

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

جامعة البليدة 1

Université Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie et Physiologie Cellulaire

Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme

de Master en Biologie

Option : Génétique et Physiologie

Par

ZEDEK NESRINE

Sujet :

Analyse génétique de patients Algériens présentant un phénotype
Duchenne-like

Soutenu le : 30 JUIL 2014, devant le Jury composé de :

M^{me} AISSANI.R

Maitre Assistante A

Présidente

M^{me} CHERRALLAH.A

Maitre Assistante A

Promotrice

M^{me} RAHIM.I

Maitre Assistante A

Examinatrice

M^{me} CHELGHOUM

Maitre Assistante A

Examinatrice

ملخص

أضحت دراسة واستكشاف الأمراض الوراثية لدى الإنسان تشكل ميدانا خصبا لبحوث جد متطورة وذلك بفضل توفر التقنيات الجزيئية الدقيقة والجم حديثة، إلا أن الموارد المتاحة حاليا في البلاد لا ترقى لتطلعات الأطباء وعلماء البيولوجيا لهذا المرضى من أجل مكافحة هاته الأمراض الفتاكة وفي بعض الأحيان مميتة.

وما الشلل العضلي الإحير مثلا حل تطبيق هذه التقنيات بهدف دحر المرض وإيجاد الحلول الطبية اللازمة للتخفيف من حدته.

في سياقنا قمنا بتحليل جزيء الحمض النووي لـ 16 مريض جزائري كلهم يعانون من شلل عضلي وذلك بالبحث عن المنطقة المحذوفة في المورثة $C5251eT$ الومعنف الجين $SGCG$ في المنطقة $13q12$ وعند دراسة البيانات التجريبية، تم تحديد هذه المنطقة الدالة المذوفة عند 6 مرضى، تسن لنا تسهيل تشخيص المرض وذلك باستخلاص الارتباطات الظاهرية والوراثية.

إن العمل الذي قمنا به يسلط الضوء على جدوى كفاءة التشخيص الجزيء الذي اتجهنا إليه وبيين مدى سهولة تطبيقه و اعتماده في مختبرات البيولوجيا الجزيئية كونه يرتكز على تقنيات دقيقة وكفوءة، مما يجعله وسيلة المثلى و الأنجع لاستكشاف أمراض الشلل العضلي في بلادنا، زيادة على ذلك فإن التشخيص الجزيء يساهم بشكل فعال في توضيح المعطيات الوراثية و تسهيل التكفل بالمرضى وتقديم النصائح الوراثية اللازمة للعائلات احكاما للمرضى

Remerciements

Les travaux qui ont fait l'objet de ce mémoire ont été effectués au sein du Laboratoire de Génétique du Département de Biologie Cellulaire et Moléculaire de la Faculté des Sciences Biologiques de l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene (USTHB).

Je remercie vivement, Mme le Dr Traki BENHASSINE, Professeur à la Faculté des Sciences Biologiques de l'USTHB de m'avoir accueillie avec gentillesse dans son laboratoire, pour la mise en œuvre des travaux de mon mémoire et pour m'avoir offert son aide avec simplicité et ouverture d'esprit ; qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance et mon profond respect.

Je tiens à exprimer ma profonde et respectueuse reconnaissance, ainsi que mes sincères remerciements, à M^{elle} Cherrallah, Maître assistante A, à la Faculté des Sciences de la nature et de la vie de l'USDB, pour l'intérêt marqué avec lequel elle a dirigé et suivi le déroulement de ce travail.

J'adresse tous mes remerciements à M^{me} Aissani, Maître assistante A au Département de Biologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'USDB, pour avoir accepté de présider mon jury de soutenance, ainsi qu'à Mesdames Chelghoum et Rahim, Maîtres assistantes A au Département de Biologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'USDB pour tout l'intérêt qu'elles ont porté à mon travail et pour avoir accepté de l'examiner.

Sommaire

Introduction	1
Recherche bibliographique	2
I-Structure de la fibre musculaire squelettique	2
II- Maladies neuromusculaires	5
III-Définition et classification des dystrophies musculaires progressives	5
IV-Dystrophies musculaires des ceintures de type 2C (LGMD2C)	8
IV-1. Phénotype de la gamma-sarcoglycanopathie LC/MD2C	8
IV-2. Gamma-sarcoglycane	9
IV-3. Le gène <i>SGCG</i>	10
IV-5. Les mutations touchant le gène <i>SGCG</i>	12
V- Organisation du complexe de glycoprotéines associées à la dystrophine et rôle des sarcoglycane	14
VI- Diagnostic de la LGMD2C	17
VI-1. Etude clinique et para-clinique	17
VI-2. Diagnostic histologique	17
VI-3. Diagnostic immuno-histochimique	18
VI-4. Diagnostic par Western Blot	19
VI-5. Diagnostic génétique	20
VII- Approches thérapeutiques dans le traitement des γ-sarcoglycanopathies	21

VII-1. Approche génétique ou thérapie génique	21
VII-2. Approche cellulaire	21
VII-3. Approche pharmacologique	22
Matériels et méthodes	23
I-Données cliniques	23
II-Extraction de l'ADN génomique total à partir du sang périphérique par "salting out"	24
III-Estimation de la concentration de l'ADN	25
IV-Recherche par PCR-séquençage de la mutation c.525 c > T dans le gène <i>SGCG</i>	27
IV.1-Amplification de l'exon 6 du gène <i>SGCG</i> par PCR simple	27
IV.2-Mise en évidence des profils d'amplification	28
V-Séquençage et analyse des séquences	29
Résultats et discussion	30
I-Analyse clinique et généalogique	30
II-Estimation qualitative et semi-quantitative de l'ADN extrait	30
III-Amplifications géniques par PCR simple de l'exon 6 du gène <i>SGCG</i>	31
IV-Séquençage du gène <i>SGCG</i> et mise en évidence de la mutation del 525T	32
Conclusion	37
Références bibliographiques	38

INTRODUCTION

Depuis plus de 30 ans les techniques d'explorations des maladies neuromusculaires se sont considérablement développées. La génétique moléculaire est désormais un outil de référence qui confirme l'analyse sémiologique, cette dernière demeure indispensable pour poser un diagnostic de certitude.

Les dystrophies musculaires progressives représentent un ensemble d'affections d'origine génétique, liées à une dégénérescence primitive du tissu musculaire.

Les dystrophies musculaires des ceintures (LGMD) ou l'anglais Limb Girdle Muscular Dystrophy, constituent un groupe hétérogène d'affections héréditaires dans lesquels les muscles des ceintures scapulaires et pelviennes sont principalement atteints. Ces formes se transmettent selon le mode autosomique récessif ou autosomique dominant. La gamma-sarcoglycanopathie (LGMD2C) apparaît suite à une mutation siégeant au sein du gène *SGCG* qui code pour une glycoprotéine, la gamma-sarcoglycane.

La gamma-sarcoglycane fait partie d'un complexe de glycoprotéines situé au niveau de la membrane des cellules musculaires et concourt avec les autres protéines de ce complexe à la stabilité et à la résistance mécanique de la membrane de la cellule lors des contractions musculaires.

Cette forme à forte prévalence dans le bassin méditerranéen en raison de la présence d'une mutation à effet fondateur, la c.525delT serait responsable de tous les cas de gamma-sarcoglycanopathie chez ces populations.

L'objectif à travers ce mémoire était donc d'explorer au plan moléculaire un ensemble de patients dont les prélèvements sanguins nous ont été adressés afin de confirmer ou d'infirmer le diagnostic clinique de LGMD2C suspecté par le médecin traitant et d'offrir ainsi un diagnostic génétique clair et précis dont l'intérêt est évident pour la prise en charge, le traitement et le conseil génétique.

I- Structure de la fibre musculaire squelettique

Les muscles de notre organisme sont responsables du mouvement, du maintien de la posture ainsi que de la stabilité des articulations. De la naissance à l'adolescence, la masse musculaire suit l'évolution du poids et augmente sans cesse. Chez l'homme, elle représente 25% du poids total à la naissance et plus de 40% à l'âge adulte.

Le tissu musculaire est constitué de deux types bien distincts : le tissu musculaire strié qui est l'élément constitutif du muscle squelettique et cardiaque et le tissu musculaire lisse.

Le tissu musculaire strié est formé de quelques dizaines à quelques milliers de fibres musculaires. Il est constitué de différents types cellulaires spécifiques (fibre musculaire et cellule satellites) et non spécifiques (adipocytes, fibroblastes, cellules endothéliales et cellules du système immunitaire) qui participent à son organisation.

Le tissu musculaire squelettique est lié à l'ossature par des tendons dont le rôle est de maintenir le muscle en place et est entouré d'une couche de tissus fibreux appelée fascia profond. Ce fascia sépare les muscles en différents groupes fonctionnels et les maintient ensemble. En dessous, se trouve l'épimysium qui entoure tous les faisceaux de fibres musculaires. Le périnysium permet lui de séparer les faisceaux les uns des autres. A l'intérieur de ces faisceaux se situe l'endomysium qui ceint les fibres musculaires ensemble. L'ensemble de cette organisation est traversée par des vaisseaux sanguins qui permettent l'irrigation et l'apport en nutriments dans tout le muscle (**Figure 1**).

La fibre musculaire est l'entité cellulaire du tissu musculaire squelettique et l'unité de base de la contraction musculaire (**Figure 2**). C'est une formation cylindrique allongée de 10 à 80 μm de diamètre qui est pratiquement invisible à l'œil nu. Elle est constituée de la fusion de plusieurs centaines de myoblastes en un syncycium plurinucléé à noyaux périphériques [Costil et Wilmone, 2006].

Cette fibre musculaire est délimitée par une membrane plasmique (sarcolemme) qui est doublée d'une lame basale. Elle contient un ensemble de myofibrilles ainsi que tous les organites et inclusions cellulaires classiques tels que l'appareil de Golgi, les vésicules, les nombreuses mitochondries, le réticulum endoplasmique lisse (réticulum sarcoplasmique) et le réticulum endoplasmique rugueux. De plus, Elle contient des molécules assurant le stockage du glucose (glycogène) et de l'oxygène intracellulaire (myoglobine). Le réticulum

sarcoplasmique entoure les myofibrilles et émet des protubérances appelées citernes terminales. L'association de deux citernes terminales adjacentes avec une invagination du sarcolemme appelée Tubule transverse (Tubule T) forme une structure caractéristique appelée triade.

Les myofibrilles, qui la caractérisent constituent le support de la contraction musculaire. Ce sont des structures tubulaires allongées composées de myofilaments, alignés parallèlement les uns aux autres sur toute la longueur de la cellule. Ces myofilaments sont formés de filaments épais constitués de myosines et de filaments fins constitués d'actines associées à la troponine et à la tropomyosine.

Différentes protéines et complexes protéiques constituent la fibre musculaire et permettent aux différents éléments qui la composent, à savoir : la MEC, le sarcolemme, le sarcoplasme, le sarcomère, le réticulum sarcoplasmique et le noyau, d'interagir entre eux et d'être en permanente connexion. Un déficit dans l'une de ces protéines pourrait aboutir à la perturbation de l'intégrité de toute la fibre musculaire [De Recondo et De Recondo, 2001].

