si le patient de la famille n'a pas de délétion. Mais alors, on ne sait pas à quoi ressemble la mutation. Mais, connaissant la disposition des marqueurs, il est possible de dire sur quel chromosome X de la mère se trouve le gène muté dont son fils malade a hérité. Dès lors, chaque femme de la famille porteuse du même chromosome X risque d'être une porteuse génétique.

Cette méthode indirecte est utilisée depuis bientôt 20 ans; on connaît toutefois maintenant beaucoup d'autres marqueurs. C'est pourquoi, on peut presque toujours distinguer les deux chromosomes X d'une femme l'un de l'autre et il est rare de nos jours qu'une famille soit non-informative.

Si, toutefois, aucune de ces méthodes ne réussit, on peut marquer certaines régions de gènes sur le chromosome X au moyen de sondes géniques fluorescentes et vérifier ensuite au microscope la présence ou l'absence de points lumineux qui représentent des régions de gènes normaux ou délétés. Mais cette méthode, appelée FISH (fluorescence in situ hybridization) n'est utilisable que si certaines délétions spécifiques ont eu lieu dans la famille (Bartlett *et al.*, 2003).

VII-3- Diagnostic des femmes transmettrices :

Deux cas peuvent se présenter : symptomatique et asymptomatique.

VII-3- 1- Diagnostic des femmes transmettrices symptomatiques :

Bien qu'actuellement l'utilisation des techniques de biologie moléculaire soit prédominante, on ne peut passer sous silence les nombreuses études portant sur le dépistage clinique et paraclinique des conductrices.

- Clinique :

L'âge d'apparition des signes cliniques chez les femmes porteuses de DMD varie de la première à la quatrième décennie (moyen de 34 ans). Les formes les plus précoces sont généralement les plus sévères (perte de l'indépendance locomotrice en fin d'évolution). Les

formes les plus bénignes se manifestent par des douleurs et des crampes musculaires à l'exercice physique (5% des femmes porteuses).

La faiblesse musculaire (20% des femmes porteuses) est le plus souvent légère et asymétrique, et affecte les groupes musculaires proximaux.

Un quart des femmes porteuses présente des anomalies cardiaques (dilatation ventriculaire gauche et plus rarement cardiomyopathie dilatée) (Hoogerwaard *et al.*, 1999).

- Histologique :

Les femmes porteuses symptomatiques présentent des lésions plus marquées : hétérogénéité marquée de la taille des fibres, nombreuses fibres aux noyaux centraux, fibres régénératives occasionnelles, groupe disséminé de petites fibres et augmentation multifocale de quantité de tissus conjonctif. Elles possèdent aussi 20 à 30% de fibres totalement ou partiellement immunonégatives pour la dystrophine (**annexe 5**) (Bonilla *et al.*, 1988). Le nombre immunonégatives n'est pas corrélé avec l'intensité de la faiblesse musculaire (Sewry *et al.*, 1993).

- Technique d'imagerie médicale :

La tomодensitométrie révèle assez tardivement des zones hypodenses dues à l'infiltration conjonctivo-graisseuse (Gilgenkrantz, 1993).

- Biochimique :

Le dosage de la CPK reste l'examen le plus couramment employé. En effet, la CPK est très élevée dans les premiers jours de la vie. Le taux, restés bas jusque vers 5 ans, augmente ensuite progressivement jusqu'à l'adolescence ; après une brusque chute à cette période, ils baissent jusqu'à la ménopause. Cet examen ne permet que de dépister deux tiers des conductrices, le tiers restant présentant des taux de CPK normales (Gilgenkrantz, 1993).

VII-2- 2- Diagnostic des transmettrices asymptomatiques :

Un tiers des femmes porteuses de DMD ou BMD ne présentent pas de signes cliniques et sont asymptomatiques. Elles présentent une légère hétérogénéité de la taille des fibres musculaires squelettiques, un nombre augmenté de fibres aux noyaux centraux et des fibres hyalines occasionnelles, ne possèdent que moins de 5% de fibres totalement ou partiellement immunonégatives pour la dystrophine (Nguyen, 2001).

Les myofibrilles déficientes en dystrophine se caractérisent également par une diminution de quantité des protéines associées (sarcoglycane, syntrophine) en immunohistochimie et par western blot (Nguyen, 2001).

VII-3- Diagnostic prénatal :

Le diagnostic prénatal a pour objectif de déterminer si l'enfant, attendu par un couple appartenant à une famille à risque, est atteint de la maladie familiale ou s'il est sain. Pour se faire, différents prélèvements pourront être pratiqués par un médecin spécialisé sous contrôle échographique : pour un diagnostic fait en début de grossesse, il faut obtenir du tissu de l'enfant à naître, soit par une biopsie des villosités chorionales au cours de la 10^{ème} à la 12^{ème} semaine de grossesse ou par une amniocentèse dans la 13^{ème} à la 16^{ème} semaine (De Recondo *et al.*, 2001).

Les risques que la mère provoque une interruption de grossesse involontaire sont d'environ 3 à 5%. L'avantage d'une amniocentèse est que le risque d'avortement est plus faible, moins de 1%. Le désavantage est que les quelques cellules de l'enfant présentes dans le liquide amniotique doivent d'abord être multipliées en laboratoire et il faut parfois attendre jusqu'à 3 semaines avant de pouvoir commencer l'analyse, c'est-à-dire entre la 15^{ème} et la 18^{ème} semaine.

Si l'on a obtenu suffisamment de cellules de l'enfant, on commence par examiner les chromosomes, ce qui permet de déterminer le sexe de l'enfant. Si c'est une fille, on ne poursuit généralement pas l'examen parce que les conséquences d'être porteuse de la maladie de Duchenne devront être discutées avec la jeune fille quand elle sera en âge de les comprendre et de prendre ses décisions par elle-même (Bartlett *et al.*, 2003). Si l'enfant à naître est un garçon, et la mutation a été préalablement identifiée chez le propositus, on pratique alors une analyse génétique. Dans les autres cas, il faut faire appel à un diagnostic indirect par analyse de liaison au moyen de marqueurs polymorphes intragéniques (**fig. 12**) (Barois *et al.*, 1998).

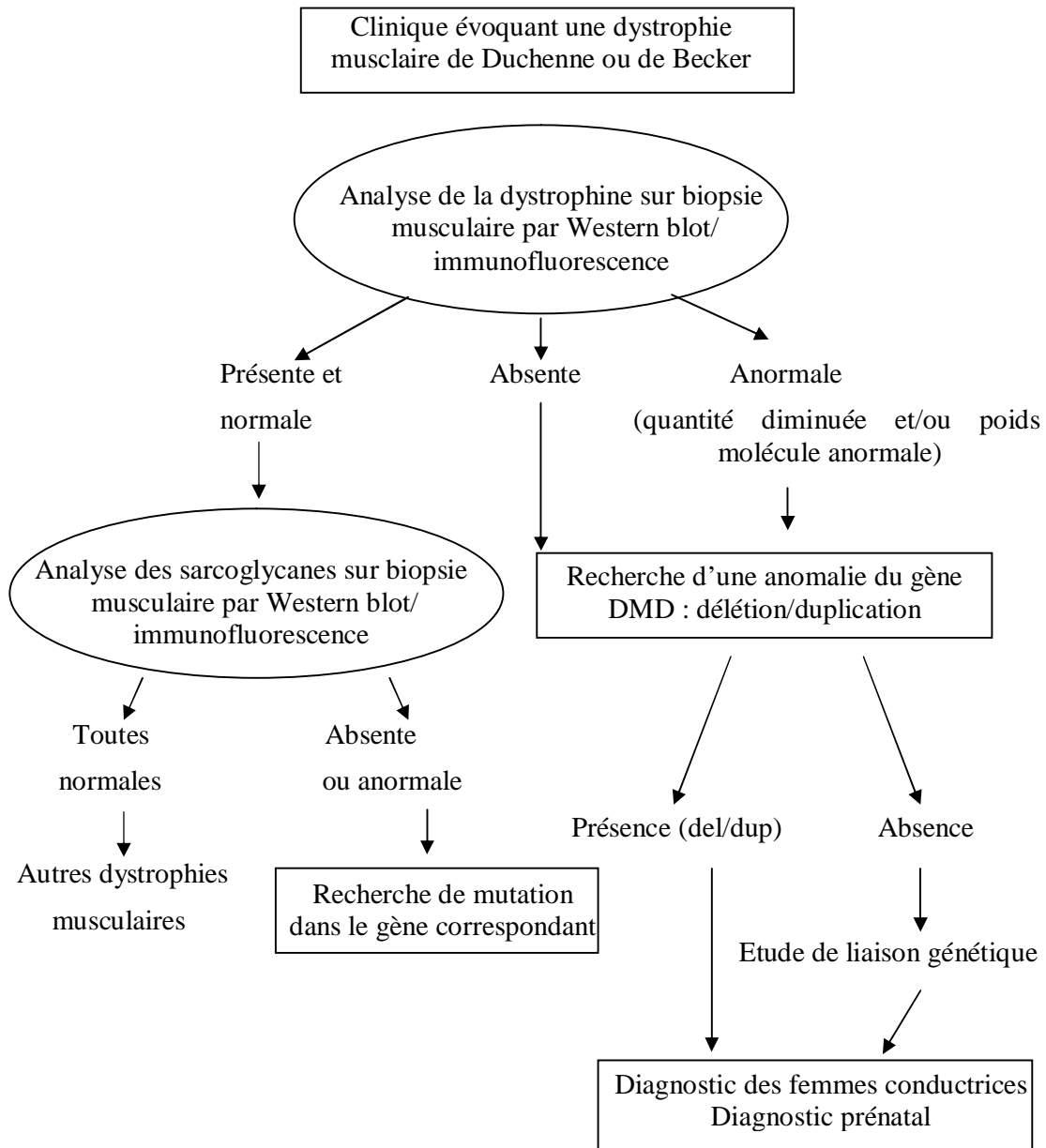


Fig. 12: Stratégie de diagnostic prénatal des dystrophies musculaire progressives (Leturcq et Kaplan, 2000).

VIII- Intérêt des modèles animaux :

Les modèles animaux sont indispensables pour des études physiopathologie d'une part et pour effectuer des essais thérapeutiques pré-cliniques d'autre part.

Il existe trois modèles animaux spontanés caractérisés par une absence d'expression de dystrophine dans leurs fibres musculaires : la souris mdx, le chien Golden Retriever et le modèle félin.

VIII-1- La souris mdx :

Pour la dystrophie musculaire de Duchenne un mutant naturel, la souris mdx (muscular dystrophy X-linked) est connue depuis 1984, elle possède une mutation (transversion d'un nucléotide C en un T) à la position 3185, dans l'exon 23 du gène de la dystrophine. Cette mutation convertit le codon glutamine CAA en un codon stop TAA. Le produit du gène muté de la dystrophine est tronqué (à une taille de 27% par rapport à celle de la dystrophine normale) et ne possède pas la capacité fonctionnelle de s'attacher au sarcolemme. De plus, comme chez les patients DMD, il en résulte une absence marquée du complexe glycoprotéique associé à la dystrophine (Chamberlain *et al.*, 2002).

Par contre, les souris mdx, comparées aux humains, ne présentent que peu de phénotypes associés à la maladie et elles ont la capacité de se reproduire. On observe peu de fibres musculaires en nécrose et elles sont continuellement remplacées par des fibres régénératrices au lieu du tissu conjonctif (Dunant, 2003).

La souris mdx a été utile lors de recherches pour expliquer les mécanismes de bris des fibres musculaires, pour des essais de transfert de myoblastes et pour des essais de thérapies géniques visant à rétablir l'expression de tout ou une partie de la dystrophine (Nguyen, 2001).

Une autre souche de souris mdx a été produite par mutagenèse chimique pour inactiver le gène de la dystrophine. La souris mdx3Cv n'exprime pas les isoformes de 427 kDa et de 70 kDa de la dystrophine. La différence entre la mdx3Cv et la mdx est que très peu de nouveau-nés par portée de mdx3Cv survivent. Le développement de la maladie s'effectue de la même manière que chez la souris mdx (Chamberlain *et al.*, 2002).

VIII-2- Le chien Golden Retriever :

L'absence de dystrophine chez les chiens cause une myopathie et une cardiomyopathie similaire aux patients DMD. L'affection canine, décrite pour la première fois par Valentine et al. en 1986 et Kornegay et al. en 1988 (Krag, 2003), est appelée « GRMD » (Golden Retriever Muscular Dystrophy). On observe des taux de CPK élevés qui sont augmentés par l'exercice. Les chiens dystrophiques ont une stature raide avançant à petits pas, une démarche chambranlante, une difficulté à ouvrir la mâchoire et à se nourrir. Ils salivent aussi excessivement à cause de l'épaississement de la base de leur langue. Du point de vue histologique, les fibres nécrosées sont graduellement remplacées par du tissu fibreux causant une atrophie. Seule la partie amino-terminale de la dystrophine canine peut être détectée à l'aide d'anticorps chez les chiens atteints de la maladie (Dunant, 2003). La mutation est causée par un changement d'une base A par G à l'intérieur d'un site d'épissage consensus situé à l'extrémité 3' de l'intron 6, un déplacement du cadre de lecture et un codon stop prématuré, ce qui résulte en une protéine manquant les exons 6 à 8 de 390 kDa (91% de la taille normale) (Nguyen, 2001).

Les avantages du modèle GRMD sont : la très grande similitude avec la dystrophie musculaire de Duchenne et le format des animaux, comparable avec celui des enfants dystrophiques susceptibles d'être l'objet d'une thérapie.

VIII-3- Le modèle félin :

Les dystrophies chez les chats sont plus rares et les symptômes sont observés durant leur première ou leur deuxième année de vie. Les chats malades présentent un élargissement musculaire, une langue proéminente, une mobilité affectée et des signes de cardiomyopathie. Sur des coupes de muscles, on observe des amas de fibres musculaires nécrotiques et un faible marquage pour la dystrophine. Le site de mutation n'a pas été identifié à ce jour (Camirand, 2004).

Le modèle félin est donc particulièrement intéressant dans l'étude des facteurs de progression des dystrophinopathies et dans l'évaluation des thérapies éventuellement utilisables en phase précoce de la dystrophie musculaire de Duchenne (Nguyen, 2001).

VIII-4- Autres modèles animaux :

Quelques laboratoires utilisent aussi des invertébrés tel que *Cænorhabditis elegans* parce que ses 19733 gènes sont connus, possède 959 cellules de son corps, dont 95 sont des cellules musculaires. Ses muscles possèdent une dystrophine similaire à celle de l'homme, qui peut aussi subir des mutations entraînant des symptômes dystrophiques. (Segalat, 2002) et plus récemment la drosophile (Basset, 2005).

IX- Possibilités thérapeutiques :

Pour guérir la dystrophie musculaire de Duchenne ou de Becker, conséquence de la mutation qui a endommagé le gène de la dystrophine, la dégénérescence musculaire doit être stoppée ou tout au moins allégée. Actuellement, il n'existe aucun traitement capable de ralentir l'inexorable progression de la DMD ou BMD. Plusieurs équipes scientifiques poursuivent leurs recherches dans le but de trouver une thérapie efficace pouvant contrer les effets néfastes liés à l'absence de dystrophine dans les muscles des patients. Trois approches thérapeutiques sont particulièrement intéressantes : la thérapie médicamenteuse, la thérapie cellulaire et la thérapie génique.

IX-1- La thérapie médicamenteuse :

Les premiers essais pour améliorer les conditions de vie des patients souffrant de la DMD ont impliqué l'utilisation de médicaments visant à ralentir la progression de la maladie. Bien qu'il n'existe aucune thérapie pharmacologique à ce jour contre la DMD, certains médicaments comme la prednisone et le déflazacort ont été utilisés.

La prednisone a démontré un effet bénéfique pour les malades DMD, les patients ont démontré un ralentissement significatif de la progression de la maladie ainsi qu'une augmentation de leur masse musculaire.

L'utilisation du déflazacort, chez des patients atteints de DMD a permis de démontrer le maintien des fonctions motrices au même niveau que l'utilisation de la prednisone (Camirand, 2004). Ainsi, l'administration de ces deux corticostéroïdes pourrait entraîner une augmentation de la synthèse de protéines apparentées à la dystrophine (l'utrophine par exemple), protéines exprimées chez les patients dystrophiques. Cette expression semble ralentir la dégénérescence du muscle (Huard, 1998).

La créatine: L'administration journalière de 5 grammes d'hydrate de créatine pour les enfants et de 10 grammes pour les adultes a montré un effet bénéfique à court terme, léger mais significatif, sur la force musculaire et la performance, sans aucun effet secondaire (Bussel *et al.*, 2002).

Des pistes de recherche consistant à développer des moyens de surexprimer l'utrophine : en 1989, le groupe de Davis a découvert une protéine homologue de la dystrophine à 80% qui est exprimée tout au long du sarcolemme chez l'embryon et seulement au niveau de la jonction neuromusculaire chez l'adulte (Dunant, 2003). L'utrophine

surexprimée pourrait prendre la place et assurer la fonction de la dystrophine déficiente. Cette protéine a l'avantage, sur la dystrophine, de ne pas risquer de provoquer de réaction immunitaire puisque l'organisme connaît déjà cette protéine. De nombreux travaux ont été consacrés à la surexpression de l'utrophine chez la souris mdx (Gillis, 2004) ; parmi les substances qui pourraient provoquer cette surexpression sous la totalité du sarcolemme et ainsi offrir une solution alternative à l'expression de la dystrophine : les glucocorticoïdes, et parmi eux la prednisone, peuvent activer dans une certaine mesure le gène de l'utrophine. La L-arginine, un acide aminé, peut augmenter la quantité d'utrophine chez la souris mdx et soulager notablement les symptômes dystrophiques (Bussel *et al.*, 2002).

D'autres stratégies, moins conventionnelles, impliquant l'utilisation de protéines recombinantes ou d'anticorps sont maintenant à l'étude. En effet, la découverte d'une délétion dans le gène de la myostatine chez une race de bovins Belges résultait en une masse musculaire 20% plus importante. De plus les souris transgéniques sans le gène de la myostatine sont jusqu'à 3 fois plus massive que les souris normales. Puisque le produit du gène de la myostatine agit comme un régulateur négatif de la croissance musculaire, on cherche maintenant à bloquer son activité. Certains groupes sont actuellement en train de tester l'efficacité d'anticorps dirigés contre la myostatine. L'injection hebdomadaire d'anticorps contre la myostatine a déjà permis d'augmenter le poids d'environ 12% chez des souris mdx et d'augmenter leur force musculaire (Bogdanovich *et al.*, 2002).

IX-2- La thérapie cellulaire :

IX-2-1-Transplantation de myoblastes normaux :

Les muscles ont leurs propres cellules souches, les cellules satellites ou myoblastes, qui, durant le développement ou la réparation des muscles, fusionnent les unes avec les autres pour donner des myotubes, puis de longues fibres musculaires.

Dans les années 1990 et 1991, toute une série d'essais cliniques de transfert des myoblastes ont été effectués chez des enfants atteints de la maladie de Duchenne avec une technique qui avait montré des résultats positifs chez la souris mdx. Les myoblastes ont été prélevées sur un donneur sain, le plus souvent le père de l'enfant, et contenant donc le gène normal de la dystrophine, ces cellules ont été injectées en de nombreux endroits, à 0,5 cm de distance, directement dans des muscles dystrophiques. Ces expériences n'ont pas réussi chez les garçons atteints de la dystrophie musculaire de Duchenne parce que les myoblastes n'ont pas migré suffisamment loin des points d'injection, qu'il y a eu des problèmes

immunologiques et que, surtout, presque tous les myoblastes injectés sont morts peu après (Labrecque *et al.*, 1991).

Le succès limité des essais cliniques effectués chez l'homme a confirmé qu'il était nécessaire d'améliorer la méthode de transplantation de myoblastes pour augmenter l'efficacité thérapeutique de cette technique (Bartlett *et al.*, 2003). Le groupe de Tremblay a identifié trois types de problèmes pouvant expliquer la faible efficacité de la transplantation de myoblastes (Skuk et Tremblay, 2003) :

- 1) la faible dispersion des myoblastes hors des sites d'injections ;
- 2) la mort rapide des myoblastes suite à l'injection ;
- 3) le rejet à moyen et long terme dû à la réponse immune spécifique.

IX-2-2- Thérapie par l'utilisation de cellules souches :

L'utilisation de cellules de la moelle osseuse pour former du tissu musculaire a récemment soulevé un grand intérêt. La découverte de l'implication des cellules de la moelle osseuse dans la régénération musculaire ouvre la porte à une nouvelle thérapie pour le traitement de la dystrophie musculaire. En effet, les cellules de la moelle osseuse semblent participer à la formation de fibres musculaires normales, en migrant de la circulation sanguine aux sites de régénération (Ferrari *et al.*, 1998; Gussoni *et al.*, 1999). De plus, l'injection de cellules de la moelle osseuse directement dans le muscle a permis la production de fibres musculaires, à un taux plus faible, que l'injection de cellules d'origine musculaire (Caron, 2004). Cependant, le faible taux de migration des cellules de la moelle osseuse aux muscles ne permet pas d'envisager cette application comme traitement des dystrophies musculaires.

IX-3- La thérapie génique :

La thérapie génique consiste à introduire un ou plusieurs gènes d'intérêt à l'intérieur des cellules d'un organisme en utilisant différents vecteurs. Le but thérapeutique est de faire exprimer la dystrophine à l'intérieur des fibres musculaires. Des obstacles restent encore à franchir avant de pouvoir envisager d'appliquer efficacement cette technique à l'homme. Des problèmes comme la très grande taille du gène de la dystrophine (ce qui le rend difficile à transporter par un vecteur), l'introduction de leur matériel génétique à l'intérieur d'un grand nombre de fibres musculaires post-mitotiques, la persistance de l'expression du gène introduit et leur capacité à échapper au système immunitaire.

De manière générale deux types de thérapie génique ont été tentés in vivo : l'injection intramusculaire de plasmides et l'utilisation de vecteurs viraux.

L'injection de plasmides contenant le gène de la dystrophine n'a pas permis d'observer l'expression de la dystrophine que dans 1% des fibres musculaires (Acsadi *et al.*, 1991).

Plus récemment, l'électrotransfert de plasmides, contenant un gène rapporteur, à l'intérieur des muscles de souris mdx, a permis d'obtenir une expression atteignant 40% des fibres (Vilquin *et al.*, 2001). Cette expression a été prolongée à plus de 10 semaines sous une immunosuppression transitoire ou soutenue, comparée à une expression de 3 semaines sans immunosuppression. Dans cette même étude, un plasmide de grande taille contenant le gène de la dystrophine en fusion avec le gène de l'eGFP (enhanced green fluorescent protein) a été électrotransféré à l'intérieur de muscles de souris mdx. Cette technique nécessite par contre des injections répétées de plasmides pour une expression à très long terme et est limitée par son accès à certains muscles (Huard, 1998).

L'emploi de l'adénovirus a permis l'introduction du gène de la mini-dystrophine (dystrophine tronquée ayant les parties C et N terminales intactes) à l'intérieur de 50% des fibres musculaires 15 jours après l'injection du virus (Ragot *et al.*, 1993). Par contre, l'expression de la mini-dystrophine a été grandement diminuée six mois suivant l'injection (Harper *et al.*, 2002).

La mise au point de vecteurs chargés de transporter le gène thérapeutique à l'intérieur des cellules malades progresse. Les nouveaux vecteurs deviennent plus efficaces, mieux adaptés et mieux tolérés. Parmi eux, les travaux sur l'adénovirus ont abouti à la mise au point d'un adénovirus dit de "3^{ème} génération". Moins immunogène, il est capable de transporter des gènes thérapeutiques de grande taille, comme la partie codante du gène de la dystrophine. Mais il ne peut infecter que les fibres musculaires jeunes (qui se divisent encore). De son côté, l'AAV (adeno-associated virus) bénéficie d'un avenir prometteur : ce virus non pathogène, ne peut transporter que des petits gènes mais infecte des cellules musculaires matures (qui ne se divisent plus) et y incorpore le gène médicament de façon stable. Il est déjà utilisé à titre expérimental chez l'animal dans une autre forme de dystrophie musculaire (chez le hamster syrien, modèle animal de la δ -sarcoglycanopathie).

