

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE SAAD DAHLEB-BLIDA1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV
Filière Sciences Biologiques

Option : Génétique

Thème

Dystrophinopathies : Approche diagnostique et biomarqueur capable de prédire l'efficacité des traitements

Présenté par :

Date de soutenance : 13/07/2022

* **BOUCHAKOUR Nor el-houda**

* **SELMANE Maria**

Devant le jury :

• Nom	Grade /Lieu	Qualité
Mme SAADIL	Professeur /USDB-1	Présidente
Mme CHALAL.N	MCA /USDB-1	Examinatrice
Mme CHARALLAH A.	MCA /USDB-1	Promotrice

Promotion 2021-2022

Résumé

Les dystrophinopathies représentent l'ensemble des maladies héréditaires liées à des mutations dans le gène qui code pour une protéine dystrophine. Sont la première cause de myopathie de l'enfant de sexe masculin transmises selon un mode récessif lié à l'X.

Dans le cadre de notre travail, nous avons tenté à travers la technique de PCR multiplexe de caractériser les délétions intragéniques responsables de l'apparition de dystrophinopathies au sein d'un panel de 24 patients. Cette approche consistait à cribler d'une manière directe le gène de la dystrophie musculaire du Duchenne en ciblant deux régions mutationnelles appelées points chauds *P20* et *Xj*.

Les résultats de ce travail ont montré que 37,4% (9/24) de nos patients présentaient des délétions d'un ou de plusieurs exons dans l'une des deux régions mutationnelles 3' ou 5' du gène de la dystrophie musculaire du Duchenne. Nous avons ainsi noté que la région centrale de ce gène était plus fréquemment mutée.

Il n'existe actuellement aucun traitement curatif permettant de guérir les patients atteints de dystrophinopathies. Le traitement standard repose sur l'utilisation des glucocorticoïdes. De plus, tous les traitements existants sont au stade expérimental et cela nécessite la mise en évidence de biomarqueurs puissants et spécifiques. Aujourd'hui, la présence des miARN et leur quantification dans le sérum des patients atteints de dystrophinopathies représentent un outil formidable en tant que biomarqueurs pour améliorer le diagnostic et en tant que biomarqueurs de choix pour tester l'efficacité de nouveaux traitements thérapeutiques.

Mots clé : Dystrophinopathies, criblage direct, PCRm, Délétions, biomarqueurs.

Abstrat

Dystrophinopathies represent all hereditary diseases linked to mutations in the gene that codes for a dystrophin protein. Are the first cause of myopathy in male children transmitted in an X-linked recessive mode.

As part of our work, we have attempted through the multiplex PCR technique to characterize the intragenic deletions responsible for the appearance of dystrophinopathies in a panel of 24 patients. This approach consisted in directly screening the Duchenne muscular dystrophy gene by targeting two mutational regions called hotspots P20 and Xj.

The results of this work showed that 37.4% (9/24) of our patients presented deletions of one or more exons in one of the two mutational regions 3' or 5' of the muscular dystrophy gene of the Duchenne. We thus noted that the central region of this gene was more frequently mutated.

There is currently no curative treatment to cure patients with dystrophinopathies. The standard treatment is based on the use of glucocorticoids. In addition, all existing treatments are at the experimental stage and this requires the identification of powerful and specific biomarkers. Today, the presence of miRNAs and their quantification in the serum of patients with dystrophinopathies represent a formidable tool as biomarkers to improve diagnosis and as biomarkers of choice for testing the effectiveness of new therapeutic treatments.

Keywords: Dystrophinopathies, direct screening, mPCR, deletions, biomarkers.

ملخص

يشمل مرض ضمور العضلات جميع الامراض الوراثية المتعلقة بالطفرات التي تصيب الجين الذي يشفر لبروتين "الديستروفين" و تعتبر هذه الامراض السبب الاول للضمور العضلي عند الاطفال الذكور منتقلا بطريقة متتالية ومرتبطا بالكروموزوم X .

في اطار دراستنا هاته حاولنا من خلال تقنية PCRm ان نحدد عمليات الحذف داخل الجين المسؤول عن ظهور الضمور العضلي في عينة مؤافة من 24 مريض . تعتمد هذه التقنية على الفحص الدقيق المباشر لجين الحثل العضلي الدوشيني باستهداف منطقتين اكثر عرضة للطفرات تدعى النقاط الساخنة P20 و Xj . بينت نتائج هذه الدراسة ان 37.4% (24/9) من مرضى العينة قد اظهروا حذفاً على مستوى عدة قطع دالة في كلتا المنطقتين ذات الطفرات 3 او 5 للجين المسؤول عن الحثل العضلي الدوشيني . وقد لاحظنا ان المنطقة الوسطى من هذا الجين كانت الاكثر اظهاراً للطفرات .

لا يوجد حالياً علاج لمرضى ضمور العضلات العلاج الاساسي يعتمد على استعمال الجلايكورتيكويد. بينما كل العلاجات الموجودة في الميدان التجريبي تستلزم مؤشرات حيوية شديدة و معينة. يمثل وجود miRNAs وقياسه الكمي في مثل المثلى اداة هائلة كمؤشرات حيوية اجدر لاختبار فعالية العلاجات الجديدة .

الكلمات المفتاحية: ضمور العضلات، الحذف، PCRm، المؤشرات الحيوية .

Remerciements

Nos remerciements et gratitude vont tout d'abord et avant tous au bon Dieu tout puissant pour nous avoir octroyée la santé, la persévérance, et la détermination, qui nous ont énormément facilité la réalisation de ce modeste travail que nous avons l'honneur de vous présenter à cette occasion.

Ces mêmes remerciements nous tenons à les exprimées aussi pour notre chère promotrice M^{me} CHARALLAH.A que nous ne pourrons jamais suffisamment remercier pour sa gentillesse, sa disponibilité, pour avoir accepté de diriger et de suivre de près ce travail, qui a été d'une grande aide dans sa réalisation, et surtout la patience de ces conseils et orientations.

Nos remerciements vont aussi à M^{me} SAADI .L pour l'honneur qui nous a fait d'avoir accepté de présider le jury.

Enfin nous ne pouvons que témoigner notre sincère gratitude à M^{me} CHALLAL.

A Toutes les personnes qui 'ont cru en nous et qui nous ont aidé de près ou de loin à la réalisation de ce travail

Dédicace 1

Je dédie ce modeste travail à : Ma famille et Mes amis

Rien n'est aussi beau à offrir que le fruit d'un labeur qu'on dédie du fond du cœur à ceux qu'on aime et qu'on remercie en exprimant la gratitude et la reconnaissance durant toute notre existence.

Je dédie ce modeste travail à ceux que j'aime :

Mon cher père Mohammed, qui a toujours cru en moi et a mis à ma disposition tous les moyens nécessaires pour que je réussisse dans mes études.

Ma chère mère Khadija, que je ne cesse de remercier pour tout ce qu'elle m'a donné, sacrifiée pour moi et m'avoir permis d'arriver à ce stade d'éducation.

Je le dédie aussi à :

Mes très chères sœurs Sarah, Soumia, Baraa, Karima, Mhem et Widad.

Particulièrement À la mémoire de ma cousine qu'est ma petite sœur, qu'est décédée trop tôt et qu'elle a toujours voulu venir à ma remise du diplôme

Mon cher frère Abd el-Malek Yacine et toutes Mes nièces, et mon reveur.

A mes amis Sarah, Nabla, Aicha, Asma, Amira, Abdel-Raouf, Ali et Karim.

Ma chère Binôme Maria ainsi sa famille.

A tous la promotion de Génétique.



Dédicaces 2

Mes dédicaces vont d'abord et avant tout à mes chers parents

Rabeh et Leïla

Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous port, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour toutes les efforts et les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bienêtre. Ont été d'une extrême importance pour moi.

*Ces mêmes dédicaces je les adresse également à mes sœurs **Hadil** et **Taïma** et à mes frères **Houssem el dîne** et **Mohamed el amine** .dont le soutien indéfectible à mon égard à constitué pour moi une source de motivations supplémentaire.*

A tout ma grande famille

*Aussi a mes chères amies :**Ferdaous, Sadjia , Rania , Ahlem** .*

*A ma chère binôme **NOR el Houda***



Sommaire

Introduction	1
Généralités	3
I. Physiologie du muscle squelettique	3
I.1. Structure du muscle squelettique	3
I.2. Eléments structurels de la fibre musculaire.....	3
II. Dystrophies musculaires progressives (DMP)	4
II.1. Définition des dystrophies musculaires progressives (DMP)	4
II. 2. Classification des dystrophies musculaires progressives	4
III.Dystrophinopathies	7
III.1. Description clinique.....	7
III.1.1. Phénotype classique de la dystrophie musculaire de Duchenne.....	7
III.1.2. Phénotype classique de la dystrophie musculaire de Becker	8
III.2. Gène <i>DMD</i>	9
III.2.1. Structure et organisation du gène <i>DMD</i>	9
III.2.2.1. Isoformes issus des promoteurs tissulaires ou transcrits.....	9
III.3. Dystrophine	11
III.3.1. Structure et localisation.....	11
III.3.2. Role de la dystrophine	12
III.4. Mutations touchant le gène <i>DMD</i>	13
III.4.1. Délétions et duplications.....	14
III.4.2. Mutations ponctuelles.....	14
III.5. Corrélations génotype-phénotype	15
IV. Approche diagnostic	16
IV.1. Examens paracliniques.....	16
IV.1.1. Dosage des creatinines phosphokinases (CPK).....	17
IV.1.2. Electroneuromyogramme (ENMG).....	17
IV.2. Etude de Biopsies musculaires	17
IV.2.1. Immuno-histochimie(IHC) et Wastern-blot.....	17
IV.3.Diagnostic moléculaire	18

V. Traitement actuel et essai thérapeutique :Approche thérapeutique.....	21
V.1. Approches pharmacologiques.....	21
V.1.1. Saut d'exon (<i>exon skipping</i>)	21
V.1.2. Aminoglycosides.....	22
V.2. Approche cellulaire	23
V.3. Approche génétique ou thérapie génique	23
Matériel et méthodes.....	25
I. Recherche d'altérations génétiques par criblage direct	25
I.1.Patients.....	25
I.2. Méthodes	27
I.2.1. Extraction d'ADN génomique total à partir du sang périphérique par la méthode de relargage par « Salting Out ».....	27
I.2.2. Recherche par PCRs multiplexes de délétions intragéniques dans le gène <i>DMD</i>	28
Résultats et discussion.....	31
I. Recherche par PCRs multiplexes de délétions intragéniques dans le gène <i>DMD</i>.....	31
I.1. Analyse clinique et généalogique.....	31
I.1.1 Données cliniques	31
I.1.2. Données généalogiques	32
I.2. Mise en évidence de délétions intragéniques dans le gène <i>DMD</i> chez des patients présentant un phénotype de dystrophinopathie.....	33
I.2.1. Fréquences et répartition des délétions dans différents pays	37
I.2. Localisation des délétions	39
I.2.3. Corrélations génotype phénotype	40
I.3.Patient ne présentant pas de délétions dans le gène <i>DMD</i>.....	43
I.4.Patient présentant des délétions intragéniques dans le gène <i>DMD</i>.....	43
Conclusion.....	46
Références bibliographiques	

Liste des Figures

Figure 1 : Structure d'une fibre musculaire squelettique.....	3
Figure 2 : Aspects cliniques d'un enfant atteint de maladie de Duchenne.....	9
Figure 3 : Localisation du gène <i>DMD</i> dans le chromosome X.....	10
Figure 4 : Représentation du gène <i>DMD</i> et d'une partie de ses différentes isoformes.....	11
Figure 5 : Organisation de la protéine dystrophine, corrélé au gène.....	12
Figure 6 : Complexe protéique associés à la dystrophine.....	13
Figure 7 : Distribution des mutations chez les patients DMD et BMD.....	15
Figure 8 : Fréquence des différentes microlésions touchant le gène <i>DMD</i> chez les patients de DMD et BMD.....	15
Figure 9 : Exemple de biopsie musculaire d'un muscle sain (A) et de patients atteints myopathies de Becker (B et C) et patients atteint de myopathie de Duchenne (F).....	18
Figure 10 : Organigramme de l'approche diagnostique des dystrophinopathies.....	19
Figure 11 : Représentation schématique d'une stratégie de saut d'exon.....	22
Figure 12 : Répartition des cas selon l'âge des premiers signes cliniques.....	32
Figure13 : Répartition des familles selon la consanguinité.....	33
Figure 14(a) : Profils d'amplification obtenus chez les patients de notre panel présentant des délétions allant de la région <i>Xj</i> à la région <i>P20</i> du gène <i>DMD</i> et du patient présentant une délétion du promoteur après électrophorèse sur gel d'agarose 2.5% des produits des deux PCRs multiplexes de Chamberlain et <i>al.</i> (1988)(a) et de Begges et <i>al.</i> (1990)(b).....	34
Figure 14(b) : Profils d'amplification obtenus chez les patients de notre panel présentant des délétions allant de la région <i>Xj</i> à la région <i>P20</i> du gène <i>DMD</i> et du patient présentant une délétion du promoteur après électrophorèse sur gel d'agarose 2.5% des produits des deux PCRs multiplexes de Chamberlain et <i>al.</i> (1988)(a) et de Begges et <i>al.</i> (1990)(b).....	35
Figure 15 : Fréquence des délétions dans notre recrutement du malade.....	39
Figure 16 : Pourcentages des délétions chez nos patients dans les points chauds <i>Xj</i> et <i>P20</i>	40

Liste des Tableaux

Tableau I : Classification génétique des dystrophies musculaires.....	5
Tableau II : Données cliniques relatives aux patients étudiés dans ce travail.....	26
Tableau III: Résultat des deux PCRs multiplex de Chamberlain et al. (1988) et Beggs et al. (1990) chez nos patients.....	36
Tableau IV : Répartition et données généalogiques des patients dans des pays européens et non européens	38
Tableau V : Corrélation entre le génotype et le phénotype clinique.....	42
Tableau VI : miRNAs circulants dérégulés dans le sérum des patients DMD.....	44

Liste des abréviations

ABD	Actin Binding Domain
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	Acide Désoxy ribo nucléique complémentaire
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
BMD	Dystrophies Musculaires de Becker
CPK	Créatine PhosphoKinase
DAPC	Complexe Protéique Associe à la Dystrophine
DGC	Complexe Dystrophine-Glycoprotéines
DMD	Dystrophies Musculaires de Duchenne
DMP	Dystrophie musculaire progressive
DP	DystrophinProtein
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétracétique
ENMG	Electroneuromyogramme
IHC	Immuno Histo Chimie
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
Kb	kilobase
kDA	kiloDalton
LGMD	Limb-GirdleMuscularDystrophy
mdx	muscular dystrophy X-linked
MLPA	Multiplex Ligation dependent Probe Amplification
nNOS	neuronal Nitric Oxide synthase
Pb	Paire de base
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCRm	Polymerase Chain Reaction multiplex
Pm	Promoteur Musculaire
WB	Western Blot

Introduction

Introduction

A l'heure actuelle, l'exploration des maladies héréditaires humaines reçoit plus d'attention grâce aux développements des outils de la biologie moléculaire qui sont devenus puissant et efficace. Ce nouvel éclairage a permis de créer des occasions pour comprendre la physiopathologie d'un large éventail des maladies conduisant surtout à envisager des thérapeutiques nouvelles et originales.

Les dystrophies musculaires progressives regroupent un ensemble d'affections génétiquement et cliniquement hétérogènes, qui sont caractérisées par une faiblesse et un déficit de la force musculaire. Il existe plus de 40 formes de DMP dont les plus fréquentes sont les dystrophinopathies.

Les dystrophinopathies représentées essentiellement par les dystrophies musculaires de Duchenne de Boulogne (DMD) [OMIM 310200] et de Becker (BMD) [OMIM 300376], constituent la cause la plus grave et la plus fréquente des myopathies de l'enfant de sexe masculin (Monaco *et al.*, 1986).

La DMD est la forme sévère et la plus fréquente des myopathies avec une incidence de 1/3.500 garçon nouveau-né et 1/12.000 garçon nouveau-né pour la BMD. Ces deux affections ont un tableau clinique similaire, comprenant des difficultés à courir et à monter les escaliers, des chutes fréquentes (Le signe de Gowers), un déficit musculaire prédominant à la racine des membres inférieurs avec une hypertrophie des mollets qui sont présent à partir de l'enfance.

Les DMD et BMD se transmettent selon le mode gonosomique récessif lié au chromosome X, causée par des mutations dans un même gène « *DMD* » codant pour la dystrophine qui est une protéine du sarcoplasme de la fibre musculaire possédant un rôle clé dans le maintien et l'intégrité de cette dernière.

Généralement, la majorité des mutations responsables de ces affections correspondent à des délétions d'un ou de plusieurs exons (60-65%), des duplications dans environ 5-10% et des mutations ponctuelles dans les 10-30% restants.

Dans le cadre de ce travail, nous avons procédé à une analyse moléculaire de 24 patients Algériens présentant le phénotype de dystrophie musculaire de Duchenne et de Becker à travers une approche moléculaire de criblage direct par l'analyse ciblé du

gène *DMD* par PCR multiplex. Cette approche permet d'amplifier et d'examiner les 19 exons de ce gène. Elle s'appuie sur l'observation que deux hot spots mutationnels, dénommés *Xj* et *P20*, permettant de détecter 98% des macrodélétions. Deux PCRs multiplexes indépendantes ciblent donc ces deux sites : la PCR multiplexe de Chamberlain *et al.* (1988) et la PCR multiplexe de Beggs *et al.* (1990).

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

- Rechercher les macro-délétions au sein du gène de la dystrophine par PCR multiplex.
- Rechercher certaines corrélations entre l'anomalie moléculaire et le phénotype clinique
- Mettre en évidence un ensemble de biomarqueurs permettant d'étudier l'efficacité des nouveaux traitements expérimentaux.

Généralité

I- PHYSIOLOGIE DU MUSCLE SQUELETTIQUE

I-1 Structure du muscle squelettique

Le muscle strié ou squelettique : est responsable du maintien de la posture et est sous le contrôle du système nerveux somatique (volontaire), il représente la majorité de notre système musculaire avec près de 400 muscles différents (**Maiga, 2018**).

Le muscle squelettique est constitué d'une dizaine à des milliers de fibres musculaires. Ils sont multi-nucléés, cylindriques et peuvent mesurer jusqu'à plusieurs centimètres de long, avec des diamètres allant de 10 à 100 micromètres. Leurs extrémités se terminent par des filaments de collagène qui, une fois réunis, forment des tendons et assurent l'ancrage des muscles à ces points d'insertion (**Yablonka-Reuveni, 2011**).