PDF Creator
www.nuance.com

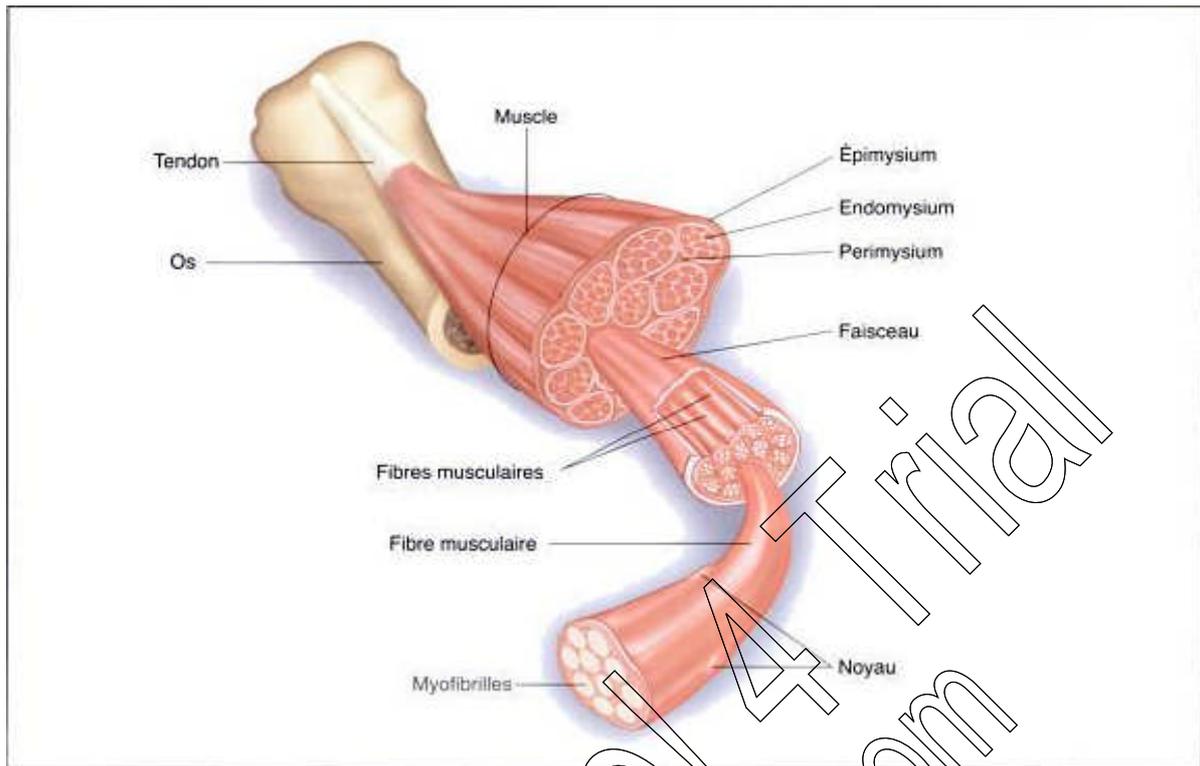


Figure 1 :Schéma représentatif d'une structure de base d'un muscle squelettique [Costill et Wilmore, 2006]

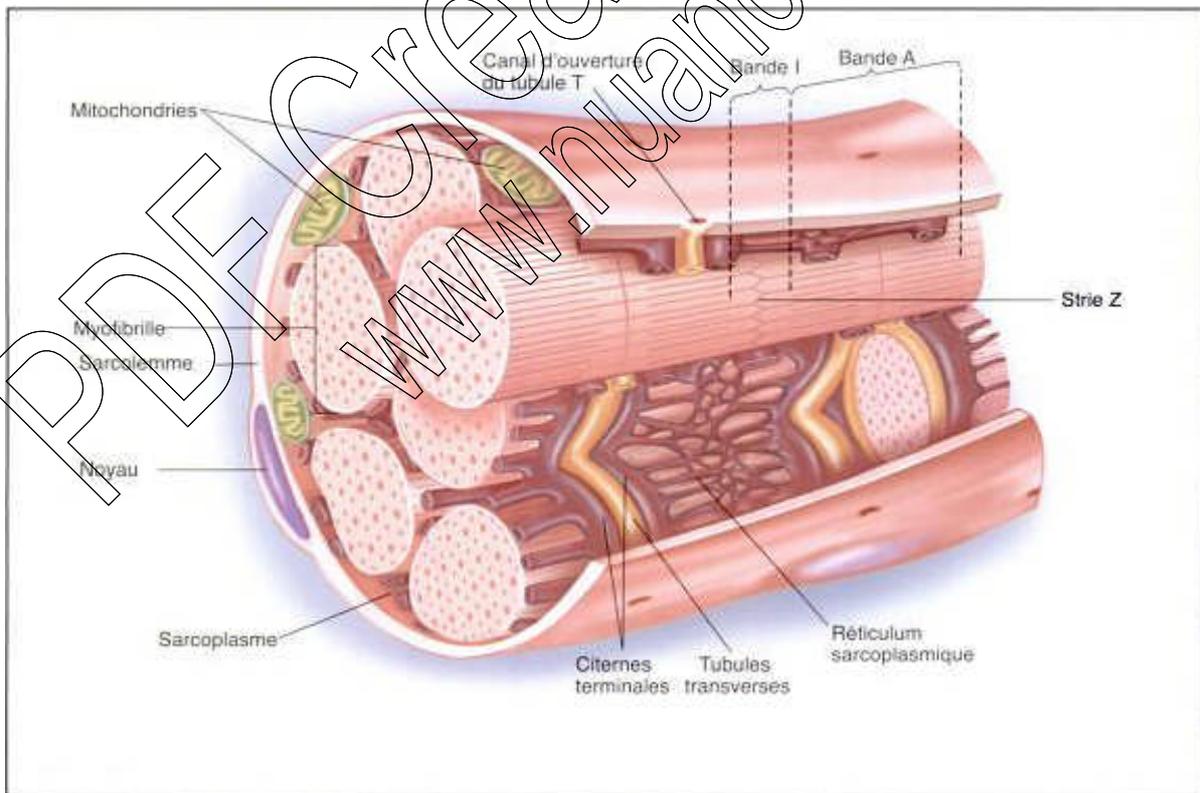


Figure 2 :Schéma d'une coupe de fibre musculaire [Costill et Wilmore, 2006]

II-Maladies neuromusculaires

Les maladies neuromusculaires sont des pathologies qui se traduisent par la perturbation de l'intégrité de l'unité motrice (**Figure 3**), et se traduisant par une perte transitoire ou permanente de la force musculaire s'aggravant progressivement ou se stabilisant avec le temps.

Ces maladies neuromusculaires liées à l'atteinte primitive et isolée de l'unité motrice peuvent être classées en quatre grands groupes :

- Atteintes de la fibre musculaire : myopathies
- Atteintes de la jonction neuro-musculaire : myasthénie
- Atteintes du nerf moteur périphérique : maladie de Charcot-Marie-Tooth
- Atteintes du motoneurone dans la corne antérieure de la moelle : amyotrophies spinales infantiles

Ce mémoire s'intéressera à l'une des formes de myopathies.

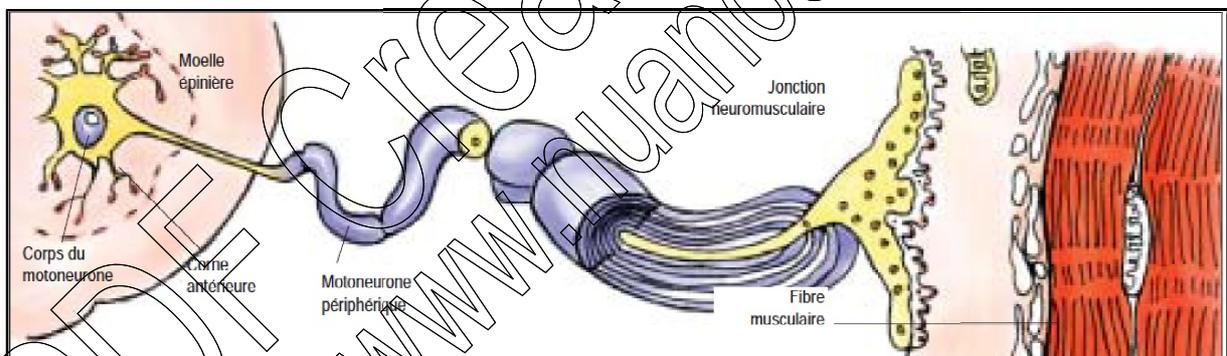


Figure 3 : Schéma illustratif de l'unité motrice [www.apf.asso.fr]

III-Définition et classification des dystrophies musculaires progressives

Les dystrophies musculaires progressives sont des affections génétiquement et cliniquement hétérogènes. Ces pathologies se manifestent par une faiblesse musculaire d'évolution progressive survenant suite à une dégénérescence primitive du tissu musculaire ayant atteint sa maturité structurelle.

L'évolution de ces pathologies est très variable d'une forme à une autre et d'un individu à l'autre. Elle peut ainsi se limiter à une simple fatiguabilité ou évoluer jusqu'à la perte de la marche avec une perturbation des fonctions respiratoire et cardiaque.

Sur un plan histologique, elles se caractérisent par l'alternance d'épisodes de nécrose et régénération conduisant à long terme à l'atrophie musculaire qui aura pour conséquence le remplacement du tissu musculaire par du tissu fibreux et adipeux.

Actuellement, les classifications des dystrophies musculaires proposées se basent principalement sur une approche moléculaire et combinent les données phénotypiques, anatomopathologiques et génétiques. Chaque année, une reclassification mettant à jour les gènes impliqués dans ces maladies est rapportée (**Tableau I**) [Kaplan et Hamroun, 2013].

PDF Create! 4 Pro
www.nuance.com

Tableau I : Classification des dystrophies musculaires progressives [Kaplan et Hamroun, 2013].

Maladie	Mode de transmission	Locus	Localisation cytogénétique	Gène	Protéine
Dystrophie Musculaire de Duchenne	XR	DMD	Xp21.2	<i>DMD</i>	Dystrophine
Dystrophie Musculaire de Becker	XR	BMD	Xp21.2	<i>DMD</i>	Dystrophine
Dystrophie musculaire Emery-Dreifus type 1, lié à l'X	XR	EDMD1	Xq28	<i>EMD</i>	Emerine
Dystrophie musculaire Emery-Dreifus type 2, lié à l'X	XR	EDMD6	Xq27.2	<i>FHL1</i>	Four and half LIM domain 1
Dystrophie musculaire Emery-Dreifus autosomal dominant	AD	EDMD2	1q21.2	<i>LMNA</i>	Lamine A/C
Dystrophie musculaire Emery-Dreifus autosomal recessive	AR	EDMD3	1q22	<i>LMNA</i>	Lamine A/C
Dystrophie musculaire lié à la Nesprine-1	AD	EDMD4	6q25	<i>SYNE1</i>	Spectrine
Dystrophie musculaire liée à la Nesprine-2	AD	EDMD	14q23	<i>SYNE2</i>	Spectrine
Dystrophie musculaire lié à la LUMA	AD		3p25.1	<i>TMEM43</i>	Protéine transmembrane 43
Dystrophie musculaire Fasio-scapulo-humérale type1	AD	FSHMD1A	4q35	<i>DUX4</i>	Double homeobox 4
Dystrophie musculaire Fasio-scapulo-humérale type2	AD	FSHMD1B	4q35	?	
Dystrophie musculaire avec une lipodystrophie généralisée	AD		17q21-q23	<i>PTRF</i>	Polymerase I et cavin-1
LGMD1A	AD	LGMD1A	5q31	<i>MYO1</i>	Myotiline
LGMD1B	AD	LGMD1B	1q22	<i>LMNA</i>	Lamine A/C
LGMD1C	AD	LGMD1C	3p25	<i>CAV3</i>	Caveoline-3
LGMD1D	AD	LGMD1D	7q26.2	<i>HSPA8</i>	HSP-40
LGMD1E	AD	LGMD1E	2q35	<i>DES</i>	Desmine
LGMD1F	AD	LGMD1F	7q32	?	
LGMD1G	AD	LGMD1G	4q21	?	
LGMD1H	AD	LGMD1H	3p25.1-p23	?	
LGMD2A	AR	LGMD2A	25q15.1	<i>CAPN3</i>	Calpaine-3
LGMD2B	AR	LGMD2B	2p13	<i>DYSF</i>	Dysferline
LGMD2C	AR	LGMD2C	13q12	<i>SGCG</i>	Gamma-sarcoglycane
LGMD2D	AR	LGMD2D	17q12-q21.33	<i>SGCA</i>	Alpha sarcoglycane
LGMD2E	AR	LGMD2E	4q12	<i>SGCB</i>	Beta-sarcoglycane
LGMD2F	AR	LGMD2F	5q33	<i>SGCD</i>	Delta-sarcoglycane
LGMD2G	AR	LGMD2G	17q12	<i>TCAP</i>	Telethonine
LGMD2H	AR	LGMD2H	9q31.2	<i>TRIM32</i>	Tripartite contenu motif 32
LGMD2I	AR	LGMD2I	19q13.3	<i>FKRP</i>	Protéine lié à la Fukutine
LGMD2J	AR	LGMD2J	2q31	<i>TTN</i>	Titine
LGMD2K	AR	LGMD2K	9q34	<i>POMT1</i>	Protéine o-mannosyl transférase1
LGMD2L	AR	LGMD2L	11p14.3	<i>ANO5</i>	Anoctamine5
LGMD2M	AR	LGMD2L	9q31-q33	<i>FKTN</i>	Fukutine
LGMD2N	AR	LGMD2N	14q24	<i>POMT2</i>	Protéine o-mannosyl transférase2
LGMD2O	AR	LGMD2O	1p34	<i>POMGNT1</i>	Protéine lie o-mannose beta1, 2-N-acetylglucosaminy-1-transférase1
LGMD2Q	AR	LGMD2Q	8q24	<i>PLEC1</i>	Plectine
LGMD2R	AR	LGMD2R	2q35	<i>DES</i>	Desmine
LGMD2S	AR	LGMD2S	4q35.1	<i>TRAPPC11</i>	Trafficking Protein Particle Complex 11
LGMD2T	AR	MDDGC14	3p21.31	<i>GMPPB</i>	GDP-Mannose Phosphorylase B

AR : autosomique récessive, AD : autosomique dominant, XR : lié au chromosome X

IV- Dystrophies musculaires des ceintures de type 2C (LGMD2C)

Les LGMDs représentent le groupe de dystrophies musculaires progressives caractérisées par une atteinte des muscles de la ceinture pelvienne et scapulaire.