L'élaboration d'un minigène (ADN complémentaire raccourci) de la dystrophine permet son inclusion dans un vecteur de type AAV (adénovirus associé). Après injection intra-musculaire du vecteur, les dystrophines tronquées produites sont retrouvées dans la

membrane cellulaire des souris mdx dont la dystrophie musculaire peut ainsi se corriger jusqu'à 80%. Des travaux sont en cours pour tester les potentialités thérapeutiques de ces constructions (Leturcq et Kaplan, 2005).

Un essai de phase I de thérapie génique (étude de tolérance et de faisabilité sans bénéfice thérapeutique attendu) est en cours chez l'homme depuis septembre 2000 dans la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD). Les malades doivent recevoir une injection intramusculaire d'ADN contenant la séquence codante de la dystrophine. L'étude se déroule à l'Institut de Myologie (Paris), en collaboration avec la société Transgène. Après avoir testé plusieurs méthodes de transfert de gènes sur des souris et des chiens dystrophiques, il a été décidé d'utiliser tout l'ADNc du gène d'une dystrophine de pleine longueur emballé dans un plasmide servant de vecteur en compagnie d'un puissant promoteur tiré d'un virus. Les plasmides présentent l'avantage de ne contenir aucune protéine et ne devraient donc provoquer aucune réaction immunitaire. Le gène thérapeutique à transporter n'a pas non plus de protéine, c'est de l'ADN pur, ou nu. D'autres essais préliminaires, avec des cultures de cellules musculaires et des souris, ont montré que ce vecteur donnait naissance à la nouvelle dystrophine à l'endroit correct, sous la membrane de la cellule musculaire des animaux, qu'il restaurait le complexe dystrophine-glycoprotéine et qu'il prolongeait la vie des cellules (Klein et Jaeger, 2001).

Il n'y a eu aucun signe de rejet, ni contre le plasmide, ni contre la dystrophine nouvellement produite. Ceci était la réponse à la question de l'étude de phase I: le transfert de gènes avec de l'ADN nu est une manipulation sûre. Elle pourrait, après amplification, devenir un moyen thérapeutique, car les essais chez l'animal, montre la production de dystrophine dans 20% environ des fibres musculaires améliorerait nettement la fonction musculaire (Fardeau *et al.*, 2001).

Le saut d'exon : La technique du saut d'exon a pour objectif de changer une mutation Duchenne en mutation Becker par la correction de l'ARNm. Dans le cas où une délétion ou une mutation ponctuelle entraîne un décalage du cadre de lecture induisant une dystrophie de Duchenne, le cadre de lecture normal peut être restauré en éliminant artificiellement de l'ARNm, un ou plusieurs exons placés aux bornes de la mutation, par des oligoribonucléotides antisens. Il s'agit d'ARNs courts d'environ 20 nucléotides dont les séquences sont conçues de façon à ce que l'appariement ne se fasse qu'avec la séquence complémentaire correspondante à l'exon à éliminer. En masquant les sites d'épissages (**fig. 13**), ces oligonucléotides font en sorte que les exons ciblés ne soient plus inclus dans

l'ARNm. Après un mois de l'injection intramusculaire ou intra-artérielle du vecteur viral l'AAV chez la souris mdx, une restauration efficace et durable de la synthèse de dystrophine. Depuis plus de six mois, le niveau d'expression de la dystrophine reste stable chez ces souris (**fig. 14**) (Goyenvalle *et al.*, 2004).

Le transfert d'oligonucléotides a été testé par transfection de cellules musculaires en culture provenant de patients atteints de dystrophie musculaire de Duchenne et portant des délétions et des mutations non sens grâce à la technique du saut d'exon. Dans chaque cas le saut de l'exon cible a été obtenu et la synthèse de dystrophine restaurée à 75 %. Une étude hollandaise décrit le succès de transferts d'oligonucléotides antisens induisant des doubles et triples sauts pour les exons 43 et 44, 46 à 50 dans des myotubes de deux patients DMD en culture (Aartsma-Rus *et al.*, 2004).

Saut d'exon sur des souris modèles Duchenne

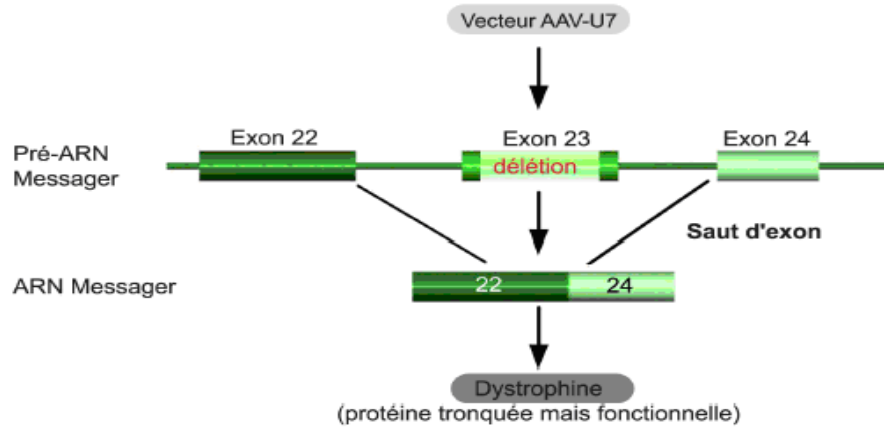


Fig. 13 : Le principe de la technique du saut d'exon pour que l'épissage ignore l'exon défectueux (chez ces souris, il s'agit de l'exon 23) (AFM-Genethon, 2004).

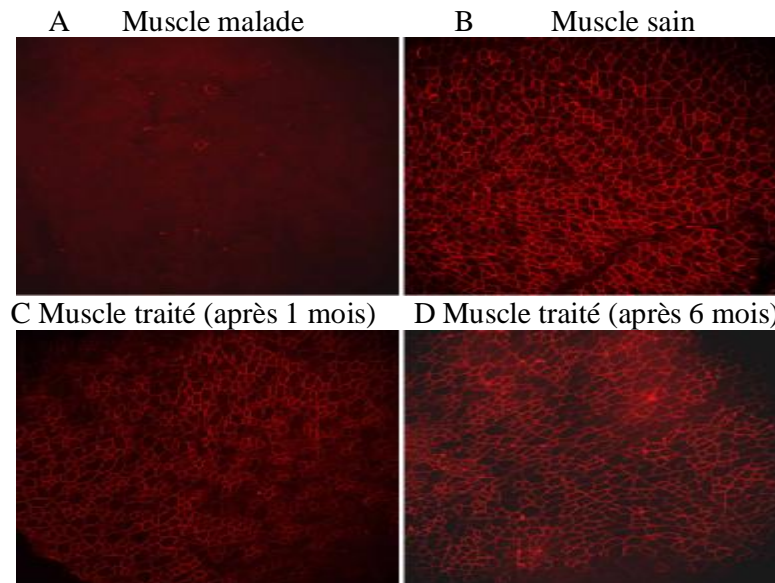


Fig. 14 : Immunomarquage sur sections de muscles de souris *mdx* non traitée (A), de souris normale (B), de souris *mdx* 1 mois (C) et 6 mois (D) après l'injection de l'AAV-U7 (Goyenvalle *et al.*, 2004).

Méthodologie

I- Patients :

I-1- Description de la population d'étude :

Notre étude a porté sur 33 patients remplissant les critères diagnostiques de dystrophinopathies. Ils appartiennent à 28 familles venant de différentes régions du territoire national. Tous les patients ont été référés pour l'analyse de l'ADN au service de neurologie du C. H. U. de Constantine. L'âge des patients varie entre 2 et 37 ans.

I-2- Examen clinique :

Cet examen détaillé a inclus diverses informations d'ordre général sur le motif de consultation, des antécédents familiaux, l'âge et les signes de début, le bilan neurologique clinique, les signes associés, le mode de transmission; accompagnés des examens complémentaires tels que le bilan biochimique (CPK, LDH) et l'EMG et l'ECG. Le phénotypage de ces patients est basé sur les paramètres cliniques tels que la sévérité de la faiblesse musculaire, l'âge de début de la maladie et l'âge de la perte de l'autonomie de la marche.

I-3- Critères d'inclusion et d'exclusion :

Seuls les patients jeunes présentant un arbre généalogique compatible avec une transmission récessive liée à X, la présence de cas similaires chez les apparentés, ayant montré les signes de la maladie tôt dans leur enfance, le début et la prédominance de la faiblesse musculaire au niveau des membres inférieurs, ainsi qu'un taux des CPK élevées et un EMG de type myogène ont été retenus.

Les malades qui avaient une atteinte faciale, oculopharyngée ou un phénomène myotonique ont été exclus de notre étude.

Les jeunes patients qui avaient des fasciculations avec hypertrophie des mollets et CPK élevées ont été également exclus car considérés cliniquement comme présentant une amyotrophie spinale infantile.

I-4- Définition du phénotype des patients selon l'âge de la perte de la marche :

Les patients ont été classés en deux catégories tranchées, Duchenne ou Becker, selon le diagnostic du clinicien mais certains malades ne sont pas classés à cause de leur cursus évolutif qui ne ressemblait pas à un cas typique Duchenne ou lorsque l'enfant était encore trop jeune pour prédire l'évolution de sa maladie. Ainsi, ont été classés Duchenne, les patients

qui sont confinés au fauteuil roulant avant l'âge de 13 ans, Becker, les malades qui ont encore une marche autonome passé l'âge de 16 ans et comme cas intermédiaires, les patients qui ont perdus l'indépendance locomotrice entre 13 et 16 ans, ou qui, encore jeunes ne semblent pas suivre une évolution typique de dystrophie musculaire de Duchenne sévère.

Deux catégories de malades ont été distingués :

- Les cas familiaux : lorsque au moins deux individus sont atteints dans la famille et que la mère d'un enfant atteint présente un taux de CPK élevé.

- Les cas sporadiques : lorsque l'enquête familiale ne retrouve aucun autre patient dans la famille et que le taux de CPK est normal chez les femmes susceptible d'être conductrices.

Nous avons entrepris une analyse systématique de l'ADN par PCR multiplex des 33 patients recrutés, dont :

- 18 patients DMD,
- 7 patients BMD,
- 2 patients présentent la forme intermédiaire,
- 6 patients n'ont pas encore atteint l'âge de la perte de la marche.

Tableau 3 : Répartition des malades selon l'âge de début de la maladie, de la perte de la marche et l'âge actuel.

Patients	Age de début de la maladie (années)	Age de la perte de la marche (années)	Age actuel (années)
M1	6	9	13
M2	4	12	16
M3	6	10	12
M4	6	L'enfant marche	9
M5	-	L'enfant marche	5
M6	5	12	13
M7	2	L'enfant marche	6
M8	4	13	15
M9	-	-	13
M10	3	9	13
M11	2	L'enfant marche	7
M12	4	11	16
M13	5	10	16
M14	8	L'enfant marche	14
M15	7	15	15
M16	3	Marche sur la pointe des pieds	12
M17	7	Marche sur la pointe des pieds	11
M18	6	Marche sur la pointe des pieds	15
M19	7	12	12
M20	10	L'enfant marche	15
M21	25	Marche	37
M22	4	L'enfant marche	12
M23	6	15	16
M24	6	17	26
M25	-	Marche sur la pointe des pieds	18
M26	-	L'enfant marche	8
M27	-	L'enfant marche	8
M28	4	Marche sur la pointe des pieds	8
M29	4	Marche difficilement	9
M30	4,5	Marche sur la pointe des pieds	7,5
M31	3	Marche sur la pointe des pieds	11
M32	3	9	12
M33	3	9	14

On remarque qu'il existe une variabilité dans l'âge de début de la maladie ainsi que dans son évolutivité.

II- Méthodes :

II-1- L'enquête familiale :

L'interrogatoire des parents du malade est indispensable afin de récapituler l'histoire évolutif de la pathologie ainsi que pour rechercher des cas similaires chez les apparentés et le mode de transmission. Il faut toujours tracer un arbre généalogique (**annexe 6**) et rechercher s'il y a une consanguinité. Nous avons également recherché dans la famille d'autres pathologies qui pourraient avoir un rapport avec une affection musculaire (cardiopathie, douleurs musculaires, des crampes, hypertrophie des mollets...) ainsi que les décès.

II-2- Le bilan biologique :

La présence des CPK en grande quantité dans le sang est un indicateur de la dégradation du muscle. Chez nos patients nous avons dosé la créatines phosphokinases (CPK) et la lactate déshydrogénase (LDH) parfois dans le sérum qui a été retenus comme critère diagnostique dans notre étude. Les valeurs normales de CPK sont comprises entre 25 et 170 UI/L et de LDH entre 220 et 450 UI/L. Ces dosages sont effectués au laboratoire de biochimie au C.H.U de Constantine. Le dosage des CPK est réalisé également dans le but de dépister les porteuses de maladie de DMD ou BMD (mères et les sœurs). Une autre application importante dans le dosage de la CPK est de permettre de diagnostiquer très précocement la dystrophinopathie dans la fratrie d'un myopathe confirmé.

II-3- Electromyographie :

L'électromyographie consiste à étudier l'activité électrique des muscles striés. Elle apporte donc des renseignements sur leur fonctionnement. Dans la DMD ou la BMD, l'électromyogramme révèle un tracé de type myopathique : absence d'activité musculaire au repos, diminution de la durée des potentiels d'unité motrice et des potentiels polyphasiques. Il existe aussi un contraste entre la faiblesse des mouvements volontaires et la richesse du tracé recueilli. Un EMG a été pratiqué chez les 33 patients (à mettre dans résultats et qui est de type myogène.

II-3- La biopsie musculaire :

La mise en évidence par immunohistochimie de l'anomalie de la dystrophine musculaire, permet de formuler un diagnostic de certitude mais malheureusement elle n'est pratiquée chez quelques malades.

Résultats

II-4- L'électrocardiographie :

Un ECG est demandé chaque année chez nos patients pour rechercher une éventuelle atteinte cardiaque.

II-5- L'analyse moléculaire :

Le prélèvement sanguin permet d'étudier l'ADN et plus précisément d'identifier l'anomalie moléculaire du gène de la dystrophine responsable de la maladie.

On procède à cette analyse en plusieurs étapes :

I-5-1- Extraction de l'ADN :

Toute étude de génétique moléculaire implique la disposition d'échantillon d'acides nucléiques, les leucocytes sanguins représentent la source majeure d'ADN. Les autres sources cellulaires peuvent être des biopsies musculaires des malades ou des biopsies de villosités choriales ou des cultures de cellules amniotiques (amniocytes, fibroblastes...). Dans la grande majorité des cas, la technique d'extraction de l'ADN doit être adaptée à l'échantillon biologique, à la nature du génome, au nombre de copie dans l'échantillon et aux méthodes de biologie moléculaire utilisées ultérieurement (PCR, Southern blot...).

Les procédés d'extraction et de purification d'ADN varient, dans notre étude nous avons utilisés la méthode au NaCl.

I-5-1-1- Principe :

Les leucocytes sont séparés du sang total par lyse et traités ensuite par un détergent (SDS) et une protéinase K. l'ADN nucléaire est libéré dans le milieu et les protéines qui lui sont digérées et éliminées par précipitation au NaCl. La pelote d'ADN est formée dans le surnageant par précipitation avec l'éthanol.

I-5-1-2- Préparation du culot leucocytaire :

10 ml de sang sont prélevés sur anticoagulant (EDTA qui permet d'inhiber l'action des enzymes de type DNase qui pourraient dégrader l'ADN).

1- Dans un tube Falcon de 50 ml mettre le sang et compléter à 50 ml avec du TE 20 : 5 (Tris 20 mM, EDTA 5 mM). Laisser 10 min dans la glace.

2- Centrifuger 10 min à 3900 tours/min.

- 3- Aspirer le surnageant avec la trompe à vide.
- 4- Le lavage consiste à verser le surnageant en conservant le culot formé, puis à rajouter à nouveau le TE 20 : 5 (compléter à 25 ml) et laisser 10 min dans la glace.
- 5- Centrifuger dans les mêmes conditions que la première fois.
- 6- Aspirer le surnageant avec la trompe à vide : obtention d'un culot de leucocytes (si on veut s'arrêter à ce niveau les mettre dans un tube conique de 15 ml avec du TE 10 : 1 et les conserver à -20°C dans le frigo).

I-5-1-3- Extraction de l'ADN :

- 1- Transvaser le culot de leucocytes dans un tube Falcon de 15 ml.
- 2- Ajouter 3 ml de tampon de lyse (NaCl 400mM, EDTA 2Mm, Tris 10mM, pH 8,2).
- 3- Ajouter 200µl de SDS 10% ce qui a pour effet de détruire les membrane des globules blancs et de libérer l'ADN total.
- 4- Ajouter 100µl de protéinase K à 10 mg/ml ce qui a pour digérer toutes les protéines.
- 5- Agiter le tube sur une roue à 37°C pendant une nuit.
- 6- Le lendemain, refroidir dans la glace.
- 7- Ajouter 1 ml de NaCl 4M et agiter vigoureusement à la main.
- 8- Remettre 5 min dans la glace (précipitation des protéines).
- 9- Centrifuger 15 min à 2500 tours/min.
- 10- Transvaser le surnageant dans un tube Falcon de 50 ml, ajouter 2 fois son volume d'éthanol absolu préalablement refroidi et agiter on retournant le tube plusieurs fois : la pelote d'ADN se forme.
- 11- laisser éventuellement 30 min à -20°C si la pelote ne se forme pas.
- 12- Récupérer la pelote d'ADN avec une pipette Pasteur et la rincer 2 fois dans l'éthanol 70%.
- 13- Mettre la pelote dans un tube Ependorff de 1,5ml.

1-5-2- Solubilisation :

- 1- Ajouter entre 300 et 1000µl de TE 10 : 1 selon la grosseur de la pelote et la concentration souhaitée.

2- laisser une nuit sur agitateur rotateur à 37°C, puis à 4°C jusqu'à dissolution complète (1 à 2 jours).

1-5-3- Détermination de la concentration et de la pureté de l'ADN :

La concentration de l'ADN et sa pureté sont déterminées grâce à la lecture de la densité optique à l'aide d'un spectrophotomètre. Les bases puriques et pyrimidiques absorbent fortement dans l'ultraviolet à 260 nm. Il faut rechercher une éventuelle contamination protéique (les protéines absorbent à 280 nm ainsi qu'à 260 nm), pour cela on effectue une seconde lecture de densité optique à 280 nm.

1-5-3-1- Détermination de la pureté de l'ADN :

- 1- Mettre 1000µl d'eau distillée dans une cuve pour mesurer le zéro expérimental.
- 2- Ajouter 10µl d'ADN dans un tube contenant 990µl d'eau distillée (l'échantillon est dilué au 1/10 dans l'eau distillée). Bien vortexer le mélange et le transvaser dans une cuve.
- 3- Après avoir fait le zéro sur la cuve d'eau distillée, mesurer la DO à 260 nm.
- 4- Faire le zéro une autre fois à 280 nm et mesurer ensuite la DO.
- 5- Calculer le rapport DO_{260}/DO_{280} pour évaluer la pureté de l'ADN.

Un ADN pur doit avoir un rapport DO_{260}/DO_{280} compris entre 1,6 et 2 (l'ADN est contaminé par les protéines si $DO_{260}/DO_{280} < 1,6$ et par les ARN si $DO_{260}/DO_{280} > 2$).

Dans le cas où l'ADN est contaminé cela ne laisserait pas aboutir à des bons résultats dans les étapes suivantes de son analyse par PCR. Il est donc indispensable de procéder à la réextraction de la pelote afin d'obtenir la pureté souhaitée (**annexe**).

Les échantillons sont conservés à 4°C pour une utilisation fréquente ou à -80°C pour une longue durée.

1-5-3-2- Détermination de la concentration :

La densité optique à 260nm permet de calculer la concentration de l'ADN sachant que :

$$1 \text{ unité de DO à } 260\text{nm} = 50\mu\text{g/ml d'ADN double brin.}$$

Exemple : pour un ADN solubilisé dans 1000µl de TE10:1 ayant une $DO_{260}=0,083$

$$1 \text{ unité de } DO_{260\text{nm}} \longrightarrow 50\mu\text{g/ml d'ADN}$$

$$0,083 \text{ de } DO_{260\text{nm}} \longrightarrow X$$

$$X = 0,083 \times 50 = 4,15\mu\text{g/ml}$$

Considérant que l'ADN est dilué à 1/100 donc : $4,15 \times 100 = 415 \mu\text{g/ml}$.

Donc la concentration de l'ADN en $\mu\text{g/ml} = \text{facteur de dilution} \times \text{DO}_{260} \times 50 \mu\text{g/ml}$.

1-5-4- Amplification de l'ADN par PCR multiplex pour la recherche des macro-délétions du gène de la dystrophine :

C'est un protocole destinée à amplifier plus d'un amplicon à la fois, généralement en ajoutant un couple d'amorce par type désiré. Les produits de PCR ne seront alors compétitifs que pour la polymérase, les dNTP.

La recherche de délétions dans le gène de la dystrophine par deux PCR multiplex selon Chamberlain et Beggs, explorant 19 exons correspondant aux points les plus fréquemment délétés. Cette technique permet de détecter 98% des délétions retrouvées dans 70% des cas de dystrophinopathies.

Chaque réaction de PCR est réalisée dans un volume final de $50 \mu\text{l}$, contenant 100ng de chaque amorce, 25 mM de dNTP, tampon TC 10X, de la taq polymérase (Eurobio), le DMSO (les conditions d'amplification sont celles décrites par Beggs et Chamberlain).

Chaque exon a une taille différente des autres, mais la différence doit être suffisante pour qu'on puisse les distinguer.

1-5-4-1- Principe :

L'amplification est réalisée par une réaction de polymérisation en chaîne, ou PCR, qui requiert des amorces pour chaque exon. Les amorces sont des petites séquences d'ADN synthétisées qui se fixent au début et à la fin d'une séquence d'exon. Les petits fragments de gène ainsi obtenus sont séparés par électrophorèse car ils migrent à différentes distances dans une couche de gel et peuvent ensuite être rendus visibles sous forme de bandes de gel, mais à des distances variables. Chaque bande correspond à un des 19 exons amplifiés. Une délétion se manifeste par l'absence d'une ou plusieurs de ces bandes.

L'amplification simultanée de 19 exons du gène de la dystrophine s'effectue par deux mélanges d'oligonucléotides I et II permettant l'amplification de 10 exons et 9 exons simultanément. Les amorces sont choisis de telle façon que les différents produits d'amplification obtenus au sein d'une seule réaction aient de tailles différentes et soient donc facilement individualisés.

- Le mélange I amplifie les exons : 4, 8, 12, 17, 19, 44, 45, 46, 48, 51.

- Le mélange II amplifie les exons : Pm, 3, 6, 13, 43, 47, 50, 52, 60.

1-5-4-2- Préparation de la PCR multiplex (selon les méthodes de Chamberlain et Beggs, 1988) :

1- Dans un tube Eppendorff de 0,5 ml, ajouter successivement pour chaque individu a étudié les solutions suivantes :

	MIX I (µl)	MIX II (µl)
Tampon TC 10X	5	5
DMSO	5	5
dNTP 25mM	3	3
Eau distillée	13	13
Mélange d'amorce (0,5µM) PI	9	-
Mélange d'amorce (0,5µM) PII	-	9
Total	35	35

1- Vortexer bien le mélange MIX I et MIX II.

2- Dans deux autres tubes Eppendorf de 0,2 ml, déposer 1µl d'ADN du malade et 10µl d'eau distillée dans chacun.

3- Ajouter 35µl du MIX I dans le premier tube et 35µl du MIX II dans le deuxième tube.

4- Placer les tubes dans le thermocycleur contenant le mélange à amplifier et programmer l'appareil à PCR de la manière suivante :

- Dénaturation à 94°C pendant 7 min.
 - Hybridation à 56°C pendant 2 min.
 - Elongation à 72°C pendant 3 min.
 - Dénaturation à 92°C pendant 1 min.
 - Hybridation à 56°C pendant 2 min.
- } Un cycle

- Extension finale à 72°C pendant 10 min.

5- L'appareil à PCR est mis sur pause à 56°C du premier cycle pour ajouter dans chaque tube 4µl de taq polymérase diluée : 0,8µl de taq polymérase diluée dans 3,2µl d'eau distillée.

6- Relancer l'appareil en appuyant sur la même touche après l'extension finale à 72°C, le produit PCR peut être conservé à 4°C.