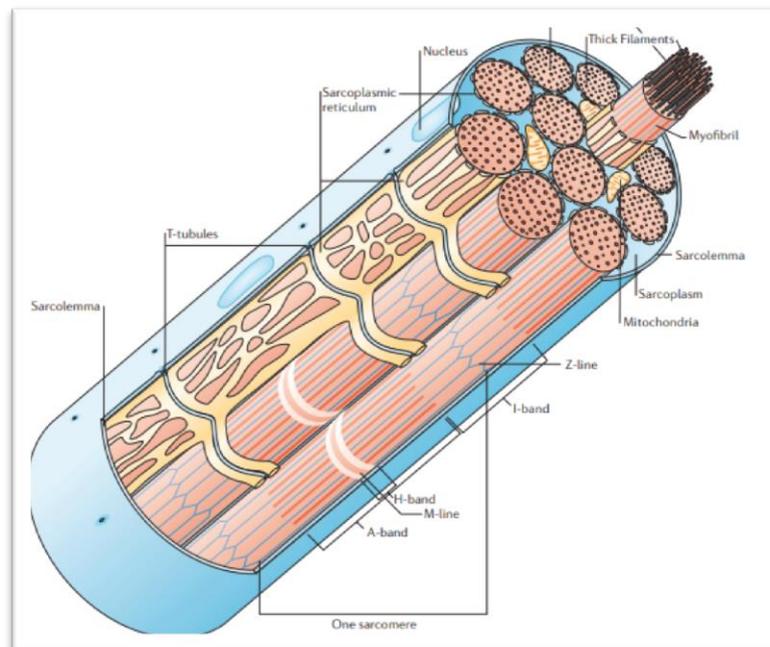


Figure 1 : Structure d'une fibre musculaire squelettique (**Davis et Nowak, 2006**).

I-2 Éléments structurels de la fibre musculaire

Le muscle squelettique strié est constitué de fibres post-mitotiques multi-nucléées qui sont les agents de la contraction. Ces fibres résultent de la fusion de cellules mononucléées précurseurs ayant migré des somites vers l'emplacement du muscle. La cascade d'événements qui conduisent à la différenciation myogénique de ces cellules est aujourd'hui bien détaillée

(**Sabourin et Rudnicki, 2000**). Certaines cellules précurseur présentes dans le muscle adulte sont nommées cellules satellites (**Mauro, 1961**) du fait de leur localisation entre la membrane plasmique et la matrice extracellulaire de la fibre musculaire. A cause de leur rôle dans la croissance et la régénération du muscle, elles ont été les premières cellules candidates pour traiter les dystrophies musculaires. Malgré de nombreuses données expérimentales positives sur la transplantation de ces cellules, aucun résultat clinique effectif n'a été obtenu à ce jour. Toutefois cette attente de résultats a permis une réflexion très riche sur l'hétérogénéité de cette cellule précurseur musculaire et sur leur mode possible d'administration (**Sebille, 2008**).

II. Dystrophies musculaires progressives (DMP)

II.1. Définition des dystrophies musculaires progressives (DMP)

Les dystrophies musculaires progressives sont un groupe d'affections génétiquement et cliniquement hétérogènes qui affectent les muscles ayant atteint leur maturité structurelle, elles s'expriment sur le plan clinique par un déficit de la force musculaire, associé à une amyotrophie, se présentant généralement au début de l'enfance et qui entraîne une perte de mobilité au début de l'adolescence qui fait suite à la dégénérescence primitive du tissu musculaire (**Boel De Paepe, 2020**).

Un grand nombre de gènes responsables des dystrophies musculaires progressives (DMP) ont été identifiés. Ces gènes codent pour des protéines dont la localisation et les fonctions varient au sein du tissu musculaire squelettique

II. 2. Classification des dystrophies musculaires progressives

Les dystrophies musculaires sont classées en fonction du gène touché et du mode de transmission.

Tableau I : Classification génétique des dystrophies musculaires (Kaplan et Hamroun, 2014 ; Nigro et Savares, 2014)

Maladie	Mode de transmission	Locus	Gène	Protéine	Référence
Dystrophie musculaire de Duchenne	XR	Xp21.2	<i>DMD</i>	Dystrophine	Monaco <i>et al.</i> (1986) Burghes <i>et al.</i> (1987) Koenig <i>et al.</i> (1987, 1988) Hoffman <i>et al.</i> (1987, 1988)
Dystrophie musculaire Emery-Dreifuss type 1, lié à l'X	XR	Xq28	<i>EMD</i>	Emerine	Hodgson <i>et al.</i> (1986) Romeo <i>et al.</i> (1988) Bione <i>et al.</i> (1994, 1995) Klauck <i>et al.</i> (1995) Nigro <i>et al.</i> (1995)
Dystrophie musculaire Emery-Dreifuss type 2, lié à l'X	XR	Xq27.2	<i>FHL1</i>	Four and half LIM domain 1	Gueneau <i>et al.</i> (2009)
Dystrophie musculaire Emery-Dreifuss autosomique Dominante	AD	1q21.2	<i>LMNA</i>	Lamine A/C	Bonne <i>et al.</i> (1999) Worman et Bonne (2007)
Dystrophie musculaire Emery-Dreifuss autosomique récessive	AR	1q22	<i>LMNA</i>	Lamine A/C	Raffaele di Barletta <i>et al.</i> (2000) Worman et Bonne (2007)
Dystrophie musculaire lié à Nesprine-1	AD	6q25	<i>SYNE1</i>	Spectrine	Zhang <i>et al.</i> (2007)
Dystrophie musculaire liée à Nesprin-2	AD	14q23	<i>SYNE2</i>	Spectrine	Zhang <i>et al.</i> (2007)
Dystrophie musculaire lié à LUMA	AD	3p25.1	<i>TMEM43</i>	Protéine transmembrane 43	Liang <i>et al.</i> (2011)
Dystrophie musculaire liée à LAP1B	AR	1q25.2	<i>TORIAIPI1</i> <i>LAP1B</i>	Torsin A Interacting Protein 1	Kayman-Kurecki <i>et al.</i> (2014)
Dystrophie musculaire facio-scapulo-humérale type1	AD	4q35	<i>DUX4</i>	Double homeobox 4	Wijmenga <i>et al.</i> (1990, 1991, 1992, 1993) Upadhyaya <i>et al.</i> (1990, 1992) Wright <i>et al.</i> (1993) van Deutekom <i>et al.</i> (1993) Gabellini <i>et al.</i> (2002) Van der Maarel <i>et al.</i> (2005) Gabellini <i>et al.</i> (2006) Petrov <i>et al.</i> (2006) Lemmers <i>et al.</i> (2010)
Dystrophie musculaire facio-scapulo-humérale type2	AD	18p11.2	<i>SMCHD1</i>	Structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain containing 1	de Greef <i>et al.</i> (2010) Sacconi <i>et al.</i> (2012) Lemmers <i>et al.</i> (2012) Sacconi <i>et al.</i> (2013)
Dystrophie musculaire avec une lipodystrophie généralisée	AD	17q21-q23	<i>PTRF</i>	Polymerase I et cavin-1	Hayashi <i>et al.</i> (2009)

LGMD1A	AD	5q31	MYOT	Myotiline	Speer et al. (1992) Hauser et al. (2000)
LGMD1B	AD	1q22	LMNA	Lamine A/C	van der Koo et al. (1997) Muchir et al. (2000) Worman et Bonne (2007)
LGMD1C	AD	3p25	CAV3	Caveoline-3	Minetti et al. (1998) McNally et al. (1998)
LGMD1D	AD	7q36.2	DNAJB6	HSP-40	Speer et al. (1999) Sarparanta et al. (2012) Harms et al. (2012)
LGMD1E	AD	2q35	DES	Desmine	Messina et al. (1997) Greenberg et al. (2012) Hedberg et al. (2012)
LGMD1F	AD	7q32	TNPO3	Transporine 3	Palenzuela et al. (2003), Melia' et al. (2013) Torella et al. (2013)
LGMD1G	AD	4q21	HNRPDL	Heterogeneous nuclear ribonuclear-protein D-like	Starling et al. (2005) Vieira et al. (2014)
LGMD1H	AD	3p25.1-p23	?		Bisceglia et al. (2010)
LGMD2A	AR	15q15.1	CAPN3	Calpaine-3	Beckmann et al. (1991) Young et al. (1992) Richard et al. (1995, 1997)
LGMD2B	AR	2p13	DYSF	Dysferline	Bashir et al. (1994) Bashir et al. (1998) Liu et al. (1998)
LGMD2C	AR	13q12	SGCG	Gamma-sarcoglycane	Ben Othmane et al. (1992) Azibi et al. (1993) Noguchi et al. (1995) McNally et al. (1996) Piccolo et al. (1996)
LGMD2D	AR	17q12-q21.33	SGCA	Alpha-sarcoglycane	Roberds et al. (1994) Piccolo et al. (1995) Passos-Bueno et al. (1995) Ljunggren et al. (1995) Carrie' et al. (1997)
LGMD2E	AR	4q12	SGCB	Beta-sarcoglycane	Lim et al. (1995) Bönnemann et al. (1995)
LGMD2F	AR	5q33	SGCD	Delta-sarcoglycane	Passos-Bueno et al. (1996)
LGMD2G	AR	17q12	TCAP	Telethonine	Moreira et al. (1997) Moreira et al. (2000)
LGMD2H	AR	9q31.2	TRIM32	Tripartite contenu motif 32	Weiler et al. (1998) Frosk et al. (2002)
LGMD2I	AR	19q13.3	FKRP	Protéine lié à la Fukutine	Driss et al. (2000) Brockington et al. (2001a)
LGMD2J	AR	2q31	TTN	Titine	Hackman et al. (2003)
LGMD2K	AR	9q34	POMT1	Protéine o-mannosyl transférase1	Balci et al. (2005) D'Amico et al. (2006)
LGMD2L	AR	11p14.3	ANO5	Anoctamine5	Jarry et al. (2007), Bolduc et al. (2008,2010), Hicks et al. (2011)
LGMD2M	AR	9q31-q33	FKTN	Fukutine	Murakami et al. (2006) Godfrey et al. (2006)
LGMD2N	AR	14q24	POMT2	Protéine o-mannosyl transférase2	Biancheri et al. (2007)
LGMD2O	AR	1p34	POMGNT1	Protéine lie o-mannose beta1,2-N-acetylglucosaminyl-transférase1	Godfrey et al. (2007) Clement et al. (2008) Raducu et al. (2012)
LGMD2P	AR	3p21	DAG1	Dystroglycane	Hara et al. (2011)
LGMD2Q	AR	8q24	PLEC1	Plectine	Gundesli et al. (2010)
LGMD2R	AR	2q35	DES	Desmine	Cetin et al. (2013)

LGMD2S	AR	4q35.1	TRAPPC11	Trafficking Protein Particle Complex 11	Bögershausen <i>et al.</i> (2013)
LGMD2T	AR	3p21.31	GMPPB	GDP-Mannose Phosphorylase B	Carss <i>et al.</i> (2013)
LGMD2U	AR	7p21	ISPD	Isoprenoid synthase domain containing	Tasca <i>et al.</i> (2013)
LGMD2V	AR	17q25.3	GAA	Alpha-1,4-Glucosidase	Preisler <i>et al.</i> (2013)
Dystrophie musculaire avec un déficit en glycosylation de type I0	AR	1q22	DPM3	Dolichyl-phosphate Mannosyltransferase Polypeptide 3	Lefebvre <i>et al.</i> (2009)
Dystrophie musculaire scapulopéronéale et syndrome de la tête tombante		9p13-p12	VCP	Valosin-Containing Protéin	Liewluck <i>et al.</i> (2014)

III. Dystrophinopathies

Les dystrophies musculaires représentent l'ensemble des maladies musculaires associées à des mutations du gène *DMD*. Leur transmission se fait selon un mode de transmission récessive liée au chromosome X. Les femmes sont rarement touchées, sont généralement asymptomatiques et transmettent la maladie à leurs garçons dans les deux tiers des cas.

(Letrucq *et al.*, 2015)

La DMD est la forme la plus grave et la plus courante de dystrophies musculaires, affectant 1 garçon nouveau-né sur 4000. La forme allélique de BMD est moins sévère, affectant seulement 1 garçon nouveau-né sur 20 000. **(Aartsma-Rus *et al.*, 2016)**

Ces deux formes alléliques résultent d'altérations qualitatives et/ou quantitatives du produit du gène *DMD* : la dystrophine.

III.1. Description clinique

III.1.1. Phénotype classique de la dystrophie musculaire de Duchenne

A la naissance, l'enfant atteint de DMD ne présente aucun signe clinique sauf un taux anormalement élevé en créatine kinase (CPK). La maladie est généralement observée entre 2 et 5 ans, parfois précédées d'un retard à l'acquisition de la marche autonome **(Fernandez *et al.*, 2010)**. Ces signes consistent en une perte progressive de la force musculaire évoluant jusqu'à la perte totale de la marche avant l'âge de 12 ans. Cette faiblesse musculaire proximale et symétrique touche d'abord les membres inférieurs s'étendant progressivement aux membres supérieurs **(Connolly *et al.*, 2013)**.

A l'examen clinique, les patients sont caractérisés par une hyperlordose (**Figure 2 :A**), une démarche dandinante, marche sur la pointe des pieds (**Figure 2 :B**), des difficultés à se relever du sol (signe de Gowers), des difficultés à marcher et à courir et à monter les escaliers ainsi qu'une pseudohypertrophie (**Figure 2 : C**) des mollets secondaire notée dans presque tous les cas (**Blake et al., 2002**).

Un retard mental est retrouvé dans 30% des cas et serait due à l'altération de l'isoforme Dp71 cérébrale de la dystrophine (**Anderson et al., 2002**).

L'atteinte cardiaque aboutissant à une cardiomyopathie dans 40 % à 50 % des patients atteints de DMD due au remplacement des cardiomyocytes, par du tissu conjonctif et fibreux et qui reste un facteur clé de décès prématuré des patients (**Bourke et al., 2018**).

III.1.2. Phénotype classique de la dystrophie musculaire de Becker

Cliniquement, un enfant atteint de BMD se caractérise par un phénotype moins sévère que la DMD avec des symptômes d'apparition plus tardive et une atteinte musculaire progressive plus lente. L'apparition des premiers signes survient au début de l'adolescence, et parfois même plus tard, l'hypertrophie des mollets est un signe caractéristique et les crampes sont très fréquentes et représentent les premiers symptômes dans cette forme (**Fernandez et al., 2010**).

L'âge de la perte de marche est variable et se situe généralement au début de l'âge adulte ; mais parfois, dans certains cas, la marche autonome est conservée très longtemps suite à une évolution lente de la maladie (**Fernandez et al., 2010**).

De plus, Certains patients restent pauci-symptomatiques tout au long de leur vie. Chez certains patients, une atteinte cardiaque sévère peut survenir et reste la cause principale de décès de cette forme de dystrophinopathie (**Maggot et al., 2015**).



Figure 2 : Aspects cliniques d'un enfant atteint de maladie de Duchenne. (**Fernandez *et al.*, 2010**).

- A. Attitude en hyperlordose.
- B. Marche sur la pointe des pieds et légère hypertrophie des mollets.
- C. présence d'une hypertrophie des mollets.

III.2. Gène *DMD*

III.2.1 Structure et organisation du gène

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

En 1986 Monaco et son collaborateur ont effectué pour la première fois l'isolement des premières portions de ce gène ; en 1987 kumkel a pu cloner le gène qu'il a nommé *DMD*, le séquençage complet a été réalisé en 1987 par Koenig et ses collaborateurs (**Koenig *et al.*,1987**)

Le gène *DMD* est localisé sur le bras court du chromosome X en Xp21.2 (**Murray *et al.*.,1982**), c'est le plus grand gène observé dans le génome humain ; représente 1% du chromosome X et 0.1 % des chromosomes humains (**Muntoni *et al.*,2003**).

La séquence codante est constituée de 79 exons d'une taille moyenne de 100 Pb en moyenne séparées par des introns de très grande taille pouvant atteindre 250 kb représentant 99% du gène.

L'expression du gène DMD est sous le contrôle de huit promoteurs tissus spécifiques de ceux-ci donne naissance à huit isoformes de la dystrophine (**Figure 4**) (**Ervasti, 2007 ; Leturcq, Tuffery-Giraud, 2015**).

III.2.2. Isoformes issus des promoteurs tissulaires ou transcrits

Isoformes longues

À l'extrémité 5' du gène, trois promoteurs régulent l'expression d'isoformes pleine longueur de la dystrophine (427 kDa). Ces promoteurs, M (Muscle), B (Brain), P (Purkinje cell), diffèrent par leur premier exon qui s'associe ensuite à 78 exons communs. (**Leturcq, Tuffery-Giraud, 2015**).

- l'isoforme musculaire (promoteur Dp427M) exprimée majoritairement dans les muscles squelettiques et cardiaques.
- l'isoforme cérébrale (promoteur Dp427B) dans les neurones du cortex et de l'hippocampe.
- l'isoforme spécifique des cellules de Purkinje (promoteur Dp427P).

Isoformes courtes

Le gène de DMD possède également quatre promoteurs internes qui donnent naissance à des protéines plus courtes dépourvues de l'extrémité N-terminale de la dystrophine. Ces promoteurs situés dans les introns 29, 44, 55 et 62 génèrent des protéines à des poids moléculaires différents exprimés comme suit (**Muntoni et al., 2003 ; Leturcq, Tuffery-Giraud, 2015**).

- La dystrophine de 260 kDa (Dp260) est exprimée dans la rétine.
- la dystrophine de 140 kDa (Dp140) est exprimée dans le cerveau, la rétine et le rein.
- la dystrophine de 116 kDa (Dp116) est exprimée dans les cellules de Schwann du nerf périphérique.
- la dystrophine de 71 kDa (Dp71) est exprimée dans le cerveau, la rétine, le rein, le foie et les poumons, mais aussi dans le muscle cardiaque

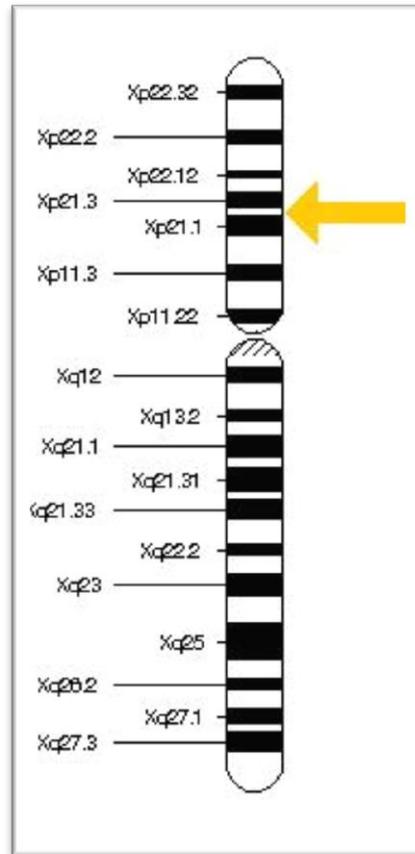


Figure 3: localisation du gène *DMD* dans le chromosome X.