Au plan clinique, les sujets atteints se caractérisent par une grande variabilité phénotypique allant des formes sévères aux formes modérées sans aucun signe de retard mental [Zatz *et al.*, 2000].

Une classification basée sur le mode de transmission de ces pathologies ainsi que sur les loci/gènes mis en évidence à ce jour nous permet de distinguer :

- Les dystrophies musculaires des ceintures de type 1 (LGMD1) à transmission autosomique dominante représentant environ 10% des LGMDs [Bushby, 1999].
- Les dystrophies musculaires des ceintures de type 2 (LGMD2) à transmission autosomique récessive.

La γ -sarcoglycanopathie (LGMD2C, MIM : 253700) est l'affection musculaire liée à des mutations dans le gène *SGCG* qui code pour la gamma-sarcoglycane et se transmet selon le mode autosomique récessif [Ben Hamida *et al.*, 1996].

Les sarcoglycanes sont un complexe formé de quatre protéines: gamma-sarcoglycane, alpha-sarcoglycane, beta-sarcoglycane, delta-sarcoglycane, situées au niveau de la membrane des cellules musculaires. Ces protéines jouent un rôle crucial dans le maintien de la stabilité ainsi que dans la résistance mécanique de la membrane de la cellule musculaire lors des contractions du muscle.

Le déficit dans l'une des protéines du complexe des sarcoglycanes entraîne souvent la destabilisation du complexe entier. La fragilisation de la membrane de la fibre musculaire qui en résulte est à l'origine de dégénérescence de la fibre musculaire.

IV.1-Phénotype de la gamma-sarcoglycanopathie LGMD2C

Un patient atteint de gamma-sarcoglycanopathie présente un tableau clinique superposable à celui d'une dystrophinopathie dans ces différentes formes (duchenne, becker). Les premiers signes cliniques apparaissent entre l'âge de 3 à 12 ans. Ils sont caractérisés par :

- Une difficulté à la marche et un retard dans l'acquisition de celle-ci

-Une atteinte musculaire symétrique affectant les muscles de la ceinture pelvienne puis ceux de la ceinture scapulaire [Ben Hamida *et al.*, 1996].

Le processus évolue progressivement et n'atteint les extrémités distales qu'à un stade tardif de la maladie [Kaplan *et al.*, 1996].

A l'examen clinique on remarque :

- Une hyperlordose (cambrure accentuée au niveau du bas du dos)
- Une marche dandinante
- Une difficulté à se relever du sol (signe de Gowers).
- Une pseudo-hypertrophie des mollets dans presque tous les cas

Après la perte de la marche, des complications commencent à apparaître tel que :

- Rétractions qui apparaissent fréquemment au niveau des membres inférieurs
- Des rétractions tendineuses et une scoliose sont fréquemment observées dans les stades les plus avancés.

Les muscles extra-oculaires ne sont jamais atteints et le cœur l'est exceptionnellement [Kefi *et al.*, 2003].

IV.2- Gamma-sarcoglycane

La gamma-sarcoglycane est une protéine transmembranaire de 35 kDa qui présente environ 70% d'homologie avec la delta-Sarcoglycane. Elle est constituée d'un domaine N-terminal composé de 37 acides aminés, d'un domaine transmembranaire composé de 21 acides aminés (leu-38 à val-58) et d'un domaine carboxy-terminal extracellulaire composé de 233 acides aminés. Cette protéine ne contient pas de séquence signal dans son domaine N-terminal et possède des résidus d'acides aminés chargés dans les positions 32 à 34 (RKR). Le domaine cytoplasmique contient un site de glycosylation potentiel lié à l'asparagine ; quant au domaine C-terminal, il est caractérisé par la présence de quatre résidus Cys conservés (Cys265, Cys267, Cys283 et Cys290) [Bushby *et al.*, 2009].

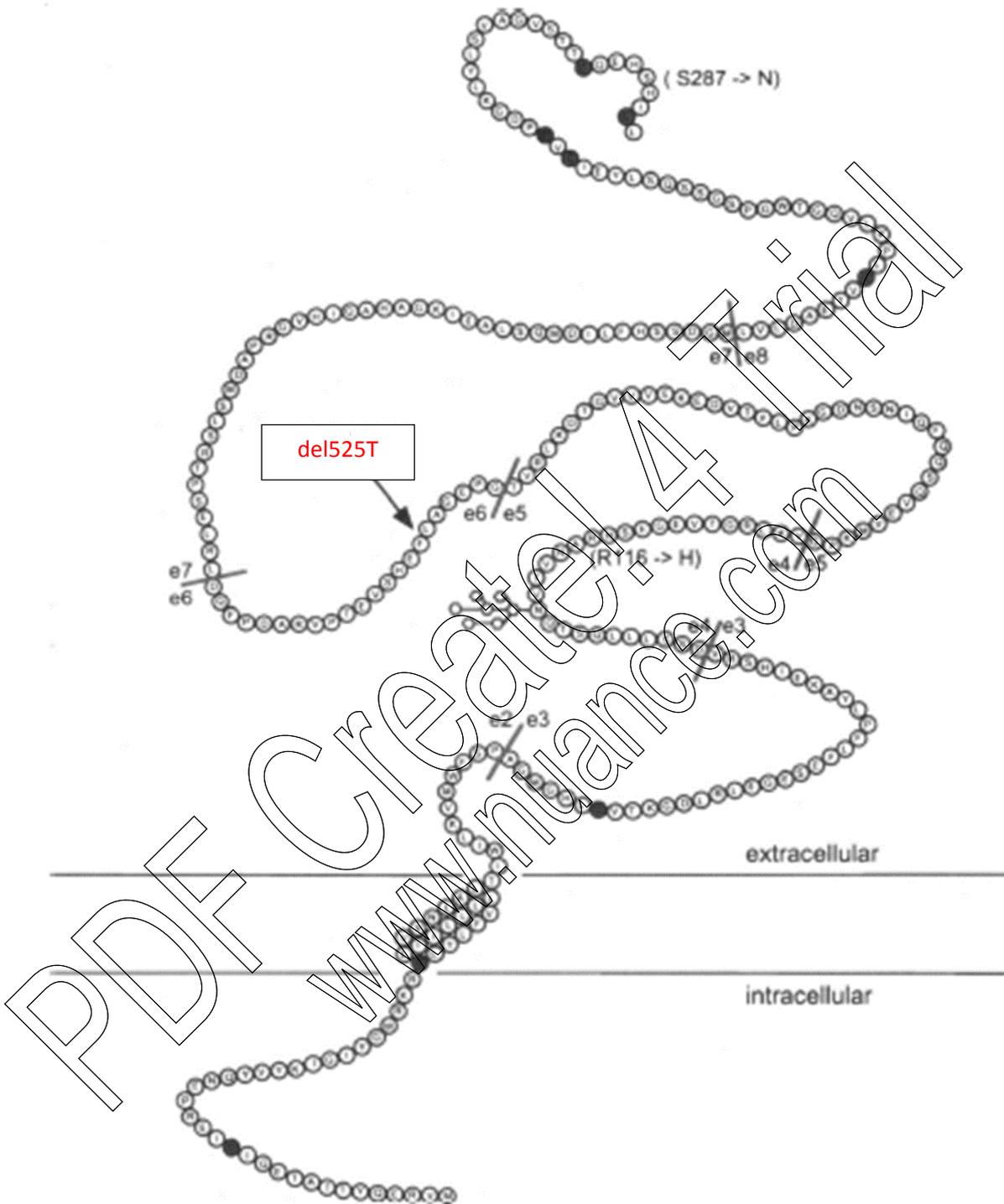


Figure 5 : Organisation de la protéine gamma-sarcoglycane [McNally *et al.*,1996].

IV.3- Le gène *SGCG*

Le gène *SGCG* est localisé sur le bras long du chromosome 13 en position 13q12. Il est constitué de huit exons et sept introns couvrant 100 kb d'ADN génomique. Le transcrit en ARNm est de 1,7 kb et ne s'exprime que dans les muscles striés [Noguchi *et al.*, 1995]. Il code pour la γ -sarcoglycane, une glycoprotéine sarcolemmale de 35 kDa constituée de 291 acides aminés [Bushby *et al.*, 2009].

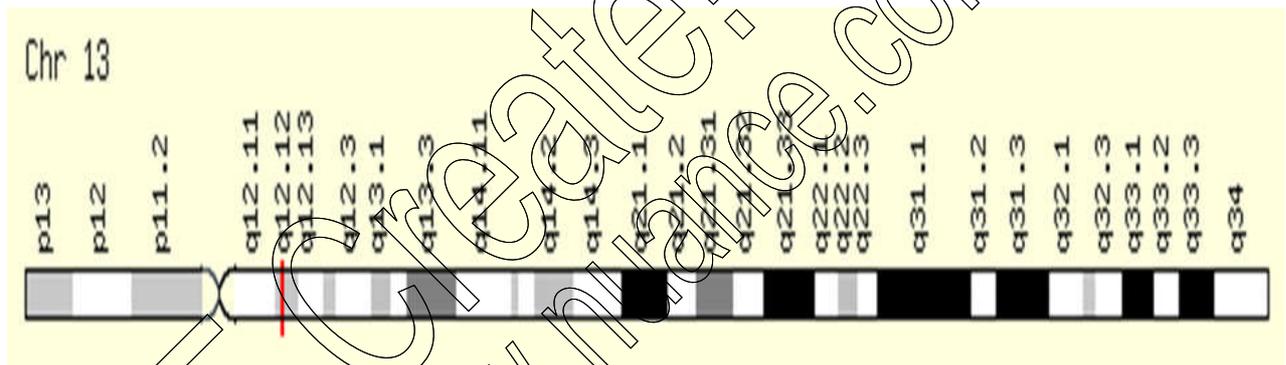


Figure 4 : Localisation du gène *SGCG* [www.dmd.nl]

VI.5-Les mutations touchant le gène *SGCG*

Le spectre des mutations à l'origine des sarcoglycanopathies est très large, et semble être mieux connu pour le gène qui code pour l' α -sarcoglycane, le premier du complexe des sarcoglycanes à avoir été identifié [www.dmd.nl]. Des mutations faux-sens donnant naissance à une protéine complète avec la substitution d'un seul résidu ainsi que des mutations à l'origine d'une protéine tronquée sont fréquemment décrites dans le gène *SGCG*. Parmi ces altérations, deux mutations avec effet fondateur au sein de populations à fort taux de consanguinité ont été décrites :

- La mutation c.525delT est la délétion d'une thymine dans l'exon 6 du gène *SGCG*. Elle conduit à une perturbation du cadre de lecture au 175^{ème} codon et entraîne l'apparition d'un codon Stop au codon 193. Cette mutation est à forte prévalence en Afrique du Nord et conduit à la production d'une protéine tronquée dépourvue du domaine EGF-like impliqué dans les interactions avec les autres sarcoglycanes [Ben Othmane *et al.*, 1992 ; Mc Nally *et al.*, 1996 ; Crosbie *et al.*, 2000].
- La mutation c.848G>A (p.C238Y) est une mutation faux-sens au niveau de l'exon 8. C'est la substitution de la guanine en position 848 par une Adénine conduisant à la substitution du résidu cystéine en position 283 du domaine riche en cystéine par une tyrosine, un acide aminé situé dans le domaine EGF-like et qui semblerait avoir un rôle crucial sur le plan fonctionnel [Piccolo *et al.*, 1996].