1-5-4-3- Electrophorèse sur gel d'agarose-Nusieve :

1-5-4-3-1- Préparation du gel d'agarose-Nusieve :

Composition du gel :

- 2% agarose
 - 1% Nusieve
 - 100ml du TBE X1
- } Agiter bien le mélange

Faire chauffer l'agarose/Nusieve au micro-onde pendant 1 à 2 min puis ajouter 10µl de Bromure d'Ethidium.

Laisser refroidir légèrement puis couler le gel et introduire le peigne de façon à ce que les dents forment des puits lors de la polymérisation du gel.

1-5-4-3-2- Dépôt de l'échantillon :

Après fixation du gel en position horizontal sur la cuve d'électrophorèse,

- Remplir la cuve avec le tampon TBEX1 jusqu'à ce qu'il recouvre le haut du gel, puis retirer le peigne délicatement.
- Additionner à 12µl du produit PCR 3µl de BBP (Bleu de Bromophénol).
- Déposer dans chaque puits du gel un échantillon en évitant les extrémités du gel.
- Placer les électrodes de façon que le cathode se trouve du coté opposé du dépôt des échantillon par ce que la molécule d'ADN est chargé négativement.
- Brancher le générateur et sélectionner le voltage à 80 volts puis à 100 volts pendant 3 heures jusqu'à la séparation des bandes.
- Examiner le gel sous UV.

Les 33 patients étudiés présentent les caractéristiques générales suivantes:

- Sexe masculin,
- Phénotype DMD ou BMD,
- Agés de 02-37 ans,
- Consanguinité parentale : 12 familles (43%),
- 20 patients : cas familiaux (61%),
- 13 patients : cas sporadiques (39%).

Parmi nos patients étudiés, un malade est décédé à l'âge de 13 ans par suite de complications cardiaque dues à l'évolution de la ma maladie.

I- Dosage des CPK :

Le dosage des CPK chez le malade, sa maman, ses sœurs et ses frères jeunes nous a permis d'une part de classer les malades en deux catégories (familiales et sporadiques) et d'une autre part de prévenir les femmes à risques de transmettre la maladie à sa descendance, d'installer le conseil génétique et le diagnostic prénatal.

- Ø 100% des malades ont un taux de CPK élevées,
- Ø 39% des mères présentent un taux de CPK élevées,
- Ø 13% des filles présentent un taux de CPK élevées,
- Ø 0% des jeunes frères présentent un taux de CPK élevées.

La maman du malade M2 présentait un taux de CPK très élevées et a décédé à l'âge de 44 ans suite à un problème cardiaque.

II- Répartition des dystrophinopathies en fonction de la perte de l'autonomie de la marche et du caractère sporadique ou familial :

Grâce à l'enquête familiale (recherche du nombre de malade dans la famille), le dosage des CPK chez les mamans et les sœurs des patients, l'âge de la perte de l'autonomie de la marche nous a permet de classer les malades en deux catégories : familiale et sporadique (**tableau 4a et 4b**) (**fig. 15**).

Tableau 4a : Répartition des dystrophinopathies en fonction de la perte de l'autonomie de la marche et du caractère sporadique ou familial.

Phénotype	Malades	Age de la perte de l'autonomie de la marche (années)	Origine de la maladie
Duchenne	M1	9	S
	M2	12	F
	M3	10	S
	M4	Marche	F
	M5	Marche	F
	M6	12	F
	M7	Marche	S
	M8	13	F
	M9	13	F
	M10	9	F
	M11	Marche	F
	M12	11	S
	M13	10	S
	M19	12	S
	M26	Marche	F
	M27	Marche	F
	M32	9	F
	M33	9	F
Becker	M14	Marche	F
	M17	Marche	S
	M20	Marche	F
	M21	Marche	F
	M22	Marche	F
	M24	17	S
	M25	Marche	S
Intermédiaire	M15	15	S
	M23	15	F
Indéfini	M16	-	F
	M18	-	S
	M28	-	F
	M29	-	S
	M30	-	S
	M31	-	F

S : sporadique, F : familiale.

L'âge de la perte de l'autonomie de la marche est critère fonctionnel majeur, il permet de différencier les DMD des BMD ; il est entre 9 et 13 ans pour les DMD, au-delà de 16 ans pour les BMD, entre 13 et 16 ans pour la forme intermédiaire et pour la forme indéfini tous les malades n'ont pas encore atteints l'âge de la perte de l'autonomie motrice.

Tableau 4b : L'âge de la perte de l'autonomie de la marche et le nombre de cas sporadiques et familiales pour chaque phénotype.

Clinique	%	Age de la perte de l'autonomie de la marche (années)	Familiale	Sporadique
Duchenne	55	9-13	12	6
Becker	21	un seul malade qui a perdu la marche à l'âge de 17 ans les autres marches encore	4	3
Phénotype indéterminé	6	15	1	1
Phénotype indéfini	18	-	3	3

Ainsi nos malades se répartissent de la manière suivante :

- 18 patients ont perdu l'autonomie de la marche entre 9 et 13 ans dont 12 cas familiaux et 6 cas sporadiques et présentant le phénotype Duchenne,
- 7 patients BMD, un seul cas a perdu la marche à l'âge de 17 ans dont 4 cas familiaux et 3 cas sporadiques,
- 2 patients présentent le phénotype intermédiaire et ont perdu la marche à l'âge de 15 ans l'un d'eux est un cas familial et l'autre un cas sporadique,
- 6 patients ont un phénotype indéfini (n'ont pas encore atteint l'âge de perte de la marche) parmi eux, 3 cas sont familiaux et 3 sont sporadiques.

Le phénomène de consanguinité a été retrouvé chez 12 familles (61%).

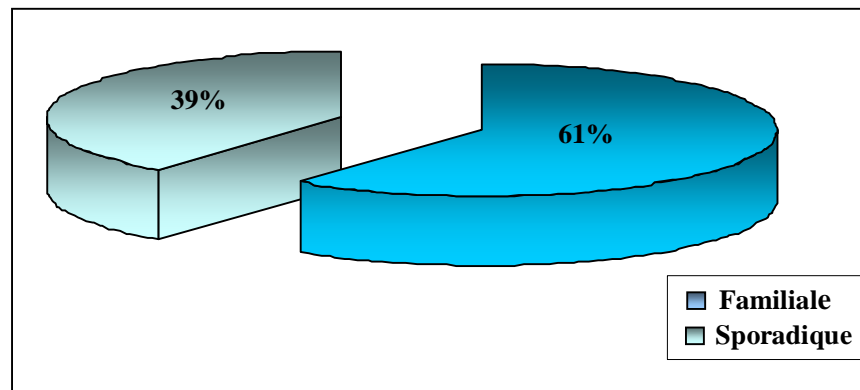


Fig. 15 : Répartition des malades selon le caractère sporadique ou familial.

III- Recherche des signes associés :

Les signes associés retrouvés chez nos patients sont : des déformations squelettiques, une macroglossie, une atteinte cardiaque et des troubles cognitifs (**tableau 5**).

Tableau 5 : Résultats de la recherche des signes associés.

Signes associés	Nombre de malades	%
Déformations Squelettiques	15	45
Macroglossie	21	64
Atteinte Cardiaque	6	18
Troubles cognitifs	5	15

IV- Immunohistochimie :

L'étude immunohistochimique de la dystrophine a été faite chez seulement 5 patients. Elle a montré l'absence totale de la dystrophine chez les patients : M3, M7 et M12, les deux restant (M16 et M24) présentent une quantité réduite.

V- Analyse de l'ADN par PCR multiplex :

L'analyse systématique du gène de la dystrophine des 33 patients nous a permis de détecter des délétions chez 17 patients (52%) (**fig. 16**).

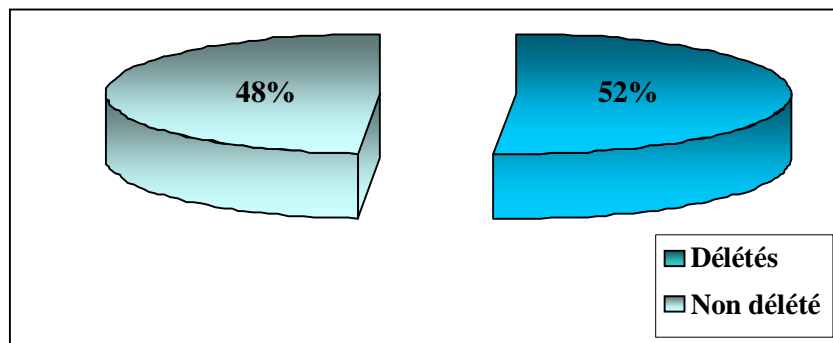


Fig. 16 : Fréquence des délétions dans notre recrutement de malade.

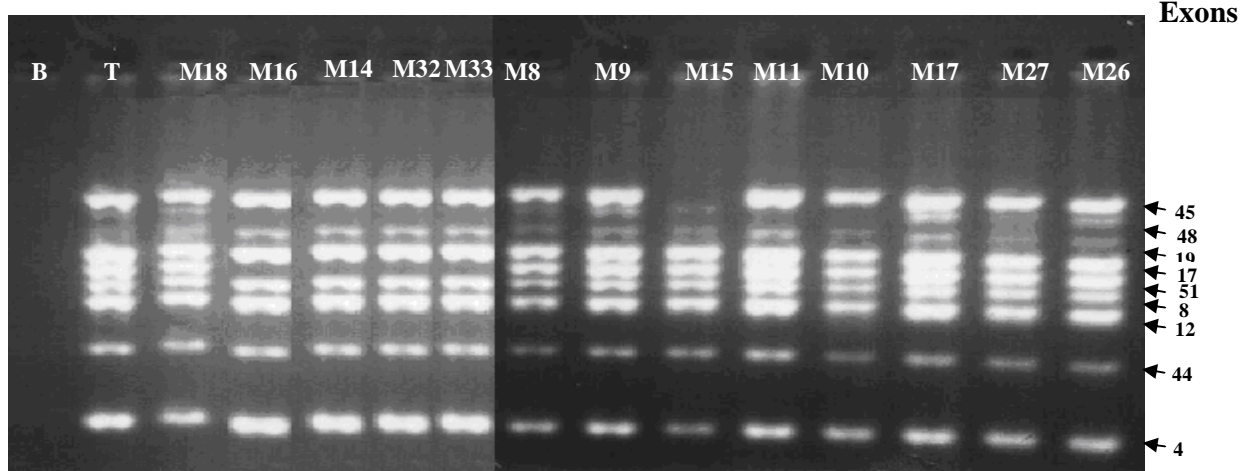
Les résultats obtenus par PCR multiplex sont illustrés dans les figures 17, 18, 19, 20.

Les séries de couples d'amorces utilisées permettant d'amplifier simultanément l'ADN génomique situé dans les zones sensible du gène (exons 4, 8, 12, 17, 19, 44, 45, 46, 48, 51 pour la série PI et Pm, 3, 6, 13, 43, 47, 50, 52, 60 pour la série PII. Les produits PCR sont séparés par électrophorèse sur gel Agarose/Nuseive additionné de BET puis visualisés par transillumination sous UV. La vitesse de migration se fait selon la taille des exons de haut en bas. Les exons délétés sont indiqués par les chiffres situés entre les deux clichés.

Remarque : le mélange réactionnel PI, selon Chamberlain, inclut l'exon 46 mais les bandes ne sont pas visibles pour cela on les a amplifié seuls.

Discussion

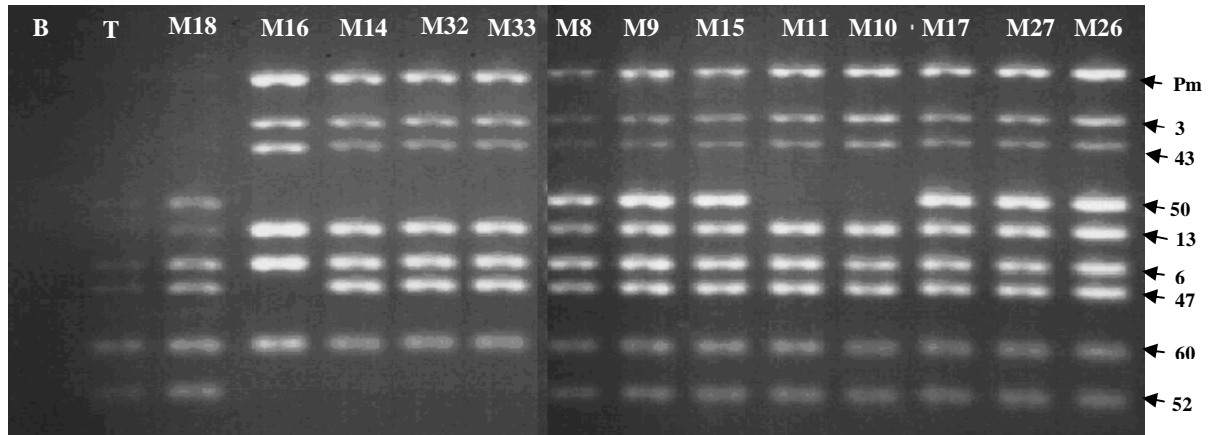
PI



Exon 46



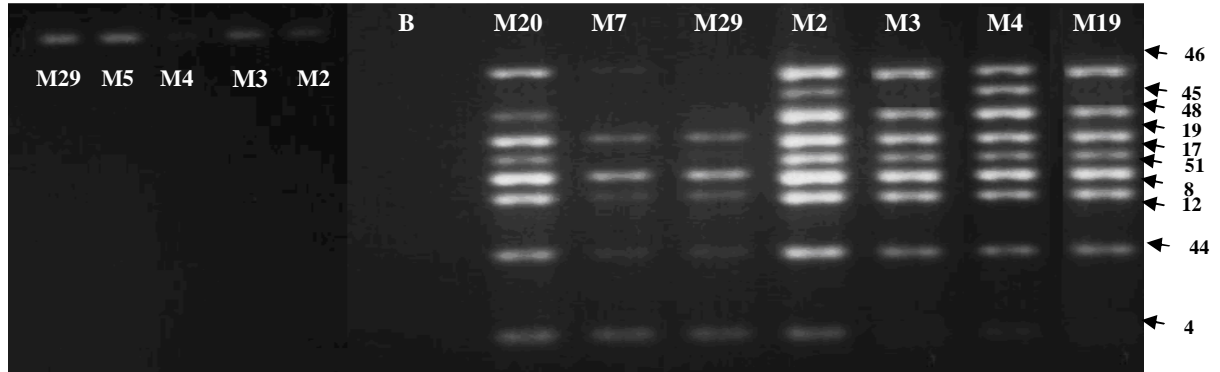
PII



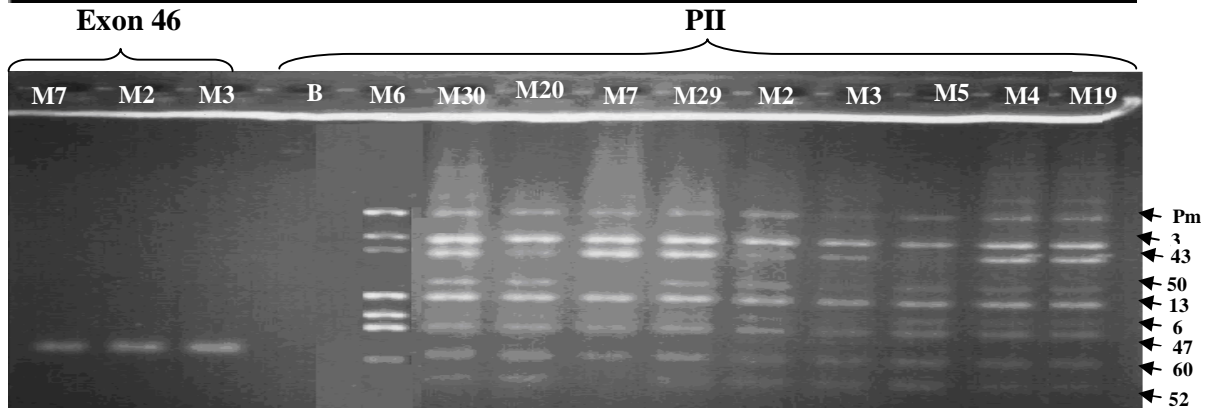
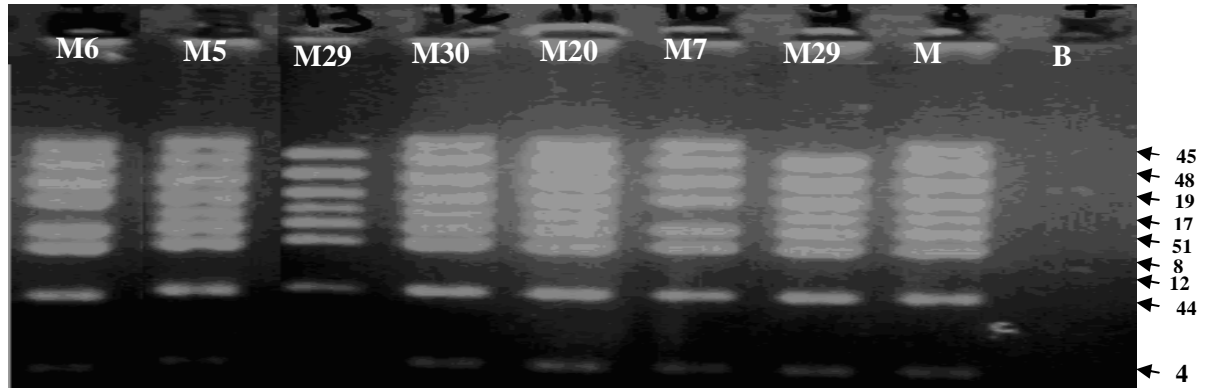
PI		PII	
M18	→ non délété	M18	→ non délété
M16	→ délétion des exons 46, 48, 51	M16	→ délétion des exons 47, 50, 52
M14	→ délétion des exons 48, 51	M14	→ délétion des exons 50, 52
M32	→ délétion des exons 48, 51	M32	→ délétion des exons 50, 52
M33	→ délétion des exons 48, 51	M33	→ délétion des exons 50, 51
M8	→ non délété	M8	→ non délété
M9	→ non délété	M9	→ non délété
M15	→ délétion de l'exon 45	M15	→ non délété
M11	→ délétion de l'exon 48	M11	→ délétion de l'exon 50
M10	→ délétion de l'exon 48	M10	→ délétion de l'exon 50
M17	→ non délété	M17	→ non délété
M27	→ non délété	M27	→ non délété
M26	→ non délété	M26	→ non délété

Fig. 17 : Résultat de la PCR multiplex chez les malades M18, M16, M14, M32, M33, M8, M9, M15, M11, M10, M17, M27 et M26.

PI



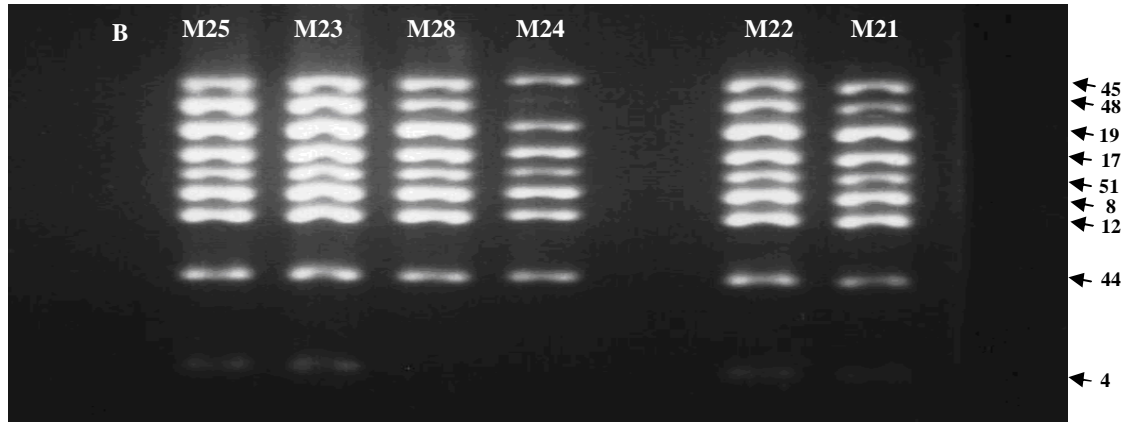
PI'



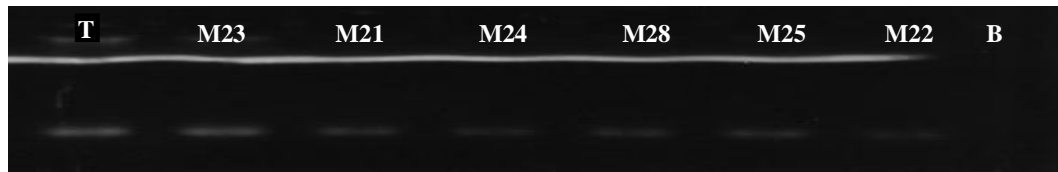
PI		PII	
M2	→ non délété	M2	→ non délété
M3	→ non délété	M3	→ non délété
M4	→ non délété	M4	→ non délété
M5	→ non délété	M5	→ non délété
M6	→ délétion de l'exon 51	M6	→ délétion des exons 50, 52
M7	→ délétion de l'exon 51	M7	→ délétion des exons 50, 52
M19	→ délétion des exons 4, 48	M19	→ non délété
M20	→ non délété	M20	→ non délété
M29	→ délétion de l'exon 45	M29	→ non délété
M30	→ non délété	M30	→ non délété

Fig. 18 : Résultat de la PCR multiplex chez les malades M2, M3, M4, M5, M6, M7, M19, M20, M29 et M30.

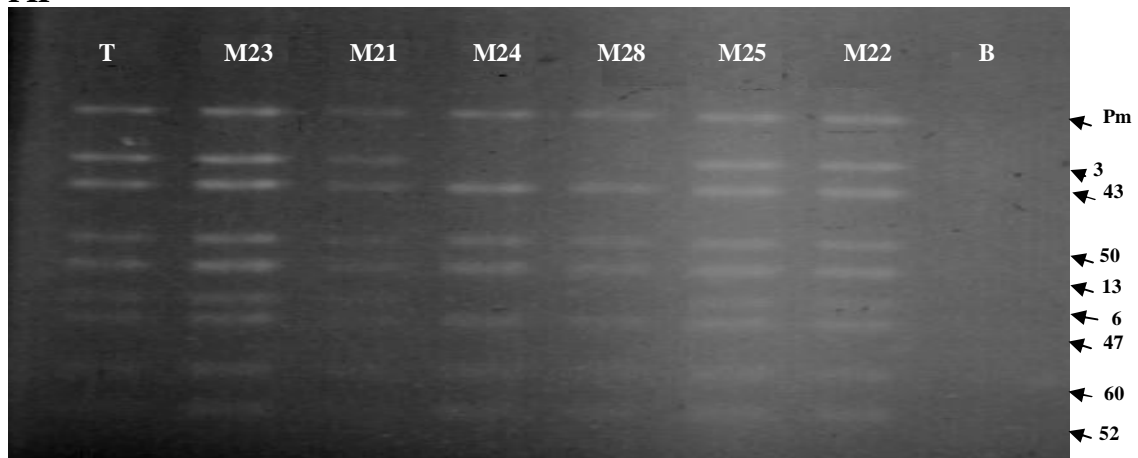
PI



Exon 46

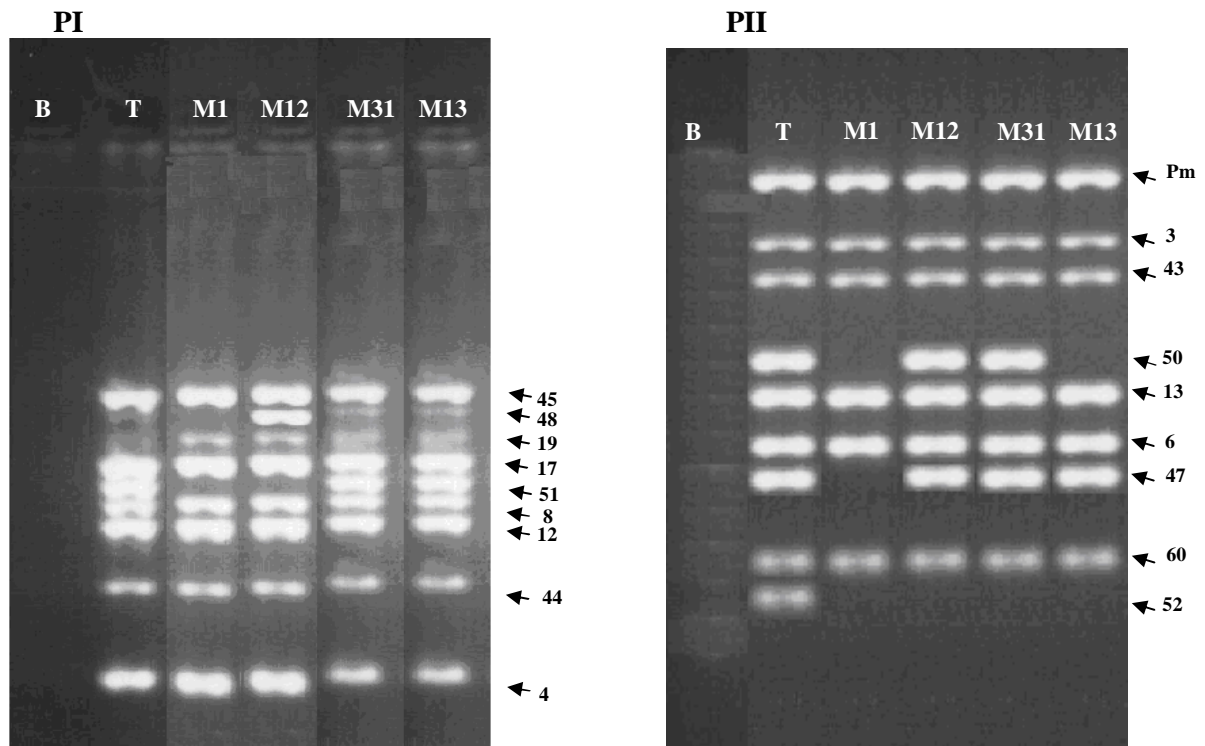


PII



PI		PII	
M21	→ non délété	M21	→ non délété
M22	→ non délété	M22	→ non délété
M23	→ non délété	M23	→ non délété
M24	→ délétion de l'exon 4	M24	→ délétion des exons 3, 6
M25	→ non délété	M25	→ non délété
M28	→ délétion de l'exon 4	M28	→ délétion des exons 3, 6

Fig. 19 : Résultat de la PCR multiplex chez les malades M21, M22, M23, M24, M25 et M28.