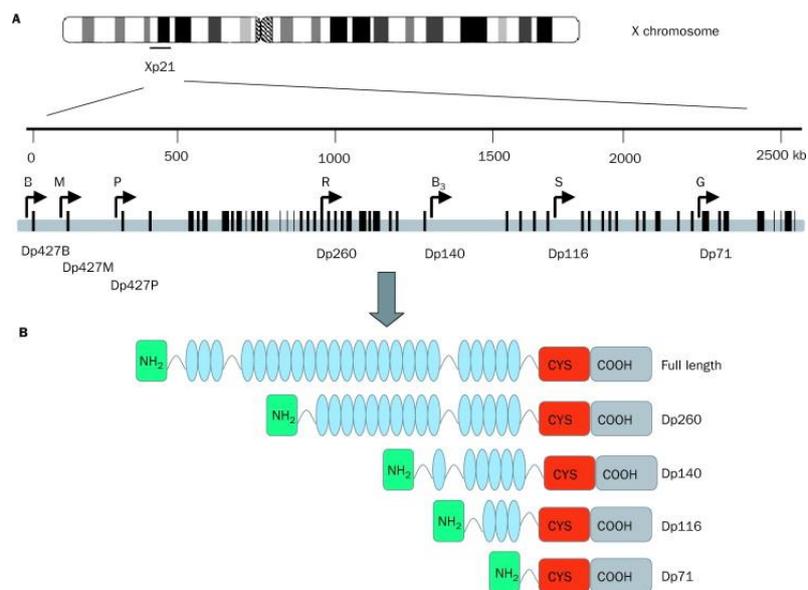


Figure 4: Représentation du gène *DMD* et d'une partie de ses différentes isoformes (Muntoni *et al.*, 2003).

(A) Les flèches indiquent la position des promoteurs mieux décrits le long de gène *DMD*, Les ligne verticales noir représentent les 79 exons du gène.

(B) Représentent les isoformes les plus décrites.

III.3. Dystrophine

III.3.1 Structure et localisation

La dystrophine est une grande protéine de 3685 acides aminés (427kDa) en forme de bâtonnet (**Leturcq, Tuffery-Giraud, 2015**). Sa structure est très conservée entre les espèces humaines, c'est une protéine subsarcolemma (localisée à la face interne du sarcolemme) qui fait partie du complexe de dystrophine –glycoprotéines. (DGC) qui forment un pont entre le cytosquelette (filaments d'actine) et la matrice extracellulaire (**Marques, 2004**).

L'analyse moléculaire primaire de la structure de dystrophine permet de distinguer quatre domaines distincts (**Figure5**) :

-Domaine N-terminal : contient un domaine de liaison avec l'actine ABD1 (Actine binding domaine).

-Domaine centrale : est le plus grand fragment, il comporte un deuxième domaine de liaison d'actine (ABD2), il est composé de 2850 acide aminé, répartie en (1 à 24) séquence répétée similaire de spectrine et de quatre zones charnière (A à D), riche en proline et qui confèrent la flexibilité de de la protéine.

-Domaine riche en cystéine : composé de plus de 280 acides aminés, comporte deux sites de fixation au calcium EF1 et EF2, site de fixation au zinc ZZ, et site implique dans l'interaction avec β -dystroglycane.

-Domaine C terminal : composé de 320 acides aminés, contient site de fixation d'actine. Cette partie de la molécule interagit avec la membrane plasmique par l'intermédiaire d'une des glycoprotéines associées (**Le Rumeur et al., 2010**).

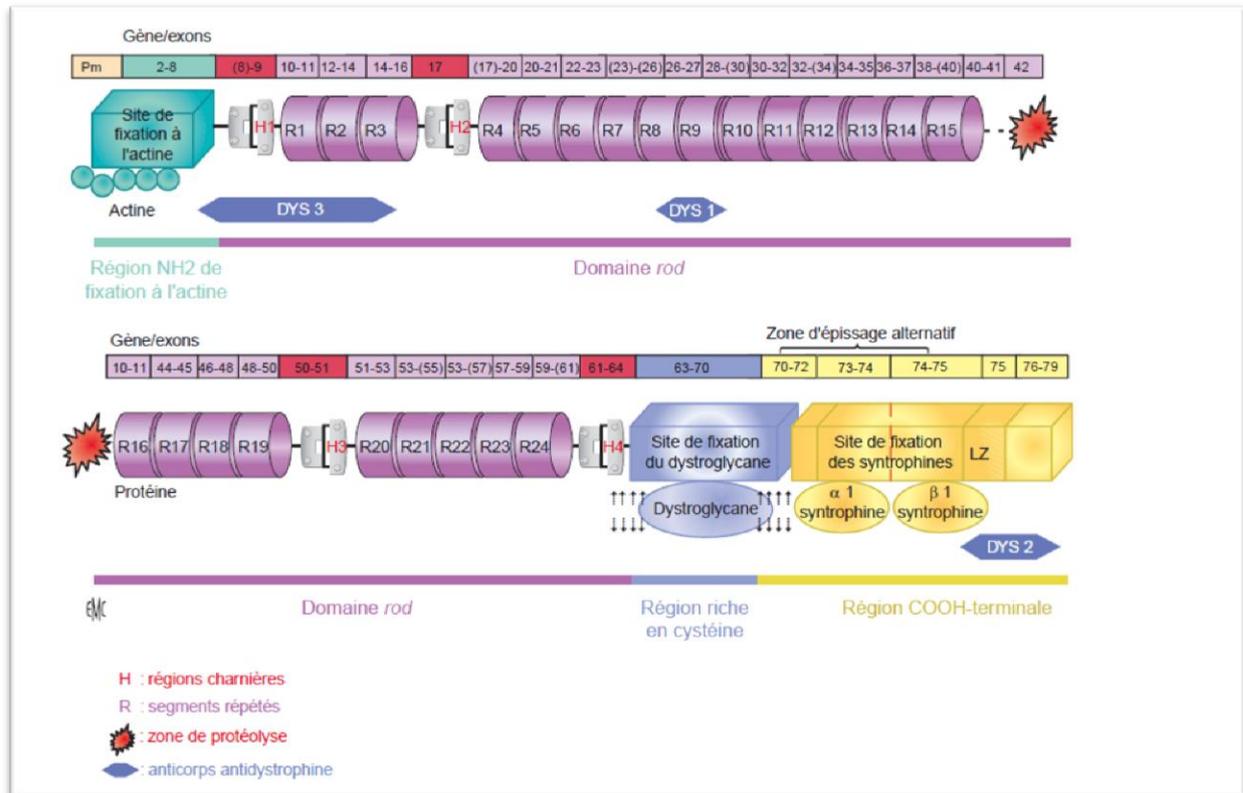


Figure 5 : Organisation de la protéine dystrophine, corrélé au gène (Fernandez et al., 2010).

III.3.2 Rôle de la dystrophine

La dystrophine est une protéine cytosqueletique sous-membranaire associée à la membrane de surface interne, et incorporée dans une grande complexe macromolécule de protéines : le complexe protéique associé à la dystrophine (DAPC). Ce complexe est composé de dystroglycanes, sarcospan, dystrobrevines et la syntrophine .

Le DAPC joue un rôle structural en assurant la stabilité de membrane et la transduction de force pendant la contraction musculaire, considéré comme une protéine d'échauffage en participant à la transduction de signaux a médiation extracellulaire vers le muscle (Constantin, 2014).

La dystrophine participe également à la stabilisation des récepteurs de neurotransmetteurs et des canaux ioniques comme les canaux calcique (Persiconi et al., 2020).

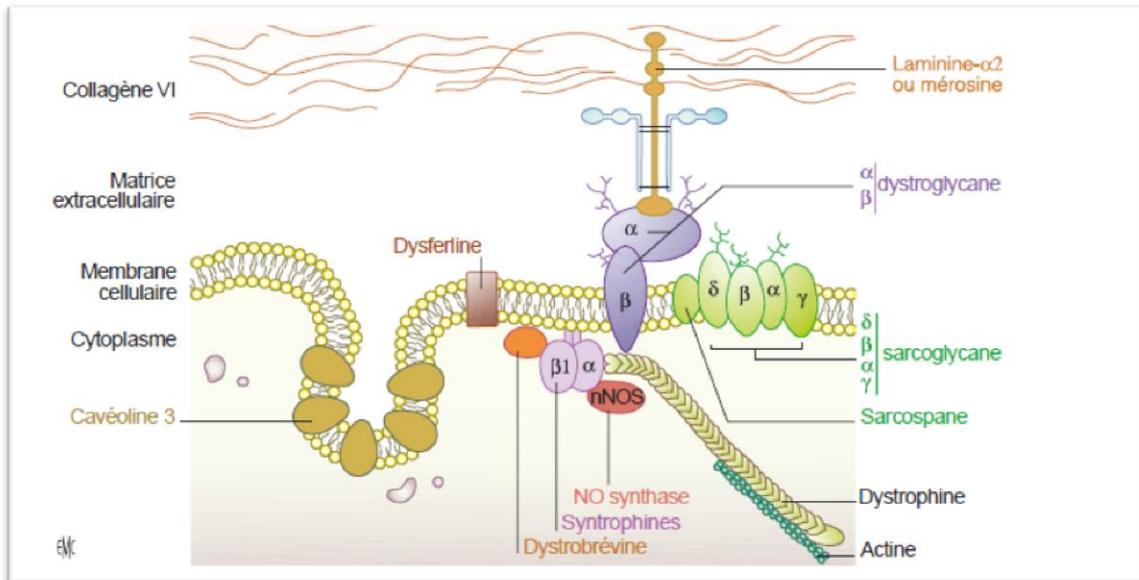


Figure 6: Complexe protéique associés à la dystrophine (Fernandez et al., 2010).

III.4. Mutations touchant le gène *DMD*

L'origine génétique de la dystrophinopathie est soit l'absence totale de la dystrophine, ou un déficit quantitatif et/ou qualitatif dans cette dernière.

La grande taille du gène *DMD*, contribue significativement à un taux élevé de mutations spontanées ou de novo :

La majorité des mutations sont des délétions intragéniques (61%DMD, 81%BMD) et duplications (13% DMD, 6% BMD) d'un ou plusieurs exons, puis, nous retrouvons des mutations ponctuelles telles que les insertions et les substitutions. Il faut également souligner qu'on peut avoir des mutations introniques profondes (Monaco et al., 1985 ;Tuffery-Giraud et al., 2009 ;Abbs et al., 2010 ;Aartsma-Rus et al., 2016).

III.4.1 Délétions et duplications

Les études menées par différentes équipes ont montré que les délétions et les duplications sont des mutations localisées tout le long du gène *DMD* ; résultant de cassures introniques ; encadrant un ou plusieurs exons.

Les délétions intragéniques regroupent 61% à 81% des mutations des individus atteints de DMD et BMD, la taille des délétions est très variable allant de 0,5 kb à 2000 kb touchant

préférentiellement deux points chauds dits "hot-spots" mutationnels *Xj* et *P20*, ce dernier étant plus fréquemment touché (Tuffery-Giraud *et al.*, 2009 ; Abbs *et al.*, 2010).

Les délétions les plus fréquemment rencontrées sont celles de l'exon 45 (1.7% des mutations rapportées) et des exons 45-47 (1.5% de toutes les mutations) (Aartsma-Rus *et al.*, 2006).

Le phénomène de duplications d'un ou de plusieurs exons est plus rare que les délétions (6 à 13%). Contrairement aux délétions, les duplications se produisent plus fréquemment près de l'extrémité 5' du gène (hot spot *Xj*) (Mohammed *et al.*, 2018) .

III-2-2 les mutations ponctuelles

Environ 13% à 20% des mutations responsable des dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker sont des mutations ponctuelles d'une ou plusieurs paires de bases ; tout le long du gène *DMD* entraînant des conséquences variables sur la production et la qualité de la dystrophine synthétisée (non fonctionnelle ou partiellement fonctionnelle ou avec fonction normale) (Aartsma-Rus *et al.*, 2006) .

A ce jour, la base de données internationale (www.dmd.nl) regroupe environ 32147 mutations ponctuelles, essentiellement de type non-sens avec une fréquence de 48% chez les patients atteints d'une DMD et 24% chez les patients BMD.

De plus, les mutations faux sens sont les plus rare chez les patients DMD avec un taux de 1% contre 4% chez les patients BMD (Figure 8) (Tuffery-Giraud *et al.*, 2009).

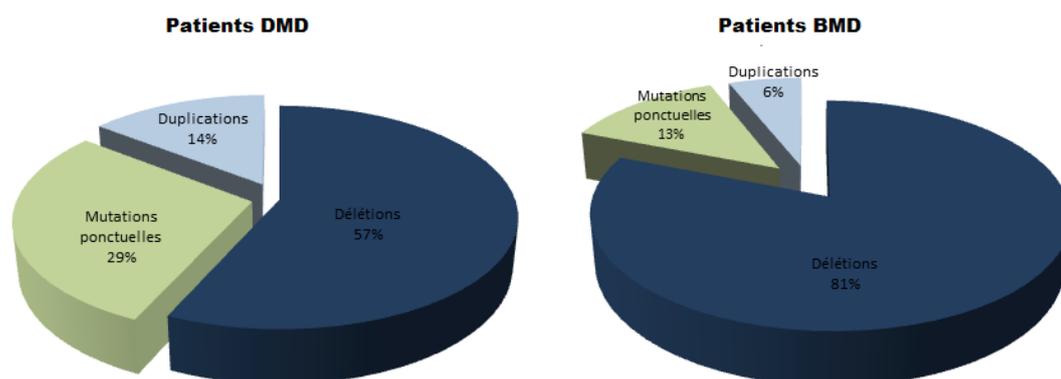


Figure 7 : Distribution des mutations chez les patients DMD et BMD (Tuffery-Giraud *et al.*, 2009)

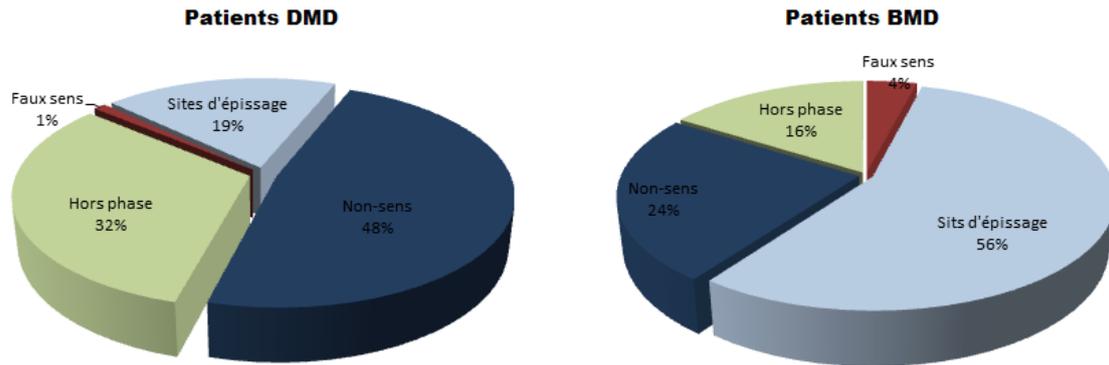


Figure 8: fréquence des différentes micro-lésions touchant le gène *DMD* chez les patients de DMD et BMD (Tuffery-Giraud *et al.*, 2009).

III.5. Corrélations génotype/phénotype

Les premières corrélations génotype/phénotype ont été recherchées juste après l'identification des premières délétions. Cependant, la relation entre la taille, la localisation de la mutation et la sévérité de la maladie n'était pas expliquée.

Après l'analyse détaillée du gène *DMD*. En 1988, Monaco a proposé un modèle basé sur la conservation ou non du cadre de lecture, il a montré que, le phénotype de la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) survient généralement lorsque les mutations entraînent un changement de cadre de lecture qui cause un arrêt de la transcription suite à l'insertion d'un codon stop prématuré donnant naissance à une protéine tronquée non fonctionnelle ou à l'absence de celle-ci dans le muscle. Chez les sujets atteints de la dystrophie musculaire de Becker (BMD), les mutations ne perturbent pas le cadre ouvert de lecture, ce qui permet la production d'une dystrophine raccourcie ayant perdue une partie interne, mais qui conserve pourtant une certaine fonctionnalité (Monaco *et al.*, 1988).

Il n'y a aucune relation entre l'étendue de la délétion et de la duplication (le nombre d'exons délétés) et la gravité de la maladie, puisque de très grandes délétions ont déjà été observées dans la forme de type BMD, et qu'à l'inverse, la délétion d'un seul exon a été identifiée dans une forme grave de type DMD, notamment la délétion de l'exon 45 (Muntoni *et al.*, 2003).

La règle de Monaco s'applique dans 96% des cas de DMD et dans 93% des cas de BMD alors que près de 10% des mutations génétiques ne suivent pas la règle du cadre de lecture (Aartsma-Rus *et al.*, 2016).

IV. Approche diagnostique

Il est très important de pouvoir poser un diagnostic clair et précis quel que soit la pathologie génétique soupçonnée, l'intérêt d'établir un diagnostic est préventif et curatif afin d'envisager une thérapeutique.

Cependant, plusieurs éléments compliquent souvent le diagnostic de dystrophinopathies notamment, la grande taille du gène DMD, le large spectre mutationnelle rendant l'analyse fastidieuse et coûteuse.

Dans cette partie, nous mettrons les éléments diagnostiques permettant l'identification des dystrophinopathies :

IV.1 Examens paraclinique

Suite à un tableau clinique et des données généalogique en faveur d'une dystrophie musculaire progressive, il est nécessaire de faire des examens paraclinique pour conforter le diagnostic primaire.

L'examen paraclinique repose sur le dosage des enzymes musculaires, en particulier le taux de créatines kinase (CPK), et l'électromyogramme (EMG).

IV.1.1 Dosages des créatinines phosphokinases (CPK)

La créatine phosphokinase est une enzyme musculaire qui participe à la phosphorylation de la créatine, et qui joue un rôle dans la contraction musculaire de cette dernière.

L'élévation du taux de CPK est très précoce, elle peut survenir pendant la grossesse et avant l'apparition des signes cliniques (avant l'âge de 5 ans), Néanmoins, des niveaux accrus de cette enzyme est mesurée par dosage immunologique dans des taches de sang séché et utilisé pour le dépistage néonatal de la DMD (**Moat et al., 2017**).

Cette élévation peut être utilisée comme biomarqueur plasmatique non spécifique pour orienter le diagnostic vers une dystrophie musculaire progressives (**Grounds et al., 2020**). Ce paramètre peut varier d'une forme à une autre de DMP (**Campana-Salort et al., 2008**).

IV.1.2 Electroneuromyogramme (ENMG)

L'ENMG est un test qui mesure l'activité électrique des muscles lors d'une contraction par de petits chocs électriques et permet d'analyser l'activité électrique dans le muscle. Dans le cas de la DMD/BMD, le tracé électromyographique indique une lésion musculaire (myogène) (Petiot et Urtizberea, 2004).

IV.2. Etude de Biopsies musculaires

Suite aux examens cliniques et para-cliniques ayant confirmé une atteinte myogène, la biopsie musculaire est un élément essentiel pour le diagnostic de la dystrophinopathie. Elle permet de prélever une quantité de tissu musculaire deltoïde ou quadriceps suffisante pour les différentes analyses anatomopathologiques et histochimiques (Petiot et Urtizberea, 2004).

En effet, en cas de dystrophie musculaire, l'évolution de l'anomalie mesurée par la présence de nombreuses fibres musculaires nécrosées et de dimensions anormalement grandes, ainsi que des noyaux centralisés. Le tissu musculaire nécrosé se trouve également remplacé par du tissu graisseux et fibreux (Deconinck, 2007).