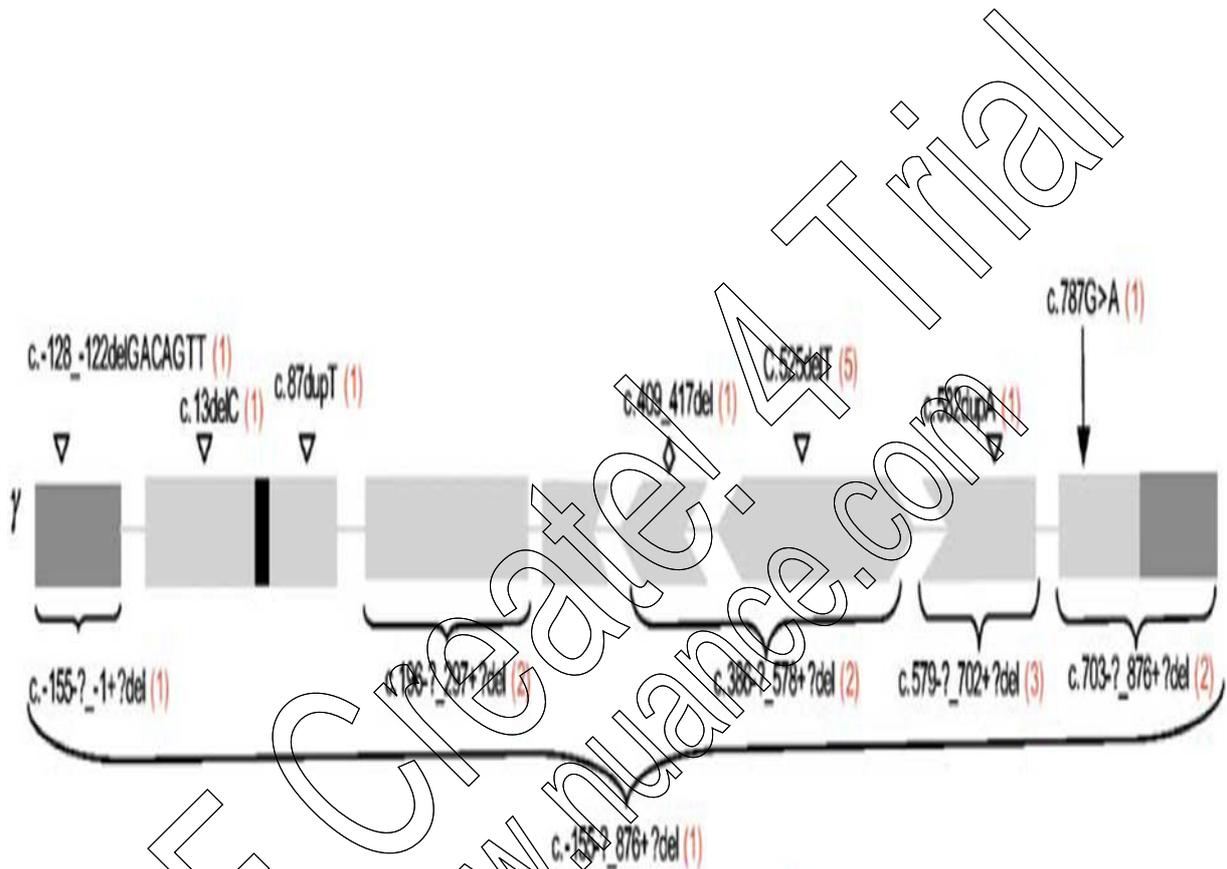


Figure 6: Spectre de mutations dans le gène gamma-sarcoglycane : Les mutations faux-sens, non-sens, insertion/délétion, mutation du site d'épissage, délétions exoniques et les duplications sont représentées dans cette figure, respectivement par les symboles suivants : ∇ , \triangle , ∇ , \blacktriangledown , \diamond , \sim et \blacklozenge . Les rectangles gris foncé représentent les régions exoniques des séquences non codantes 3',5' ; par contre le rectangle noir représente les séquences qui codent le domaine transmembranaire du gène *SGCG*. Les numéros entre parenthèses indiquent pour chaque mutation le nombre d'allèles mutés [Trabelsi *et al.*, 2008].

V- Organisation du complexe de glycoprotéines associées à la dystrophine et rôle des sarcoglycanes

Le DAPC (Dystrophin Associated Protein Complex) est un complexe protéique associé à la dystrophine, il est composé de : laminine $\alpha 2$, dystroglycanes (α , β), sarcoglycanes (α , β , δ et γ), sarcospan, dystrobrevine, syntrophines ($\alpha 1$, $\beta 1$, $\beta 2$), nNos (oxyde nitrique synthase), MAST205 (microtubule-associated, serine thréonine kinase 205KDa), syncoilin, cavéoline-3, et la protéine Grb2 (**Figure 7**).

Ce complexe fourni via le lien étroit qu'il établit avec la dystrophine un support structural qui permet de relier les myofibrilles, le sarcolemme et la matrice extracellulaire. Un déficit dans l'une des protéines du DAPC peut entraîner une perte de l'intégrité du sarcolemme et donc rendre les fibres musculaires plus vulnérables. Ces fibres ne résisteraient alors plus aux contraintes imposées lors de la contraction musculaire.

Ce complexe peut être divisé en trois groupes :

- **Le groupe des dystroglycanes (DG)** est constitué de l' α -dystroglycane et du β -dystroglycane de poids moléculaires de 156 kDa et de 43 kDa respectivement. La première est extracellulaire et la deuxième transmembranaire responsable de la liaison aux domaines WW et EF de la dystrophine par son domaine cytoplasmique riche en proline.
- **Le groupe des sarcoglycanes/sarcospan (SG)** est formé d'un tétramère α , β , γ et δ sarcoglycane et d'une autre protéine de la famille des tétraspans, le sarcospan. Les sarcoglycanes forment un complexe de glycoprotéines transmembranaires à passage unique avec une queue intracellulaire courte et une grande partie extracellulaire glycosylée qui est riche en résidus cystéines conservés. Ces protéines sont spécifiques du muscle squelettique et cardiaque situées dans la membrane des cellules musculaires qui concourt à la stabilité et à la résistance mécanique de la membrane de la cellule lors des contractions musculaires. Ces glycoprotéines appelées alpha, beta, gamma et delta ont des poids moléculaires respectifs de 50kDa, 43kDa, 35kDa et 35 kDa. Elles présentent de fortes similarités entre elles, mais n'ont aucune homologie avec d'autres protéines connues [De Recondo et De Recondo, 2001 ; Sandona et Betto, 2009].

- **Le groupe des protéines cytoplasmiques** constitué des syntrophines (α -, β 1-, β 2-), de la dystrobrevine, nNos, et de la dystrophine qui est une protéine du sarcoplasme des cellules musculaires qui se présente sous forme d'un bâtonnet mesurant 150 nm de long, constituée de 3 685 acides aminés et d'un poids moléculaire total de 427 kDa [Muntoni *et al.*, 2003].

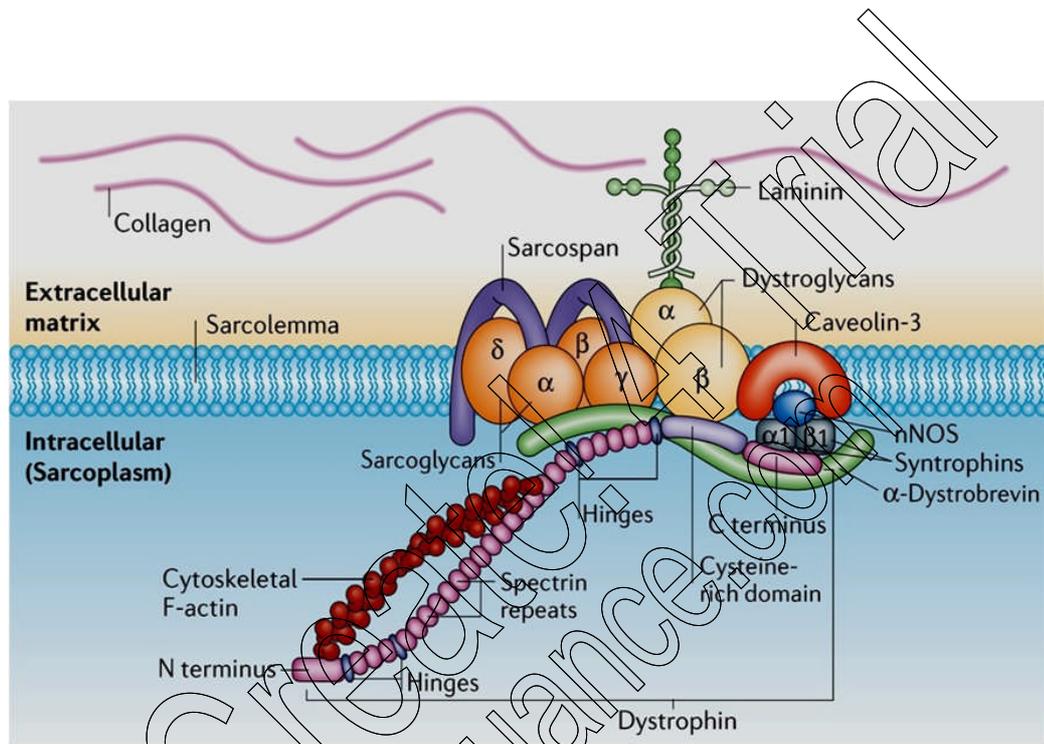


Figure 7: Complexe de glycoprotéines associées à la dystrophine [Davies *et al.*, 2006].

Les quatre sarcoglycannes ont un rôle important au niveau du sarcolemme mais seulement quand elles existent en tant que complexe. Une meilleure compréhension de l'organisation du complexe des sarcoglycannes est donc centrale pour améliorer notre connaissance des mécanismes pathogènes responsables du phénotype dystrophique.

Le complexe sarcoglycane est connu pour former une association avec les dystroglycannes mais il est également impliqué dans les relations avec d'autres éléments constitutifs du DAPC tels que la dystrobrevine, syntrophine, nNos, et sarcospane. Ce dernier, interagit directement avec les sarcoglycannes.

Le complexe sarcoglycane à l'exception de la γ -sarcoglycane, s'associe avec les dystroglycannes via un protéoglycane extracellulaire appelé biglycane.

Les queues intracellulaires de β et δ -sarcoglycane se lient à la dystrophine au niveau de son extrémité c-terminale. L' α dystrobrevine, la syntrophine et la nNos forment une sous unité de signalisation avec la dystrophine par l'intermédiaire du domaine C-terminal de la dystrobrevine.

Au total, ces données démontrent que le complexe des sarcoglycane forme de multiples interactions avec les autres composantes du DAPC et joue un rôle crucial dans la stabilisation de toute la structure de ce dernier. Les sarcoglycane pourraient également être impliquées dans la transduction du signal mais l'organisation du complexe DAPC ainsi que le rôle exacte de tous ses composants n'est pas encore bien élucidé [Sandona et Beito, 2009].

Ainsi, un déficit en sarcoglycane déstabilise tout le complexe qui ne sera plus capable de protéger le sarcolemme de la tension mécanique imposé. Cette tension non atténuée par le DAPC altère la membrane et fini par causé la mort de la cellule musculaire.

Le complexe DAPC fourni donc un support structurel au sarcolemme et le protège de la contrainte mécanique générée lors de l'activité contractile en transmettant cette tension a la matrice extra cellulaire.

Cette mort cellulaire active la régénération des fibres musculaires par l'intermédiaire des cellules satellites, toutefois l'ampleur du phénomène de la mort cellulaire dépasse celui de la régénération.

En effet, les cellules satellites restent dans le muscle mature à l'état de cellules mononuclées quiescentes et ne sortent de cette quiescence que lors d'une lésion musculaire. Elles se divisent ainsi de façon asymétrique afin de s'auto-renouveler et de générer des myoblastes qui vont fusionner avec les myotubes existants pour permettre la régénération du muscle. Avec le temps, suite à la déplétion du pool de cellules satellites, le tissu musculaire ne parvient plus à se régénérer et ceci conduit à l'atrophie musculaire.