PI		PII	
M1	→ délétion des exons 46, 48, 51	M1	→ délétion des exons 47, 50, 52
M12	→ délétion de l'exon 51	M12	→ délétion de l'exon 52
M31	→ non délété	M31	→ délétion de l'exon 52
M13	→ non délété	M13	→ délétion de l'exon 50

Fig. 20 : Résultat de la PCR multiplex chez les malades M1, M12, M31M13.

L'étude des 17 patients délétés a permis de répertorier les délétions des exons suivants : 3, 4, 6, 45, 46, 47, 48, 50, 51 et 52. ces délétions sont localisées dans deux points chauds ; de l'exon 3 à 6 chez 12% et de l'exon 45 à 52 chez 82% ainsi nous avons un seul malade qui présente une délétion de l'exon 4 dans l'extrémité 5' et de l'exon 48 dans l'extrémité 3' (**fig.17**).

N ^o	Pm	3	4	6	8	12	13	17	19	43	44	45	46	47	48	50	51	52	60
M1												•	•	•	•	•	•		
M6																•	•	•	
M7																•	•	•	
M10															•	•			
M11															•	•			
M12																	•	•	
M13																•			
M14															•	•	•	•	
M15												•							
M16														•	•	•	•	•	
M19			•												•				
M24		•	•	•															
M28		•	•	•															
M29												•							
M31																		•	
M32															•	•	•	•	
M33															•	•	•	•	

Fig. 17 : Distribution des exons délétés chez nos patients.

VII- La recherche de corrélation entre la taille de délétion et le phénotype clinique :

Connaissant la taille de chaque exon, la taille des délétions a été calculée par sommations des tailles des différents exons délévés (**tableau 6**).

Tableau 6 : Corrélation entre la taille du remaniement de l'ADN et le phénotype clinique

Malade	Taille de la délétion (pb)	Phénotype clinique
M1 M16	1607	DMD ?
M6 M7	772	DMD DMD
M10 M11	777	DMD DMD
M12	501	DMD
M13	271	DMD
M14 M32 M33	1278	BMD DMD DMD
M15 M29	574	I ?
M19	702	DMD
M24 M28	808	BMD ?
M31	113	?

La délétion est dite bornée si l'exon qui précède ou qui suit l'exon délévé est exploré.

VIII- La recherche de corrélation entre le cadre de lecture et la sévérité de la maladie

Grâce à la connaissance des limites exoniques, nous avons pu étudier le cadre de lecture engendré par les délétions dépistées. Chaque exon n'étant pas constitué d'un multiple de 3 nucléotides, il ne s'achève pas toujours par la terminaison d'un codon. Connaissant à partir de la banque de données (www.dmd.nl), les limites de chaque exon au nucléotide prêt, il est donc possible de déduire la nouvelle phase engendrée par une délétion (**tableau 7**).

Tableau 7 : Corrélation entre le cadre de lecture et la sévérité de la maladie

Nature de la délétion	Nombre de sujet	Phénotype clinique			
		DMD	BMD	Intermédiaire	indéfini
Délétion des exons 46, 47, 48, 50, 51, 52 non bornée	2	1	1		
Délétion des exons 50, 51, 52 non bornée	2	2			
Délétion des exons 48, 50 bornée+ décalage du cadre de lecture	2	2			
Délétion des exons 51, 52 non bornée	1	1			
Délétion de l'exon 50 non bornée	1	1			
Délétion des exons 48, 50, 51, 52 non bornée	3	2	1		
Délétion de l'exon 45 non bornée	2			1	1
Délétion des exons 4, 48 non bornée	1	1			
Délétion des exons 3, 4, 6 non bornée	2		1		1
Délétion de l'exons 52 non bornée	1				1

IX- La répartition des délétions selon le phénotype chez nos patients :

La répartition des délétions selon le phénotype est résumée dans le tableau et sont comme suit :

ü 10 patients de phénotype DMD :

- 02 : délétions bornées + décalage du cadre lecture.
- 08 : délétions non bornées, chez deux patients la biopsie musculaire a montrée une absence totale de la dystrophine.

ü 03 patients de phénotype BMD (délétions non bornées), chez deux patients la biopsie musculaire a montrée une quantité réduite de la dystrophine.

ü 04 patients de phénotype indéfini (délétions non bornées).

L'étude de 33 patients a permis :

- De classer les malades selon le phénotype clinique (âge de la perte de l'autonomie locomotrice) comme suit :

- 55% de phénotype Duchenne ayant perdus l'autonomie de la marche entre 9 et 13 ans, dont 66% familiale et 33% sporadique.
- 21% de phénotype Becker, un seul malade (M24) a perdu l'autonomie de la marche à l'âge de 17 ans les autres marchent encore dont 57% familiale et 43% sporadique.
- 6% de phénotype intermédiaire, qui ont perdus la marche entre 13 et 16 ans dont 50% familiale et 50% sporadique.
- 18% ne sont pas classés car ils marchent encore ; ils présentent un âge e début varie entre 3 et 7 ans, leurs age actuel est entre 7,5 et 15 ans dont 50% familiale et 50% sporadique.

L'âge de la perte de l'autonomie de la marche est un critère fonctionnel majeur d'orientation diagnostic. Il nous a permis de différencier cliniquement des DMD des BMD ainsi de classer phénotypiquement la majorité de nos patients.

- De retrouver une corrélation entre le taux de CPK et la progression de la maladie, elles sont très élevées au début de la maladie puis diminuent progressivement pour se normaliser dans le stade évolué ; dans notre étude, les CPK sont élevées chez tous les patients.

- Les CPK sont aussi élevées chez 39% des mères et 13% chez des filles. L'activité sérique des CPK est augmenté dans une proportion significative des conductrices et constitue le meilleur et le plus important des critères du conseil génétique.

Nos résultats Concernant l'atteinte cardiaque ne concorde pas avec les travaux réalisés par Angelini et al. (1996) car l'âge de la majorité de nos patients est inférieur à 21 ans. Ainsi que les résultats des troubles cognitifs ne concorde pas avec les travaux de Boyce et al. (1991).

- L'étude génétique, outil majeur de diagnostic, a permis :

- De confirmer le diagnostic dystrophinopathie cliniquement suspectés dans 52% des cas délétés.
- D'évaluer la fréquence des délétions dépistée pour les 19 exons explorés du gène DMD.
- De répertorier les délétions des exons : 3, 4, 6, 45, 46, 47, 48, 50, 51 et 52.

- De confirmer la règle de Monaco concernant le cadre de lecture, il existe une corrélation étroite entre le phénotype et le décalage du cadre de lecture (Monaco *et al.*, 1988), chez certains nos patients.

- D'infirmer la corrélation entre la sévérité de la maladie et la taille de la délétion (Koenig *et al.*, 1988).

- L'apport de la biopsie musculaire (marquage en immunofluorescence de la dystrophine) chez 5 malades où on a trouvés une absence totale de la dystrophine chez le malade M7 qui présente la délétion des exons 50, 51 et 52, et chez le malade M12 délété au niveau des exons 51 et 52 ainsi que chez le malade M3 qui ne présente aucune délétion, ce résultat confirmé le diagnostic de la dystrophie musculaire de Duchenne. Les deux autres patients présentent une quantité réduite, le malade M24 délété au niveau des exons 3, 4 et 6 et qui présente le phénotype léger de Becker ; le malade M16 présente la délétion des exons 46, 47, 48, 50, 51 et 52 son phénotype est indéfini BMD ou intermédiaire car il a 12 ans et il marche encore.

La PCR multiplex permet de repérer 98% des délétions, les 2% restant peuvent être des délétions au niveau des exons qui ne sont pas explorés ou d'autres types mutationnels.

Dans les 48% des cas où aucune délétion n'a pu être repérée, il serait souhaitable de rechercher : les délétions rares non explorés par la PCR multiplex, les duplications ou les mutations ponctuelles par d'autres techniques plus adaptées tels que : SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism), DGGE (Denaturant Gradient Gel Electrophoresis), PPT (Protein Truncation Test), MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification), MAPH (Multiplex amplification and Probe Hybridization)... Ou d'orienter le diagnostic vers une autre myopathie des ceintures autosomique récessif tel que la myopathie magrébine qui présente les mêmes signes cliniques (Sbiti *et al.*, 2002).

La proportion des délétions dans différent pays de quatre continents est comparée dans le tableau 8. Le taux des délétions publié en Europe et en Amérique (Nord et Sud) varie entre 31% et 92,6% tandis que ce taux est plus faible en Asie et se situe entre 31% et 69%.

En Afrique, les études publiées se limitent au Maroc, Egypt et Afrique du sud qui présente respectivement les fréquences suivantes : 51,4% (Sbiti *et al.*, 2002), 51% (www.dmd.nl. 2005), 42% (Ballo *et al.*, 1994). Les résultats obtenus en Afrique du nord (Maroc et Egypt) par PCR multiplex I et II rejoint la fréquence des délétions que nous avons obtenus chez nos patients (52%).

La fréquence des différentes délétions répertoriées a montré deux points chauds, le premier point se localise dans le domaine central de l'exon 45 à 52 (14 patients soit 82%), le deuxième point se situe dans l'extrémité 5' de l'exon 3 à 6 où la fréquence est de 12% (2 patients). Un seul malade présente une délétion au niveau des deux points chauds ; l'exon 4 dans la région 5' et l'exon 45 dans la région 3'.

Ces résultats se rapprochent de celui retrouvé chez les patients Marocain où 81% de délétions se situent dans la région central, de l'exon 43 à 52, et 16% dans l'extrémité 5', de la région promotrice à l'exon 12. En Egypt, 76% de délétions sont de l'exon 44 à 51 et 13% dans l'extrémité 5' de l'exon 2 à 8.

Seulement chez 17 patients nous avons confirmé le diagnostic de dystrophinopathie. Les 16 patients restants où aucune délétion n'est trouvée malgré l'existence chez quelques patients une histoire familiale doivent faire l'objet d'une autre recherche par d'autres techniques. Ces études doivent confirmer des mutations ponctuelles ou des duplications. Il est possible d'avoir des sarcoglycanopathies autosomiques récessifs qui présentent le même tableau clinique. On prend en considération le taux élevé de consanguinité 12/28 familles (soit 43%) et chez qui nous avons 8 malades issus de 6 mariages consanguins où aucune délétion n'est trouvée.

Une autre dystrophie musculaire progressive (dystrophie musculaire magrébine) en particulier la γ -sarcoglycanopathie peut être suspectée chez ces malades et chez qui l'analyse de la biopsie musculaire n'est pas recherchée.

A l'exception de six cas familiaux, deux cas sont sporadiques puisque la γ -sarcoglycanopathie est fréquente en Afrique du Nord (Tunisie, Algérie et Maroc) dont l'analyse de la dystrophine est très importante pour confirmer le diagnostic DMD ou BMD, en particulier chez les cas sporadiques qui n'ont pas de délétions.

Cependant, la détection de délétions offre une information précise pour le conseil génétique et le diagnostic prénatal chez les femmes à risques.

Il est intéressant de noter que chez la population Algérienne, la plus grande fréquence de délétions se situe dans l'exon 45 à 52 (82%).

Le développement des techniques de biologie moléculaire et leurs applications pour les analyses de l'ADN, comme la PCR multiplex, permet un diagnostic moléculaire rapide, et peut être actuellement la seule approche pour la prévention à travers le conseil génétique et le diagnostic prénatal en l'absence de thérapie.

Tableau 8 : Fréquence des délétions dans différents pays.

Références	Délétion %	Méthode utilisée
Nord et Sud Américain		
www.dmd.nl . 2004	Argentine 48%	Multiplex I, II, III et IV
Arenas Sordo, 2003	Mexico 50%	Multiplex I, II
www.dmd.nl . 2003	Chili 47%	Multiplex I, II
www.dmd.nl . 2004	Colombie 31%	Multiplex I, II
www.dmd.nl . 2004	Canada 60,2%	Southern blot (HindIII, EcoRI, PstI)
www.dmd.nl . 2005	USA : -Columbus 92,6% - Huston 31%	? Southern blot (HindIII)
Europe		
Lalic <i>et al.</i> , 2005	Yougoslavie 51,4%	Multiplex I, II, III, IV et V; MAPH ; MLPA
www.dmd.nl . 2004	UK : - Newcastle upon Tyne 76,7% - Cardiff /Manchester 70,7% - London 49,4%	Multiplex I, II; Southern blot (HindIII) Southern blot (HindIII, PstI, MspI) Southern blot (HindIII)
Florentin <i>et al.</i> , 1995	Grèce	cDNA; Multiplex I, II
Battaloglu <i>et al.</i> , 1992	Turquie : 59%	cDNA, multiplex I et II
Kuseyri <i>et al.</i> , 1993	52%	cDNA, multiplex II
Ulgenalp <i>et al.</i> , 2004	63,7%	multiplex I et II
www.dmd.nl . 2003	60,3%	multiplex I et II, cDNA
www.dmd.nl . 2003	Bulgarie 66,6%	Multiplex I, II, III, IV ET V
www.dmd.nl . 2004	Estonie 42,3%	Multiplex I, II, III
www.dmd.nl . 2004	Belgique 82%	multiplex I et II, Southern blot, MLPA, cDNA
www.dmd.nl . 2005	Danemark 51%	MLPA
www.dmd.nl . 2005	Italie : - Napoli 82,4% - Milano 83% - Genova 57%	multiplex I, II et III multiplex I, II et III Southern blot (HindIII et PstI)
www.dmd.nl . 2003	Hongrie 73%	multiplex I et II
www.dmd.nl . 2004	France : - Paris 44% - Montpellier 65,5%	Southern blot (HindIII), Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE). multiplex I et II, Southern blot
Asie		
www.dmd.nl . 2003	Inde 69%	multiplex I et II, Southern blot, cDNA
www.dmd.nl . 2003	Chine 62,3%	multiplex I et II, Southern blot
www.dmd.nl . 2003	Filippines 31%	multiplex I, II et III
www.dmd.nl . 2003	Japon : - Kobe University Graduate School of Medecine 60,6% - Tokyo 51,5%	multiplex I et II, Southern blot multiplex I et II
www.dmd.nl . 2004	Saudi Arabia 78%	multiplex I, II et III
Afrique		
Sbiti <i>et al.</i> , 2002	Maroc 51,4%	multiplex I et II
www.dmd.nl . 2005	Egypt 51%	multiplex I et II
Ballo <i>et al.</i> , 1994	Afrique du sud 42%	?

Nous savons que la diminution du taux de la dystrophine n'est pas en rapport avec la taille de la délétion mais dépend de la conservation du cadre de lecture ou non. Les mutations à l'origine de DMD, quelque soit leur taille, aboutissent à une interruption du cadre de lecture et donc à une désorganisation des triplet de codons de l'ADN et de l'ARNm produit à partir du gène DMD muté. En effet, le malade M3 sans délétion génique détectable avec absence totale de la dystrophine s'est arrêté de marcher à 10 ans. Le malade M14, âgé de 14 ans, son affection a débuté à 8 ans, présente une délétion de quatre exons (48, 50, 51 et 52) avec une taille de 1278 pb, il marche encore. Par contre, le malade M10 décédé à l'âge de 13 ans, son affection a débuté précocement (3 ans), n'a qu'une délétion de deux exons (exons 48 et 50) bornée avec décalage de cadre de lecture dont la taille est de 777 pb ; son phénotype est sévère. Le malade M13 a perdu la marche à l'âge de 10 ans, l'étude génétique a montré la délétion d'un seul exon (exon 50), sa taille est de 271 pb non borné, son phénotype est DMD. Nos résultats ont montré que des délétions de mêmes taille peuvent se trouver chez les DMD que chez les BMD par exemples malades M14 et M32 présentent une délétion de même taille qui est de 1278 mais le phénotype est différent. Donc, cela confirme la règle de Monaco qu'il n'y a pas de corrélation entre la taille de délétion et le phénotype clinique.

On peut expliquer le phénotype sévère dans le cas des délétions non bornées par un décalage de cadre de lecture et comme notre PCR multiplex n'explore que 19 exons cela veut dire qu'il existe d'autres exons délétés ce qui engendre une perturbation de cadre de lecture.

Les délétions emportant les mêmes exons peuvent se voir aussi bien dans les cas DMD que BMD. L'exemple le plus explicatif est celui des malades M14 et M33, les deux sont délétés au niveau des exons 48, 50, 51 et 52 ; le premier âgé de 14 ans a le phénotype Becker et marche encore mais le deuxième âgé de 14 ans, a perdu la marche à l'âge de 9 ans donc son phénotype est très sévère. Certaines délétions ne modifient pas le cadre de lecture mais donnent quand même un phénotype DMD. Si ces délétions modifient la protéine en ses parties riches en cystéine et en son domaine carboxy-terminal associé (Kaplan et Delpech, 1995).

Nous avons classés nos dystrophinopathies selon le degré de sévérité clinique et évolutif, l'âge de la perte de la marche, la délétion génique mais il est important d'analyser également l'ARNm et la protéine pour confirmer le diagnostic ainsi de rechercher les duplications et les mutations ponctuelles par des techniques plus élaborées chez les patients où aucune délétion n'a été décrite (16 cas soit 48%) pour avoir un diagnostic précis DMD/BMD ou bien de les classés dans un autre cadre nosologique (dystrophie musculaire autosomique récessive).

Diagnostic moléculaire des dystrophinopathies (étude phénotypique et génotypique)

Les dystrophies musculaires de Duchenne (DMD) et de Becker (BMD) sont deux formes alléliques d'une dystrophie musculaire progressive transmise sur le mode récessif lié au chromosome X. Toutes deux résultent de mutations survenant dans un gène identifié en 1987 codant pour une protéine de cytosquelette membranaire : la dystrophine. Il s'agit de grandes délétions dans le gène DMD chez les 2/3 des patients DMD et BMD. Nous avons analysés l'ADN de 33 patients par deux PCR multiplex, PI et PII selon Chamberlain et Beggs, pour déterminer les exons délétés dans le gène de la dystrophine, afin d'estimer la fréquence de cette anomalie et aussi d'évaluer les résultats obtenus par une comparaison entre le génotype et le phénotype clinique. Nos avons trouvés des délétions chez 17 patients (52%). Toutes les délétions sont regroupées dans deux points chauds, 81% sont localisées entre l'exon 45 et 52 (14 patients) et 12% dans la région N-terminale de l'exon 3 à 6.

Nous avons montrés qu'il n'y a pas de corrélation entre la taille de délétion et le phénotype clinique.

Il est important de noter que cette étude nous a permis de trouver les délétions du gène de DMD par la PCR multiplex des exons fréquemment délétés. Cette étude facilite également le diagnostic moléculaire des DMD/BMD dans notre pays et permettrait d'améliorer la rapidité d'un conseil génétique ou d'un diagnostic prénatal.

Conclusion

L'ère de biologie moléculaire a bouleversé la génétique humaine, tant dans sa pratique quotidienne, permettant une meilleure évolution du risque de transmission des maladies héréditaires, apportant une compréhension du déterminisme de certaines maladies.

La découverte de la dystrophine, produit protéique du gène de la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) et de Becker (BMD), est due au développement de ces technologies.

Ce travail poursuivait trois objectifs : le premier visant à déterminer la fréquence et la localisation des délétions dans notre recrutement de DMD et de BMD. Le second, à rechercher certaines corrélations entre données moléculaires et données cliniques et le dernier à proposer d'installer le conseil génétique dans le but est d'informer les individus et les familles atteints de maladies génétiques ou à risque de l'être de prendre des décisions claires pour éviter la transmission à travers les générations.

La recherche de délétions dans le gène de la dystrophine par deux PCR multiplex, PI et PII selon Chamberlain et Beggs, permet de poser le diagnostic direct de dystrophie musculaire de Duchenne chez nos patients. Les résultats de cette étude nous ont permis de confirmer le diagnostic phénotypique chez 52% de nos patients, ainsi d'évaluer la fréquence des délétions qui sont concentrées dans deux régions, la première de l'exon 45 à 52 avec une fréquence de 81%, la deuxième se situe entre l'exon 3 à 6 avec une fréquence de 12%.

La recherche de corrélation entre le remaniement de l'ADN et le phénotype clinique nous a permis de conclure qu'il n'y a pas de corrélation entre la taille délétionnelle et l'évolutivité de la maladie. Ainsi d'établir des liens étroits entre l'anomalie moléculaire et le tableau clinique (hypothèse de Monaco). Selon cette hypothèse, une délétion perturbant le cadre de lecture entraînant un phénotype sévère alors qu'une délétion respectant le cadre de lecture, entraînerait un phénotype Becker.

Nous avons remarqué que l'étude de la protéine (dystrophine) est indispensable pour confirmer le diagnostic clinique surtout chez les malades qui ne présentent pas de délétions du gène DMD. Pour cela il faut une analyse systématique de biopsie musculaire avec Western blot et immunohistochimie.

Les techniques de diagnostic prénatal et de détection des femmes transmettrices doivent se développer pour éviter la récurrence de la maladie au sein des familles affectées et de permettre aux femmes d'avoir des enfants en bonne santé. Il faut également développer d'autres techniques de diagnostic moléculaire dans notre laboratoire pour le dépistage des duplications et des mutations ponctuelles du gène DMD.

La thérapie génique et cellulaire est le seul moyen pour guérir les patients souffrant de DMD ou BMD. Pour cela, les recherches dans ces domaines ouvrent l'espoir pour de nombreuses familles. Le temps permettra de savoir si ces espoirs étaient motivés ou s'ils furent source de désillusions.