L'utilisation des techniques d'immunohistochimie et de Western blot sur une même biopsie permet d'identifier la protéine déficiente :

IV.2.1 Immuno-histochimie (IHC) et western-blot

L'immunohistochimie est fréquemment utilisée dans les cas de dystrophinopathies pour visualiser la dystrophine au niveau d'une coupe musculaire congelée, en utilisant des anticorps spécifiques monoclonaux ou polyclonaux, grâce à la fixation d'anticorps dans différents segments de la protéine, qui permet d'établir la présence et l'absence, la localisation et l'abondance de la dystrophine (Figure 9) (Arechavala et al., 2010).

Le Western Blot (WB) peut être utilisé afin de confirmer les résultats diagnostiques apportés par l'immunohistochimie (IHC) ou dans le but de mettre en évidence l'absence de la dystrophine non révélée par ce dernier. Il précise les anomalies de la dystrophine en termes de quantité et de taille en montrant des bandes de quantité anormale ou de taille diminuée de la protéine (Na et al., 2013).

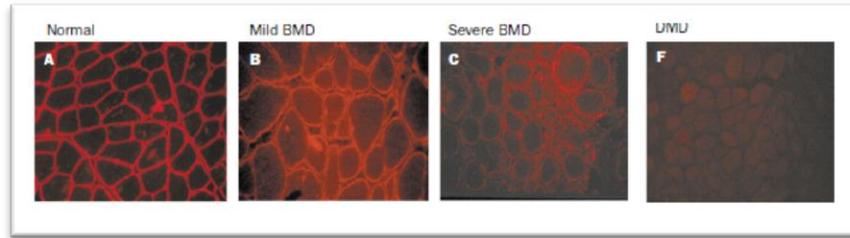


Figure 9 : Exemple de biopsie musculaire d'un muscle sain (A) et de patients atteints myopathies de Becker (B et C) et patients atteint de myopathie de Duchenne (F) (Muntoni *et al.*, 2003).

Dans le muscle sain, la dystrophine est localisée à la périphérie de chaque fibre musculaire. Chez les patients atteints de BMD, il y a une expression faible et discontinue de la dystrophine, et une expression « mosaïque » dans différentes fibres chez les patients de DMD.

IV.3. Diagnostic moléculaire

Le diagnostic génétique est obligatoire même si la dystrophie musculaire est confirmée par une biopsie musculaire. En effet, Ce diagnostic consiste à détecter des altérations génétiques chez les patients atteints en ciblant directement le gène responsable de la forme suspectée et mettre en évidence le changement intervenu à l'intérieur de l'ADN, et établir des corrélations entre le phénotype et le génotype.

Grâce à l'évolution des techniques de biologie moléculaire qui facilitent la détection des altérations génétiques de l'ADN. L'exploration du gène *DMD* à la recherche d'altérations génétiques précises est indispensable (**figure 10**) (Abbs *et al.*, 2010).

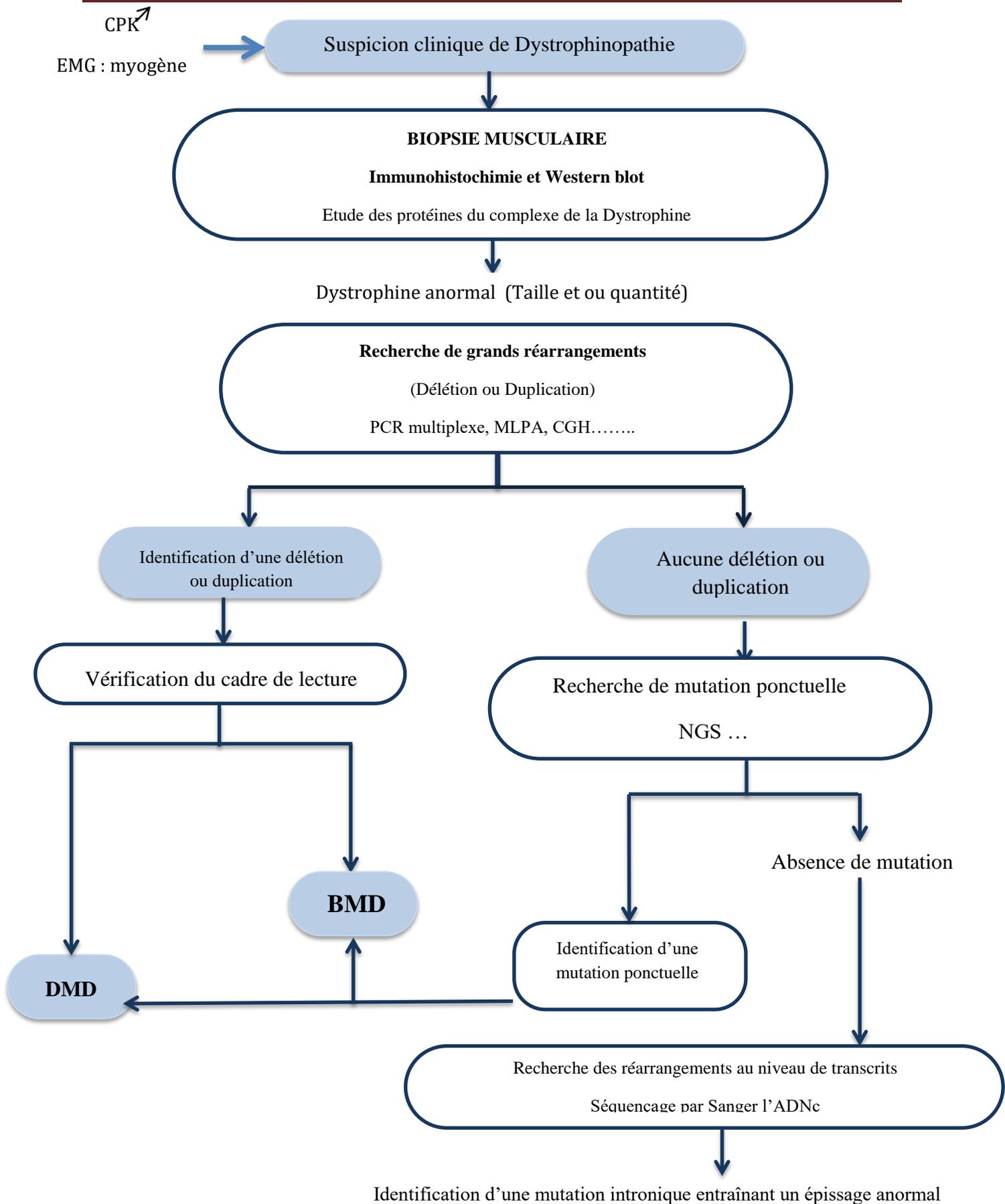


Figure 10 : Organigramme de l'approche diagnostique des dystrophinopathies➤ **Recherche des grands remaniements (délétions /duplication)**

La détection des délétions et duplications constitue la première étape de diagnostic génétique. Cependant, la PCR multiplexe était la technique la plus fréquemment utilisées, Cette approche initialement développée pour l'étude des délétions les plus fréquentes dans le gène *DMD* permet la détection de 98% des délétions en amplifiant simultanément 19 exons situés dans deux régions mutationnelles nommées « hot spots *P20* et *Xj*».

La MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*), une technique à haute résolution permettant de détecter toutes les anomalies quantitatives dans le gène *DMD* (délétions, duplications, triplications) est aujourd'hui la technique de choix dans le diagnostic de première intention des dystrophinopathies (**Suh et al., 2017**).

Une approche également recommandée, la CGH array, (*Comparative Genomic Hybridization*), une approche qui facilite la détermination de toutes les altérations génétiques sur toute la longueur du gène *DMD* (délétions, duplications et substitutions) (**Aartsma-Rus et al., 2016**).

➤ **Recherche des mutations ponctuelles**

Dans le cas où aucun grand remaniement n'a pu être identifié par les techniques précédemment citées, une nouvelle stratégie efficace dans le diagnostic moléculaire des DMD/BMD à la recherche de petites variations nucléotidiques est le séquençage à haut débit, ou NGS (*Next Generation Sequencing*) qui permet d'identifier les mutations ponctuelles, les petites insertions/délétions, mais aussi les défauts quantitatifs comme les cas de délétions exoniques partielles (**Roucher Boulez et al., 2015 ; Liu et al., 2018**).

➤ **Etude des transcrits**

Certaines variations, telles que les mutations introniques profondes, sont indétectables même avec le NGS, dans ce cas l'analyse des transcrits (ARNm) est obligatoire. L'ARNm de la dystrophine musculaire est transcrit en ADNc par la technique de RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction), puis séquencé par la méthode Sanger (**Abbs et al., 2010**). Cette technique permet de mettre en évidence les mutations ponctuelles ayant une conséquence sur l'épissage, aussi bien dans les régions de consensus d'épissage que dans les zones profondes introniques (**Roucher Boulez et al., 2015**).

VI- Traitement actuel et essai thérapeutique : Approche thérapeutique

Actuellement, il n'existe aucun traitement curatif efficace pour les dystrophinopathies

En effet, de nombreuses approches thérapeutiques ont été développées afin de corriger des défauts génétiques, ralentir la progression de la pathologie et améliorer la qualité de vie des patients.

Trois approches thérapeutiques sont particulièrement intéressantes et présentent des avantages par rapport aux autres approches et qui sont désignées comme les plus susceptibles de conduire à un traitement efficace : approche pharmaceutique ; thérapie cellulaire ; thérapie génique.

VI-1 Approche pharmacologique

A l'heure actuelle, différentes stratégies pharmacologiques sont en cour de développement.

Parmi ces stratégies :

VI-1-1- Saut d'exon

Le saut d'exon est une thérapie prometteuse pour la DMD qui a été proposé en 1995 par Takeshima et al et fait actuellement l'objet d'essais cliniques. L'idée de corriger un ARN messenger mutant due à des mutations qui entraînent un décalage dans cadre de lecture par élimination d'un ou plusieurs exons, avec utilisation des oligonucléotides qui dirigent l'épissage du pré ARNm et les conduits à une maturation correcte afin de produire une version plus courte mais fonctionnelle de dystrophine (**Mohammed et al., 2018**) .

Les oligonucléotides sont des molécules antisens complémentaires à l'ARNm de la dystrophine ; ces molécules sont des ARNs/ADNs synthétisés artificiellement et modifiés de façon à ce qu'ils soient capables de se lier à des sites spécifiques du pré ARNm, ce qui conduit à un saut d'exon qui ne sera plus reconnue par la machinerie d'épissage. Les AOS les plus utilisés sont le 2'Omethyl-ribo-oligonucléoside phosphorothioate (2OMe) et le phosphorodiamidate-morpholino-oligomers (PMOs) (**Yakota et al., 2009, Pichavant et al., 2011**).

Le saut d'exon est une approche spécifique à la mutation (dépend de la taille et de l'emplacement de la mutation), Les 5 principaux exons mutés trouvés chez les patients atteints de DMD étaient l'exon 51 (14 % du total mutations/21 % de délétions), exon 53 (10 %/15 %), exon 45 (9 %/13 %), exon 44 (7 %/11 %) et exon 43 (7%/11%) (Asher et al., 2020).

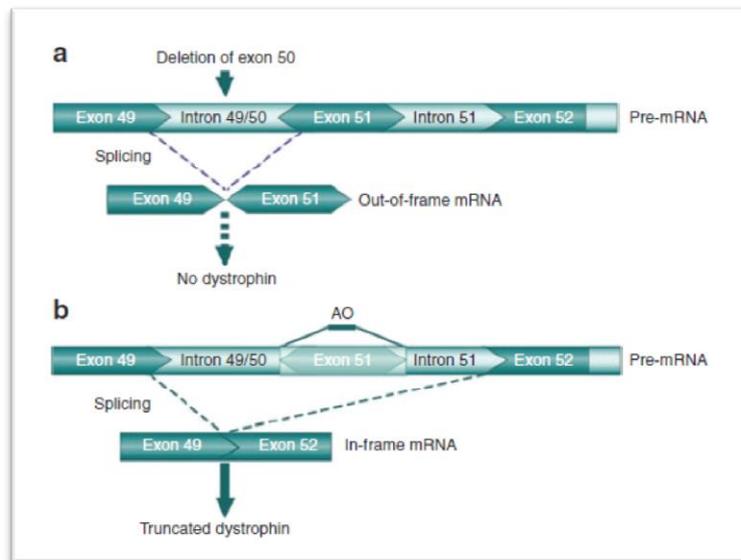


Figure 11 : Représentation schématique d'une stratégie de saut d'exon (Pichavant et al., 2011).

a) L'absence de l'exon 50 du gène de la dystrophine conduit à un ARNm hors cadre créant un codon stop prématuré dans l'exon 51, interrompant ainsi la synthèse de la dystrophine lors de la traduction.
 (b) Utilisation d'un ciblage d'oligonucléotides anti sens (AO) exon 51, cet exon est sauté lors de l'épissage. Cela restaure l'ouverture cadre de lecture de la transcription et permet la synthèse d'un dystrophine supprimée.

VI-1-2- Aminoglycosides

Parmi les mutations qui causent la DMD, les mutations non-sens avec 10 à 15% conduisent à un arrêt prématuré de la synthèse de la dystrophine.

Les antibiotiques de la famille des aminoglycosides sont des molécules qui ont la capacité d'interagir avec la machinerie traductionnel du ribosome (sous unité 40S). Cette interaction sert à l'introduction d'un acide aminé dans les codons stop d'ARNm ce qui permet à la machinerie traductionnel de poursuivre la traduction de l'ARNm (Zhou et al. 2006; Yoshizawa et al., 2010 ;Pichavant et al., 2011 ; Sun et al., 2020).

Ces antibiotiques tels que la gentamicine et l'Ataluren conduisent à une expression de la dystrophine dans tous les muscles qui résulte une stabilisation de la force musculaire ainsi qu'une modeste amélioration de la vie des patients (**Pichavant et al., 2011**).

Les effets secondaires de la gentamicine exposent les patients à un risque de néphrotoxicité, neurotoxicité, cytotoxicité, risque d'infections liées aux ports de perfusion intraveineuse et la toxicité rénale et résistance bactérienne. Pour réduire les effets indésirables de la gentamicine, un autre antibiotique, la négamycine et son analogue ont été développés. Deux analogues de la négamycine développés en 2017 (**Heo, 2020 ; Sun et al., 2020**).

VI-2- Approche cellulaire

À l'heure actuelle, la thérapie cellulaire est considérée comme un traitement palliatif potentiel, mais non curatif au plan systémique, car limité à certaines zones d'injection dans le corps. Les approches de thérapie génique sont de plus en plus nombreuses, élaborées, et fructueuses, mais thérapies géniques et cellulaires sont par essence complémentaires parce que les capacités de régénération d'un muscle déjà dystrophique même après « réparation » génique sont à priori trop limitées pour permettre un gain fonctionnel utile. Ceci est particulièrement avéré pour les petits muscles fonctionnellement nécessaires à l'autonomie des personnes (muscles de la main). Localement, cette approche pourrait toutefois permettre de préserver ou d'améliorer la qualité de vie des patients; le caractère invasif temporaire de cette procédure n'invalide pas son utilité thérapeutique finale (**Vilquin et Braun, 2019**).

VI-3- Approche génique

Le concept de thérapie génique est de délivrer une copie du gène *DMD* dans la fibre musculaire de patients afin de récupérer la fonction musculaire. Cette stratégie de transfert est réalisée par différents outils et par l'une des deux voies suivantes : ex vivo ou in vivo. Gène ex vivo, leur efficacité et dépend de l'expression du transgène (**Asher et al., 2020**).

Le remplacement du gène *DMD* se fait par introduction des vecteurs transgéniques sur le squelette de fibre musculaire de patients DMD, la grande taille de l'ADNc de la dystrophine est difficile d'utilisation car la capacité conditionnelle des vecteurs est insuffisante de délivrer l'ADNc complet même si actuellement les nouveaux vecteurs plasmides non viraux peuvent contenir de larges inserts, il est également possible d'utiliser un ADNc partiellement tronqué mais aboutissant à une protéine qui conserve certaines fonctions même si certaines

séquences manquent, afin d'obtenir ce qu'on appelle « mini-dystrophine » « ou « micro-dystrophine » lorsque la partie c-terminale est enlevée (**Pichavant et al., 2011 ;Salmaninejad et al., 2020**).

L'analyse de résultats de nombreuses souris transgéniques montre une amélioration du phénotype avec une apoptose réduite dans les fibres musculaires qui dépend du nombre d'exons de la région centrale de la dystrophine transgénique. L'amélioration de la force musculaire n'atteint jamais la force des souris sauvages (**Harish et al., 2015**).

Les principaux problèmes de cette stratégie, la possibilité d'une réponse immunitaire inflammatoire, risque de mutagénèse puisque une fraction des vecteurs s'intègre au génome. Jusqu'à présent, les essais cliniques ont montré des événements relativement indésirables à faible risque chez les patients, les plus courants étant une élévation transitoire des enzymes hépatiques. Rarement, cela a été accompagné d'augmentations transitoires de la bilirubine. La fréquence observée de la toxicité hépatique est nettement inférieure à celle observée dans de nombreux médicaments pharmacologiques utilisée (**Asher et al., 2020**).

Matériel et Méthodes

Matériel et méthodes

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Biologie cellulaire et moléculaire de l'université des sciences et de la technologie Houari Boumedienne, entre Janvier et Mai 2022. Il avait pour objectif de poser un diagnostic moléculaire précis sur des patients présentant un diagnostic clinique de dystrophinopathie. Pour plus de transparence, il est important de préciser que les différentes techniques de Biologie moléculaire ont été réalisées par une tierce personne.

Dans un deuxième temps et dans l'optique de se préparer à administrer une thérapie aux patients chez qui le diagnostic est confirmé, nous nous sommes attelés à faire une recherche des biomarqueurs spécifiques aux dystrophinopathies. Marqueurs qui seront d'une grande utilité pour l'évaluation de l'efficacité d'un traitement.

I - Recherche d'altérations génétiques par criblage direct

I.1. Patients

Notre travail a porté sur un groupe de 24 patients suivis dans le service de neurologie à l'Etablissement hospitalier Spécialisé en Appareil Locomoteur Ben-Aknoun (Hôpital professeur Boukhroufa Abdelkader). Après examen clinique et enquête familiale, établissement des arbres généalogiques, dosage de créatine kinase et électromyographie, le diagnostic de dystrophie musculaire progressive a été posé. Après que les patients aient été informés de l'analyse génétique à effectuer et que leurs consentements aient été obtenus, des prélèvements d'échantillons de sang ont été effectués.

Tableau II : Données cliniques relatives aux patients étudiés dans ce travail.