VI- Diagnostic de la LGMD2C

VI.1- Etude clinique et para-clinique

Chez les patients atteints de gamma-sarcoglycanopathie, le début des troubles survient généralement dans l'enfance et parfois dans l'adolescence. Les premiers signes cliniques sont discrets dès l'âge d'un à deux ans, et se présentent sous la forme de maladresses à la marche et d'un retard moteur fréquent. Dès l'âge de trois à quatre ans les signes sont visibles : faiblesse musculaire, chutes fréquentes, difficulté à la marche, incapacité de courir. Le diagnostic est porté en général entre quatre et six ans : difficultés à se relever du sol et pour monter les escaliers, associés à une hypertrophie des mollets plus ou moins importante.

Par ailleurs, ces signes cliniques en plus d'une histoire familiale compatible avec le mode de transmission autosomique récessif, ne sont qu'évocateurs d'une dystrophie musculaire des ceintures [Petiot et Urtizbera, 2004]. Ainsi, certains examens para-cliniques sont nécessaires pour conforter le diagnostic clinique évoqué et pour mieux l'orienter. Dans ces cas, le dosage de la créatine phospho-kinase ainsi qu'un électromyogramme sont réalisés

Electromyographie

L'électromyogramme permet d'évaluer les symptômes musculaires résultant d'une lésion ou d'une pathologie nerveuse ou musculaire. Parmi les symptômes, on peut citer les douleurs musculaires, la faiblesse et l'engourdissement [Karpati *et al.*, 2001].

Dosage des enzymes musculaires

La nécrose des fibres musculaires libère des protéines dans le sang et plus particulièrement les créatines phosphokinases (CPK). Chez un enfant atteint, le taux de CPK peut être 50-100 fois plus élevé que chez un sujet normal (comprise entre 10 et 200 UI/l) [Karpati *et al.*, 2001].

VI.2- Diagnostic histologique

Suite à des examens para-cliniques ayant confirmé une atteinte myogène, une biopsie musculaire prélevée au niveau du muscle deltoïde ou quadriceps est souvent pratiquée. Elle permet d'appuyer le diagnostic de dystrophie musculaire, et ce par la réalisation d'une étude histologique classique visant à visualiser la morphologie et la structure des fibres musculaires à l'aide d'une batterie de colorations standards.

En effet, en cas de dystrophie musculaire, le muscle présente de nombreuses fibres musculaires en nécrose et de dimensions anormalement grandes. A mesure que la maladie progresse, le tissu musculaire nécrosé se trouve également remplacé par du tissu graisseux et fibreux.

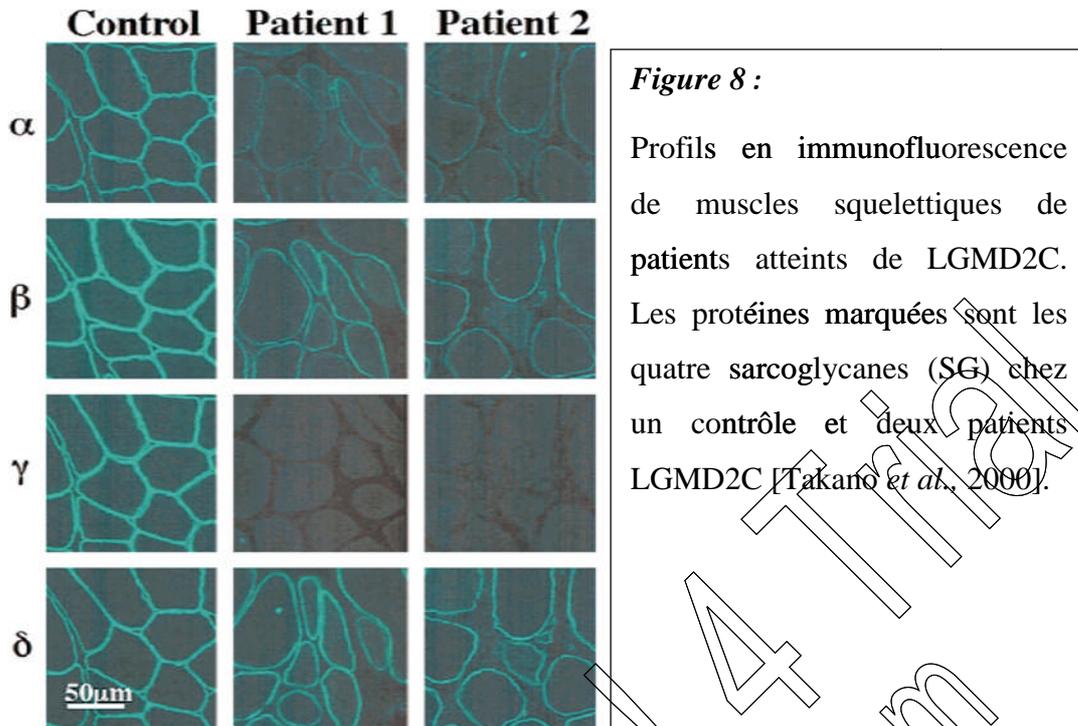
La pratique des techniques d'immuno-histochimies et de Western blot à partir de cette même biopsie permettra d'identifier la protéine déficiente.

VI.3- Diagnostic immuno-histochimique

Une orientation diagnostique en faveur d'une dystrophie musculaire progressive suite à la phase histologique descriptive nécessitera le recours aux techniques d'immuno-histochimies disponibles pour les différentes protéines musculaires impliquées et identifiées actuellement pour ces pathologies (Dystrophine, Sarcoglycane, Dysferline, émerine, mérosine...etc), ce qui nécessitera la réalisation de techniques complémentaires [Petiot et Urtizbera, 2004].

L'immuno-histochimie est une méthode qui permet de localiser une protéine spécifique au sein d'une coupe tissulaire à l'aide d'anticorps. Ainsi, la fixation d'anticorps spécifiques, permet d'apporter un caractère de reconnaissance et une classification idéale en terme de déficit protéique lorsque le défaut protéique est connu et qu'il s'agit d'une protéine de structure [Anderson et Davison, 1999]. Dans un muscle sain, la gamma-sarcoglycane est présente à la périphérie de chaque fibre musculaire, elle est détectée comme un anneau homogène autour de la périphérie de toutes les fibres musculaires. Chez un patient atteint de LGMD2C, l'anneau n'est pas visualisé : le muscle ne présente aucune gamma-sarcoglycane

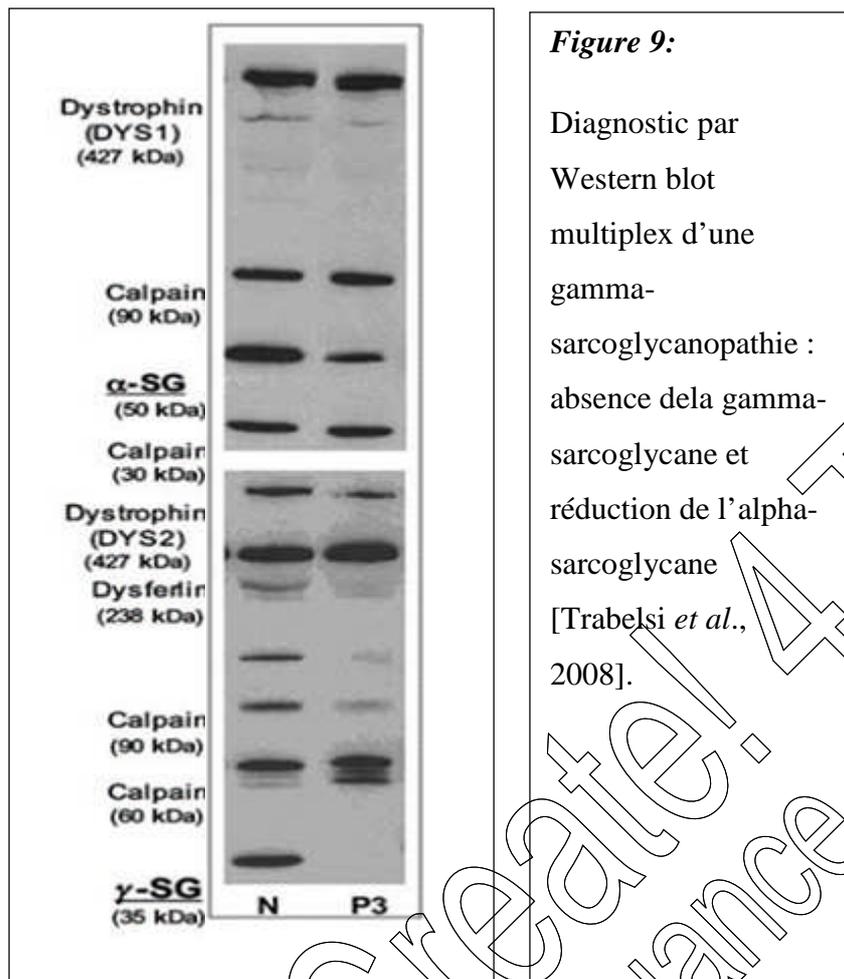
(Figure 8).



VI.4-Diagnostic par Western Blot

L'étude par Western blot des différentes protéines musculaires permet leur évaluation semi-quantitative et qualitative en fonction du poids moléculaire. Elle est réalisée afin d'affiner le résultat diagnostique apporté par l'immunomarquage ou dans le but de mettre en évidence un déficit protéique non révélé par l'immuno-histochimie, la technique du western blot peut être appliquée.

Le système de Western Blot multiplex dans lequel la plupart des protéines musculaires fréquemment altérées dans les DMP peuvent être analysées simultanément, est très efficace pour déterminer l'atteinte protéique primaire dans les sarcoglycanopathies (**Figure 9**). En effet, une absence d'expression de la gamma-sarcoglycane, associée à une anomalie dans l'expression des autres sarcoglycanes et plus particulièrement l' α -sarcoglycane, est en faveur d'un diagnostic de γ -sarcoglycanopathie [Pelissier et Urtizberea, 1996].

**Figure 9:**

Diagnostic par Western blot multiplex d'une gamma-sarcoglycanopathie : absence de la gamma-sarcoglycane et réduction de l'alpha-sarcoglycane [Trabelsi *et al.*, 2008].

VI.5-Diagnostic génétique

L'évolution des techniques de biologie moléculaire a facilité considérablement la détection des altérations génétiques chez les patients atteints et les femmes apparentées. En effet, l'identification d'altérations génétiques responsables de la maladie est indispensable.

Cette exploration se fait généralement par séquençage direct du gène *SGCG*. Cependant, cette recherche n'est malheureusement pas toujours possible et disponible (mutations trop nombreuses). Dans ce type de situation, un contexte clinique particulier peut aider à orienter la recherche diagnostique. Par exemple, devant un cas d'origine maghrébine présentant une dystrophie musculaire des ceintures à transmission autosomique récessive avec un phénotype clinique Duchenne-like ou Becker-like, la recherche de l'altération génétique en cause sera

orientée d'emblée vers le gène *SGCG* et la mise en évidence de la mutation avec effet fondateur la « del525T » à l'état homozygote [Mc Nally *et al.*, 1996].

VII- Approches thérapeutiques dans le traitement des gamma-sarcoglycanopathies

Actuellement, il n'existe aucun traitement curatif pour la LGMD2C. Cependant, plusieurs pistes thérapeutiques basées sur une thérapie cellulaire, pharmacologique et/ou génique ont été développées afin de restaurer une expression fonctionnelle de la gamma-sarcoglycane, ralentir la progression de la pathologie et améliorer la qualité de vie des patients [Van Deutekom et Van Ommen, 2003; Chakkalakal *et al.*, 2005].

VII.1-Approche génétique ou thérapie génique

La thérapie génique consiste en l'introduction d'une copie du gène *SGCG* dans la fibre musculaire afin de restaurer la fonction musculaire. L'efficacité d'une telle stratégie dépend de l'expression durable du transgène qui doit diffuser aussi largement que possible, de la nécessité de traiter les différents muscles atteints et de limiter au maximum les réactions immunitaires [Pichavant *et al.*, 2011].

La taille réduite de l'ADNc a fait que cette approche a été testée sur plusieurs modèles animaux de sarcoglycanopathies et les meilleurs résultats ont été observés pour le vecteur non pathogène « AAV » (adenoassociated virus) surtout lorsqu'il a été injecté avant le développement et l'apparition de la pathologie [Sandona et Betto, 2009].