Reference bibliographique

- Aartsma-Rus A., Janson AAM., Kaman WE., Bremmer-Bout M., van Ommen GJB., den Dunnen JT. and van Deutekom JCT. (2004).** Antisense-Induced Multiexon Skipping for Duchenne Muscular Dystrophy Makes More Sense. *Am. J. Hum. Genet.* **74**:83–92.
- Acsadi G., Dickson G., Love DR., Jani A., Walsh FS., Gurusinghe A., Wolff JA. and Davies KE. (1991).** Human dystrophin expression in mdx mice after intramuscular injection of DNA constructs. *Nature.* **352** (6338): 815-818.
- AFM-Genethon. (2004).** La myopathie de Duchenne corrigée sur la souris. Mise au point d'une technique innovante de thérapie génique : le saut d'exon. Communiqué de presse.
- Ahn A.H. and Kunkel L.M. (1993).** The structural and functional diversity of dystrophin. *Nat. Genet.* **3**: 283-291.
- Ahn AH. and Kunkel LM. (1995).** Syntrophin binds to an alternatively spliced exon of dystrophin. *J. Cell Biol.* **128**: 363-371.
- Ahn AH., Freener CA., Gussoni E., Yoshida M., Ozawa E. and Kunkel LM. (1996).** The three human syntrophin genes are expressed in diverse tissues, have distinct chromosomal locations, and each bind to dystrophin and its relatives. *J. Biol. Chem.* **271** (5): 2724-30.
- Amann KJ., Guo AWX., Ervasti JM. (1999).** Utrophine lacks the rod domain actin binding activity of dystrophin. *J. Biol. Chem.* **274** (50): 35375-35380.
- Angelini C., Fanin M., Freda MP., Martinello F., Miorin M., Melacini P., Siciliano G., Pegoraro E., Rosa M., Danielli GA. (1996).** Prognostic factors in mild dystrophinopathies. *J. Neurol. Sci.* **142** (1-2): 70-78.
- Arenas-Sordo ML., González-Huerta NC., Hernández-Zamora E., Escobar-Cedillo RE., Leyva-GarcíaSilva N. (2004).** Detection of Duchenne/Becker muscular dystrophy gen deletions in Mexican patients through multiplex PCR. Poster Abstracts. Disease Mechanisms.
- Ballo R., Viljoen D., Beighton P. (1994).** Duchenne and Becker muscular dystrophy prevalence in South Africa and molecular findings in 128 persons affected. *S Afr Med. J.* **84** (8): 494-7.
- Barois A., Abinum MF., Bataille J., Blain-Lambert B., Correlet P., Sidi D., Melki J., Kaplan JC. et al. (1998).** Maladies neuromusculaires. 113–125. (Ed) Doin. Paris.
- Bartlett RJ., Bernheim L., Braun S., Campbell KP., Chamberlain J., Clemens P., van Deutekom JCT. et al. (2003).** Les approches de la recherche en vue d'un traitement de la

dystrophie musculaire de Duchenne. Rapport sur la situation de la recherche au plan international visant à la mise au point d'une thérapie causale de la dystrophie musculaire de Duchenne. Réunion internationale de travail des *National Institutes of Health* à Bethesda près de Washington.

Basset O. (2005). Implication du récepteur à l'inositol 1, 4, 5-trisphosphate dans l'homéostasie calcique et l'apoptose des cellules musculaires squelettiques dérivées du modèle murin de la Dystrophie Musculaire de Duchenne. *Thèse présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève pour obtenir le grade de Docteur ès sciences.* Université de Genève. 16-24.

Battaloglu E., Telatar M., Deymeer F., Serdaroglu P., Kuseyri F., Ozdemir C., Apak M., Tolun A. (1992). DNA analysis in Turkish Duchenne/Becker muscular dystrophy families. *Hum. Genet.* **89**: 635–639.

Becker PE., Kiener F. (1955). Eine neue X-chromosomale Muskel-dystrophie. *Arch. Psychiat-Zeitschr. Neurol.* **193** : 427-448.

Beggs AH., Koenig M., Boyce FM. and Kunkel LM. (1990). Detection of 98-percent DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum. Genet.* **86**:45-48.

Bernard V. (1999). Augmentation de la capacité proliférative de myoblastes humains dystrophiques à l'aide de l'antigène grand T et de la télomérase. *Mémoire présenté à la faculté des études supérieures de l'université Laval pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.).* 4-17.

Blake DJ., Nawrotzki R., Loh NY., Gorecki DC., Davis KE. (1998). Beta-Dystrobrevin a member of the dystrophin related protein family. *Proc Natl Acad Sci USA.* **95** (1): 241-246.

Blake DJ., Hawkes R., Benson MA., Beesley PW. (1999). Different dystrophin-like complexes are expressed in neurons and glia. *J. Cell Biol.* **147**: 645-658.

Blake DJ. and Kröger S. (2000). The neurobiology of Duchenne muscular dystrophy: learning lessons from muscle?. *Trends. Neurosci.* **23**: 92-99.

Blake DJ., Weir A., Newey SE. and Davies KE. (2002). Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol. Rev.* **82** (2): 291-329.

Bogdanovich S., Krag TOB., Barton ER., Morris LD., Whittemore L., Ahima RS., Khurana TS. (2002). Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature.* **420**: 418–421

- Bonilla E., Samitt CE. et al. (1988).** Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin at the muscle cell surface. *Cell*. **54** (4): 447-452.
- Bonne G., Carrier L., Richard P., Hainque B., Tesson F., Komajda M., et Schwartz K. (1998).** Génétique des cardiomyopathies hypertrophiques. *Médecine/sciences*. **14** : 1054-66.
- Bordais A. (2004).** Organisation moléculaire des synapses photorécepteurs neurones secondaires Rôle des dystrophines. Thèse présentée en vue d'obtenir le grade de Docteur de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg. 27-35.
- Bouvagnet P. (2005).** Hérité lié a l'X dystrophinopathies, dystrophie musculaire de Duchenne, dystrophie musculaire de Becker PCEM 2.
- Boyce FM., Beggs AH., Feener CA. and Kunkel LM. (1991).** Dystrophin is transcribed in brain from a distant upstream promoter. *Proc. natl. Acad. Sci. USA*. **88**: 1276-1280.
- Brooke MH., Griggs RC. et al. (1981).** The natural history of Duchenne muscular dystrophy: a caveat for therapeutic trials. *Trans. Am. Neurol. Assoc.* **106**: 195-9.
- Brown RH., Hoffman EP. (1988).** Molecular biology of Duchenne muscular dystrophy. *TINS*. **11**: 480-483.
- Bussel B., Raphael JC., Ultizbera JA., Leturcq F., Kaplan JC. (2002).** Myopathies de Duchenne-Becker. (Ed) Frison-Roche. Paris.13-25.
- Camirand G. (2004).** Développement d'un protocole d'induction de tolérance immunologique applicable à la transplantation de myoblastes comme traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne. *Thèse présentée à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval dans le cadre du programme de doctorat en Microbiologie et Immunologie pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor*. Faculté de Médecine Université Laval Québec. 1-26.
- Caron N. (2004).** Transduction de protéines dans le développement d'un traitement pour la dystrophie musculaire de duchenne *Thèse présentée à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval dans le cadre du programme de doctorat en biologie cellulaire et moléculaire pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)* Faculté de Médecine Université Laval Québec. 3-26.
- Chamberlain JS., Gibbs RA., Ranier JE., Nga Nguyen PN. and Caskey CT. (1988).** Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucl. Acids Res.* **3**:11141-11156.

- Chamberlain JS. (2002).** Gene therapy of muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **11**: 2355-2362.
- Crosbie RH., Heighway J., Venzke DP., Lee JC., Campbell KP. (1997).** Sarcospan, the 25-kDa transmembrane component of the dystrophin- glycoprotein complex. *J. Biol. Chem.* **272** (50): 31221-31224.
- Crosbie RH., Lim LE., Moore SA., Hirano M., Hays AP., Maybaum SW., Collin H., Dovico SA., Stolle CA., Fardeau M., Tome FM., and Campbell KP. (2000).** Molecular and genetic characterization of sarcospan: insights into sarcoglycan-sarcospan interactions. *Hum. Mol. Genet.* **9**: 2019-2027.
- Culligan KG., Mackey AJ., Fin DM., Maguire PB., Ohlendieck K. (1998).** Role of dystrophin isoforms and associated proteins in muscular dystrophy. *J. Mol. Men.* **3**: 639-648.
- De La Porte S., Morin S., Koenig J. (1999).** Characteristics of skeletal muscle in mdx mutant mice. *Int. Rev. Cytol.* **191**: 99-148.
- De Recondo J. et De Recondo AM. (2001).** Pathologie du muscle strié. De la biologie cellulaire à la thérapie. Ed: Médecine. Science/ Flammarion. Paris.
- Dubowitz V. (1992).** The muscular dystrophies. *Postgrad. Med.* **68** (801): 500-506.
- Duchenne GBA. (1868).** Recherches sur la paralysie musculaire pseudohypertrophique ou paralysie myo-scl,rosique. *Arch. G,n. M,d.* **11**: 5-25.
- Dunant P. (2003).** Strategies for molecular therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Thèse présentée à la Faculté de chimie et pharmacie de l'Université de Ludwig-Maximilians pour obtenir le grade de Docteur.* Université de Ludwig-Maximilians-Munich. 3-18.
- Ehrig K., Leivo I., et al. (1990).** Merosin, a tissue-specific basement membrane protein, is a laminin-like protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **87** (9): 3264-3268.
- Emard B. (1999).** Traité de neurologie, neurogénétique, affections hérédo-dégénératives. 235-240. (Ed) Doin. Paris.
- Emery AE. and Skinner R. (1976).** Clinical studies in binign (Becker typa) X-linked muscular dystrophy. *Clin. Genet.* **10** (4): 189-201.
- Engel A. and Franzini-Armstrong C. (1994).** *Myology : basic and clinical.* New York, McGraw-Hill.

- Fardeau M., Eymard B., Chérin P., Herson S., Fontaine B. and Leroy JP. (1996).** In *Traité de Médecine*. Flammarion. Paris. 2257-2184.
- Fardeau M., Braun S., Romero NB., Hogrel JY., Rouche A., Ortega V., Mourof B., Squiban P., Benveniste O., Herson S. (2001).** A propos d'un essai de Phase I de thérapie génique effectué avec un plasmide contenant l'intégralité du gène dystrophine dans la Myopathie de Duchenne/Becker. *HANYANG MEDICAL REVIEWS*. **26** (1).
- Feener CA., Koenig M. and Kunkel LM. (1989).** Alternative splicing of human dystrophin mRNA generates isoforms at the carboxy terminus. *Nature* **338**: 509-511.
- Ferrari G., Cusella-De Angelis G., Coletta M., Paolucci E., Stornaiuolo A., Cossu G., and Mavilio F. (1998).** Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*. **279** (5356): 1528-1530.
- Florentin L., Mavrou A., Kekou K., Metaxotou C. (1995).** Deletion patterns of Duchenne and Becker muscular dystrophies in Greece. *J. Med. Genet.* **32**: 48-51.
- Franz WM., Muller M., Muller OG., Horrmann R., RothmannT., Cremer M., Cohn RD., Voit T., Katus HA. (2000).** Association of nonsense mutation of dystrophin gene with disruption of sarcoglycan complex in X-linked dilated cardiomyopathy. *Lancet*. **355**: 1781-1785.
- Galbiati F., Razani B., Lisanti MP. (2001).** Caveolae and caveolin-3 in muscular dystrophy. *Trends Mol. Med.* **7** (10): 435-41.
- Ghozlane S. (2001).** Diagnostic des maladies neuromusculaires. Repère myoline AFM.
- Gilgenkrantz H. (1990).** Pathologie moléculaire des myopathies de Duchenne et de Becker : contribution à l'étude des délétions. *Thèse de doctorat en médecine*. Faculté de médecine Lyon-Nord-Université Claude Bernard-Lyon I. 13-89.
- Gilgenkrantz H. (1993).** Dystrophine et myopathies: pathologie moléculaire, expression et thérapie génique. AFM. 15-87.
- Gillis JM. (2004).** Guérir la myopathie de Duchenne par l'utrophine?. *MEDECINE/SCIENCES*. **20**: 442-447.
- Gowers WR. (1879).** Clinical lecture on pseudo-hypertrophic muscular paralysis. *Lancet*. **2**: 37-39.

- Goyenvalle A., Fougousse F., Garcia L., Danos O., Vulin A., Leturcq F., Kaplan JC. (2004).** Le saut d'exon thérapeutique : un espoir pour les dystrophinopathies. *Médecine sciences.* **12** (20): 1163-1165
- Gussoni E., Soneoka Y., Strickland CD., Buzney EA., Khan MK., Flint AF., Kunkel LM. and Mulligan RC. (1999).** Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature.* **401** (6751): 390-394.
- Hance JE., Fu SY., Watkins SC., Beggs AH., Michalak M. (1999).** Alpha-actinin-2 is a new component of the dystrophin-glycoprotein complex. *Arch. Biochem.Biophys.* **365** (2): 216-222.
- Harper SQ., Hauser MA., DelloRusso C., Duan D., Crawford RW., Phelps SF., Harper HA., Robinson AS., Engelhardt JF., Brooks SV. and Chamberlain JS. (2002).** Modular flexibility of dystrophin: Implications for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Nature Medicine.* **8**: 253-261.
- Hoffman EP., Brown RH. and Kunkel LM. (1987).** Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell.* **51** (6): 919-928.
- Hoffman EP., Beggs AH., Koenig M., Kunkel LM. and Angelini C. (1989).** Cross reactive protein in Duchenne muscle. *Lancet.* **2**: 1211-1212.
- Hoffman EP. and Kunkel LM. (1989).** Dystrophin abnormalities in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Neuron.* **2**: 1019-1029
- Hoffman EP. (1993).** La myopathie de Duchenne. *La recherche.* **24** (250): 36-44.
- Hoffman EP. (1999).** Musclar dystrophy. Identification and use of genes for diagnostics and therapeutics. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **123** (11): 1050-1052.
- Hoogerwaard EM., Bakker E., Ippel PF., Leschot NJ.,Majoer-Krakauer DF., Van Essen AJ., Brunner HG., van Der Wouw PA., Wilde AA. and De Visser M. (1999).** Signs and symptoms of Duchenne muscular dystrophy and Becker muscular dystrophy among carries in the Netherlands: a cohort study. *Lancet.* **353**: 2116-2119.
- Huard C. (1998).** Transplantation de fibroblastes dermiques génétiquement modifiés dans muscle de souris dystrophique. *Mémoire présenté à la Faculté des &des supérieures de l'université Laval pour L'obtention du grade maître dès sciences (M. Sc.) Programme de biologie cellulaire et moléculaire.* Faculté de Médecine Université Laval. 4-14.

- Jeffrey S. and Chamberlain JS. (2002).** Gene therapy of muscular dystrophy *Human Molecular Genetics*, **11** (20) 2355-2362.
- Kaplan JC., Delpech M. (1995).** Biologie moléculaire et médecine, de la biologie à la clinique. (Éd) Médecine-Sciences/flammarion. Paris.
- Kingston HM., Harper PS., Pearson PL., Davies KE., Williamson R. and Page D. (1983).** Localization of the gene for Becker muscular dystrophy. *Lancet*. **2**: 1200
- Klein I. et Jaeger C. (Mars 2001).** La dystrophie musculaire de Duchenne. AFM.
- Kobzik L., Reid MB. et al. (1994).** Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature*. **372** (6506): 546-548.
- Koenig M., Hoffman EP., Bertelson CJ., Monaco AP., Feener CA. and Kunkel LM. (1987).** Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell*. **50**: 509-517
- Koenig M., Monaco AP. and Kunkel LM. (1988).** The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell*. **53**: 219-228.
- Koenig M. and Kunkel LM. (1990).** Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility. *J. Biol. Chem*. **265**: 4560-4566.
- Krag T. (2003).** Amelioration of the dystrophic mdx phenotype mediated by pharmacological compound: effect and possible mechanisms. *PhD Dissertation*. University of Copenhagen.
- Kuseyri GN., Topalogulu H., Yuksel-Apak M., Kirdar B. (1993).** Screening of deletions and RFLP analysis in Turkish DMD/BMD families by PCR. *Clin. Genet*. **43**: 261–266.
- Labrecque C., Bouchard JP., Malouin F., Roy R., Huard J., Tremblay JP. (1991).** Approche thérapeutique de La myopathie de Duchenne par transplantation de myoblastes. *Médecine/Sciences*. **7** (8): 821-829.
- Leger JJ., Augier N., Leger J., Mornet D., Pons F. (1991).** La ou les dystrophine (s), trois années après leur découverte. *Médecine/science*. **7** (8): 805-819.
- Lalic1 T., HAM Vossen R., Coffa J., Schouten JP., Guc-Scekic M., Radivojevic1 D., Djurisc1 M., Breuning MH., White SJ. and den Dunnen JT. (2005).** Deletion and

duplication screening in the DMD gene using MLPA. *European Journal of Human Genetics*. 1-4.

Lemaire C., Heilig R. and Mandel JL. (1988). The chicken dystrophin cDNA: striking conservation of the C-terminal coding and 3' untranslated regions between man and chicken. *EMBO J.* **7**: 4157-4162.

Leturcq F. et Kaplan JC. (2000). Le diagnostic étiologique des dystrophies musculaires récessives. *La lettre du neurologue*. **5** (IV) : 1-11.

Leturcq F. et Kaplan JC. (2005). Bases moléculaires des dystrophinopathies. Thérapie des dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker. Séance du 17 décembre 2003 TOME 199 N°1.

Lumeng C., Phelps S., Crawford GE., Walden PD., Barald K. and Chamberlain JS. (1999). Interactions between beta 2-syntrophin and a family of microtubule-associated serine/threonine kinases. *Nature Neuroscience*. **2** (7): 611-617.

Marques MJ. (2004). Structural biology of the dystrophin-deficient muscle fiber. *Braz. J. morphol. Sci.* **21** (3): 145-152.

Monaco AP., Bertelson CJ., Liechti-Gallati S., Moser H. and Kunkel LM.. (1988). An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics*. **2** (1): 90-95.

Monaco AP., Walker AP., Millwood I., Larin Z., and Lehrach H. (1992). A yeast artificial chromosome contig containing the complete Duchenne muscular dystrophy gene. *Genomics*. **12**: 465-473.

Mukoyama M., Kondo K. et al. (1987). Life spans of Duchenne muscular dystrophy patients in the hospital care program in Japan. *J. Neurol. Sci.* **81** (2-3): 155-158.

Newey SE., Howman EV., Ponting CP., Benson MA., Nawrotzki R., Loh NY., Davies KE. and Blake DJ. (2001). Syncoilin, a novel member of the intermediate filament superfamily that interacts with alpha-dystrobrevin in skeletal muscle. *J Biol Chem*. **276**:6645-55.

Nguyen F. (2001). La dystrophie musculaire du chien Golden Retriever (GRMD): Etude histologique de la forme néonatale fulminante et contribution à l'étude de pathogénie des lésions. *Thèse pour le diplôme d'Etat de Docteur Vétérinaire*. Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes. 13-96

- Nudel U., Zuk D., Einat P., Zeelon E., Levy Z., Neuman S. and Yaffe D. (1989).** Duchenne muscular dystrophy gene product is not identical in muscle and brain. *Nature*. **337**: 76-78.
- Olive M., Martineez-Matos JA., Montero J., Ferrer I. (1997).** Apoptosis is not the mechanism of cell death of muscle fibers in human muscular dystrophies and inflammatory myopathies. *Muscle Nerve*. **20** (10): 1328-1330.
- Partridge T. (1993).** Pathophysiology of muscular dystrophy. *Br. Hosp. Med.* **49** (1): 26-35
- Pasternak J.J. (2003).** Génétique moléculaire humaine. (Ed) De bœck université. Paris. 235-263.
- Pélissier J. et Urtizbera JA. (1996).** Les maladies neuromusculaires. De la génétique à la réadaptation. (Ed) Masson. Paris. 19-23.
- Perloff JK. Sydney Moice N., Stevenson WG., Gilmour RF. (1992).** Cardiac electrophysiology in duchenne muscular dystrophy: from basic science to clinical expression. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **3** (4): 394-409.
- Petrof BJ., Shrager JB., Stedman HH., Kelly AM. and Sweeney HL. (1993).** Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc Natl. Acad. Sci. U S A.* **90**: 3710-3714.
- Plauchu H., Junien C., Maire I., Said R., Gozlan R., Lalouel JM. (1982).** Detection of carriers for Duchenne muscular dystrophy. Quality control of creatine kinase assay. *Hum Genet.* **61** (3): 205-209.
- Ponting CP., Blake DJ., Davies KE., Kendrick-Jones J., Winder SJ. (1996).** ZZ and TAZ: new putative zinc fingers in dystrophin and other proteins. *Trends Biochem Sci.* **21** (1):11-13.
- Prelle A., Medori R. et al. (1992).** Dystrophin deficiency in a case of congenital myopathy. *J. Neurol.* **239** (2): 76-78.
- Ragot T., Vincent N., Chafey P., Vigne E., Gilgenkrantz H., Couton D., Cartaud J., Briand P., Kaplan JC., Perricaudet M. and Kahn A. (1993).** Efficient adenovirus-mediated transfer of a human minidystrophin gene to skeletal muscle of mdx mice. *Nature*. **361**: 647-650.
- Rentschler S., Linn H., Deininger K., Bedford MT., Espanel X., Sudol M. (1999).** The WW domain of dystrophin requires EF-hands region to interact with beta-dystroglycan. *Biol Chem.* **380** (4): 431-442.

- Reymond AN. (2004).** Ventilation à domicile chez les patients atteints d'une maladie neuromusculaire : Etude des patients suivis pendant 10 ans dans les cantons de Genève et Vaud *Thèse présentée à la Faculté de médecine de l'Université de Genève pour obtenir le grade de Docteur en médecine.* Editée par l'Hôpital Cantonal Universitaire Genève.
- Roberts RG., Gardner RJ. and Bobrow M. (1994).** Searching for the 1 in 2,400,000: a review of dystrophin gene point mutations. *Hum. Mutat.* **4**: 1-11.
- Rott HD., Breimesser FH. et Rodl W. (1985).** Imaging technics in muscular dystrophies. *J. Genet. Hum.* **33** : 397-403.
- Sadoulet-Puccio HM., Khurana TS., Cohen JB. et Kunkel LM. (1996).** Cloning and characterization of the human homologue of a dystrophin related phosphoprotein found at the Torpedo electric organ post-synaptic membrane. *Hum. Mol. Genet.* **5**: 489-496.
- Sadoulet-Puccio HM., Kunkel LM. (1996).** Dystrophin and its isoforms. *Brain Pathol.* **6**: 25-35.
- Sadoulet-Puccio HM., Rajala M. and Kunkel LM. (1997).** Dystrobrevin and dystrophin: An interaction through coiled-coil motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **94**: 12413-12418.
- Sbiti A., El Kerch F. and Sefiani A. (2002).** Analysis of Dystrophin Gene Deletions by Multiplex PCR in Moroccan Patients. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* **2** (3): 158-160.
- Schanen-Bergot MO. (2005).** Diagnostic des maladies neuromusculaires. Repère Savoir et Comprendre AFM.
- Schlaepfer DD., Hanks SK. et al. (1994).** Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature.* **372** (6508): 786- 91.
- Segalat L. (2002).** Dystrophin and functionally related proteins in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Neuromuscular Disorders* **12**, S105-109.
- Serratrice G., Pellissier JF., Pouget J. (1997).** Les maladies neuromusculaires. (Ed) masson. Paris. 17-25.
- Serre JL., Boileau C., Boutros N., Casetta A., Cointe D. et al. (2002).** Les diagnostics génétiques. (Ed) Biotech.INFO. Dunod. Paris. 140-155.
- Sewry CA., Sansome A., Clerk A., Sherratt TG., Hasson N., Rodillo E., Heckmatt JZ., Strong PN. and Dubowitz V. (1993).** Manifesting carriers of Xp21 muscular dystrophy: lack

of correlation between dystrophin expression and clinical weakness. *Neuromusc. Disord.* **3** (2): 141-148.

Shield LK. (2003). Les dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker ou myopathies de Duchenne et de Becker : questions/réponses. Muscular Dystrophy Association (MDA) Australia,

Skuk D., Tremblay JP. 2003). Cell therapies for inherited myopathies. *Curr Opin Rheumatol.* **15**: 723-729.

Smalheiser NR. and Kim E. (1995). Purification of cranin, a laminin binding membrane protein. Identity with dystroglycan and reassessment of its carbohydrate moieties. *J. Biol. Chem.* **270** (25): 15425-15433.

Stromer MH. (1998). The cytoskeleton in skeletal, cardiac and smooth muscle cells. *Histol. Histopathol.* **13** (1): 283-291.

Suzuki A., Yoshida M., Ozawa E. (1995). Mammalian alpha 1- and beta 1-syntrophin bind to the alternative splice- prone region of the dystrophin COOH terminus. *J. Cell. Biol.* **128** (3): 373-81.

Towbin JA. (1998). The role of cytoskeletal proteins in cardiomyopathies. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10** (1) : 131-139.