Les patients	Age (ans)	Age de début de la maladie	Age de la perte de la marche	Consanguinité
P1	6 ans	5ans	Marche encore	Oui
P2	9ans	4ans	Marche encore	Oui
P3	10ans	2 ans et demi	Marche encore	Non
P4	12ans	4ans	10ans	Non
P5	7ans	6ans	Marche encore	Oui
P6	10ans	4ans	9ans	Non
P7	13ans	5ans	Marche encore	Oui 2 ^{ème} degré
P8	5ans	3ans	Marche encore	Oui
P9	13ans	8ans	Marche encore	Non
P10	14ans	4ans	13ans	Non
P11	16ans	9ans	Marche encore	Oui 2 ^{ème} degré
P12	11ans	5ans	Marche encore	Oui (les grands parents du côté paternel)
P13	5ans	3ans	Marche encore	Non
P14	12ans	7ans	Marche encore	Non 2 ^{ème} degré
P15	8ans	5ans	Marche encore	Non
P16	18ans	8ans	12ans	Oui 3 ^{ème} degré
P17	5ans	3ans	Marche encore	Non
P18	9ans	5ans	Marche encore	Oui 2 ^{ème} degré
P19	12ans	5-6ans	Pas de perte de la marche mais très déficitaire	Oui 3 ^{ème} degré
P20	4ans	17 mois marche digitigrade	Marche en cours	Non
P21	4ans	-17 mois marche digitigrade - Chute fréquente -Impossibilité de se relever du sol	?	Non
P22	13ans	10ans	Marche préservée	Oui
P23	10ans	3ans	8ans	Non
P24	7ans	18 mois marche digitigrade	Difficulté de la marche à l'âge de 3ans (signe de Gowers)	Oui

I.2 Méthodes

I.2.1 Extraction de l'ADN génomique total à partir du sang périphérique par la méthode de relargage par les sels « Salting-Out »

Principe

Le principe d'un « Salting Out » c'est une déshydratation suivie d'une précipitation des protéines par une solution de chlorure de sodium saturée.

Après précipitation des protéines, l'ADN est précipité par de l'éthanol puis repris en suspension (**Jeannesson, 2007**).

L'objectif de l'utilisation des solutions salines (solvant non organique) pour l'extraction de l'ADN est d'éliminer par précipitation sélective les protéines dans un lysat cellulaire (**Brown, 2010**).

Solutions

- Solution de lyse des globules rouges (SLR)
- Solution de lyse des globules blancs(SLB)
- SDS ; Protéinase K et NaCl .
- Ethanol 100%
- Eau DNase/RNase

Mode opératoire

1. Prélever 10 ml de sang total dans un tube avec anticoagulant.
2. Transférer le sang dans un tube de 50 ml.
3. Compléter à 40 ml avec la solution SLR, puis mettre les tubes dans de la glace pendant 20 min.
4. Centrifuger à 3.000 tpm pendant 10 min, puis éliminer le surnageant constitué de globules rouges lysés.
5. Répéter les deux précédentes étapes jusqu'à obtention d'un culot blanc.
6. Re-Suspendre le culot constitué de globules blancs dans 9 ml de solution SLB, puis ajouter 1 ml de SDS 10% et 20 µl de Protéinase 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 sec.
9. Centrifuger à 3.000 tpm pendant 15 min à 4°C.

10. Transférer le surnageant dans un tube de 50 ml.
11. Ajouter 2.5 volumes d’Ethanol 100% 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. Laisser sécher l’ADN à température ambiante.
15. Re-suspendre l’ADN dans de l’eau DNase/RNase free.
16. Conserver à +4°C.

I.2.2 Recherche par PCRs multiplexes de délétions intragéniques dans le gène *DMD*

Principe

La PCR multiplexe est une variante de la PCR classique. Elle consiste à amplifier simultanément plusieurs régions différentes de l’ADN en utilisant les couples d’amorces correspondant aux différents locus à analyser et qui sont introduits dans le même tube réactionnel. Les conditions d’amplification étant fixées pour un même tube dans lequel ont lieu plusieurs réactions différentes.

Les principaux avantages de cette adaptation technique est la réduction du coût et la diminution du temps de réalisation.

La PCR multiplexe se révèle difficile, mais très utile et d’une importance énorme lors de l’exploration d’un grand gène ou d’un gène avec un grand nombre d’exons comme le gène *DMD* (79 exons).

Solutions

- Tampon PCR
- MgCl₂ - dNTPs (mélange de dATP, dTTP, dGTP, dCTP, à 10 mM)
- Amorces sens et reverse
- *Taq* polymérase

Mode opératoire

La recherche de délétions intragénique dans le gène de la dystrophine par deux PCR multiplexe permet d'explorer en globalité 19 exons en ne ciblant que les points les plus fréquemment délétés « deux hots spots mutationnels *Xj* et *P20* »: la PCR multiplexe de Chamberlain et la PCR multiplexe de Beggs (**Chamberlain *et al.*, 1988; Beggs *et al.*, 1990**). Cette technique permet de détecter 98 % des délétions retrouvées dans 70 % des cas de dystrophinopathies.

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 : PCR multiplexe de Chamberlain permet d'amplifier les régions comprenant les exons 4, 8, 12, 17, 19, 44, 45, 46, 48 et 51, alors que la PCR multiplexe de Beggs permet d'amplifier en même temps les régions comprenant le promoteur musculaire PM et les exons 3, 6, 13, 43, 47, 50, 52 et 60.

1-Chacune des deux PCRs multiplexes a été réalisée dans un volume total de 50 µl contenant :

- 250 ng d'ADN génomique.
- 1.5 mM de dNTPS.
- 25 pmol de chacune des amorces (sens et reverse) selon le pool.
- 6.7 mM de MgCl₂.
- 5 U de Taq polymerase.
- un tampon d'amplification 1x final.

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

PCR de Chamberlain *et al.* (1988)

- 94°C, 7 min
- [94°C, 30 sec - 53°C, 30 sec - 65°C, 4 min] 23x
- 65°C, 7 min
- 4°C, infini

PCR de Beggset *al.* (1990)

- 94°C, 7 min
- [94°C, 30 sec - 53°C, 30 sec - 65°C, 4 min] 25x

- 65°C, 10 min
- 4°C, infini

➤ Révélation des profils d'amplification par PCRs multiplexes

Principe

Les produits de PCR sont ensuite analysés dans une électrophorèse sur un gel d'agarose, qui permet de contrôler le produit afin de confirmer la bonne réussite de l'amplification, et que la PCR s'est déroulé correctement, et permettant aussi d'apprécier qu'il y ait effectivement un produit d'amplification (dans notre Protocole, 10 fragments pour PCR multiplexe de Chamberlain, et 9 fragments de celle de Beggs) (**Chamberlain *et al.*, 1988; Beggs *et al.*, 1990**). Elle permet également de vérifier si une éventuelle contamination de l'ADN est survenue et qu'il n'existe pas d'amplifications parasites grâce au contrôle négatif (**Sambrook *et al.*, 1989**). Cette électrophorèse permet également la détection de délétions dans les exons criblés. En effet, si l'un des exons amplifiés est manquant, il s'agit d'une délétion.

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-Aldrich®).
- Bleu de dépôt (0.05% Bleu de bromophénol, 60% Glycérol).
- Marqueur de poids moléculaire 100-Base pair ladder (1 µg/ml) (Invitrogen®).

Mode opératoire

1. Préparer un gel d'agarose à 2.5% dans du tampon TBE 1x supplémenté de bromure d'éthidium à une concentration finale de 0.5 µg/ml.
2. Préparer les échantillons :
30 µl de produit PCR + 6 µl de Bleu de dépôt 87
3. Déposer les échantillons et le marqueur de poids moléculaire dans le gel et laisser migrer à 100 V pendant 3-4 heures .
4. Révéler les produits d'amplification par exposition du gel sous rayons UV.

Résultats et Discussion

Résultats et Discussion

I. Recherche par PCRs multiplexes de délétions intragéniques dans le gène *DMD*

I.1 Analyse clinique et généalogique

Le groupe de patients que nous avons étudié dans notre cadre de travail était composé de 24 patients présentant un phénotype clinique de dystrophinopathie recruté au niveau du service de neurologie à l'Etablissement hospitalier Spécialisé en Appareil Locomoteur Ben-Aknoun (Hôpital professeur Boukhroufa Abdelkader), qui ont été recrutés entre 2018 et 2020.

I.1.1 Données cliniques

Les patients que nous avons étudiés présentent les caractéristiques générales suivantes :

- Sexe masculin
- Faiblesse musculaire proximale avec signe de Gower positif chez certains patients
- Taux sérique élevé de CPK
- Tracé EMG révélant une atteinte myogène

Dans notre panel, les premiers signes de la maladie étaient en moyenne de 5 ans (entre 17mois et 10 ans), alors que l'âge moyen de diagnostic était de 10 ans (entre 4ans et 18ans) (**Figure12**). Dans une étude menée sur 81 patients, **Dey et ses collaborateurs** ont rapportés que chez 80% des patients l'âge des premiers symptômes est de 5 ans (Dey et al., 2015). Alors qu'une autre étude réalisée sur 384 Italiens de phénotype DMD **D'amico et ces collaborateurs** ont rapportés un âge moyen de diagnostic de 4ans (**D'amico et al., 2017**).

Cependant, la répartition des différents signes de début de la maladie dans notre recrutement est en conformité avec l'histoire et l'évolution naturelle des formes classiques de ces affections, il s'agit d'une faiblesse musculaire et d'une hypertrophie des mollets, des difficultés à la marche, difficultés à courir, à se lever du sol et à monter les escaliers. Ces résultats sont semblables à ceux qui sont décrits par plusieurs auteurs avec des fréquences plus ou moins variables (**Bushby et al., 2010 ; Mohammed et al., 2018**).

I.1.2 Données généalogiques

D’après, l’enquête familiale et l’établissement des arbres généalogique au moment de la consultation au niveau de l’hôpital. Aucune atteinte des parents ni des sœurs n’ont été signalés. Cependant, dans certaines familles, nous avons pu identifier plusieurs individus de sexe masculin atteints ce qui conforterait le mode de transmission récessif lié au chromosome X relatif aux dystrophinopathies.

Contrairement aux taux de consanguinité rapportée dans la population générale algérienne (38,3%) (Enquête sur la consanguinité en Algérie, 2007). Dans notre étude le taux de consanguinité est estimé à 54 ,17%, ce pourcentage comprend la consanguinité de premier et de second degré (**Figure13**).

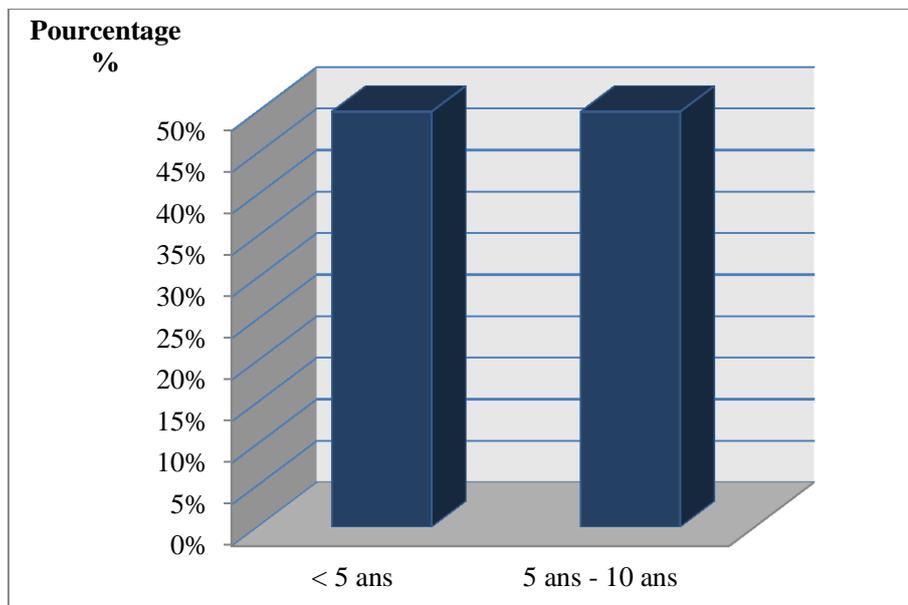


Figure12: Répartition des cas selon l’âge des premiers signes cliniques.

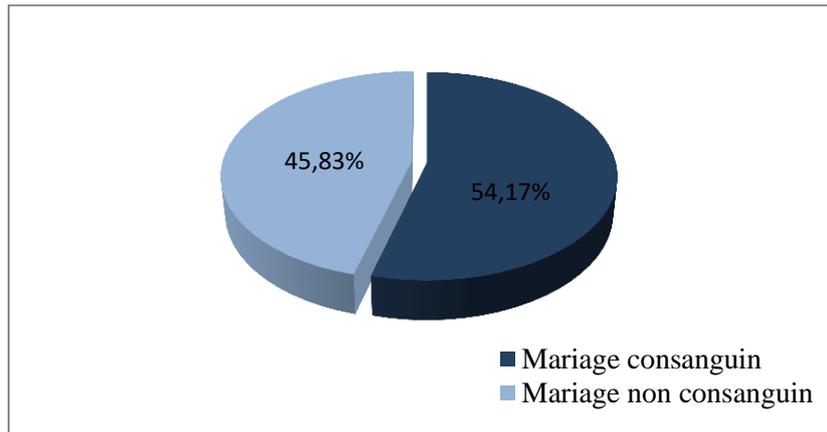


Figure13 : Répartition des familles selon la consanguinité.

I.2 Mise en évidence de délétions intragéniques dans le gène *DMD* chez des patients présentant un phénotype de dystrophinopathie

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) et de Becker (BMD) sont deux formes alléliques d’une dystrophie musculaire progressive ; due à des altérations moléculaires dans le gène *DMD* codant pour une protéine musculaire : la dystrophine.

Les différentes altérations qui affectent le gène *DMD* sont regroupées en trois grands groupes : les délétions intragéniques les plus étendues représentant environ 70 – 81 % des mutations ; affectant un ou plusieurs exons , des mutations plus rares de type duplications représentant environ 5 -10 % affectant des régions plus ou moins large du gène *DMD* , et enfin les mutations ponctuelles qui touchent n’importe quelle région du gène ; avec une proportion de 20 % des mutations (Tuffery-Giraud *et al.*, 2009).

Grace à la grande taille du gène *DMD* ; il est difficile et lourd d’explorer la totalité des exons du gène *DMD*.

Dans notre travail nous avons recherché en priorité les délétions intragéniques les plus fréquemment rencontré dans ce gène, siégeant préférentiellement au niveau des deux sites mutationnels « hot-spots », *Xj* et *P20*, qui regroupent ensemble 98% des altérations délétionnelles intragéniques. Nous avons donc ciblé spécifiquement ces deux sites en amplifiant plusieurs exons simultanément de 24 patients par deux PCR multiplex, celle décrite par Chamberlain *et al.* (1988) (que l’on désignera PCR de Chamberlain) permettant d’amplifier les exons 4, 8, 12, 17, 19, 44, 45, 46, 48 et 51, et celle décrite par Beggs *et al.* (1990) (qu’on nommera PCR de Beggs) permettant d’amplifier une région du promoteur

musculaire PM et les exons 3, 6, 13, 43, 47, 50, 52 et 60 (**Chamberlain *et al.*, 1988; Beggs *et al.*, 1990**).

La révélation des produits d'amplification par électrophorèse indique la présence ou l'absence des exons en indiquant la délétion intragénique d'un ou des exons absents (**Figure 14**) (**tableau III**).

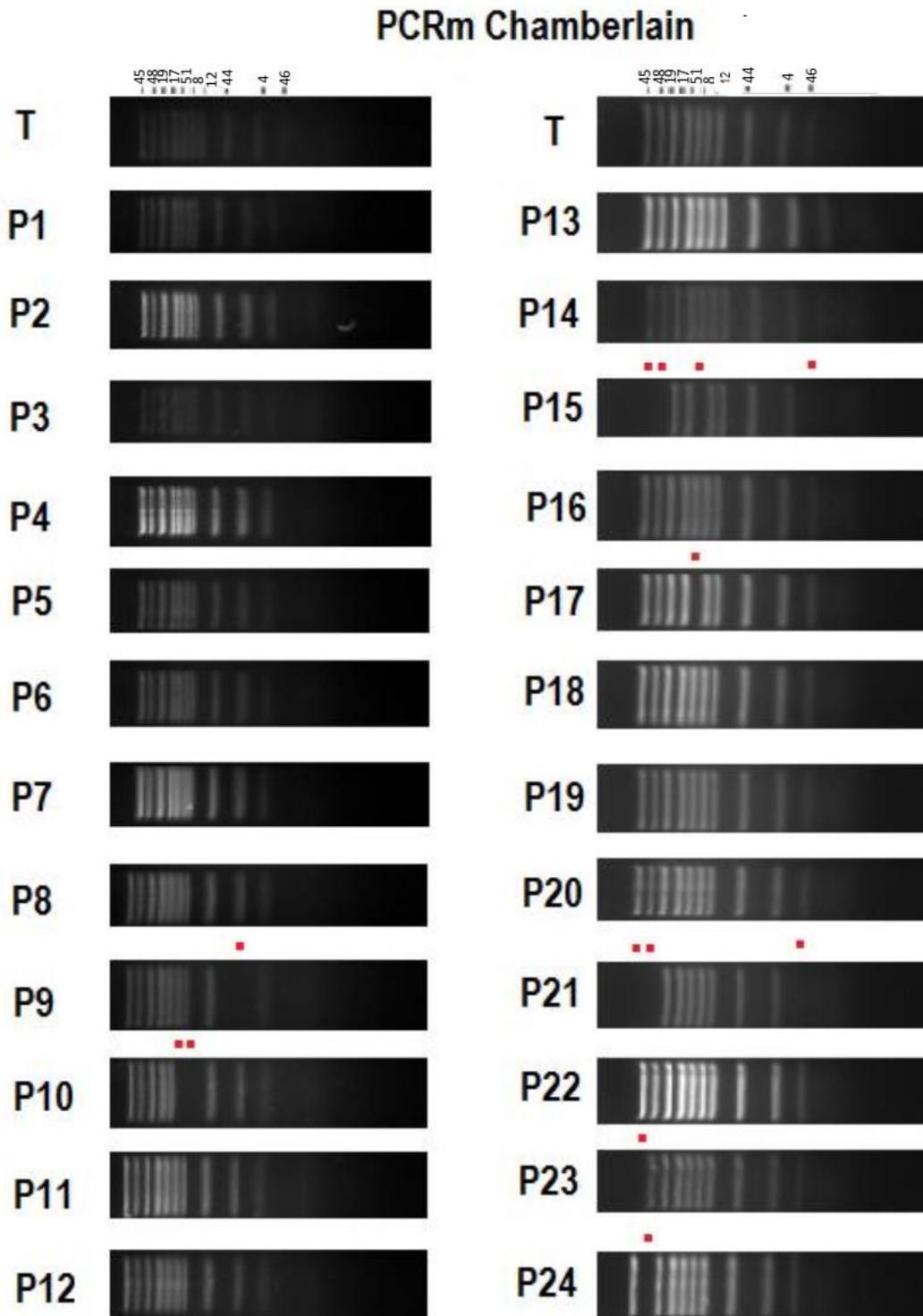


Figure 14(a) : Profils d’amplification obtenus chez les patients de notre panel présentant des délétions allant de la région *Xj* à la région *P20* du gène *DMD* et du patient présentant une délétion du promoteur après électrophorèse sur gel d’agarose 2.5% des produits des deux PCRs multiplexes de Chamberlain et *al.*(1988) (a)et de Begges et *al.*(1990)(b). En haut de chaque gel sont indiqués les exons d’amplification ciblant le gène *DMD* ;**T**:témoin sain ;**P** : patients. Les points rouges indiquent les exons manquants.

Le sens de migration est haut > bas.