VII.2-Approche cellulaire

Une fonction musculaire normale est directement corrélée au maintien et à la régénération des myofibrilles. C'est un processus hautement régulé qui commence par l'activation de cellules précurseur quiescentes se différenciant en progéniteurs qui prolifèrent puis fusionnent pour générer des myofibrilles. La transplantation de différents précurseurs musculaires provenant de cellules souches musculaires (cellules satellites) ou de cellules souches mésenchymateuses et des cellules dérivées des parois des vaisseaux sanguins comme les mésoangioblastes ou les péricytes [Sampaolesi *et al.*, 2003] devrait permettre de fournir la protéine nécessaire au tissu musculaire.

Les tentatives d'implantations de cellules pluripotentes pour le traitement de la δ -sarcoglycan se sont soumises à l'échec [Lapidos *et al.*, 2004], alors que l'implantation des cellules satellites musculaires ont été plus efficaces [Wallace *et al.*, 2008].

En plus de la difficulté de traiter le tissu le plus abondant du corps, la thérapie via les cellules souches présente plusieurs inconvénients potentiels tels que le rejet immunologique, la difficulté d'identification des cellules souches adultes appropriées et la faible capacité de diffusion de ces cellules en dehors du site d'injection [Sampaolesi *et al.*, 2006].

VII.3- Approche pharmacologique

Les approches pharmacologiques visant beaucoup plus à soulager le patient atteint de sarcoglycanopathies sont des stratégies incluant principalement les traitements anti-inflammatoires qui font face aux mécanismes physiopathologiques [Van Deutekom et Van Ommen, 2003 ; Chakkalakal *et al.*, 2005].

L'avantage d'une telle approche est que presque toutes les molécules peuvent être administrées par voie orale, intraveineuse et sous-cutanée, et parviennent ainsi à atteindre tous les muscles.

PDF Create! 4 Trial
www.nuance.com

I-Données cliniques

Ce mémoire a été réalisé au niveau du Laboratoire de Génétique de la Faculté des Sciences Biologiques de l'Université USTHB durant une période de trois mois, d'Avril à Juin 2014. Notre travail a porté sur l'étude génétique de 16 patients algériens qui nous ont été adressé par le service de neurologie de l'Hôpital Mustapha Pacha d'Alger Centre. Notre principal objectif était de poser un diagnostic précis sur la nature moléculaire de l'atteinte que les médecins traitant avaient évoqué. En effet, une suspicion de dystrophie musculaire des ceintures de type 2 sur la base de données généalogiques et d'explorations cliniques, les a conduit à nous adresser des prélèvements sanguins sur tube avec anticoagulant pour chacun de ces patients, après les en avoir informé et obtenu d'eux un consentement éclairé.

Ce panel comprenait 10 patients de sexe masculin et 6 patients de sexe féminin avec un âge variant entre 5 ans et 26 ans (*Tableau II*).

Tableau II: Données cliniques des patients explorés, M: sexe masculin, F: sexe féminin

Patients	Sexe	Age (ans)	Phénotype clinique
P-1	M	16	Becker-like
P-2	M	26	Becker-like
P-3	M	18	Duchenne-like
P-4	F	14	LGMD2C
P-5	F	15	LGMD2C
P-6	F	15	LGMD2C
P-7	M	24	Becker-like
P-8	M	5	Duchenne-like
P-9	F	16	Duchenne-like
P-10	M	15	Duchenne-like
P-11	F	11	LGMD2C
P-12	M	14	Duchenne-like
P-13	M	6	LGMD2C
P-14	M	13	Duchenne-like
P-15	M	12	Duchenne-like
P-16	F	10	Duchenne-like

II-Extraction de l'ADN génomique total à partir du sang périphérique par "salting out"

Afin de procéder au diagnostic génétique direct de la dystrophie musculaire suspectée, la première étape de notre travail consistait à réaliser l'extraction d'ADN génomique par la méthode de "salting out".

a) Principe

Les leucocytes sont séparés du sang total par lyse hypotonique et thermique ensuite, par un détergent (SDS) et une protéinase K, la membrane leucocytaire est lysée et les protéines dénaturées et dégradées. L'ADN nucléaire est libéré dans le milieu et les protéines qui lui sont associées sont éliminées par précipitation au NaCl, la méduse d'ADN est formée dans le surnageant par précipitation avec l'éthanol. L'ADN est solubilisé ensuite en phase aqueuse.

b) Solutions

- Solution SLR (10 mM Tris, pH 7,6, 5 mM MgCl₂, 10 mM NaCl).
- Solution SLB (10 mM Tris, pH 7,6, 10 mM EDTA, pH 8,0, 10 mM NaCl).
- SDS 10 %
- Protéinase K (10 mg/ml)
- Ethanol 100%
- Ethanol 70 %
- NaCl 6 M
- Eau distillée

c) Mode opératoire

1. Prélever 10 ml de sang dans un tube avec anticoagulant.
2. Transférer dans un tube de 50 ml.

3. Compléter à 45 ml avec la solution SLR glacée, mélanger puis mettre les tubes dans de la glace pendant 20 min.
4. Centrifuger à 5000 tpm pendant 15 min à 4°C, puis éliminer le surnageant constitué de globules rouges lysés.
5. Répéter les deux précédentes étapes jusqu'à éclaircissement du culot.
6. Resuspendre le culot constitué de globules blancs dans 2 ml de solution SLB, puis ajouter 300 µl de SDS 10 % et 20 µl de Proteinase K (10 mg/ml).
7. Incuber durant toute une nuit à 37°C sous agitation.
8. Ajouter 1 ml de NaCl 6 M et agiter vigoureusement pendant 15-20 secs.
9. Centrifuger à 5000 tpm pendant 15 min à 4°C.
10. Transférer le surnageant dans un nouveau tube de 50 ml.
11. Ajouter 2 volume d'Ethanol absolu 100% glacé et mélanger doucement par retournement jusqu'à apparition de la méduse d'ADN.
12. Récupérer la méduse avec une pipette Pasteur et la transférer dans un microtube de 1.5 ml.
13. Laver la méduse avec 1 ml d'Ethanol 70% puis éliminer l'éthanol.
14. Répéter l'étape précédente une à deux fois selon le besoin.
15. Laisser sécher l'ADN à température ambiante.
16. Ajouter de l'eau distillée ou du tampon TE et laisser la méduse se resuspendre à 4°C.

III-Estimation semi-quantitative de la concentration d'ADN extrait

Dans le cadre de notre travail, c'est l'électrophorèse sur gel d'agarose qui a été utilisée pour quantifier et estimer la qualité et la concentration de l'ADN.

a) Principe

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une méthode d'analyse de l'ADN au cours de laquelle des échantillons d'acides nucléiques sont déposés dans un gel d'agarose immergé dans un tampon puis mis à migrer sous l'effet d'un champ électrique (l'ADN étant un polyanion). Le gel agit comme un tamis moléculaire laissant passer plus facilement les petits fragments.

L'ADN est visualisé en ajoutant du Bromure d'éthidium (fluorescent) qui s'intercale entre les bases de l'ADN. La vitesse de migration dépend, entre autres, de la taille de la molécule d'ADN. On peut ainsi, en utilisant les marqueurs de taille adéquats, déterminer la taille des molécules ou des fragments présents dans un échantillon.

b) Solutions :

- Tampon TBE 1 x (89 mM Tris, 89 mM Acide borique, 2 mM EDTA, pH 8,0).
- Bromure d'éthidium (10 mg/ml).
- Bleu de dépôt (0.05% Bleu de bromophénol, 60 % Glycérol).
- ADN λ (50 ng/ μ l) (utilisé pour réaliser une gamme permettant d'évaluer la concentration de l'ADN extrait).

c) Mode opératoire :

1. Préparer un gel d'agarose à 1 % dans un Tampon TBE 1x contenant 0.5 μ g/ml de Bromure d'éthidium.
2. Préparer les échantillons de cette façon :
 - + 1 μ l d'ADN génomique
 - + 2 μ l de Bleu de dépôt
 - + 10 μ l d' H_2O
3. Préparer une gamme de concentration d'un ADN λ .
4. Déposer les échantillons et la gamme de concentration dans les puits et laisser migrer à 100 V pendant 45 min.
5. Révéler l'ADN par exposition du gel sous rayons UV.

IV-Recherche par PCR-séquençage de la mutation c.525 del T dans le gène *SGCG*

IV.1-Amplification de l'exon 6 du gène *SGCG* par PCR simple :

a) Principe

Cette technique décrite en 1985 par K.Mullis et al, a permis d'amplifier des séquences d'ADN de manière spécifique et d'augmenter de manière considérable la quantité d'ADN dont on dispose initialement, elle nécessite de connaître la séquence des régions qui délimitent l'ADN à amplifier. Ces séquences serviront à synthétiser des amorces oligonucléotides complémentaires, des oligonucléotides qui serviront à délimiter la séquence d'ADN à amplifier. L'ADN polymérase les utilisera comme amorces.

La PCR est constituée de cycles successifs, chaque cycle comprend une succession de trois phases :

- Une phase de dénaturation par la chaleur.
- Une phase d'hybridation avec deux amorces spécifiques.
- Une phase d'extension par l'ADN polymérase à partir des amorces.

Le nombre de cycles est généralement compris entre 30 et 40, et grâce à la *Taq* polymérase extraite d'une bactérie thermophile (*Thermus Aquaticus*), cette technique a été automatisée (dans des appareils appelés thermocycleurs).

Dans le cadre de ce travail, nous avons eu à amplifier l'exon 6 du gène *SGCG*, siège de la mutation récurrente c.525delT responsable de la dystrophie musculaire des ceintures LGMD2C.

a) Solutions

- dNTPs (Mélangede:dTTP,dATP,dGTP, dCTP,).
- Amorces (*sens et anti-sens*)
- *Taq* polymerase.
- Tampon de la *Taq*polymerase 10x.
- H₂O ultra pure.

- ADN du patient.

b) Mode opératoire

1. Les réactions d'amplification ont été réalisées dans un volume total de 25 μ l contenant :

- 50 ng d'ADN génomique.
- 0,2 mM de dNTPs
- 0,4 μ M de chacune des amorces.
- 5 U de *Taq* polymérase.
- Tampon d'amplification 1x final de la *Taq* polymérase.

2. Les réactions PCR ont été réalisées dans un thermocycler programmé pour exécuter le profil suivant :

- 94°C, 5 min (Dénaturation totale)
- [94°C, 30 sec - 57°C, 30 sec - 72°C, 30 sec] x 35 (Cycles)
- 72°C, 10 min (Elongation finale)
- 4°C, ∞

IV.2-Mise en évidence des profils d'amplification

a) Principe

Le contrôle des produits d'amplification sur gel d'agarose permet de s'assurer que la PCR s'est déroulée correctement, permettant ainsi d'apprécier :

- qu'il y ait effectivement un produit d'amplification.
- que ces fragments aient la taille attendue.
- qu'il n'y ait pas d'amplifications parasites ou de contaminants [Sambrook *et al.*, 1989].

b) Solutions

- Tampon TBE (Tris-Borate-EDTA) 1x (89 mM Tris, 89 mM Acide borique, 2 mM EDTA, pH 8.0).
- Bromure d'éthidium (10 mg/ml) (Sigma®).
- Bleu de dépôt (0.05% Bleu de bromophénol, 60% Glycérol).
- Marqueur de poids moléculaire 100-Base pair ladder (1 µg/ml) (Invitrogen®).

c) Mode opératoire

1. Préparer un gel d'agarose à 1.5% dans du tampon TBE 1x supplémenté de bromure d'éthidium à une concentration finale de 0.5 µg/ml.
2. Préparer les échantillons : 10 µl de produit PCR + 2 µl de Bleu de dépôt.
3. Déposer les échantillons et le marqueur de poids moléculaire dans le gel et laisser migrer à 100 V pendant 1 heure.
4. Révéler les produits d'amplification par exposition du gel sous rayons UV.

V-Séquençage et analyse des séquences

Après amplification de l'exon 6 du gène *SGCG*, un séquençage direct de cet exon a été réalisé sur un séquenceur de type ABI 3130XL.

Les chromatogrammes obtenus ont été analysés en utilisant la version 2.1 du logiciel Chroma Lite et les profils obtenus ont été comparés à la séquence de référence du gène *SGCG* humain (NM_000231.2) afin de déterminer la présence ou non de la mutation c.525delT.