Ulgenalp A., Giray1 O., Bora1 E., Hyzly T., Kurul1 S., Saoyin-Saylam G., Karasoy H., Uran N., Dizdarer G., Tutuncuoolu S., Dirik1 E., Ozkynay F., Erçal1 D. (2004). Deletion analysis and clinical correlations in patients with Xp21 linked muscular dystrophy. *The Turkish Journal of Pediatrics.* **46** (4): 333-338.

Van Bogaert. (2005). Introduction à la Neurologie Pédiatrique. Cours théorique 30 H, licence en logopédie ULB-UCL (1ère année) et licence en sciences psychologiques ULB (spécialisation psychologie des apprentissages et des déficiences, option neuropsychologie). 94-99.

Van Ommen GJB., Bertelson CJ., Ginjaar HB., Den Dunnen JT., Bakker E., Chelly J., Matton M., Van Essen AJ., Bartley JA., Kunkel LM. and Pearson PL. (1987). Long-range genomic map of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene: Isolation and use of J66 (DXS268), a distal intragenic marker. *Genomics.* **1**: 329-336.

Vilquin JT., Kennel PF. et al. (2001). Electrotransfer of naked DNA in the skeletal muscles of animal models of muscular dystrophies. *Gene Ther.* **8** (14): 1097-107.

Wang J., Pansky A., Venuti JM., Yaffe D., Nudel U. (1998). A sea urchin gene encoding dystrophin-related proteins. *Hum. Mol. Genet.* **7** : 581-588.

Warte JM. (2003). Diagnostic des maladies musculaires. *Faculté de médecine–ULB–Strasbourg–France–Enseignement.*

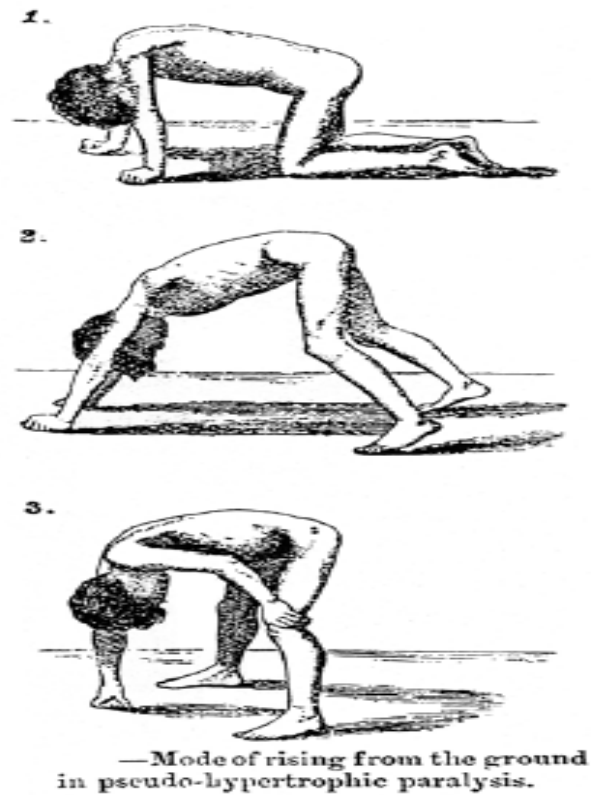
www.dmd.nl

Yoshida M., Suzuki A., Yamamoto H., Noguchi S., Mizuno Y. and Ozawa E. (1994). Dissociation of the complex of dystrophin and its associated proteins into several unique groups by n-octyl beta-D-glucoside. *Eur. J. Biochem.* **222**: 1055-1061.

Young-Chul Choi MD. (2006). Molecular and Pathological Diagnosis of Muscular Dystrophies. *HANYANG MEDICAL REVIEWS.* **26** (1): 77-93.

Annexes

Annexe 1 : Dessins de Gower d'un enfant atteint de dystrophie musculaire se levant du sol (Engel *et al.*, 1994).



Annexe 2 : Classification des maladies neuromusculaires (Rivière *et al.*, 2005 ; Young-Chul Choi, 2006)

Maladies	Mode de transmission	Localisation chromosomique	Protéine (produit du gène)
Dystrophies musculaires progressives			
<i>Dystrophies musculaires de Duchenne de Boulogne</i>	RX	Xp21	Dystrophine
<i>Dystrophies musculaires de Becker</i>	RX	Xp21	Dystrophine
<i>Formes mineures de dystrophinopathies</i>	RX ou sporadique	Xp21	Dystrophine
Limb-girdle muscular dystrophy (LGMD)			
<i>Dystrophie musculaire des ceintures type « Erb » ou LGMD 2A</i>	AR	15q15.1-15q15.3	calpaine 3
<i>Dystrophie musculaire type « ceintures » 2B ou LGMD 2B</i>	AR	2p12-14	dysferline
<i>γ-sarcoglycanopathie (LGMD 2C)</i>	AR	13q12	<i>LGMD2C=SGCG</i>
<i>α- sarcoglycanopathie ou LGMD 2D</i>	AR	17q21	α- sarcoglycane ou

			adhaline
<i>B- sarcoglycanopathie ou LGMD 2E</i>	AR	4q12	β- sarcoglycane
<i>γ- sarcoglycanopathie ou LGMD2F</i>	AR	13q12	γ - sarcoglycane
<i>Dystrophie musculaire type « ceintures » 2G ou LGMD 2F</i>	AR	17q11-q12	Télétonine
<i>Dystrophie musculaire type « ceintures » 2H ou LGMD 2H</i>	AR	9q31-33	TRIM32
<i>Dystrophie musculaire type « ceintures » 2I ou LGMD 2I</i>	AR	19q13.3	FKRP
<i>Dystrophie musculaire type « ceintures » 2J LGMD2J</i>	AR	2q31	Titine
<i>Dystrophie musculaire type « ceintures » 1A ou LGMD 1A</i>	AD	5q31-q33	myotiline
<i>Dystrophie musculaire type « ceintures » 1B ou LGMD 1B</i>	AD	1q11-q21	Lamine A et/ou C
<i>Dystrophie musculaire type « ceintures » 1C ou LGMD 1C</i>	AD	3p25	cavéoline3
<i>Dystrophie musculaire type « ceintures » 1D ou LGMD 1D</i>	AD	6q23	inconnue
<i>Dystrophie musculaire type « ceintures » 1E ou LGMD 1E</i>	AD	6q	inconnue
<i>Dystrophie musculaire type « ceintures » ou LGMD 1F</i>	AD	2q	inconnue
<i>Dystrophie musculaire des ceintures dominante LGMD1G</i>	AD	4p21	?
<i>Dystrophie musculaire facio-scapulo-humérale (FSH)</i>	AD	4q35	?
<i>Dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss</i>	RX	Xq23	émerine
<i>Dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss Autosomique dominante</i>	AD	1q11-q23	lamine A/C
<i>Dystrophie musculaire oculopharyngée (DMOP)</i>	AD	14q11.2-q13	Poly-A-binding protein 2
Dystrophies musculaires congénitales			
<i>Dystrophie musculaire congénitale avec déficit en mérosine</i>	AR	6q22.23	mérosine ou laminine α2
<i>Dystrophie musculaire congénitale avec déficit secondaire en mérosine</i>	AR	1q42	?
<i>Dystrophie musculaire congénitale sans déficit en mérosine</i>	AR	?	?
<i>Syndrome de la colonne raide (Rigid Spine Syndrom)</i>	AR	1q35-36	SEPN1
<i>Dystrophie musculaire congénitale de type Fukuyama</i>	AR	9q31-q33	fukutine
<i>Syndrome de Walker-Warburg</i>	AR	9q34	POMT1
<i>Syndrome MEB (Muscle-Eye-Brain)</i>	AR	1p32-p34	POMGNT1
Myopathies distales			
<i>Myopathies distales de type Welander</i>	AD	2p13	?

<i>Myopathies distales de type Markesbery-Griggs</i>	AD	2q31-33	TTN
<i>Myopathies distales de type Miyosh</i>	AR	2p13.3-p13.1	dysferline
<i>Myopathies distales de type Monaka</i>	AR	9p1-q1	GNE
Myopathies congénitales			
<i>Nemaline myopathie</i>	AD	1q21-q23	tropomyosine 3 ou TPM-3
	AR	2q21-q22	nébuline
	AR	19q13.4	troponine T1
	AD, AR ou sporadique	1q42.1	α -actine 2
	AD, AR ou sporadique	9p13.2-p13.1	tropomyosine 2
<i>Myopathie congénitale à central core</i>	AD	19q13.1	récepteur à la ryanodine
<i>Myopathie congénitale centronucléaire</i>	AD ou AR	19p13.2	?
<i>Myopathie congénitale myotubulaire</i>	RX	Xq28	myotubularine
<i>Myopathie congénitale à multi-minicores</i>	AD ou AR	1p36	SEPNI
Dystrophies myotoniques			
<i>Dystrophie myotonique de Steinert</i>	AD	19q13.2-13.3	myotonine protéine kinase
<i>Dystrophie myotonique de type 2 (DM2)</i> <i>Myopathie myotonique proximale (PROMM : proximal myotonic myopathy)</i>	AD	3q21.3	ZNF9
<i>Dystrophie myotonique de type 3 (DM3) (AD) 15q21</i> <i>Rippling muscle disease)</i>		15q21	
	AD	1q41 3p25	CAV
<i>Maladie de Brody</i>	AR	16p12	SERCA1
<i>Dystrophie myotonique de type 2 (PROMM)</i>	AD	3q21.3	ZNF9
Myotonies Congénitales			
<i>Myotonie Congénitale de Thomson</i>	AD	7q35	canal chlore musculaire
<i>Myotonie Congénitale de Becker</i>	AR	7q35	canal chlore musculaire
<i>Syndrome de Schwartz-Jampel de type I ou myotonie chondrodysplasique</i>	AR	1p34 -p36.1	perlecan
<i>Syndrome Schwartz-Jampel type II</i>	AR	5p13.1	LIFR
Paralysies périodiques			
<i>Paralysie périodique hyperkaliémique (adynamie épisodique de Gamstorp) (AD), voir aussi paramyotonie d'Eulenburg</i>		17q13.1-q13.3	Sous-unité α du canal sodium musculaire
<i>Paramyotonie d'Eulenburg, voir aussi paralysie périodique hyperkaliémique</i>	AD	17q13.1-q13.3	Sous-unité α du canal sodium musculaire
<i>Myotonie avec crampes douloureuses, voir aussi paralysie périodique hyperkaliémique</i>	AD	17q13.1-q13.3	Sous-unité α du récepteur aux

			dihydropyridines
<i>Myotonie fluctuante, voir aussi paralysie périodique hyperkaliémique</i>	AD	17q13.1-q13.3	SCN4A
<i>Paralysie périodique hypokaliémique type I (maladie de Westphal)</i>	AD	1q31-32	CACNL1A3
<i>Paralysie périodique hypokaliémique type II</i>	AD	17q13.1-q13.3	SCN4
<i>Paralysie périodique avec dysrythmie cardiaque, sensible au potassium ou syndrome d'Andersen</i>	AD	17q23	KCJN2= Kir2.1
<i>Paralysie périodique</i>	AD, AR	11q13-q14	KCNE3
Maladies inflammatoires du muscle			
<i>Polymyosites</i>	Non héréditaires		
<i>Dermamyosites</i>	Non héréditaires		
<i>Myosite à inclusions</i>	Non héréditaire		
Fibrodysplasie ossifiante progressive			
<i>Fibrodysplasie ossifiante progressive (FOP)</i>	AD ou sporadique	4q27-31	
Myopathies métaboliques			
<i>Myopathies mitochondriales</i>	Transmission maternelle, AD, AR		
Lipidoses musculaires :			
<i>Myopathie avec déficit en carnitine palmitoyl transférase de type II (CPTII)</i>	AR	1p32	carnitine palmitoyl transférase II
<i>Myopathie avec déficit en carnitine</i>	AR	5q33.1	carnitine
<i>Myopathie avec déficit en acyl CoA déshydrogénase</i>	AR	12q22-qter	acyl CoA déshydrogénase
Glycogénoses musculaires :			
<i>Maladie de pompe</i>	AR	17q25.2-25.3	maltase acide
<i>Maladie de Mac Ardle</i>	AR	11q13	phosphorylase musculaire
<i>Maladie de Tarui</i>	AR	12q13.3	phosphofruktokinase musculaire
<i>Maladie de Cori</i>	AR	1p21	enzyme débranchante
Maladies de jonction neuromusculaire			
<i>Myasthénie acquise</i>	Non héréditaire, auto-immune		
Syndromes myasthéniques congénitaux :			
<i>Myasthénie infantile familiale</i>	AR	17pter	
<i>Déficit en acétylcholinestérase</i>	AR	3p24.2	collagène Q
<i>Déficit en récepteur de l'acétylcholine (RACH)</i>	AR	17p13	Sous-unité ε du récepteur à l'acétylcholine
<i>Syndrome du canal lent</i>	AD	2q24-q32	Sous-unité α du récepteur à l'acétylcholine

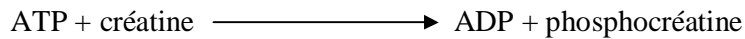
	AD	17p11-p12	Sous-unité β du récepteur à l'acétylcholine
	AD	17p13	Sous-unité ε du récepteur à l'acétylcholine
<i>Syndrome du canal rapide</i>	AR	2q24-q32	Sous-unité α du récepteur à l'acétylcholine
	AR	17p11-p12	Sous-unité β du récepteur à l'acétylcholine
	AR	17p13	Sous-unité ε du récepteur à l'acétylcholine
Maladies du motoneurone			
<i>Amyotrophie spinale infantile de type, I bis et II</i>	AR	5q12.2-13.3	SMN ou Survival Motor Neuron
<i>Amyotrophie spinale infantile de type III</i>	AR	5q12	SMN
<i>Amyotrophie spinale de l'adulte de type IV</i>	AR	5q12	SMN
Neuropathies héréditaires sensitivo-motrices			
<i>CMT1A</i>	AD	17p11.2-p12	PMP-22
<i>CMT1B</i>	AD	1q22-q23	Po
<i>CMT1D</i>	AD	10q21.1-p12	EGR2
<i>CMT1C</i>	AD	16p13.1-p12.3	LITAF
<i>CMTX</i>	DX	Xq13.21	connexine 32
<i>CMT2A1</i>	AD	1p35-p36	KIF1B β
<i>CMT2A2</i>	AD	1p32-p36	MFN2
<i>CMT2B1</i>	AD	3q13-Q22	RAB7
<i>CMT2B2</i>	AD	19q13.3	?
<i>CMT2C</i>	?	?	?
<i>CMT2D</i>	AD, forme spinale	7p14	GARS
<i>CLT 2E</i>	AD	8p21	NEFL
<i>CMT 2F</i>	AD	7q11-q21	HSPB1
<i>CMT 2L</i>	AD	12q24	?
<i>CMT4A</i>	AR	8q13-q21.1	GDAP1
<i>CMT4B1</i>	AR	11p22	CMT4B = MTMR2
<i>CMT4B2</i>	AR	11p15	SBF2
<i>CMT2C</i>	AR	5q31-q33	KIAA1985
<i>CMT4D ou Maladie de Lom (HSMN-L)</i>	AR	8q24.3	HSMN-L=NDRG1
<i>CMT 4E</i>	AD, AR	10q21-q22.1	CMT4E = EGR2
<i>CMT4F ou maladie de Dejerine-Sottas</i>	AR	19q13.1- 13.3	CMT4F = PRX
<i>CMT</i>	intermédiaire dominante	19p12-p13.2	DNM2

Abréviations : AD : autosomique dominante ; AR : autosomique récessive ; FKRP : fukutin-related protein ; TCAP : telethonin ; XR : récessive liée à X. PROMM : proximal myotonic myopathy

Annexe 3

La créatine phosphokinase (CPK) :

La créatine phosphokinase a pour nom systématique « ATP : créatine N- transférase ». Elle catalyse la réaction réversible :



La créatine phosphokinase existe sous quatre formes monomériques codées par des gènes différents. Deux formes sont cytoplasmiques : B et M, et forment des dimères : MM, BM et BB. Deux formes sont mitochondriales : mi-CPKu ou mi-CPKa, forme ubiquitaire, et mi-CPKs ou mi-CPKb, forme musculaire.

Dans le muscle strié squelettique, l'isoforme CPK-MM représente 95 à 98% de la créatine kinase présente, le reste étant une CPK mitochondriale. Dans le muscle strié squelettique, l'isoforme CPK-MM est liée à l'ATPase de la myosine, dont elle favorise l'activité en contrôlant localement le pH. Elle est également présente sur la membrane du réticulum endoplasmique, où elle favorise localement le flux entrant de calcium.

L'augmentation du taux sérique de créatine kinase indique l'existence d'une pathologie musculaire active :

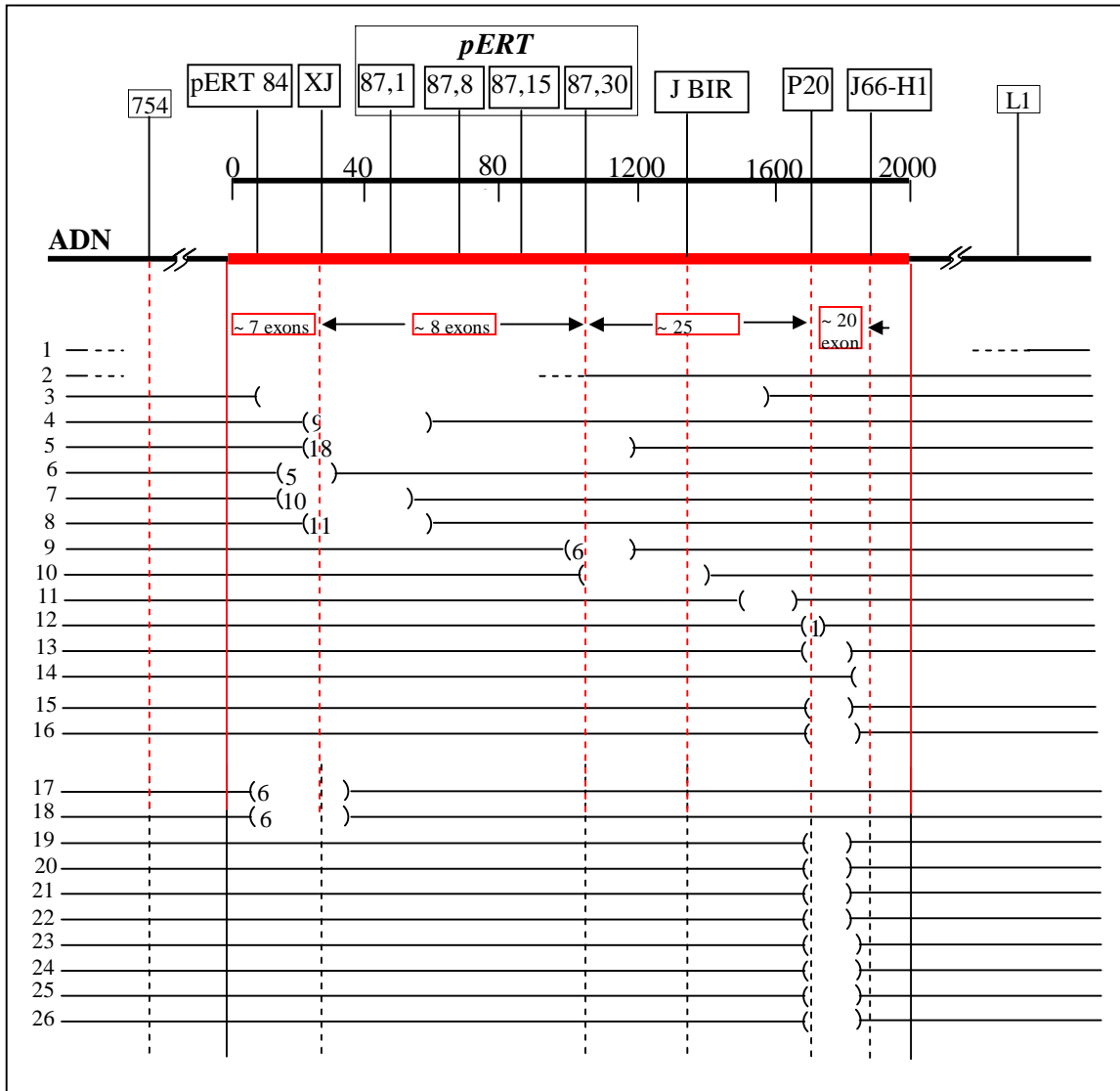
La CPK est libérée dans le sérum à la faveur d'une repture de l'intégrité et/ ou d'un trouble de la perméabilité membranaire des fibres musculaires.

Les taux de CPK-MM sérique sont significativement augmentés dans de nombreuses dans de nombreuses affections musculaires, au premier rang desquelles la dystrophie musculaire de Duchenne.

L'isoenzyme BB significativement augmenté dans les cardiomyopathies et l'infarctus du myocarde.

L'isoenzyme MB (cardiaque) est détectable dans le sérum des patients atteints de DMD.

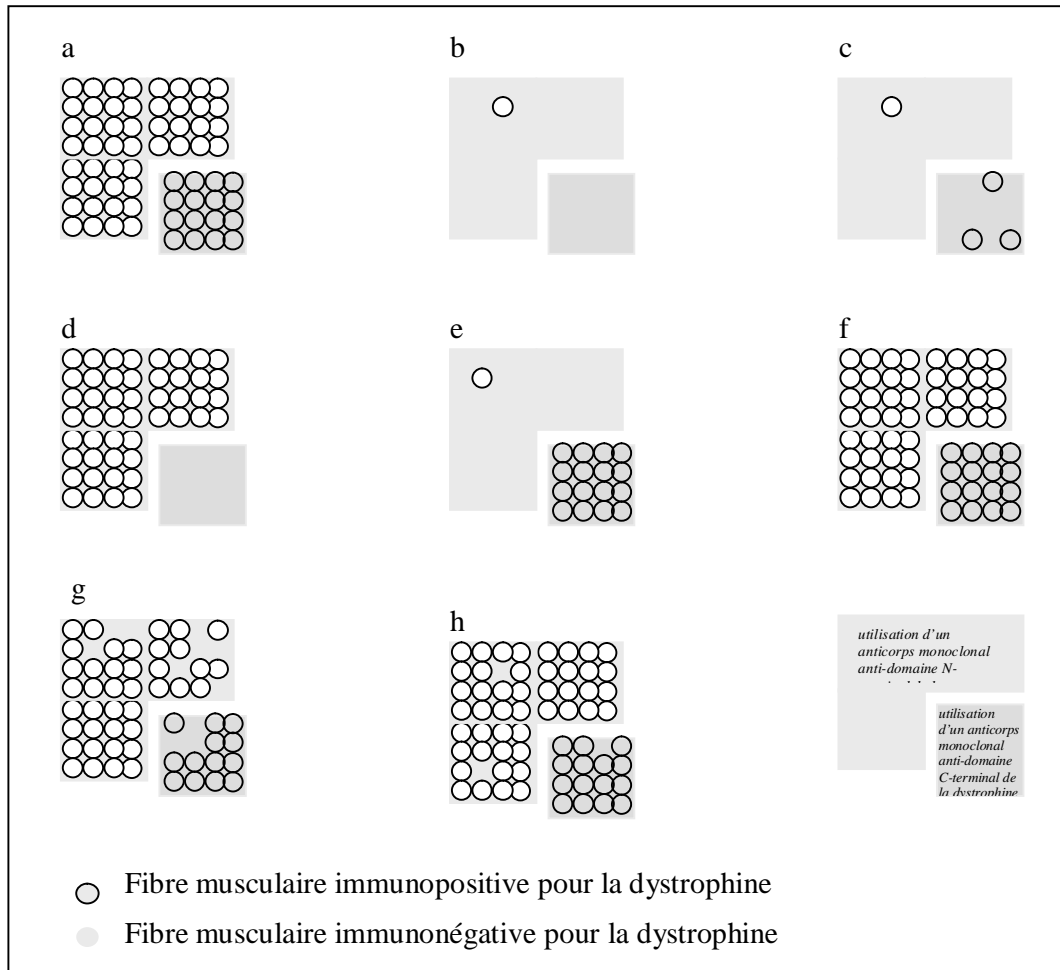
Annexe 4 : Diversité des délétions dans le gène DMD (Kaplan et Delpech, 1995).



Les dystrophies musculaires de Duchenne sont en rouge, les dystrophies musculaires de Becker en noir.