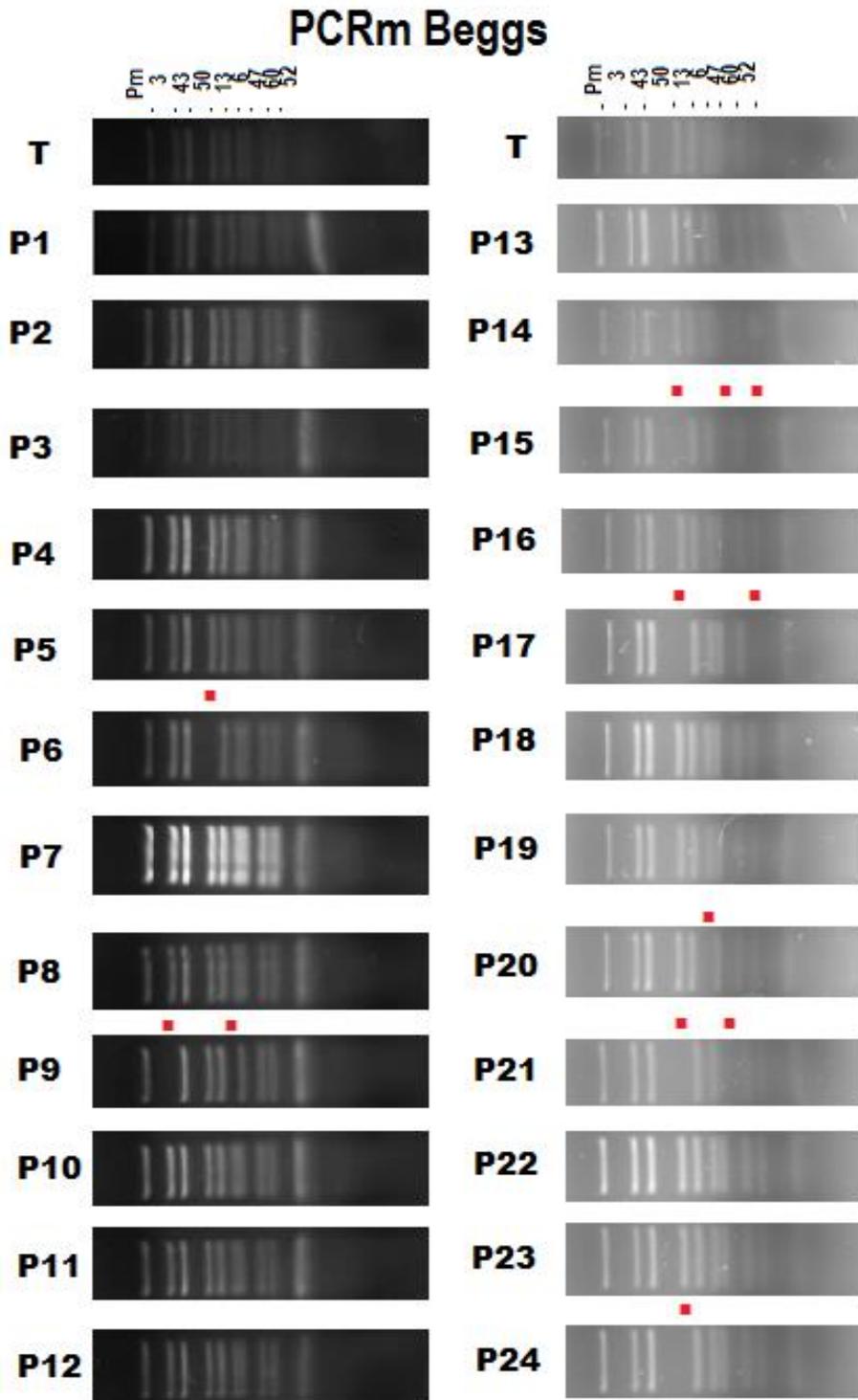


Figure 14 (b): Profils d'amplification obtenus chez les patients de notre panel présentant des délétions allant de la région *Xj* à la région *P20* du gène *DMD* et du patient présentant une délétion du promoteur après électrophorèse sur gel d'agarose 2.5% des produits des deux PCRs multiplexes de Chamberlain et *al.*(1988) et de Begges et *al.*(1990). En haut de chaque gel sont indiqués les exons d'amplification ciblant le gène *DMD* ;**T**:témoin sain ;**P** : patients. Les points rouges indiquent les exons manquants.

Le sens de migration est haut > bas.

Tableau III: Résultat des deux PCRs multiplex de Chamberlain et *al.* (1988) et Beggs et *al.* (1990) chez nos patients.

Patients	PCR Chamberlain	PCR Beggs	Etendu
P1	Aucune délétion	Aucune délétion	
P2	Aucune délétion	Aucune délétion	
P3	Aucune délétion	Aucune délétion	
P4	Aucune délétion	Aucune délétion	
P5	Aucune délétion	Aucune délétion	
P6	Aucune délétion	Délétion de l'exon 50	Exon 51
P7	Aucune délétion	Aucune délétion	
P8	Aucune délétion	Aucune délétion	
P9	Délétion de l'exon 4	Délétion d'exons 3 et 6	Exons 3 à 6
P10	Délétion d'exons 8 et 12	Aucune délétion	Exons 8 à 12
P11	Aucune délétion	Aucune délétion	
P12	Aucune délétion	Aucune délétion	
P13	Aucune délétion	Aucune délétion	
P14	Aucune délétion	Aucune délétion	
P15	Délétion d'exons 45 et 48 et 51 et 46	Délétion d'exons 50 et 47 et 52	Exons 45 à 52
P16	Aucune délétion	Aucune délétion	
P17	Délétion d'exon 51	Délétion d'exons 50 et 52	Exons 51 à 52
P18	Aucune délétion	Aucune délétion	
P19	Aucune délétion	Aucune délétion	
P20	Aucune délétion	Délétion d'exon 6	
P21	Délétion d'exons 45 et 48 et 46	Délétion d'exons 50 et 47	Exons 45 à 50
P22	Aucune délétion	Aucune délétion	
P23	Délétion d'exon 45	Aucune délétion	Exon 46
P24	Délétion d'exon 48	Délétion d'exon 50	Exons 48 à 50

I.2.1 -Fréquences et répartition des délétions dans différents pays

Le tableau IV résume les données rapportées par une étude réalisée par **Rita Selvatici et ses collaborateurs** en 2021 sur 328 patients référés par 10 pays d'Europe de l'Est (Pologne, Hongrie, Lituanie, Roumanie, Serbie, Croatie, Bosnie, Bulgarie, Ukraine et Russie) et 2 pays non européens (Algérie et Chypre) dans le but d'identifier les mutations du gène *DMD* (**Tableau V**) (**Rita Selvatici et al., 2021**) .

Etant donné que notre panel est réduit, nous ne pouvons pas extrapoler ni faire d'analyse statistique sur la fréquence des délétions avec les différents pays de cette étude car ils ont considérés qu'il y appartenant de deux groupes de patients distincts l'Europe d'Est et l'Algérie ; Chypre n'a pas été inclut car elle a deux cas seulement. D'après la notion de distribution des mutations chez les patients atteints de DMD d'Europe de l'Est (A) et d'Algérie (B) (**Rita Selvatici et al., 2021**). Les mutations non-sens étaient les mutations les plus fréquentes chez les patients d'Europe de l'Est, représentant (31 %) des types des mutations chez les patients atteints de DMD, suivies des délétions (29%). Les délétions étaient les mutations les plus fréquentes chez les patients algériens (77 %), tandis que les variations non-sens, décalage de cadre, épissage des sites canoniques, duplications et mutations faux-sens sont les moins fréquentes (**Rita Selvatici et al., 2021**).

Nous n'avons observé aucune corrélation entre l'étendue d'une délétion, sa localisation et la gravité clinique de la maladie associée. Pour certains cas avec des délétions dans les deux régions de délétion à haute fréquence, l'effet prédit sur le cadre de lecture traductionnelle de l'ARNm de la dystrophine résultant n'était pas corrélé avec le phénotype de la maladie associée (**Baumbach et al., 1989**). Nous verrons plus bas que cela n'a pas été le cas pour notre panel puisque des corrélations ont pu être mises en évidence.

Tableau IV : Répartition et données généalogiques des patients dans des pays européens et non européens (Rita Selvatici et al., 2021).

Pays	Patients inscrits	Négatif pour la mutation DMD	Positif pour la mutation DMD	DMD	BMD	Nombre totale et fréquence des délétions
Algérie	68	16	52	39	9	36 (77%)
Bosnie	1	0	1	1	0	0
Bulgarie	12	0	12	11	1	1(9%)
Croatie	5	0	5	4	1	0
Hongrie	14	5	9	9	0	1(11%)
Lituanie	6	2	4	4	0	0
Pologne	66	30	36	31	1	2(7%)
Roumanie	62	25	37	29	7	23(14%)
Russie	1	0	1	1	0	0
Serbie	2	0	2	2	0	0
Ukraine	89	27	62	56	5	25(38%)
Chypre	2	1	1	1	0	0

I.2.2-localisation des délétions

L'analyse des résultats de nos PCR multiplexe nous a permis de montrer que 9 des 24 patients (37.5%) présentaient une délétion d'un ou de plusieurs exons. ce qui confirme le diagnostic clinique de dystrophinopathies révélées chez ces patients (**Figure 15**).

La majorité des délétions que nous avons identifiées dans notre pool de malades (19 /24 ; 75%), se produit dans la partie centrale du gène (région 3' du gène) alors que (6/24 ; 25%) surviennent dans la région 5' du gène (**Figure 16**).

Conformément aux études précédentes (**Bladen et al.,2015 ; Mohammed et al.,2018 ; Zhao et al., 2018**), nous avons noté que la distribution des larges délétions est non aléatoire. En effet, elles étaient regroupées en deux régions du gène *DMD* : point chaud *Xj* et point chaud *P20*.

Les résultats montrent également que la longueur de la région délétère dans le site distale (point chaud *P20*) était relativement importante, tandis que pour le site proximal, les délétions étaient de moins grande importance avec seulement 6 exons délétés en moyenne.

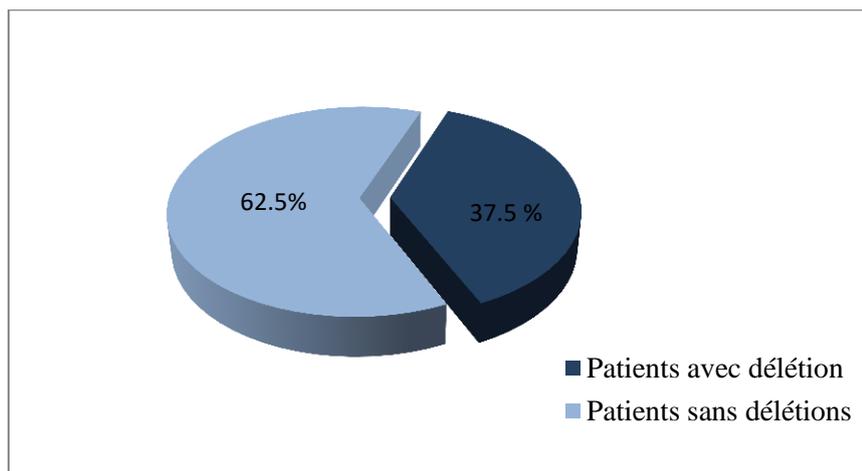


Figure 15: Fréquence des délétions dans notre recrutement du malade.

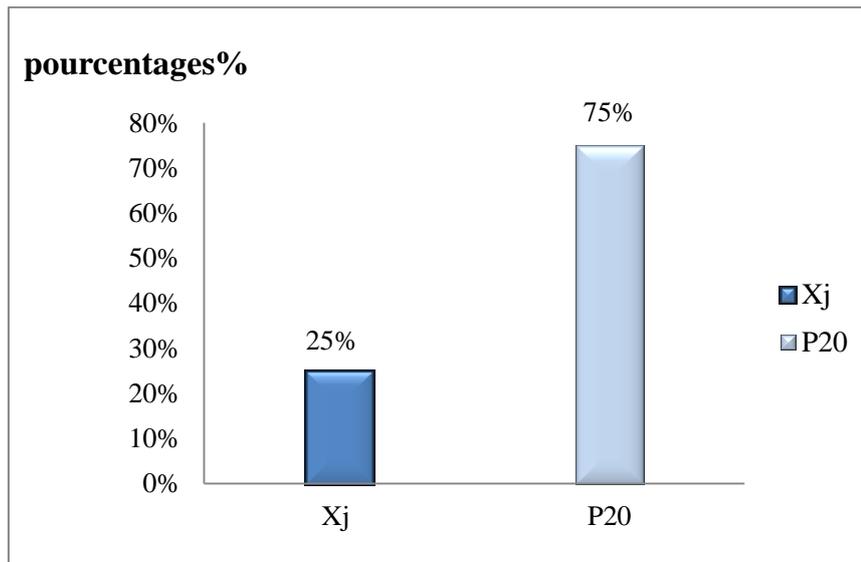


Figure 16 : Pourcentages des délétions chez nos patients dans les points chauds *Xj* et *P20*.

I.2.3 Corrélations génotype –phénotype

La règle de **Monaco** décrite en 1988, a montré que le phénotype des dystrophinopathies dépend de la conservation du cadre de lecture ou non, les mutations qui maintiennent un cadre de lecture dans les transcrits mutés permettent la synthèse une dystrophine tronquée partiellement fonctionnelle, ceci conduit à un phénotype du type BMD.

Cependant, dans le phénotype DMD, les mutations perturbant le cadre de lecture donnaient un ARN instable et la production d'une protéine non fonctionnelle ou totalement absente (**Monaco, 1998**).

De ce fait, nous avons tenté de prédire l'effet réel des délétions sur le processus de traduction en se basant sur la séquence de référence du gène *DMD* (Référence dans la banque de données NCBI : NM_004006), et ainsi de mettre en évidence la corrélation entre le génotype et le phénotype. Ceci nous a permis de faire ressortir les patients chez qui il y'avait un décalage ou non du cadre de lecture (**Tableau V**).

Sur l'ensemble des patients présentant une délétion intragénique dans le gène *DMD* (9patients), 8 patients montrent une corrélation avec la règle des cadres de lecture (règle de **Monaco**).

L'analyse de l'ensemble des délétions, nous a permis de conclure que toutes les mutations sont des mutations hors phage qui entraînent un décalage du cadre de lecture, s'étalant de la région 5' à la région centrale 3' du gène *DMD*. Ces mutations affectaient les patients **P6** (50), **P10** (8-10), **P15** (45-52), **P17** (50-52), **P21** (45-50), **P23**(45) et **P24** (48-

50) chez qui le phénotype semblait sévère de type DMD et conduit à l'absence total de dystrophine dans le muscle .

Dans notre étude une exception de la règle est notée chez **le patient 9** de phénotype BMD. Ce dernier présente une mutation hors phase qui décale le cadre de lecture (3-6). Cette observation a été également été rapportée par d'autres chercheurs et été bien documenté. En effet, des études ont montré que les mutations hors cadre avant l'exon 8 entraînent un phénotype BMD, ceci est dû à la présence d'un site alternatif d'initiation de la traduction dans l'exon 6 ou l'exon 8 qui sont activés par certaines mutations favorisant ainsi une réinitiation de la traduction du gène *DMD* permettant la synthèse d'une dystrophine tronquée présentant une fonctionnalité partielle (**Aartsma-Rus et al.,2016**) .

Théoriquement, la correction du cadre de lecture peut être obtenue en sautant un ou deux exons flanquant une délétion, en sautant les exons dans le cadre contenant une mutation non-sens, ou en sautant les exons dupliqués. Cela se traduirait par des protéines similaires à celles trouvées chez divers patients atteints de BMD (**Aartsma-Rus et al., 2003**).

Tableau V : Corrélation entre le génotype et le phénotype clinique.

Patients	Délétion	Effet prédit	Phénotype clinique
P6	Exon 50	Décalage de cadre de lecture	DMD
P9	Exons 3-6	Décalage de cadre de lecture	BMD
P10	Exons 8-12	Décalage de cadre de lecture	LGMD2C
P15	Exons 45-52	Décalage de cadre de lecture	LGMD2C
P17	Exons 50-52	Décalage de cadre de lecture	LGMD2C
P21	Exons 45-50	Décalage de cadre de lecture	DMD
P23	Exon 45	Décalage de cadre de lecture	LGMD2C
P24	Exons 48-50	Décalage de cadre de lecture	DMD

I.3 Patients ne présentant pas de délétions dans le gène *DMD*

Sur les 24 patients étudiés pour la mise en évidence de délétions intragéniques du gène *DMD*, 15 (62,5%) patients ne présentaient aucune altération dans les régions ciblées.

Pour ceux-ci nous présenterons un certain nombre de possibilités qu'il serait intéressant d'explorer :

-Les patients pourraient présenter d'autres délétions intragéniques dans d'autres régions différentes de celles que nous avons amplifiées par les deux PCRs multiplexes de Chamberlain et al. (1988) et de Beggs et al. (1990).

- Les patients pourraient avoir un autre type de mutations différent de celui des délétions intragéniques, soit des altérations de type duplication ou de petites mutations ponctuelles, le Protocol PCRs multiplexes utilisé dans notre étude ne nous permet pas d'identifier les autres mutations, mais nous pouvons les rechercher par Southern blots ou MLPA, et par séquençage respectivement.

- Les patients pourraient être atteints par un autre type de dystrophie musculaire progressive et qui partagerait des symptômes cliniques avec celles des dystrophinopathies, ou ils auraient une affection neuromusculaire différente. Si aucun type de mutation n'est identifié, il est nécessaire de reprendre les examens cliniques et paracliniques complémentaires pour un autre diagnostic (criblage protéique par western blot ou par immunohistochimie).

- Les patients présenteraient une dystrophie musculaire dont le locus/gène est encore aujourd'hui inconnu.

I.4 Patients présentant des délétions intragéniques dans le gène *DMD*

Pour 9 patients /24 le diagnostic de dystrophinopathie a été clairement posé. Il a en effet été confirmé sur le plan génétique.

Pour ces patients, une prise en charge adaptée doit être proposée aux patients. De plus, ces individus représentent des sujets candidats aux nouveaux traitements thérapeutiques.

Ces traitements étant toujours à l'échelle expérimentale, il est nécessaire de déterminer (ou mettre en place) des outils puissants permettant d'évaluer leur efficacité. Parmi ces outils, les biomarqueurs se révélant être des molécules de choix. Qui profitent au patient non seulement en améliorant la prise en charge avec des traitements déjà existants mais

aussi en facilitant le développement de nouvelles thérapies. Ces approches visent à traiter les dystrophinopathies sur une base moléculaire comprennent la thérapie par saut d'exon et l'administration d'une version plus courte de la dystrophine (minidystrophine) médiée par l'AAV.

Les CK, Myoglobine, Aldolase, Lactate déshydrogénase se sont des biomarqueurs fiables de la dystrophie musculaire depuis longtemps, et ils ont été utilisés pour évaluer le niveau de lésions musculaires et de nécrose ainsi que pour l'efficacité des thérapies potentielles, mais ils ne sont pas toujours fiables car ils sont facilement affectés par le stress corporel, comme l'exercice, l'âge...ect. De plus, ils sont également perturbés dans d'autres formes de myopathies, ce qui en fait des marqueurs non spécifiques.