I-Analyse clinique et généalogique

Lors de notre travail effectué au courant des 5 derniers mois, nous avons eu l'opportunité d'analyser un panel de 16 patients issus de familles indépendantes pour lesquels une suspicion clinique de gamma-sarcoglycanopathie avait été évoquée par leur médecin traitant au niveau du service de neurologie du CHU Mustapha Pacha d'Alger Centre. Notre objectif était donc de confirmer/d'infirmer le diagnostic clinique évoqué au plan génétique, et ce à travers la recherche de la mutation c.525del T à l'état homozygote au sein du gène *SGCG* (exon6 ,chr 13) responsable de la dystrophie musculaire des ceintures de type 2C (LGMD2C).

Les patients qui ont fait l'objet de cette analyse ont été sélectionnés sur la base des critères suivant :

- 1- L'analyse familiale a montré que 10 de ces patients étaient issus de mariages consanguins (**P3, P4, P5, P6, P9, P11, P12, P14, P15 et P16**).
- 2- Une atteinte principalement proximale et une apparition des premiers symptômes relativement précoces ont été notés.
- 3- Les délétions intragéniques les plus fréquemment retrouvées dans le gène *DMD*, ont été recherchés par PCR multiplex et ce, chez les patients issus de mariages consanguins ou non. Ceci avait pour but d'exclure les formes dystrophinopathies (Duchenne/Becker), phénotypiquement proche voire semblable à la LGMD2C chez tous les garçons du panel.

II-Estimation qualitative et semi-quantitative de l'ADN extrait

Nous avons eu à extraire les ADN dont nous avons besoin à partir du sang périphérique des patients, prélevé sur des tubes contenant un anticoagulant de type EDTA.

Notre choix s'est porté sur la technique d'extraction d'ADN par « salting out » ou autrement dit relargage salin, qui réunit à elle seule les avantages suivant : rapidité, simplicité d'exécution, utilisation d'un nombre restreint et non toxique de réactifs et enfin obtention de quantités appréciables d'acides nucléiques.

Nous avons fort heureusement pu montrer que tous les ADN extraits par la technique de salting-out s'adaptaient pleinement aux analyses moléculaires que nous voulions accomplir

(quantitativement et qualitativement) et cela par une estimation semi-quantitative et qualitative par électrophorèse sur gel d'agarose 1% en présence d'une gamme de concentrations croissantes d'un ADN lambda.

Le gel que nous avons obtenu témoigne d'extraits d'ADN de bonne qualité en raison de la présence de bandes uniques, intenses, et non dégradées. Cependant, le patient **P5** semblait dégrader et ceci mettait en doute la possibilité d'achever nos explorations sur ce cas.

De plus la présence d'une gamme de concentration d'un ADN contrôle du phage λ à 100, 200 et 400 ng/ μ l montre que l'ADN est présent en concentrations variables d'un individu à l'autre allant de 100 à plus de 400 ng/ μ l, concentrations suffisamment importantes pour poursuivre nos explorations moléculaires, sauf encore une fois pour le patient **P5** pour lequel il n'a pas été possible d'estimer la concentration.



Figure 9 : Estimation semi-quantitative et qualitative par électrophorèse sur gel d'agarose 1% en présence de certains ADN génomique extraits par salting-out p1) à p10 :ADN génomiques extraits. λ100, λ200, λ400 (ng/ μ l) :Gamme de concentration. La flèche blanche : indique le sens de la migration.

III-Amplifications géniques par PCR simple de l'exon 6 du gène *SGCG*

Après l'extraction de l'ADN des 16 patients, une estimation qualitative et quantitative de ce dernier était indispensable pour la suite de nos explorations.

L'étape suivante de notre travail consistait en l'amplification par PCR simple de l'exon 6 du gène *SGCG*, siège de la mutation c.525delT grâce à l'utilisation de deux amorces spécifique : Ex6-*SGCG*-Forward et Ex6-*SGCG*-Reverse.

Suite à cette amplification, tous nos produits PCR ont été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% en présence de Bromure d'éthidium afin de s'assurer de l'amplification des séquences cibles.

La figure ci-dessous illustre la migration électrophorétique de 10 μ l de produit d'amplification. L'exon 6 du gène *SGCG* a pu être amplifié pour tous nos échantillons y compris le patient P5 qui semblait dégradé. Les bandes obtenues sont approximativement à la taille attendue soit 198 pb. De plus, aucune contamination n'est apparue dans nos produits PCR.



Figure 10: Illustration de la migration électrophorétique du produit PCR sur gel d'agarose 1,5% en présence de bromure d'éthidium. P-1 à P-16 : patients testés, T- : Témoin négatif de la PCR, M : Marqueur de taille 100pb ladder. La flèche blanche : indique le sens de la migration.

IV-Séquençage du gène *SGCG* et mise en évidence de la mutation del 525T

Les produits d'amplification de l'exon 6 générés par PCR ont tous été séquencés sur un séquenceur de type ABI 3130XL au niveau de l'hôpital Pitié-Salpêtrière à Paris. L'analyse des chromatogrammes obtenus a été effectuée en utilisant le logiciel Chroma Lite. Afin de déterminer la présence ou non de la mutation c.525delT, les profils obtenus ont été comparés à la séquence de référence du gène *SGCG* humain (NM_000231.2).

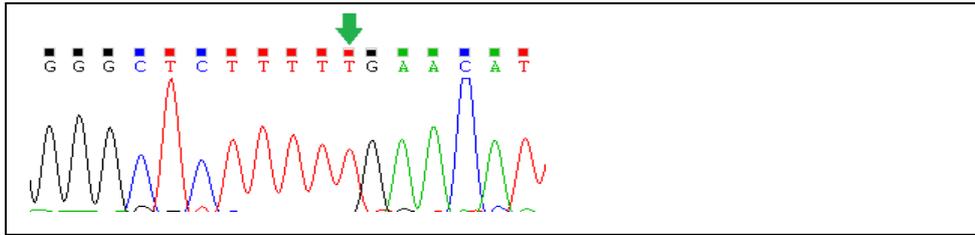
Après le séquençage des produits d'amplifications générés par PCR, les chromatogrammes obtenues ont permis de mettre en évidence la délétion à l'état homozygote de la thymine en position 525 dans l'exon 6 du gène *SGCG* chez 6 patients :

2 garçons :P12, P15 et 4 filles : P5, P9, P11, P16

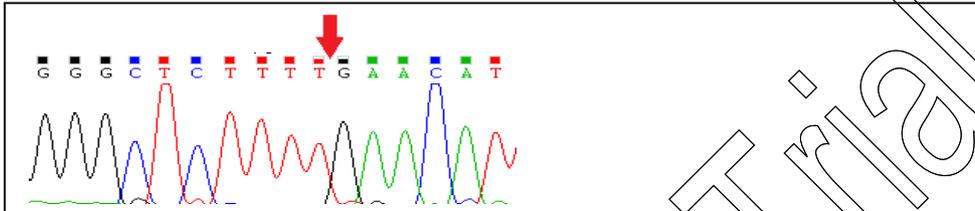
Ces résultats permettent ainsi de poser un diagnostic claire de LGMD2C et de confirmer le diagnostic clinique pour ces patients-là

PDF Create! 4 Trial
www.nuance.com

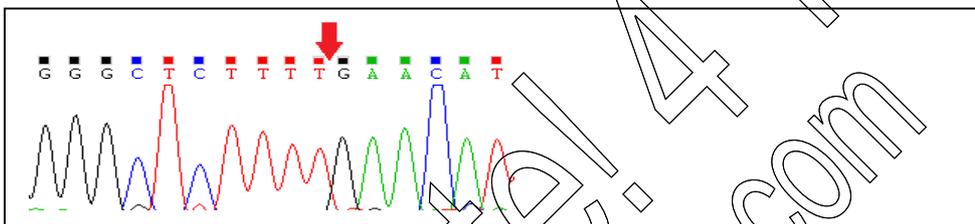
Patient sain P1



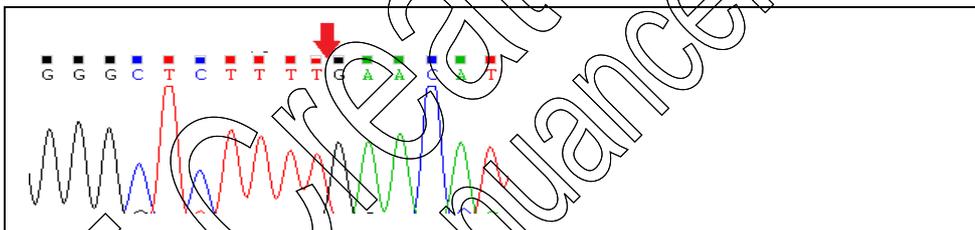
Malade P5



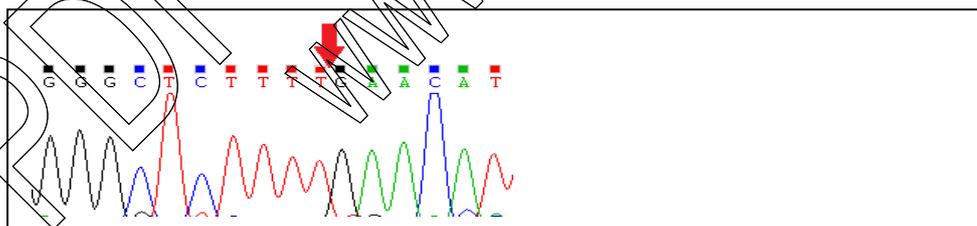
Malade P9



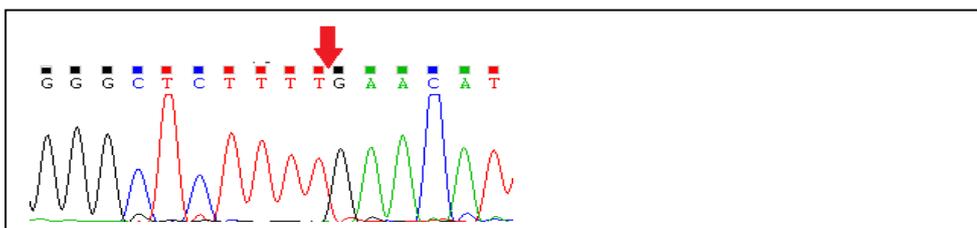
Malade P11



Malade P12



Malade P15



Malade P16

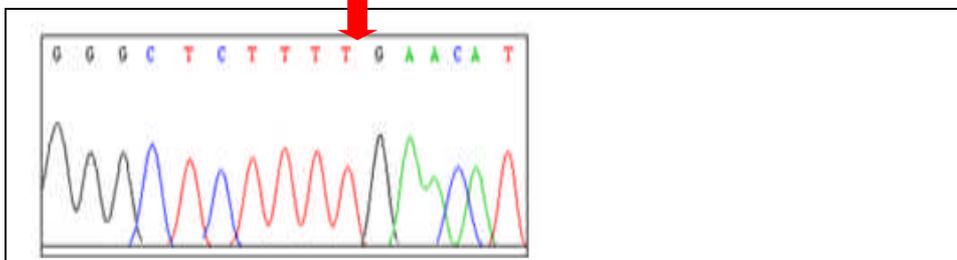


Figure 11: chromatogrammes obtenus après séquençage des produits d'amplification de l'exon 6 du gène *SGCG* chez les patients :p1(patient sain),p5,p9,p11,p12,p15(malades porteur de la deletion C.525delT. :absence de délétion, délétion de la thymine.

Bien que les prélèvements sanguins utilisés dans nos analyses moléculaires nous aient été adressé par le centre Hospitalo-universitaire Mustapha Pacha d'Alger, il faut toutefois souligner que cette structure regroupe un grand nombre de malades venu de toutes les régions d'Algérie.

Dans le cadre de ce mémoire, nous nous sommes retrouvés face à l'atteinte neuromusculaire qu'est la dystrophie musculaire des ceintures KGMD2C, ce qui aurait clairement suggéré que les altérations cellulaire ou moléculaire que nous voulions mettre en évidence puissent être directement recherchées au siège même de cette atteinte qui est le muscle. Pour cela, il aurait fallu réaliser une biopsie musculaire afin de mettre en évidence ces altérations par l'analyse des sarcoglycane par immuno-histochimie. Cependant, compte tenue des conditions de prélèvement traumatisantes pour le malade, le but de notre travail était d'avoir recours à une autre approche moins traumatisante pour le patient, simple, efficace et surtout précise. Cette approche se veut la plus adaptée à la composante génétique de notre population.

En effet, de part la nature héréditaire des dystrophies musculaires, nous avons réalisé une extraction d'ADN à partir du sang périphérique obtenu des prélèvements sanguins sur tubes EDTA. Une estimation quantitative et qualitative de notre ADN était indispensable pour la suite du travail.