Il n'existe pas de corrélation entre la taille de délétion et la gravité de la forme clinique. En effet dans le cas n°5 la délétion touche 18 exons, et entraîne un tableau clinique peu évolutif, intermédiaire entre la forme de Duchenne et celle de Becker, contrastant avec la délétion très minime du cas n°12 (un seul exon est manquant) qui est responsable d'une forme sévère. L'élément important est l'effet de la délétion sur le cadre de lecture. Les chiffres indiqués dans les délétions correspondent au nombre d'exons perdus.

Annexe 5: Représentation schématique de la répartition en immunohistochimie de la dystrophine dans le muscle d'individus normaux (a), souffrant de myopathie de Duchenne (b, c), de myopathie de Becker (d, e, f) ou porteurs de la maladie, symptomatiques (g) ou non (h).



Annexe 6 :

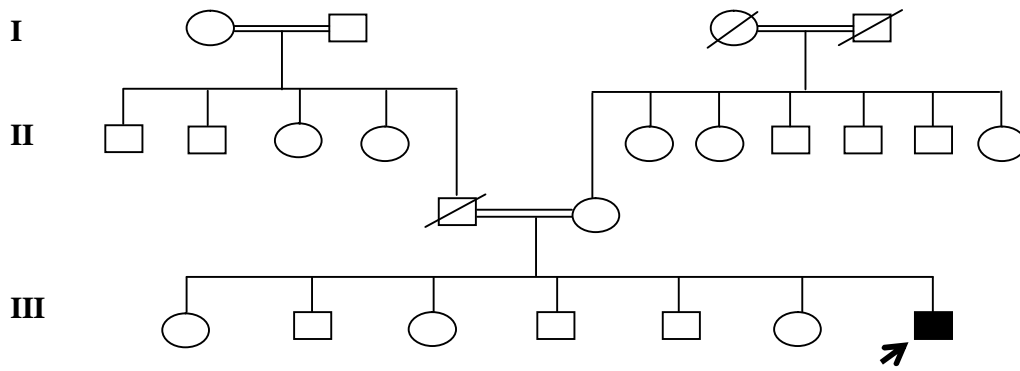


Fig.1 : Arbre généalogique de la famille du malade N° 1

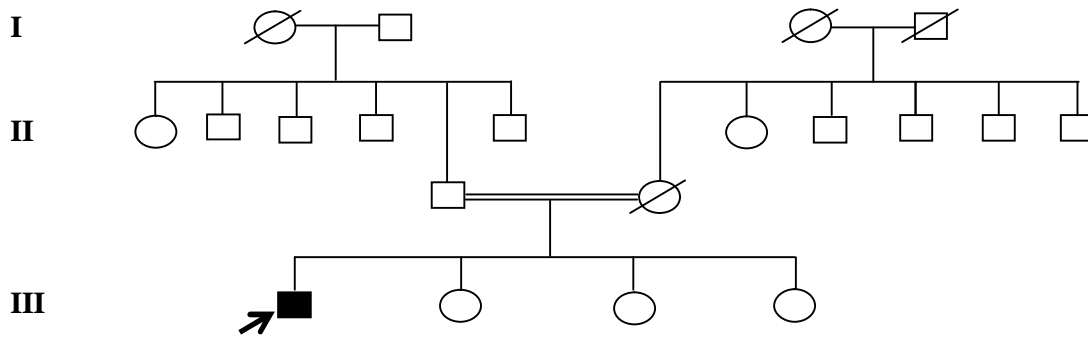


Fig.2 : Arbre généalogique de la famille du malade N° 2

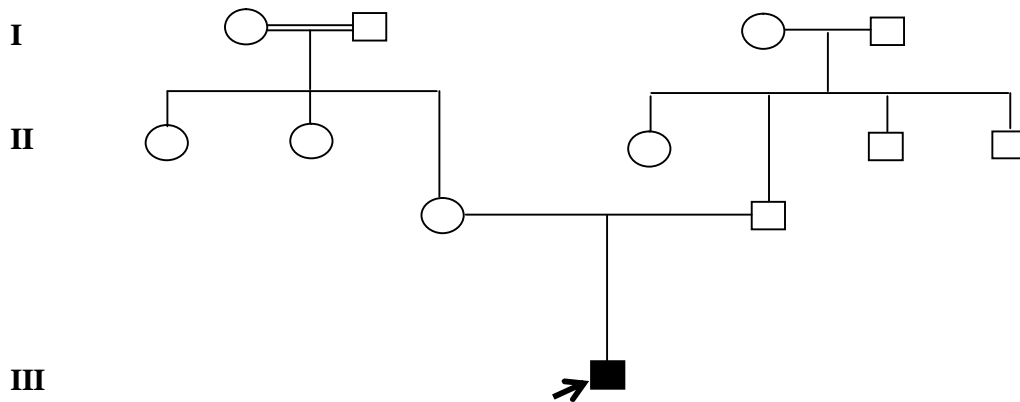


Fig.3 : Arbre généalogique de la famille du malade N° 3

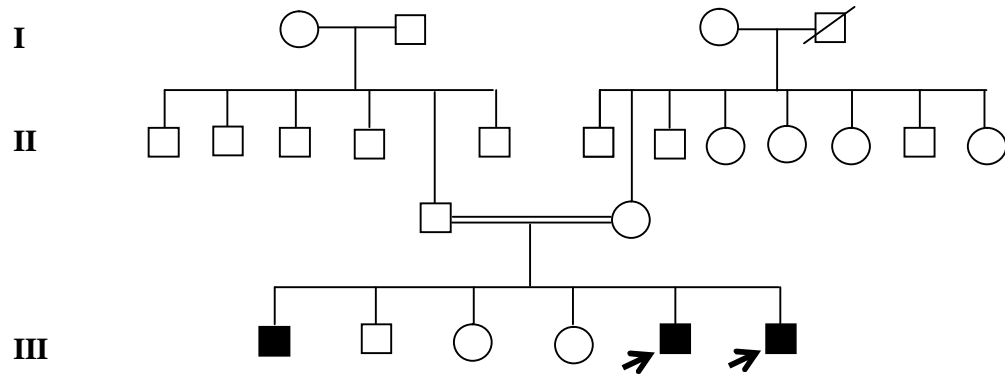


Fig.4 : Arbre généalogique de la famille du malade № 4 et 5

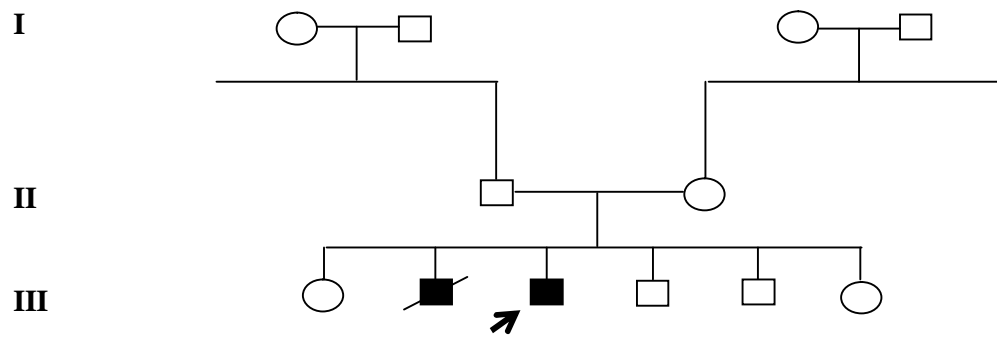


Fig.5 : Arbre généalogique de la famille du malade № 6

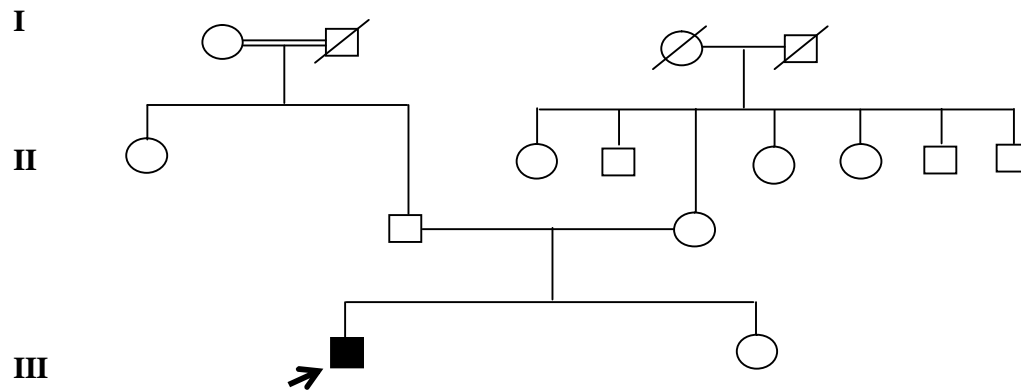


Fig.6 : Arbre généalogique de la famille du malade № 7

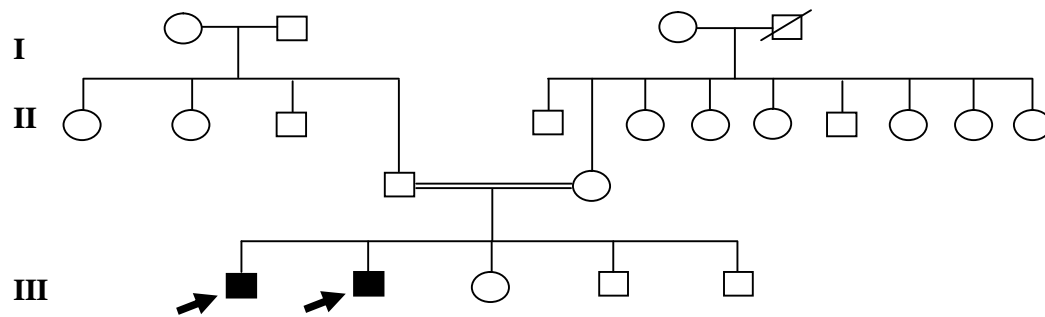


Fig.7 : Arbre généalogique de la famille du malade № 8 et 9

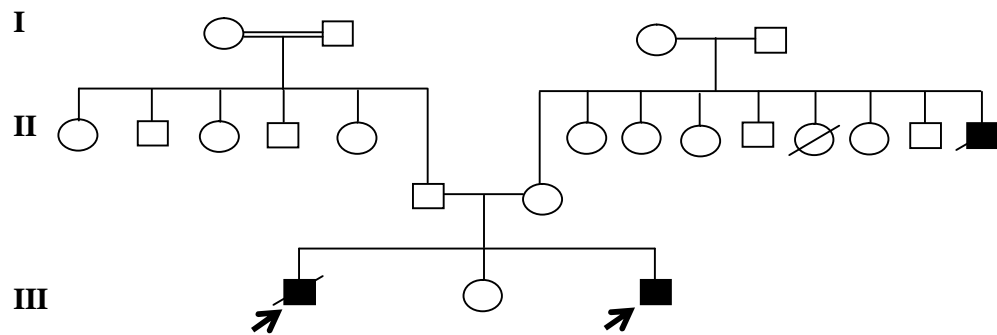


Fig.8 : Arbre généalogique de la famille du malade № 10 et 11

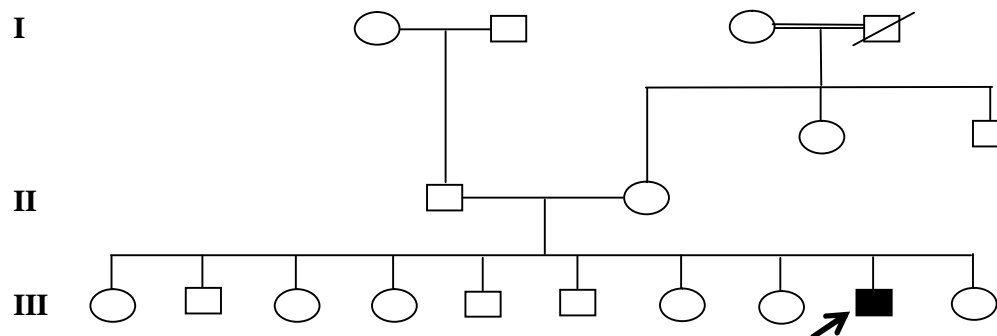


Fig. 9 : Arbre généalogique de la famille du malade № 12

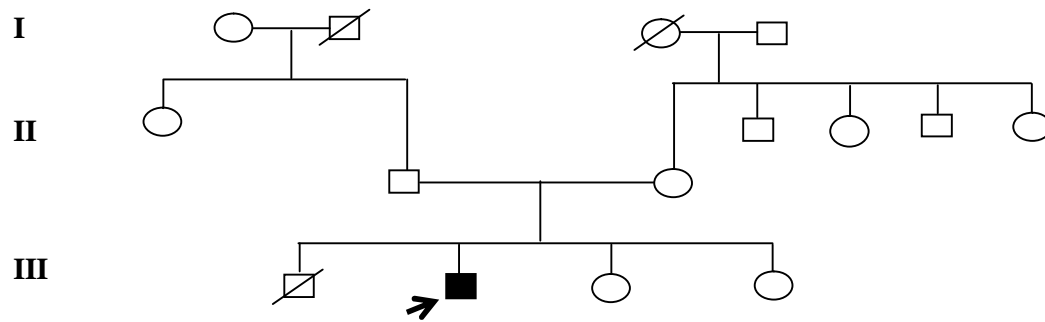


Fig.10 : Arbre généalogique de la famille du malade N° 13

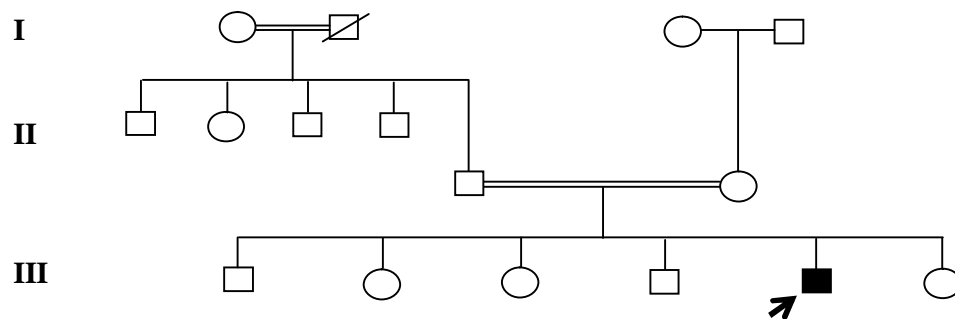


Fig.11: Arbre généalogique de la famille du malade N° 14

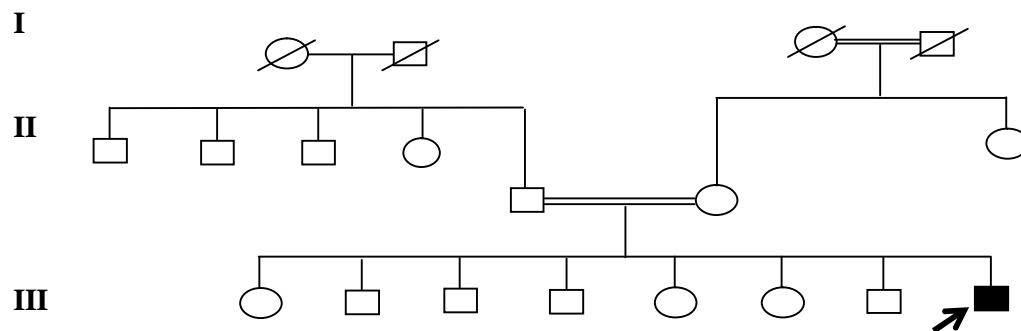


Fig.12 : Arbre généalogique de la famille du malade N° 15

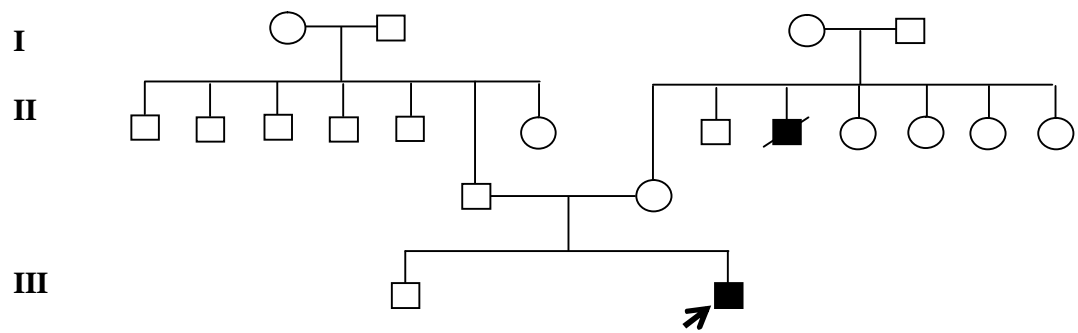


Fig.13 : Arbre généalogique de la famille du malade № 16

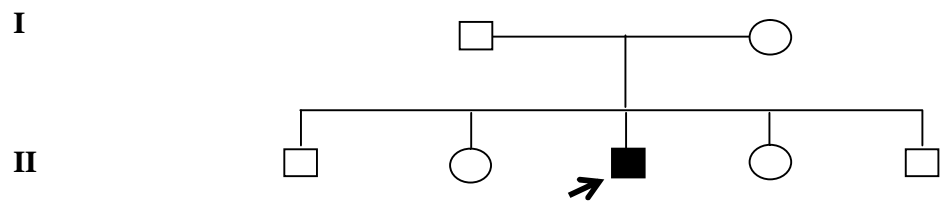


Fig.14: Arbre généalogique de la famille du malade № 17

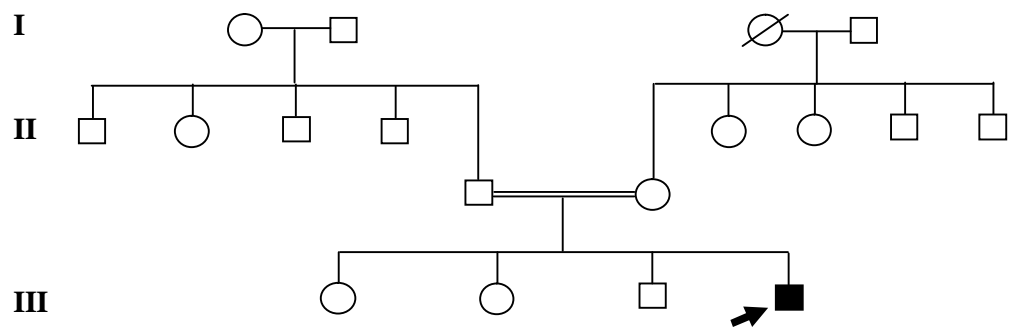


Fig.15 : Arbre généalogique de la famille du malade № 18

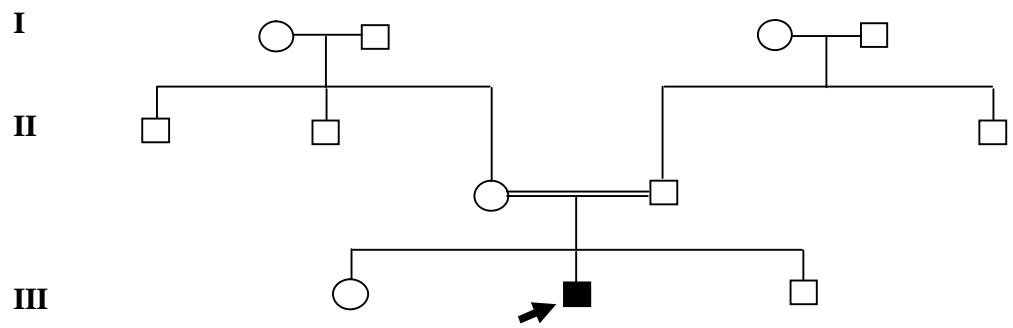


Fig.16 : Arbre généalogique de la famille du malade № 19

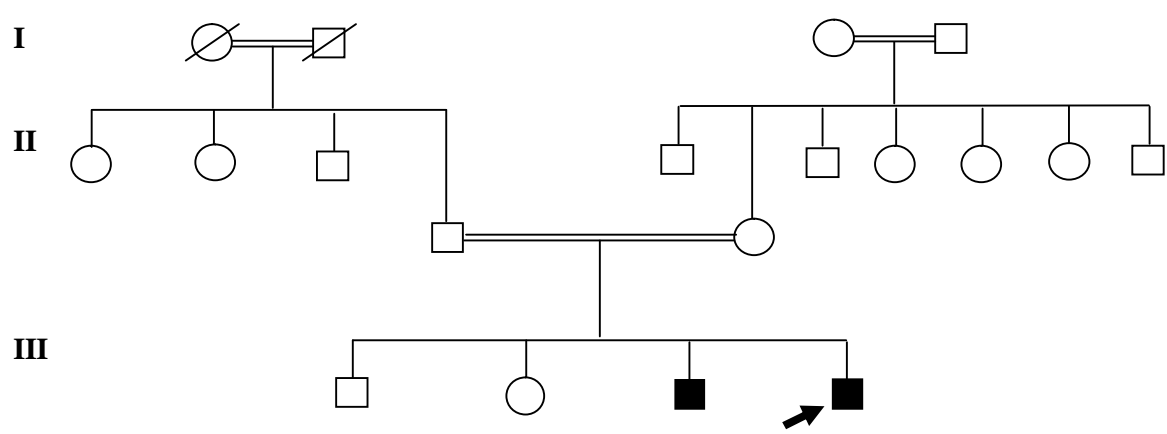


Fig.17 : Arbre généalogique de la famille du malade № 20

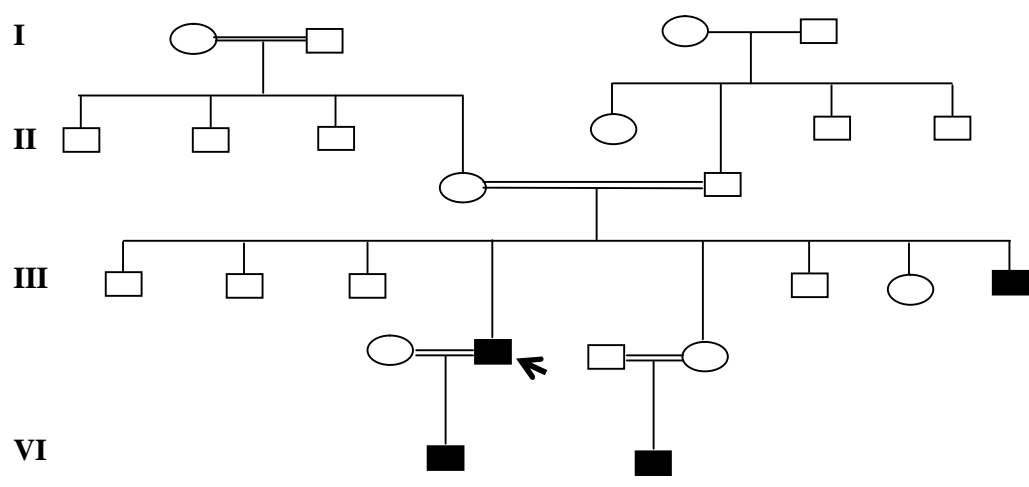


Fig.18 : Arbre généalogique de la famille du malade № 21

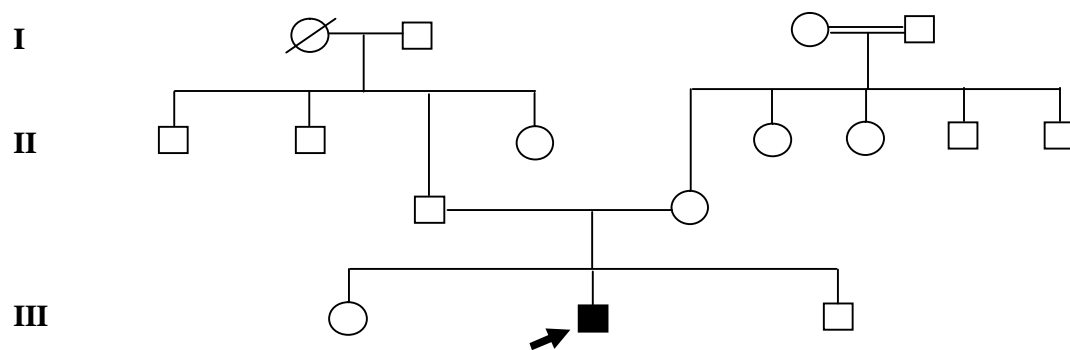


Fig.19 : Arbre généalogique de la famille du malade № 23

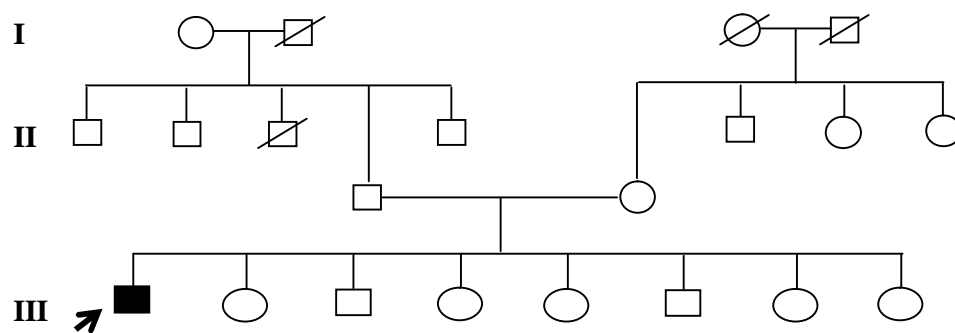


Fig.20: Arbre généalogique de la famille du malade № 24

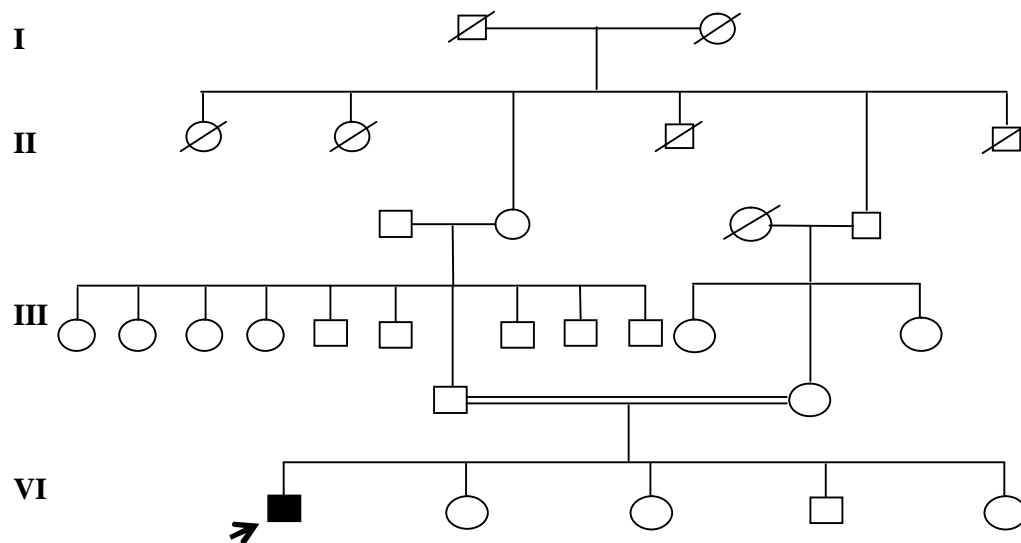


Fig. 21: Arbre généalogique de la famille du malade № 25

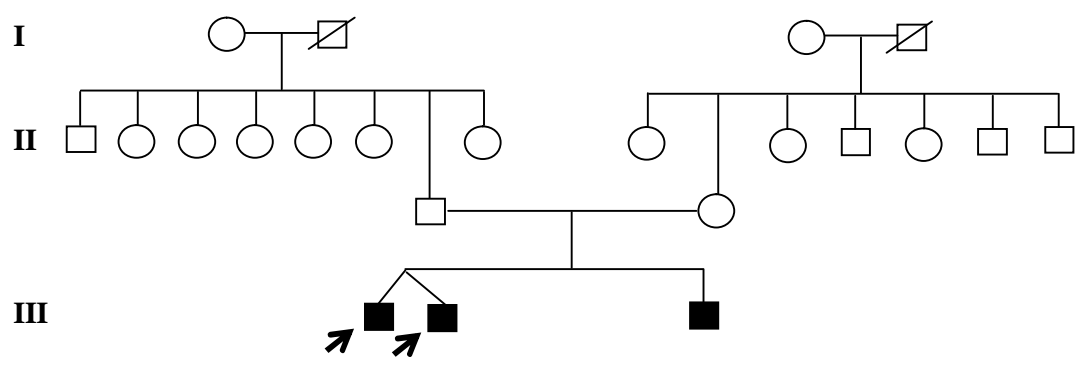


Fig.22: Arbre généalogique de la famille du malade № 26 et 27

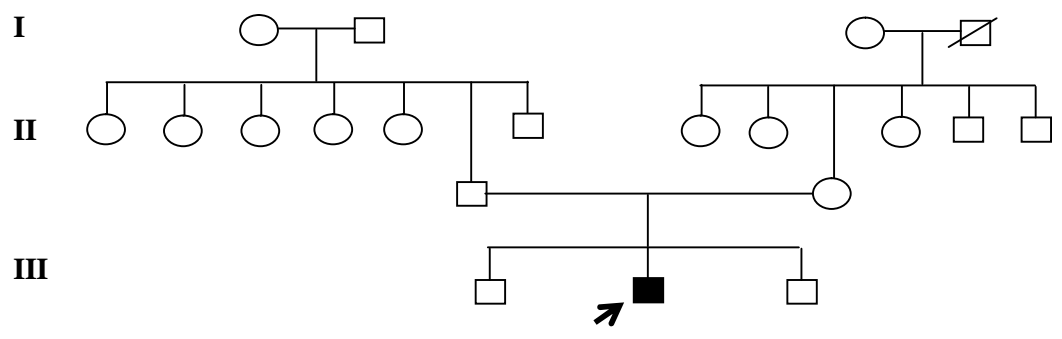


Fig. 23 : Arbre généalogique de la famille du malade № 28

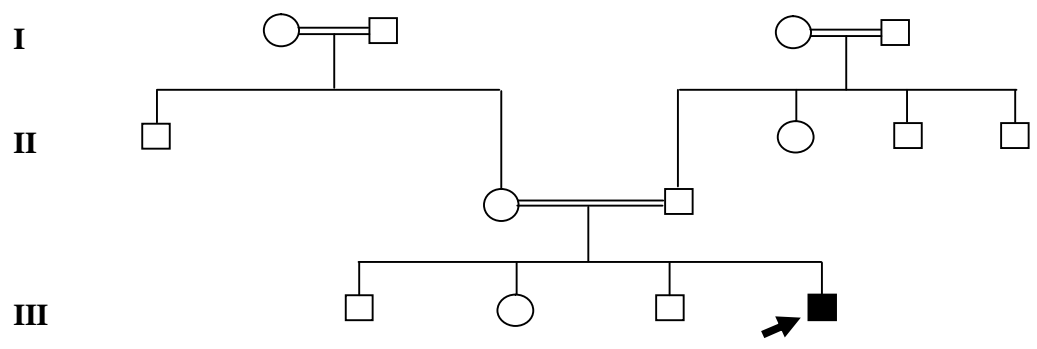


Fig. 24: Arbre généalogique de la famille du malade № 29

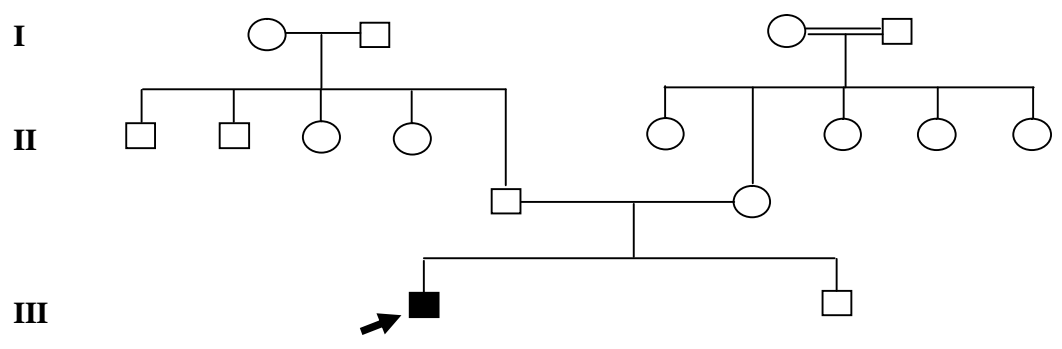


Fig. 25 : Arbre généalogique de la famille du malade № 30

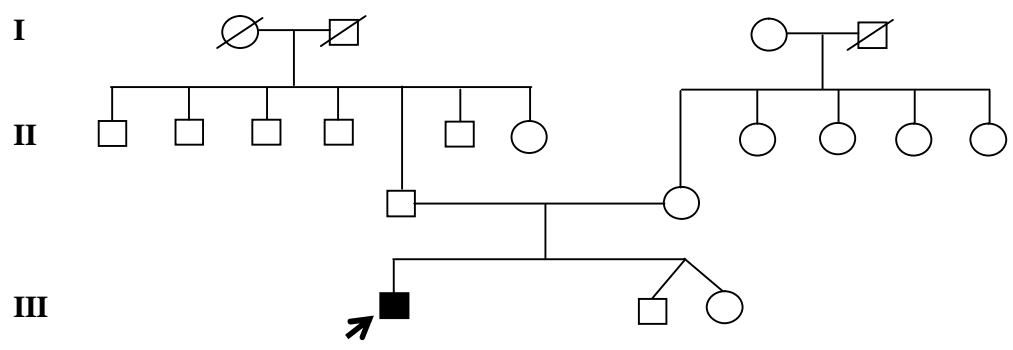


Fig.26 : Arbre généalogique de la famille du malade №31

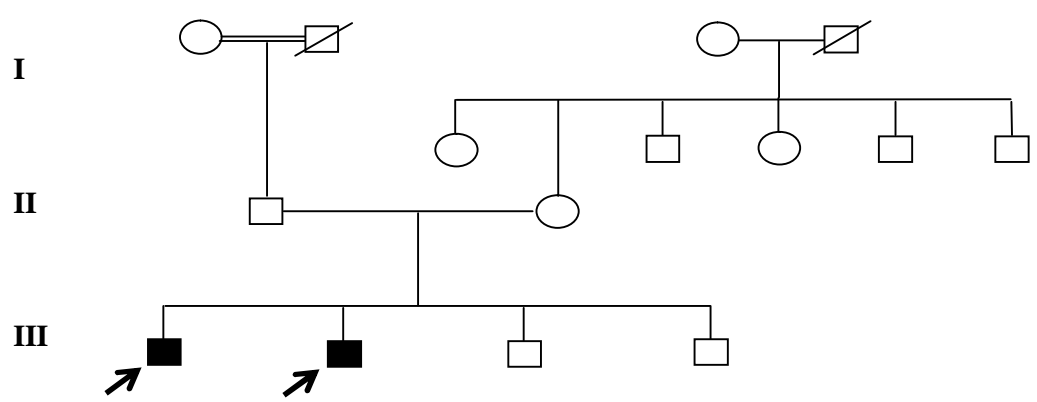


Fig.27 : Arbre généalogique de la famille du malade №32 et 33

Annexe 7 :

Extraction de l'ADN génomique à partir de sang total (technique au NaCl) :

L'ADN utilisé est extrait à partir de leucocytes présents dans le sang.

1- Principe :

Les leucocytes sont séparés du sang total par lyse et traités ensuite par un détergent (SDS) et une protéinase K. l'ADN nucléaire est libéré dans le milieu et les protéines qui lui sont digérées et éliminées par précipitation au Na Cl. La pelote d'ADN est formée dans le surnageant par précipitation avec l'éthanol.

2- Préparation du culot leucocytaire :

10 ml de sang sont prélevés sur anticoagulant (EDTA).

1- Dans un tube Falcon de 50 ml mettre le sang et compléter à 50 ml avec du TE 20 : 5 (Tris 20 mM, EDTA* 5 mM). Laisser 10 min dans la glace.

2- Centrifuger 10 min à 3900 tours/min.

3- Aspirer le surnageant avec la trompe à vide.

4- Le lavage consiste à verser le surnageant en conservant le culot formé, puis à rajouter à nouveau le TE 20 : 5 (compléter à 25 ml) et laisser 10 min dans la glace.

5- Centrifuger dans les mêmes conditions que la première fois.

6- Aspirer le surnageant avec la trompe à vide : obtention d'un culot de leucocytes (si on veut s'arrêter à ce niveau les mettre dans un tube NUNC de 1,5 ml avec du TE 10 : 1 et les conserver à -20°C dans le frigo).

3- Extraction de l'ADN :

1- Transvaser le culot de leucocytes dans un tube Falcon de 15 ml.

2- Ajouter 3 ml de tampon de lyse (NaCl 400mM, EDTA 2Mm, Tris 10mM, pH 8,2).

3- Ajouter 200µl de SDS 10% ce qui a pour effet de détruire les membrane des globules blancs et de libérer l'ADN total.

4- Ajouter 100µl de protéinase K à 10 mg/ml ce qui a pour digérer toutes les protéines.

5- Agiter le tube sur une roue à 37°C pendant une nuit.

6- Le lendemain, refroidir dans la glace.

- 7- Ajouter 1 ml de NaCl 4M et agiter vigoureusement à la main.
- 8- Remettre 5 min dans la glace (précipitation des protéines).
- 9- Centrifuger 15 min à 2500 tours/min.
- 10- Transvaser le surnageant dans un tube Falcon de 50 ml, ajouter 2 fois son volume d'éthanol absolu préalablement refroidi et agiter en retournant le tube plusieurs fois : la pelote d'ADN se forme.
- 11- laisser éventuellement 30 min à -20°C si la pelote ne se forme pas.
- 12- Récupérer la pelote d'ADN avec une pipette Pasteur et la rincer 2 fois dans l'éthanol 70%.
- 13- Mettre la pelote dans un tube Ependorff de 1,5ml.

1-3- Solubilisation :

- 1- Ajouter entre 300 et 1000µl de TE 10 : 1 selon la grosseur de la pelote et la concentration souhaitée.
- 2- laisser une nuit sur agitateur rotateur à 37°C, puis à 4°C jusqu'à dissolution complète (1 à 2 jours).

1-4- Détermination de la concentration et de la pureté de l'ADN :

La concentration de l'ADN et sa pureté sont déterminées grâce à la lecture de la densité optique à l'aide d'un spectrophotomètre. Les bases puriques et pyrimidiques absorbent fortement dans l'ultraviolet à 260 nm. Il faut rechercher une éventuelle contamination protéique (les protéines absorbent à 280 nm ainsi qu'à 260 nm), pour cela on effectue une seconde lecture de densité optique à 280 nm.

- 1- Mettre 1000µl d'eau distillée dans une cuve pour mesurer le zéro expérimental.
- 2- Ajouter 10µl d'ADN dans un tube contenant 990µl d'eau distillée (l'échantillon est dilué au 1/10 dans eau distillée. Vortexer bien le mélange et le transvaser dans une cuve.
- 3- Après avoir fait le zéro sur la cuve d'eau distillée, mesurer la DO à 260 nm.
- 4- Faire le zéro une autre fois à 280 nm et mesurer ensuite la DO.
- 5- Calculer le rapport DO_{260}/DO_{280} pour évaluer la pureté de l'ADN.

*EDTA permet d'inhiber l'action des enzymes de type DNase qui pourraient dégrader l'ADN.

Un ADN pur doit avoir un rapport DO_{260}/DO_{280} compris entre 1,6 et 2.

Les échantillons sont conservés à 4°C pour une utilisation fréquente ou à -80°C pour une longue durée.

Annexe 8 :

Amplification de l'ADN par PCR multiplex pour la recherche des macrodélétions du gène de la dystrophine :

1- Principe :