Une équipe a ainsi montré une dérégulation de plusieurs miARNs dans des échantillons de tissus musculaires de patients atteints de 10 troubles musculaires différents, ils ont inclus dans l'étude cinq miARN (miR-146b, miR-155, miR-214, miR-221, miR-222) qui étaient systématiquement dérégulés dans chaque échantillon. Ces miARN ont par la suite été nommés « dystromiR ». Ils peuvent être impliqués dans la réponse cellulaire aux dommages musculaires.

Tableau VI : miRNAs circulants dérégulés dans le sérum des patients DMD.

Les miRs	Modèle animale expérimenté	La description	Références
miR-222	Chien GRMD	Reflètent les altérations cardiaques structurelles et non fonctionnelles chez les patients DMD	Becker et <i>al.</i> , 2016
miR-1		Surexprimé dans le sérum des patients DMD et favorise la différenciation musculaire	Cacchiarelli et <i>al.</i> , 2011 ; Zaharieva et <i>al.</i> , 2013 et Zeng et <i>al.</i> , 2014
miR-21	Souris C2C12	La réduction de l'expression de miR-21 réduit la fibrose	Morgoulis et <i>al.</i> , 2019 ; Zanotti et <i>al.</i> , 2015
miR-31 miR-146b miR-374a	Souris mdx	L'inhibition augmente le sauvetage de la dystrophine	Fiorillo et <i>al.</i> , 2015 ; Cacchiarelli et <i>al.</i> , 2011
miR-29	Souris mdx	Le traitement avec le miR-29 synthétique ralentit la fibrose et favorise la régénération musculaire	Wang et <i>al.</i> , 2012

Au vu de ces différents profils de miARNs dérégulés, de nombreuses équipes ont cherchés à étudier les profils de ces miARNs dans le sérum, dans l'espoir de trouver des marqueurs de la maladie pouvant être potentiellement utilisés comme cibles thérapeutiques dans le traitement.

Un profil particulier des miARNs dans les muscles des patients atteints de DMD ainsi que de souris *mdx* a également été décrit et une augmentation de l'expression de miARNs impliqué dans le fibrogène tissulaire à savoir les miR-21, miR-29. D'autres études ont révélé que miR-34c et miR-708 étaient régulés positivement dans les cellules DMD et leur inhibition entraîne une expression accrue de nNOS, en indiquant que ces miARN sont modulateurs de l'activité de la nNos. Une autre étude a montré qu'il existe trois miARN (miR-146, miR-374a, miR-31) qui régulent l'expression de la dystrophine.

On conclut que les miARN (miR-21, miR-29, miR-146, miR-374a, miR-31, miR-146,miR-374a,miR-31) détectés dans le sérum chez les patients DMD pourraient potentiellement servir d'outils pour améliorer le diagnostic et le traitement de la DMD, en tant que biomarqueurs cibles thérapeutiques.

Conclusion

Conclusion

Dans notre travail, en se basant sur une suspicion clinique de dystrophinopathies, nous avons pu montrer une proportion d'individus de sexe masculin ciblés par PCRs multiplexes présentant une délétion d'un ou plusieurs exons dans le gène de la dystrophine, démontrant ainsi que cette approche est très efficace pour le diagnostic des dystrophinopathies dans notre pays.

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 et 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 entraînerait 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 biopsies musculaire avec Western blot et immunohistochimie.

La thérapie génique et cellulaire semble 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.

En fin, la mise en évidence de biomarqueurs sériques spécifiques aux dystrophinopathies est important pour l'évaluation de nouveaux traitements thérapeutiques et certains miRNA semblent être de très bons candidats dans ce cadre-là.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

- Aartsma-Rus A, Ginjaar IB, Bushby K. (2016). The importance of genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy. *J Med Genet.*53(3):145-51.
- Aartsma-Rus, A., Janson, AA, Kaman, WE, Bremmer-Bout, M., den Dunnen, JT, Baas, F., ... & van Deutekom, JC (2003). Saut d'exon induit par un antisens thérapeutique dans des cellules musculaires en culture de six patients DMD différents. *Génétique moléculaire humaine*, 12 (8), 907-914.
- Aartsma-Rus, A., Van Deutekom, J.C., Fokkema, I.F., Gert-Jan B, V.O., et Johan
- Abbs, S., Tuffery-Giraud, S., Bakker, E., Ferlini, A., Sejersen, T., et Mueller, C.R. (2010). Best practice guidelines on molecular diagnostics in Duchenne/Becker muscular dystrophies. *Neuromuscul. Disord.*20: 422-427.
- Anderson, J.L., Head, S.I., Rae, C., et Morley, J.W. (2002). Brain function in Duchenne muscular dystrophy. *Brain* 125: 4-13.
- Arechavala-Gomez V, Kinali M, Feng L, et al.(2010). Immunohistological intensity measurements as a tool to assess sarcolemma-associated protein expression. *Neuropathol Appl Neurobiol* . 36: 265– 274.
- Asher DR, Thapa K, Dharia SD, Khan N, Potter RA, Rodino-Klapac LR, Mendell JR.(2020). Clinical development on the frontier: Gene therapy for duchenne muscular dystrophy. *Expert Opin Biol Ther.*;20:263–274
- Azibi, K., Bachner, L., Beckmann, J.S., Matsumura, K., Hamouda, E., Chaouch, M., Chaouch, A., Ait-Ouarab, R., Vignal, A., Weissenbach, J., Vinet, M.C., Letrucq, F., Collin, H., Tome, F.M.S., Reghis, A.,Fardeau, M., Campbell, K.P., et Kaplan, J.C. (1993). Severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy with the deficiency of the 50 kDa dystrophin-associated glycoprotein maps to chromosome 13q12. *Hum Mol Genet.* 2: 1423-1428.

B

- Balci, B., Uyanik, G., Dincer, P., Gross, C., Willer, T., Talim, B., ... & Topaloğlu, H. (2005). Une dystrophie musculaire des ceintures autosomique récessive (LGMD2) avec retard mental léger est allélique au syndrome de Walker-Warburg (WWS) causé par une mutation du gène POMT1. *Troubles neuromusculaires*, 15 (4), 271-275.
- Bashir, R., Britton, S., Strachan, T., Keers, S., Vafiadaki, E., Lako, M., ... & Bushby, K. (1998). Un gène lié au facteur fer-1 de la spermatogenèse de *Caenorhabditis elegans* est muté dans la dystrophie musculaire des ceintures de type 2B. *Génétique de la nature*, 20 (1), 37-42.
- Baumbach, L.L., Chamberlain, J.S., Ward, P.A., Farwell, N.J., et Caskey, C.T. (1989). Molecular and clinical correlations of deletions leading to Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Neurology* 39: 465-474.
- Beggs, A.H., Koenig, M., Boyce, F.M., et Kunkel, L.M. (1990), Detection of 98 % of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum. Genet.* 86: 45-48.
- Biancheri, R., Falace, A., Tessa, A., Pedemonte, M., Scapolan, S., Cassandrini, D., ... & Bruno, C. (2007). Mutation du gène POMT2 dans la dystrophie musculaire des ceintures avec modifications inflammatoires. *Communications de recherche biochimique et biophysique*, 363 (4), 1033-1037.
- Bione, S., Maestrini, E., Rivella, S., Mancini, M., Regis, S., Romeo, G., & Toniolo, D. (1994). Identification d'un nouveau gène lié à l'X responsable de la dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss. *Génétique de la nature*, 8 (4), 323-327.
- Bisceglia, L., Zoccolella, S., Torracco, A., Piemontese, M. R., Dell'Aglio, R., Amati, A., ... & Petruzzella, V. (2010). A new locus on 3p23–p25 for an autosomal-dominant limb-girdle muscular dystrophy, LGMD1H. *European Journal of Human Genetics*, 18(6), 636-641.
- Bladen CL, Salgado D, Monges S, Foncuberta ME, Kekou K, Kosma K, et al.(2015). The TREAT-NMD DMD Global Database: analysis of more than 7,000 Duchenne muscular dystrophy mutations. *Hum Mutat.* 36(4):395-402.
- Blake, D.J., Weir, A., Newey, S.E., et Davies, K.E. (2002). Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol. Rev.* 82: 291-329.
- Bögershausen, N., Shahrzad, N., Chong, J.X., von Kleist-Retzow, J.C., Stanga, D., Li, Y., Bernier, F.P., Loucks, C.M., Wirth, R., Puffenberger, E.G., Hegele, R.A., Schreml, J., Lapointe, G., Keupp, K., Brett, C.L., Anderson, R., Hahn, A., Innes, A.M., Suchowersky, O., Mets, M.B., Nürnberg, G., McLeod, D.R., Thiele, H., Waggoner, D., Altmüller, J., Boycott, K.M., Schoser, B., Nürnberg, P., Ober, C., Heller, R., Parboosingh, J.S, Wollnik, B., Sacher, M., et Lamont, R.E. (2013). Recessive TRAPPC11

mutations cause a disease spectrum of limb girdle muscular dystrophy and myopathy with movement disorder and intellectual disability. *Am. J. Hum. Genet.* 93: 181-190.

- Bolduc, V., Marlow, G., Boycott, K. M., Saleki, K., Inoue, H., Kroon, J., ... & Brais, B. (2010). Recessive mutations in the putative calcium-activated chloride channel Anoctamin 5 cause proximal LGMD2L and distal MMD3 muscular dystrophies. *The American Journal of Human Genetics*, 86(2), 213-221.
- Bonne, G., Barletta, MRD, Varnous, S., Bécane, HM, Hammouda, EH, Merlini, L., ... & Schwartz, K. (1999). Des mutations du gène codant pour la lamine A/C provoquent une dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss autosomique dominante. *Génétique de la nature*, 21 (3), 285-288.
- Bönnemann, CG, Modi, R., Noguchi, S., Mizuno, Y., Yoshida, M., Gussoni, E., ... & Kunkel, LM (1995). Les mutations du β -sarcoglycane (A3b) provoquent une dystrophie musculaire autosomique récessive avec perte du complexe sarcoglycane. *Génétique de la nature*, 11 (3), 266-273.
- Bourke JP, Bueser T, Quinlivan R. (2018). Interventions for preventing and treating cardiac complications in Duchenne and Becker muscular dystrophy and X-linked dilated cardiomyopathy. *Cochrane Database Syst Rev.* 10(10):CD009068.
- Brown T., (2010). *Gene Cloning and DNA Analysis : An Introduction* 6th edition. Ed, John Wiley and Sons. USA
- Burghes, AH, Logan, C., Hu, X., Belfall, B., Worton, RG et Ray, PN (1987). Un clone d'ADNc du gène de la dystrophie musculaire de Duchenne/Becker. *Nature*, 328 (6129), 434-437.
- Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, et al.(2010). Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol.* 9(1):77-93.
- Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, et al.(2010). Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: implementation of multidisciplinary care. *Lancet Neurol.* Feb;9(2):177-89.

C

- Cacchiarelli, D.; Legnini, I.; Martone, J.; Cazzella, V.; D'Amico, A.; Bertini, E.; Bozzoni, I. miRNAs as serum biomarkers for Duchenne muscular dystrophy. *EMBO Mol. Med* 2011; 3, 258–265.
- Campana-Salort, E., Krahn, M., Bartoli, M., Richard, I., & Pouget, J. (2008). Dystrophies musculaires des ceintures : stratégie diagnostique, bases moléculaires. *Revue du rhumatisme (Ed. française)*, 75 (2), 142-150.
- Carrie, A., Piccolo, F., Leturcq, F., De Toma, C., Azibi, K., Beldjord, C., ... & Jeanpierre, M. (1997). Diversité mutationnelle et points chauds du gène alpha-sarcoglycane dans la dystrophie musculaire autosomique récessive (LGMD2D). *Journal de génétique médicale*, 34 (6), 470-475.
- Carss, K.J., Stevens, E., Foley, A.R., Cirak, S., Riemersma, M., Torelli, S., Hoischen, A., Willer, T., van Scherpenzeel, M., Moore, S.A., Messina, S., Bertini, E., Bönnemann, C.G., Abdenur, J.E., Grosman, C.M., Kesari, A., Punetha, J., Quinlivan, R., Waddell, L.B., Young, H.K., Wraige, E., Yau, S., Brodd, L., Feng, L., Sewry, C., MacArthur, D.G., North, K.N., Hoffman, E., Stemple, D.L., Hurles, M.E., van Bokhoven, H., Campbell, K.P., Lefeber, D.J., UK10K Consortium., Lin, Y.Y., et Muntoni, F. (2013). Mutations in GDP-mannose pyrophosphorylase B cause
- Cetin, N., Balci-Hayta, B., Gundesli, H., Korkusuz, P., Purali, N., Talim, B., Tan, E., Selcen, D., Erdem-Ozdamar, S., et Dincer, P. (2013). A novel desmin mutation leading to autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy : distinct histopathological outcomes compared with desminopathies. *J. Med. Genet.* 50: 437- 443.
- Chamberlain, J.S., Gibbs, R.A., Ranier, J.E., Nguyen, P.N., et Caskey, C.T. (1988). Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res.* 16: 11141-11156.
- Connolly Anne M, Julaine M, Florence Mary M, Cradock Kate Bushby Michelle. (2013). Eagle Motor and cognitive assessment of infants and young boys with Duchenne Muscular Dystrophy: results from the Muscular Dystrophy Association DMD Clinical Research Network. *Clinical Research Network. Neuromuscul Disord.*
- Constantin B. (2014). Dystrophin complex functions as a scaffold for signalling proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes.* 1838(2):635–642.

D

- D'Amico Adele, Catteruccia Michela, Baranello Giovanni, Politano Luisa, Govoni Alessandra, Previtali Stefano Carlo et al.(2017). Diagnosis of duchenne muscular dystrophy in italy in the last decade: critical issues and areas for improvements. *Neuromuscular Disorders*.
- 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 Greef, J. C., Lemmers, R. J. L. F., Camano, P., Day, J. W., Sacconi, S., Dunand, M., ... & Tawil, R. (2010). Clinical features of facioscapulohumeral muscular dystrophy 2. *Neurology*, 75(17), 1548-1554.
- De Paepe, B. (2020). Progressive skeletal muscle atrophy in muscular dystrophies: a role for toll-like receptor-signaling in disease pathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), 4440.
- Deconinck N et Dan B. Pathophysiology of duchenne muscular dystrophy: current hypotheses. *Pediatr Neurol.* 2007 ; 36(1) : 1–7.
- Deutekom, JCV, Wljmenga, C., Tlenhoven, EAV, Gruter, AM, Hewitt, JE, Padberg, GW, ... & Fronts, RR (1993). Les réarrangements d'ADN associés à la FSHD sont dus à des délétions de copies intégrales d'une unité répétée en tandem de 3,2 kb. *Génétique moléculaire humaine* , 2 (12), 2037-2042.
- Dey S, Senapati AK, Pandit A. et al. Genetic and clinical profile of patients of Duchenne muscular dystrophy: Experience from a tertiary care center in Eastern India. *Indian Pediatr.* 2015;52:481– 484.
- Di Barletta, M. R., Ricci, E., Galluzzi, G., Tonali, P., Mora, M., Morandi, L., ... & Toniolo, D. (2000). Different mutations in the LMNA gene cause autosomal dominant and autosomal recessive Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *The American Journal of Human Genetics*, 66(4), 1407-1412.
- Driss, A., Amouri, R., Hamida, C. B., Souilem, S., Gouider-Khouja, N., Hamida, M. B., & Hentati, F. (2000). A new locus for autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy in a large consanguineous Tunisian family maps to chromosome 19q13. *3. Neuromuscular Disorders*, 10(4-5), 240-246.

E

- Ervasti, J.M. (2007). Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy. *Biochim. Biophys. Acta.* 1772: 108-117.

F

- Fernandez, C., Halbert, C., Maues de Paula, A., D. Figarella-Branger, D., Chabrol, B., et Pellissier, J.F. (2010). Dystrophies musculaires liées au gène DMD : myopathie de Duchenne, myopathie de Becker, formes féminine et atypiques. *Neurologie* 378 : 43869-43875.
- Fiorillo, AA, Heier, CR, Novak, JS, Tully, CB, Brown, KJ, Uaesoontrachoon, K., ... & Hoffman, EP (2015). Les microARN induits par le TNF- α contrôlent l'expression de la dystrophine dans la dystrophie musculaire de Becker. *Rapports de cellule*, 12 (10), 1678-1690.
- Frosk, P., Weiler, T., Nylén, E., Sudha, T., Greenberg, CR, Morgan, K., ... & Wrogemann, K. (2002). Dystrophie musculaire des ceintures de type 2H associée à une mutation de TRIM32, un gène putatif E3-ubiquitine-ligase. *Le tourillon américain de la génétique humaine*, 70 (3), 663-672.

G

- G. Biomarkers for Duchenne muscular dystrophy: myonecrosis, inflammation and oxidative stress. *Disease Models & Mechanisms*.2020;13(2), dmm043638. doi:10.1242/dmm.043638.
- Gabellini, D., D'Antona, G., Moggi, M., Prellè, A., Zecca, C., Adami, R., ... & Tupler, R. (2006). Dystrophie musculaire facioscapulohumérale chez la souris surexprimant FRG1. *Nature*, 439 (7079), 973-977.
- Gabellini, D., Green, M. R., & Tupler, R. (2002). Inappropriate gene activation in FSHD: a repressor complex binds a chromosomal repeat deleted in dystrophic muscle. *Cell*, 110(3), 339-348.
- Godfrey, C., Clement, E., Mein, R., Brockington, M., Smith, J., Talim, B., ... & Muntoni, F. (2007). Affiner les corrélations génotype-phénotype dans les dystrophies musculaires avec glycosylation défectueuse du dystroglycane. *Cerveau*, 130 (10), 2725-2735.
- Greenberg, S.A., Salajegheh, M., Judge, D.P., Feldman, M.W., Kuncl, R.W., Waldon, Z., Steen, H., et Wagner, K.R. (2012). Etiology of limb girdle muscular dystrophy 1D/1E determined by laser capture microdissection proteomics. *Ann. Neurol.* 71: 141- 145.
- Grounds MD, Terrill J R, Al-Mshhdani B A, Duong M N, Radley-Crabb H G, Arthur P
- Gueneau, L., Bertrand, A. T., Jais, J. P., Salih, M. A., Stojkovic, T., Wehnert, M., ... & Bonne, G. (2009). Mutations of the FHL1 gene cause Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *The American Journal of Human Genetics*, 85(3), 338-353.
- Gundesli, H., Talim, B., Korkusuz, P., Balci-Hayta, B., Cirak, S., Akarsu, NA, ... & Dincer, P. (2010). La mutation de l'exon 1f de PLEC, entraînant une perturbation de l'isoforme de la

plectine 1f, provoque une dystrophie musculaire des ceintures autosomique récessive. Le tourillon américain de la génétique humaine, 87 (6), 834-841.