Une exploration du gène *SGCG* par une approche de séquençage direct à la recherche d'altérations génétiques en cause dans le phénotype décrit par le médecin aurait permis de confirmer ce diagnostic au plan génétique. Par ailleurs, les origines maghrébines de nos patients et la présence d'une mutation à effet fondateur spécifique aux populations

d'Afrique du nord, la c.525delT dans l'exon 6 du gène *SGCG* offre la possibilité d'orienter notre diagnostic en ciblant la recherche de cette mutation en priorité.

C'est ainsi que l'amplification par PCR simple de l'exon 6 du gène *SGCG* a été réalisée pour les 16 patients constituant notre panel. Le produit obtenu a été vérifié par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% afin de confirmer le bon déroulement de l'amplification et les produits obtenus étaient bien à la bonne taille, soit 198 pb. Ces produits ont été séquencés et les résultats du séquençage nous ont confirmé la présence de la mutation c.525 del T à l'état homozygote chez 6/16 des patients.

Cependant, sur l'ensemble des patients étudié, 10 présentaient le phénotype décrit par le médecin traitant avec absence de l'altération génétique. Ceci suggérerait plusieurs hypothèses, parmi celles-ci :

-Il est possible qu'une autre mutation touchant le gène *SGCG* soit en cause. Mutation nouvelle ou touchant un autre exon ou alors un intron du gène *SGCG* du chromosome 13. -Il pourrait également s'agir d'une mutation touchant un autre gène impliqué dans d'autres dystrophies musculaires des ceintures se présentant avec le même phénotype.

- Il n'est pas à exclure que d'autres mutations qui n'ont pas été recherchées dans le gène *DMD* soient responsables du phénotype décrit.

Pour ces derniers patients, il serait intéressant de pousser les explorations dans le but d'identifier l'altération génétique responsable de l'attitude décrite. Une approche intéressante qui nous permettrait de répondre à nos interrogations quant à l'altération moléculaire recherchée est l'analyse de la biopsie musculaire soit par immuno-histochimie ou par Western-Blot multiplex, deux méthodes qui se basent sur l'utilisation d'anticorps dirigés contre les différentes protéines musculaires et qui permettent de mettre en évidence un déficit d'intensité variable semi-quantitatif et /ou qualitatif pour une protéine ou une autre. Une fois l'anomalie protéique déterminée, le gène responsable de la production de cette protéine devra être séquencé afin d'identifier la mutation responsable du phénotype observé chez nos patients.

PDF Create! 4 Trial
www.nuance.com

Conclusion

Aborder efficacement un diagnostic moléculaire est nécessaire pour donner une réponse rapide et précis vue la progressivité et l'hétérogénéité des dystrophies musculaires, affections pour lesquelles les familles se trouvent totalement démunies et les enfants/adolescents qui en sont atteints finissent par sombrer dans une déchéance qui, malheureusement déteint sur tout l'entourage familial et social.

Bien qu'un large spectre de mutations ait été identifié dans le gène *SGCG*, le diagnostic des LGMD2C dans la population algérienne reste simple du fait de la présence d'une mutation majoritaire à effet fondateur.

Notre travail consistait à confirmer/infirmier le diagnostic de LGMD2C chez 16 patients présentant un phénotype duchenne-like, en mettant en évidence la mutation c.525delT à l'état homozygote dans l'exon 6 du gène *SGCG*.

Les résultats de nos analyses montrent que sur les 16 patients analysés, la mutation a été retrouvée chez 6 d'entre eux. Ceci confirme bien que l'orientation clinique reste d'une grande utilité et permet de cibler les malades à tester.

Par ailleurs, ces travaux devront être poursuivie et approfondie afin de mettre en évidence les altérations moléculaires responsables du phénotype clinique décrit par nos collaborateurs) chez les patients ne présentant pas la mutation recherchée (10/16). Pour ces patients là, il conviendrait également d'explorer d'autres gènes tout en envisageant de revenir vers les cliniciens pour un autre examen clinique et une meilleure orientation pour le diagnostic.

- Anderson, L.V, et Davison, K. (1999) Multiplex Western blotting system for the analysis of muscular dystrophy proteins. *Am. J. Pathol.* **154**: 1017-1022.
- Ben Hamida, M., Fardeau, M., and Attia, N. (1983) Severe childhood muscular dystrophy affecting both sexes and frequent in Tunisia. *Muscle Nerve* **6**: 469-480.
- Ben Hamida, M¹., Ben Hamida, C., Zouari, M., Belal, S., Hentati, F. (1996) Limb-girdle muscular dystrophy 2C: clinical aspects. *Neuromuscul Disord.* :493-4.
- Ben Othmane, K., Ben Hamida, M., Pericak-Vance, M. A., Ben Hamida, C., Blal, S., Carter, S. C., Bowcock, A. M., Petruhkin, K., Gilliam, T. C., Roses, A. D., Hentati, F., et Vance, J. M. (1992) Linkage of Tunisian autosomal recessive Duchenne-like muscular dystrophy to the pericentromeric region of chromosome 13q. *Nature Genet.* **2**: 315-317.
- Bushby, K.M., Lochmuller, H., Lynn, S., et Straub, V. (2009) Interventions for muscular dystrophy : molecular medicines entering the clinic. *Lancet.* **374**: 1849-1456.
- Costill, D., Wilmore, J. (2006) Physiologie du sport et de l'exercice : adaptations physiologiques à l'exercice physique : 430-444
- Chakkalakal, J.V., Thompson, J., Parks, R.J., et Jasmin, B.J. (2005) Molecular, cellular, and pharmacological therapies for Duchenne/Becker muscular dystrophies. **19**: 880-891.
- Crosbie, R.H., Lim, L.E., Moore, S.A., Hirano, M., Hays, A.P., Maybaum, S.W., Collin, H., Dovico, S.A., Stolle, C.A., Fardeau, M., Tomé, F.M., et Campbell, K.P. (2000) Molecular and genetic characterization of sarcospan: insights into sarcoglycan-sarcospan interactions. *Hum Mol Genet.* **9**: 2019-2027.
- Davies, K.E., et Nowak, K.J. (2006) Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new player. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**: 762-773.
- De Recondo, J., et De Recondo, A.M. (2001) Pathologie du muscle strié. De la biologie cellulaire à la thérapie. *Medicine Science. Flammarion.* Paris.
- Deficiences motrices et situation de handicaps. Ed, APF. 2002 : www.apf.asso.fr

- Kaplan, J., Jean-Pierre, M., Urtizbera, J.A., et Beckmann, J. (1996) Bases Moléculaires des Dystrophies Musculaires Progressives à Transmission Autosomique Récessive. *Annales de l'institut Pasteur*. **7**: 157-171.
- Kaplan, J.C., et Hamroun, D. (2013) The 2014 version of the gene table of monogenic neuromuscular disorders (nuclear genome). *Neuromuscular Disord.* **23**: 1081-1111.
- Karpati, G., Hilton-Jones, D., and Griggs, R.C. (2001) Disorders of voluntary muscle. Cambridge University Press, USA.
- Kefi, M., Amouri, R., Driss, C., Ben Hamida, C., Ben Hamida, M., Kunkel, L.M., et Hentati, F. (2003) Phenotype and sarcoglycan expression in tunisian LGMD2C patients sharing the same $\Delta 521T$ mutation. *neuromuscular disorder*. **13**:779-87.
- Lapidos, K.A., Chen, Y.E., Earley, J.U., Heydemann, A., Huber, J.M., Chien, M., Ma, A., et McNally, E.M. (2004) Transplanted hematopoietic stem cells demonstrate impaired sarcoglycan expression after engraftment into cardiac and skeletal muscle. *Journal of Clinical Investigation*. **114**: 1577-1585.
- Leiden Muscular Dystrophy pages: www.dmd.nl
- McNally, E. M., Duggan, D., Gorospe, J. R., Bonnemann, C. G., Fanin, M., Pegoraro, E., Lidov, H. G. W., Noguchi, S., Ozawa, E., Finkel, R. S., Cruse, R. P., Angelini, C., Kunkel, L. M., et Hoffman, E. P. (1996). Mutations that disrupt the carboxyl-terminus of gamma-sarcoglycan cause muscular dystrophy. *Hum. Molec. Genet.* **5**: 1841-1847.
- McNally, E.M., Passos-Bueno, M.R., Bonnemann, C.G., Vainzof, M., de Sa Moreira, E., Lidov, H.G.W., Ben Othmane, K., Denton, P.H., Vance, J.M., Zatz, M., et Kunkel, L.M. (1996) Mild and Severe Muscular Dystrophy Caused by a Single-Sarcoglycan Mutation. *Am. J. Hum. Genet.* **59** :1040-1047.
- Muntoni, F., Torelli, S., et Ferlini, A.S. (2003) Dystrophin and mutations : one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol.* **2** : 731-740.
- Noguchi, S., McNally, E.M., Ben Othmane, K., Hagiwara, Y., Mizuno, Y., Yoshida, M., Yamamoto, H., Bonnemann, C.G., Gussoni, E., Denton, P.H., Kyriakides, T., Middleton, L., Hentati, F., Ben Hamida, M., Nonaka, I., Vance, J.M., Kunkel, L.M., et Ozawa, E. (1995). Mutations in the dystrophin-

- associated protein gamma-sarcoglycan in chromosome 13 muscular dystrophy. *Science*.**270**: 819-822.
- Pélissier, J., et Urtizbera, J.A. (1996) Les maladies neuromusculaires. De la génétique à la réadaptation. Masson. Paris. 19-93.
 - Petiot, P., et Urtizbera, J.A. (2004) Diagnostic des maladies musculaires. *EMC-Neurologie*. **1** : 137–155.
 - Piccolo, F., Jeanpierre, M., Leturcq, F., Dode, C., Azibi, K., Toutain, A., Merlini, L., Jarre, L., Navarro, C., Krishnamoorthy, R., Tome, F. M. S., Urtizbera, J. A., Beckmann, J. S., Campbell, K. P., et Kaplan, J.-C. (1996) A founder mutation in the gamma-sarcoglycan gene of Gypsies possibly predating their migration out of India. *Hum. Molec. Genet.* **5**: 2019-2022.
 - Pichavant, C., Aartsma-Rus, A., Clemens, P.R., Davies, K.E., Dickson, G., Takeda, S., Wilton, S.D., Wolff, J.A., Wooddell, C.I., Xiao, X. and Tremblay, J.P. (2011) Current status of pharmaceutical and genetic therapeutic approaches to treat DMD. *Mol. Ther.* **19**: 830-840.
 - Sampaolesi, M., Torrente, Y., Innocenzi, A., Tonlorenzi, R., D'Antona, G., Pellegrino, M.A., Barresi, R., Bresolin, N., De Angelis, M.G., Campbell, K.P., Bottinelli, R., et Cossu, G.(2003) Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. *Science*.**301**:487-492.
 - Sandona, D., et Betto, R. (2009) Sarcoglycanopathies: molecular pathogenesis and therapeutic prospects. *Expert Rev Mol Med*.**11**.
 - Takano, A., Bonnemant, C.C., Honda, H., Sakai, M., Feenerl, C.A, Kunkel, C. A., et Sobue, G.(2000) Intrafamilial phenotypic variation in Limb-Girdle Muscular Dystrophy Type 2C with compound Heterozygous Mutations. *Inc. Muscle Nerve*. **23**: 807–810.
 - Trabelsi, M., Kavian, N., Daoud, F., Commere, V., Deburgrave, N., Beugnet, C., Llense, S., Barbot, J.C., Vasson, A., Kaplan, J.C., Leturcq, F., et Chelly, J. (2008) Revised spectrum of mutations in sarcoglycanopathies. *European Journal of Human Genetics*. **10**:793–803.

- Van Deutekom, J.C., et Van Ommen, G.J. (2003) Advances in Duchenne muscular dystrophy gene therapy. *Nat Rev Genet.* **4**:774-783.
- Muntoni, F., Torelli, S., et Ferlini, A.S. (2003) Dystrophin and mutations : one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol.* **2** : 731-740.
- Zatz, M., Vainzof, M., et Passos-Bueno, M.R. (2000) Limb-girdle muscular dystrophy : one gene with different phenotypes, one phenotype with different genes. *Curr Opin Neurol.* **13**: 511–507.

PDF Create! 4 Trial
www.nuance.com