L'amplification est réalisée par une réaction de polymérisation en chaîne, ou PCR, qui requiert des amorces pour chaque exon. Les amorces sont des petites séquences d'ADN synthétisées qui se fixent au début et à la fin d'une séquence d'exon. Les petits fragments de gène ainsi obtenus sont séparés par électrophorèse car ils migrent à différentes distances dans une couche de gel et peuvent ensuite être rendus visibles sous forme de bandes de gel, mais à des distances variables. Chaque bande correspond à un des 19 exons amplifiés. Une délétion se manifeste par l'absence d'une ou plusieurs de ces bandes.

L'amplification simultanée de 19 exons du gène de la dystrophine s'effectue par deux mélanges d'oligonucléotides I et II permettant l'amplification de 10 exons et 9 exons simultanément. Les amorces sont choisis de telle façon que les différents produits d'amplification obtenus au sein d'une seule réaction aient de tailles différentes et soient donc facilement individualisés.

- Le mélange I amplifie les exons : 4, 8, 12, 17, 19, 44, 45, 46, 48, 51.

- Le mélange II amplifie les exons : Pm, 3, 6, 13, 43, 47, 50, 52, 60.

2- Préparation de la PCR multiplex (selon les méthodes de Chamberlain et Beggs, 1988) :

1- Dans un tube Eppendorf de 0,5 ml, ajouter successivement pour chaque individu a étudié les solutions suivantes :

	MIX I (µl)	MIX II (µl)
Tampon TC 10X	5	5
DMSO	5	5
dNTP 25mM	3	3
Eau distillée	13	13
Mélange d'amorce (0,5µM) PI	9	-
Mélange d'amorce (0,5µM) PII	-	9
Total	35	35

- 1- Vortexer bien le mélange MIX I et MIX II.
 - 2- Dans deux autres tubes Eppendorf de 0,2 ml, déposer 1µl d'ADN du malade et 10µl d'eau distillée dans chacun.
 - 3- Ajouter 35µl du MIX I dans le premier tube et 35µl du MIX II dans le deuxième tube.
 - 4- Placer les tubes dans le thermocycleur contenant le mélange à amplifier et programmer l'appareil à PCR de la manière suivante :
 - Dénaturation à 94°C pendant 7 min.
 - Hybridation à 55°C pendant 2 min.
 - Elongation à 72°C pendant 3 min.
 - Dénaturation à 92°C pendant 1 min.
 - Hybridation à 55°C pendant 2 min.

} Un cycle

 - Extension finale à 72°C pendant 10 min.
- 5- L'appareil à PCR est mis sur pause à 56°C du premier cycle pour ajouter dans chaque tube 4µl de taq polymérase diluée : 0,8µl de taq polymérase diluée dans 3,2µl d'eau distillée.
 - 6- Relancer l'appareil en appuyant sur la même touche après l'extension finale à 72°C, le produit PCR peut être conservé à 4°C.

Annexe 9 :

Electrophorèse sur gel d'agarose-Nusieve :

1- préparation du gel d'agarose-Nusieve :

Composition du gel :

- 2% agarose
 - 1% Nusieve
 - 100ml du TBE X1
- } Agiter bien le mélange

Faire chauffer l'agarose Nusieve au micro-onde pendant 1 à 2 min puis ajouter 10 μ l de Bromure d'Ethidium.

Laisser refroidir légèrement puis couler le gel et introduire le peigne de façon à ce que les dents forment des puits lors de la polymérisation du gel.

2- Dépôt de l'échantillon :

Après fixation du gel en position horizontal sur la cuve d'électrophorèse,

- Remplir la cuve avec le tampon TBEX1 jusqu'à ce qu'il recouvre le haut du gel, puis retirer le peigne délicatement.
- Additionner à 12 μ l du produit PCR 3 μ l de BBP (Bleu de Bromophénol).
- Déposer dans chaque puits du gel un échantillon en évitant les extrémités du gel.
- Placer les électrodes de façon que le cathode se trouve du coté opposé du dépôt des échantillon par ce que la molécule d'ADN est chargé négativement.
- Brancher le générateur et sélectionner le voltage à 80 volts puis à 100 volts pendant 3 heures jusqu'à la séparation des bandes.
- Examiner le gel sous UV.

Abstract

Duchenne and Becker muscular dystrophy (DMD and BMD) are two allelic variants of progressive muscular dystrophy, characterized by an X linked pattern of inheritance. These are the result of mutation in gene were identified in 1987, encoded for a membraner cytoskeletal protein. Two-thirds of DMD and BMD cases result from various deletions in the dystrophin gene. We have analysed DNA of 33 patients DMD/BMD by two multiplex PCR, Chamberlain and Beggs sets, to screen for exon deletions within the dystrophin gene and to estimate the frequency these abnormalities, and to evaluate the results obtained by comparison between genotype and clinical phenotype. We found dystrophin gene deletions in 17 cas. Therefore the frequency of 52%. All deletions were clustered in two hot-spots regions, in 82% of cases deletions are detected in the region from 45 to 52 (14 patients) and 12% in the exon 3 to 6.

We have observed that there is no correlation between size of deletions and the clinical symptoms.

It is important to note that this study will allow searching deletions in DMD gene in frequently deleted regions by multiplex PCR. This may facilate the molecular diagnosis of the DMD and BMD in our country and to improve the speed genetic counselling and prenatal diagnosis.

Key words: DMD, BMD, gene, dystrophin, deletion, multiplex PCR.

ملخص

الشلل العضلي لدوشان و بيكر هما شكلين أليلين للشلل العضلي المتطور والذي ينتقل بصفة متنحية مرتبط بالكروموزوم X؛ كلاهما ينتج عن طفرة وراثية في مورثة الديستروفين والتي اكتشفت سنة 1987، حيث تقوم بتصنيع الديستروفين الذي يدخل في تركيب الهيكل الخلوي الغشائي؛ تُلثي هذه الطفرة عبارة عن حذف للمناطق الدالة.

لقد قمنا بتحليل الـDNA لـ33 مصابا بواسطة سلسلتين من الـPCR المتعدد، حسب Chamberlain و Beggs، لكي نتعرف على المناطق الدالة المحذوفة في مورثة الديستروفين، ولتقدير نسبة وتكرار النتائج المحصل عليها قمنا بأجراء مقارنة بين الصفة الظاهرية و الوراثة. وجدنا حذفاً للمناطق الدالة عند 17 مصاباً (أي نسبة 52%) والتي تتمركز في منطقتين؛ الأولى محصورة بين المنطقة الدالة 45 و 52 بنسبة 81% (14 مصاباً) والثانية من المنطقة الدالة 3 إلى 6 بنسبة 12% (مصائبان)؛ لقد وجدنا أنه لا علاقة لطول المنطقة المحذوفة بالصفة الظاهرية للمريض.

من المهم أن نذكر أن هذه الدراسة سمحت لنا بإيجاد أهم المناطق الدالة التي يحدث بها حذف في مورثة الديستروفين بطريقة الـPCR المتعدد؛ كما سهلت لنا هذه الدراسة التشخيص الجزئي لمرض الشلل العضلي لدوشان و بيكر في بلدنا وأيضاً السرعة في تقديم نصائح وراثية للعائلات الحاملة للمرض وتسهيل إجراء التشخيص قبل الولادة.

كلمات المفتاح: الشلل العضلي لدوشان و بيكر، مورثة، الديستروفين، حذف، الـPCR المتعدد.

Nom : BENSEGHIER

Prénom : Salima

Date de soutenance : 26/09/2006

Diagnostic moléculaire des dystrophinopathies (étude phénotypique et génotypique)

Résumé

Les dystrophies musculaires de Duchenne (DMD) et de Becker (BMD) sont deux formes alléliques d'une dystrophie musculaire progressive transmise sur le mode récessif lié au chromosome X. Toutes deux résultent de mutations survenant dans un gène identifié en 1987 codant pour une protéine de cytosquelette membranaire : la dystrophine. Il s'agit de grandes délétions dans le gène DMD chez les 2/3 des patients DMD et BMD. Nous avons analysés l'ADN de 33 patients par deux PCR multiplex, PI et PII selon Chamberlain et Beggs, pour déterminer les exons délétés dans le gène de la dystrophine, afin d'estimer la fréquence de cette anomalie et aussi d'évaluer les résultats obtenus par une comparaison entre le génotype et le phénotype clinique. Nos avons trouvés des délétions chez 17 patients (52%). Toutes les délétions sont regroupées dans deux points chauds, 82% sont localisées entre l'exon 45 et 52 (14 patients) et 12% dans l'extrémité 5' de l'exon 3 à 6.

Nous avons montrés qu'il n'y a pas de corrélation entre la taille de délétion et le phénotype clinique.

Il est important de noter que cette étude nous a permis de trouver les délétions du gène de DMD par la PCR multiplex des exons fréquemment délétés. Cette étude facilite également le diagnostic moléculaire des DMD/BMD dans notre pays et permettrait d'améliorer la rapidité d'un conseil génétique ou d'un diagnostic prénatal.

Mots clés : DMD, BMD, gène, dystrophine, délétion, PCR multiplex.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de biologie et génétique moléculaire, Université de Constantine.