H

- Hara, Y., Balci-Hayta, B., Yoshida-Moriguchi, T., Kanagawa, M., Beltrán-Valero de Bernabé, D., Gündeşli, H., Willer, T., Satz, J.S., Crawford, R.W., Burden, S.J., Kunz, S., Oldstone, M.B., Accardi, A., Talim, B., Muntoni, F., Topaloğlu, H., Dinçer, P., et Campbell, K.P. (2011). A dystroglycan mutation associated with limb-girdle muscular dystrophy. *N. Engl. J. Med.* 364: 939-946.
- Hauser, M. A., Horrigan, S. K., Salmikangas, P., Torian, U. M., Viles, K. D., Dancel, R., ... & Speer, M. C. (2000). Myotilin is mutated in limb girdle muscular dystrophy 1A. *Human molecular genetics*, 9(14), 2141-2147.
- Heo Y A.(2020). Golodirsén: First Approval. *Drugs*. 80:329–333.
- Hicks, D., Sarkozy, A., Muelas, N., Koehler, K., Huebner, A., Hudson, G., Chinnery, P.F., Barresi, R., Eagle, M., Polvikoski, T., Bailey, G., Miller, J., Radunovic, A., Hughes, P.J., Roberts, R., Krause, S., Walter, M.C., Laval, S.H., Straub, V., Lochmüller, H., et Bushby, K. (2011). A founder mutation in Anoctamin 5 is a major cause of limb-girdle muscular dystrophy. *Brain* 34: 171-182.
- Hoffman EP, Brown Jr. RH, Kunkel LM.(1987). Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51: 919-28.
- Hoffman, E.P., Fischbeck, K.H., Brown, R.H., Johnson, M., Medori, R., Loire, J.D., Harris, J.B., Waterston, R., Brooke, M., Specht, L., Kupsky, W., Chamberlain, J., Caskey, C.T., Shapiro, F., and Kunkel, L.M. (1988) Characterization of dystrophin in muscle-biopsy specimens from patients with Duchenne's or Becker's muscular dystrophy. *N. Engl. J. Med.* 318: 1363-1368.

J

- Jeannesson E., (2007). «Profils génétiques de lignées cellulaires humaines modèles en physiopathologie et pharmacotoxicologie cardio-vasculaires», Thèse de Doctorat de université de Lorraine «université Henri Poincaré – Nancy », pp 27-39.

K

- Kaplan, J.C., et Hamroun, D. (2014). The 2015 version of the gene table of monogenic neuromuscular disorders (nuclear genome). *Neuromuscul. Disord.* 24: 1123-1153.
- Kayman-Kurekci, G., Talim, B., Korkusuz, P., Sayar, N., Sarioglu, T., Oncel, I., ... & Dincer, P. (2014). Mutation dans TOR1AIP1 codant LAP1B dans une forme de dystrophie musculaire : un nouveau gène lié aux envelopathies nucléaires. *Troubles neuromusculaires*, 24 (7), 624-633.
- Koenig, M., Hoffman, E.P., Bertelson, C.J., Monaco, A.P., Feener, C.A., et Kunkel,
- Koenig, M., Monaco.C.J., et Kunkel, L.M. (1988). The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 53: 219-228.
- Kunkel L M, Hejtmancik J F, Caskey C T, Speer A, Monaco A P, Middlesworth W, et al. (1986). Analysis of deletions in DNA from patients with Becker and Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 3-9;322(6074):73-7.

L

- L.M. (1987). Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD cDNA).
- L.M. (1996). Mild and severe muscular dystrophy caused by a single y-sarcoglycan mutation. *Am. J. Hum. Genet.* 59: 1040-1047.
- Le Rumeur E, winders SJ, Hubert JF. (2010). Dystrophin : more than juste the sum of its parts. *Biochim Biophys. Acta* 1804 :1713-22.
- Lefeber, D. J., Schönberger, J., Morava, E., Guillard, M., Huyben, K. M., Verrijp, K., ... & Wevers, R. A. (2009). Deficiency of Dol-P-Man synthase subunit DPM3 bridges the congenital disorders of glycosylation with the dystroglycanopathies. *The American Journal of Human Genetics*, 85(1), 76-86.
- Lemmers, R. J., Tawil, R., Petek, L. M., Balog, J., Block, G. J., Santen, G. W., ... & van der Maarel, S. M. (2012). Digenic inheritance of an SMCHD1 mutation and an FSHD-permissive D4Z4 allele causes facioscapulohumeral muscular dystrophy type 2. *Nature genetics*, 44(12), 1370-1374.
- Lemmers, RJ, Van der Vliet, PJ, Klooster, R., Sacconi, S., Camaño, P., Dauwerse, JG, ... & van der Maarel, SM (2010). Un modèle génétique fédérateur de la dystrophie musculaire facioscapulohumérale. *Sciences*, 329 (5999), 1650-1653.

- Leturcq F, Tuffery -Giraud.(2015). Aspects génétiques et moléculaires des dystrophine 22 :1253- 12511.
- Liewluck, T., Milone, M., Mauermann, ML, Castro-Couch, M., Cerhan, JH et Murthy, NS (2014). Une nouvelle mutation VCP sous-tend la dystrophie musculaire scapulo-peronière et le syndrome de la tête tombante caractérisé par des fibres lobulées. *Muscle & nerf*, 50 (2), 295-299.
- Liu C, Deng H, Yang C, Li X, Zhu Y, Chen X, Li H, et al. (2018). A resolved discrepancy between multiplex PCR and multiplex ligation-dependent probe amplification by targeted next-generation sequencing discloses a novel partial exonic deletion in the Duchenne muscular dystrophy gene. *J Clin Laboratory Anal.*32(8):e22575
- Liu, J., Aoki, M., Illa, I., Wu, C., Fardeau, M., Angelini, C., Serrano, C., Urtizbera, J.A., Hentati, F., Hamida, M.B., Bohlega, S., Culper, E.J., Amato, A.A., Bossie, K., Oeltjen, J., Bejaoui, K., McKenna-Yasek, D., Hosler, B.A., Schurr, E., Arahata, K., de Jong, P.J., et Brown, R.H.Jr.(1998).Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nat. Genet.* 20: 31- 36.
- Ljunggren, A., Duggan, D., McNally, E., Boylan, KB, Gama, CH, Kunkel, LM et Hoffman, EP (1995). Déficit primaire en adhaline comme cause de dystrophie musculaire chez les patients ayant une dystrophine normale. *Annales de neurologie*, 38 (3), 367-372.

M

- Maggot A, Mercier S, Péréon Y.(2015).Specific features of Becker muscular dystrophy patients and female carriers of Duchenne muscular dystrophy. *Archives de pédiatrie.* 22:12531 – 12536.
- Maiga, A. D. B. (2018).Etudes clinique, paraclinique et génétique des dystrophinopathies dans le Service de Neurologie du CHU du Point G.
- Mauro, A. (1961). Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*
- 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,
- Messina, D. N., Speer, M. C., Pericak-Vance, M. A., & McNally, E. M. (1997). Linkage of familial dilated cardiomyopathy with conduction defect and

muscular dystrophy to chromosome 6q23. *The American Journal of Human Genetics*, 61(4), 909-917.

- Minetti, C., Sotgia, F., Bruno, C., Scartezzini, P., Broda, P., Bado, M., ... & Zara, F. (1998). Des mutations du gène cavéoline-3 provoquent une dystrophie musculaire des ceintures autosomique dominante. *Génétique de la nature*, 18 (4), 365-368.
- Mohammed F, Elshafey A, Al-balool H, Alaboud H, Al Ben Ali M, Baqer A, et al. Mutation spectrum analysis of Duchenne/Becker muscular dystrophy in 68 families in Kuwait: The era of personalized medicine. *PLoSOne* 2018;13(5):e0197205. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197205>.
- Monaco, A.P., Bertelson, C.J., Liechti-Gallati, S., Moser, H., et Kunkel, L.M. (1988.) An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the *DMD* locus. *Genomics* 2: 90-95.
- Monaco, A.P., Bertelson, C.J., Middlesworth, W., Colletti, C.A., Aldridge, J., Fischbeck, K.H., Bartlett, R., Pericak-Vance, M.A., Roses, A.D., et Kunkel, L.M. (1985). Detection of deletions spanning the Duchenne muscular dystrophy locus using a tightly linked DNA segment. *Nature* 316: 842-845.
- Monaco, A.P., Neve, R.L., Colletti-Feener, C., Bertelson, C.J., Kurnit, D.M., et Kunkel, L.M. (1986). Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature* 323: 646-650.
- Moreira, E.S., Wiltshire, T.J., Faulkner, G., Nilforoushan, A., Vainzof, M., Suzuki, O.T., Valle, G., Reeves, R., Zatz, M., Passos-Bueno, M.R., et Jenne, D.E. (2000). Limb-girdle muscular dystrophy type 2G is caused by mutations in the gene encoding the sarcomeric protein telethonin. *Nat. Genet.* 24: 163-166.
- Morgoulis, D., Berenstein, P., Cazacu, S., Kazimirsky, G., Dori, A., Barnea, ER et Brodie, C. (2019). Le sPIF favorise la différenciation des myoblastes et l'expression de l'utrophine tout en inhibant la fibrose dans la dystrophie musculaire de Duchenne via les voies H19/miR-675/let-7 et miR-21. *Mort cellulaire et maladie*, 10 (2), 1-10.
- Muchir, A., Bonne, G., van der Kooi, AJ, van Meegen, M., Baas, F., Bolhuis, PA, ... & Schwartz, K. (2000). Identification de mutations du gène codant pour les lamines A/C dans la dystrophie musculaire des ceintures autosomique dominante avec troubles de la conduction au riculo-ventriculaire (LGMD1B). *Génétique moléculaire humaine*, 9 (9), 1453-1459.

- Muchir, A., Pavlidis, P., Decostre, V., Herron, AJ, Arimura, T., Bonne, G. et Worman, HJ (2007). L'activation des voies MAPK relie les mutations LMNA à la cardiomyopathie dans la dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss. *Le Journal d'investigation clinique*, 117 (5), 1282-1293.
- Muntoni, F., Torelli, S. et Ferlini, A.S. (2003). Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet* 2: 731-740.
- Murakami, Y., Yasuda, T., Saigo, K., Urashima, T., Toyoda, H., Okanou, T. et Shimotohno, K. (2006). Analyse complète des profils d'expression des microARN dans le carcinome hépatocellulaire et les tissus non tumoraux. *Oncogène*, 25 (17), 2537-2545.

N

- Na SJ, Kim WJ, Kim SM, Lee KO, Yoon B, Choi YC. Clinical, immunohistochemical, Western blot, and genetic analysis in dystrophinopathy. *J Clin Neurosci*. 2013;20:1099-1105.
- Nicolas, A., Raguénès-Nicol, C., Ben Yaou, R., Ameziane-Le Hir, S., Chéron, A., Vié, V., ... & French Network of Clinical Reference Centres for Neuromuscular Diseases (CORNEMUS). (2015). Becker muscular dystrophy severity is linked to the structure of dystrophin. *Human molecular genetics*, 24(5), 1267-1279.
- Nigro, G., Comi, LI, Politano, L., Limongelli, FM, Nigro, V., De Rimini, ML, ... & Esposito, MG (1995). Evaluation de la cardiomyopathie dans la myopathie de Becker. *Muscle & Nerve : Journal officiel de l'Association américaine de médecine électrodiagnostique* , 18 (3), 283-291.
- Nigro, V et Savarese M. (2014). Genetic basis of limb-girdle muscular dystrophies: the 2014 update. *Acta Myol*. 33: 1-12.
- Noguchi, S., McNally, E.M., Ben Othmane, K., Hagiwara, Y., Mizuno, Y., Yoshida, M., Yamamo, 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: 819-821.

P

- Palenzuela, L., Andreu, AL, Gamez, J., Vila, MR, Kunimatsu, T., Meseguer, A., ... & Hirano, M. (2003). Une nouvelle dystrophie musculaire autosomique dominante des ceintures des membres (LGMD 1F) correspond à 7q32.1-32.2. *Neurologie*, 61 (3), 404-406.
- Persiconi I, Cosmi F, Guadagno NA, Lupo G, De Stefano ME. Dystrophin Is Required for the Proper Timing in Retinal Histogenesis: A Thorough Investigation on the mdx Mouse Model of Duchenne Muscular Dystrophy. *Front Neurosci*. 2020;14:760.
- 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., Urtizbera, J.A., Beckmann, J.S., Campbell, K.P., Kaplan, J.C. (1996). A founder mutation in the gamma- sarcoglycan gene of gypsies possibly predating their migration out of India. *Hum. Mol. Genet.* 5: 2019-2022.
- Piccolo, F., Roberds, S. L., Jeanpierre, M., Leturcq, F., Azibi, K., Beldjord, C., ... & Kaplan, J. C. (1995). Primary adhalinopathy: a common cause of autosomal recessive muscular dystrophy of variable severity. *Nature genetics*, 10(2), 243-245.
- Pichavant, C., Aartsma-Rus, A., Clemens, P.R., Davies, E.K., Dickson, G., Takeda, S., Wilton, S.D., Wolff, J.A., Wooddell, C., Xiao, X., et Tremblay, J.P. (2011) Current status of pharmaceutical and genetic therapeutic approaches to treat DMD. *Am. Soc. Gene Cell Ther.* 19: 830-884.
- Preisler, N., Lukacs, Z., Vinge, L., Madsen, K.L., Husu, E., Hansen, R.S., Duno, M., Andersen, H., Laub, M., et Vissing, J. (2013). Late-onset Pompe disease is prevalent in unclassified limb-girdle muscular dystrophies. *Mol. Genet. Metabol.* 110: 287-289.

R

- R. (1982). Linkage relationship of a cloned DNA sequence on the short arm of the X chromosome to Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 300: 69-71.
- Raducu, M., Baets, J., Fano, O., Van Coster, R. et Cruces, J. (2012). L'altération du promoteur provoque une répression transcriptionnelle du gène POMGNT1 dans la dystrophie musculaire des ceintures de type 2O. *Revue européenne de*

génétiq ue humaine, 20 (9), 945-952.

- Roberds, S.L, Leturcq, F., Allamand, V., Piccolo, F., Jeanpierre, M., Anderson, R.D, Lim, L.E., Lee, J.C., Tomé, F.M., Romero, N.B., Michel Fardeau, M., Beckmann, J.S., Kaplan, J.C., et Campbell, K.P. (1994). Missense mutations in the adhalin gene linked to autosomal recessive muscular dystrophy. *Cell* 78: 625-633.
- Roucher Boulez F, Menassa R, Streichenberger N, et al. (2015). A splicing mutation in the DMD gene detected by next-generation sequencing and confirmed by mRNA and protein analysis. *Clinica Chimica Acta*. 448: 146- 149.

S

- Sabourin, L. A., & Rudnicki, M. A. (2000). The molecular regulation of myogenesis. *Clinical genetics*, 57(1), 16-25.
- Salmaninejad, A., Bedoni, N., Ravesh, Z., Quinodoz, M., Shoeibi, N., Mojarrad, M., ... & Rivolta, C. (2020). Le séquençage de l'exome entier et la cartographie de l'homozygotie révèlent des défauts génétiques dans les familles iraniennes consanguines atteintes de dystrophies rétiniennes héréditaires. *Rapports scientifiques*, 10 (1), 1-7.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd edition, New York, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sarparanta, J., Jonson, PH, Golzio, C., Sandell, S., Luque, H., Screen, M., ... & Udd, B. (2012). Des mutations affectant les fonctions cytoplasmiques du co-chaperon DNAJB6 provoquent une dystrophie musculaire des ceintures. *Génétiq ue de la nature*, 44 (4), 450-455.
- Selvatici, R., Rossi, R., Fortunato, F., Trabanelli, C., Sifi, Y., Margutti, A., ... & Ferlini, A. (2021). Paysages de génotypes DMD liés à l'ethnicité dans les pays européens et non européens. *Neurologie Génétique*, 7 (1).
- Suh MR, Lee KA, Kim EY, Jung J, Choi WA, Kang SW. (2017). Multiplex ligation dependent probe amplification in X-linked recessive muscular dystrophy in Korean subjects. *Yonsei Med J* .58(3):613-8.
- Sun C, Shen L, Zhang Z, Xie X. (2020). Therapeutic Strategies for Duchenne Muscular Dystrophy: An Update. *Genes (Basel)*.11(8):837.

T

- T.D.D. (2006). Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. *Muscle Nerve* 34: 135-144.
- Torella, A., Fanin, M., Mutarelli, M., Peterle, E., Del Vecchio Blanco, F., Rispoli, R., ... & Nigro, V. (2013). Le séquençage de nouvelle génération identifie la transportine 3 comme le gène responsable de LGMD1F. *PLoS un*, 8 (5), e63536.
- Tuffery-Giraud, S., Bérout, C., Leturcq, F., Yaou, R.B., Hamroun, D., Michel-Calemard, L., Moizard, M.P., Bernard, R., Cossée, M., Boisseau, P., Blayau, M., Creveaux, I., Guiochon-Mantel, A., de Martinville, B., Philippe, C., Monnier, N., Bieth, E., Khau Van Kien, P., Desmet, F.O., Humbertclaude, V., Kaplan, J.C., Chelly, J., et Claustres, M. (2009). Genotype-phenotype analysis in 2,405 patients with a dystrophinopathy using the UMD-DMD database: a model of nationwide knowledgebase. *Hum. Mutat.* 30: 934-945.

V

- Van der Kooi, A. J., Van Meegen, M., Ledderhof, T. M., McNally, E. M., De Visser, M., & Bolhuis, P. A. (1997). Genetic localization of a newly recognized autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy with cardiac involvement (LGMD1B) to chromosome 1q11-21. *American journal of human genetics*, 60(4), 891.
- van der Maarel, SM, & Frants, RR (2005). La pathogenèse à médiation répétée D4Z4 de la dystrophie musculaire facioscapulohumérale. *Le tourillon américain de l'agénétique humaine*, 76 (3), 375-386.
- Vilquin, J. T., & Braun, S. (2019). Thérapie cellulaire des maladies musculaires- Un avenir à l'aune d'une comparaison des progéniteurs. *médecine/sciences*, 35, 7-10.

W

- Wijmenga, C., Brouwer, O. F., Moerer, P., Padberg, G. W., Frants, R. R., & Weber, J. L. (1990). Location of facioscapulo humeral muscular dystrophy gene on chromosome 4. *The Lancet*, 336(8716), 651-653.
- Wijmenga, C., Frants, RR, Hewitt, JE, van Deutekom, JC, van Geel, M., Wright, TJ, ... & van Ommen, GJB (1993). Génétique moléculaire de la dystrophie musculaire facioscapulohumérale. *Troubles neuromusculaires*, 3 (5-6), 487-491.

- Wijmenga, C., Hewitt, JE, Sandkuijl, LA, Clark, LN, Wright, TJ, Dauwerse, HG, ... & Frants, RR (1992). Réarrangements de l'ADN du chromosome 4q associés à la dystrophie musculaire facioscapulohumérale. *Génétique de la nature*, 2 (1), 26-30.
- Wijmenga, C., Padberg, GW, Moerer, P., Wiegant, J., Liem, L., Brouwer, OF, ... & Frants, RR (1991). Cartographie du gène de la dystrophie musculaire facioscapulohumérale sur le chromosome 4q35-qter par analyse de liaison multipoint et hybridation in situ. *Génomique*, 9 (4), 570-575.

Y

- Yablonka-Reuveni, Z. (2011). The skeletal muscle satellite cell: still young and fascinating at 50. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 59(12), 1041-1059.
- Yokota, T., Lu, Q. L., Partridge, T., Kobayashi, M., Nakamura, A., Takeda, S., & Hoffman, E. (2009). Efficacy of systemic morpholino exon-skipping in Duchenne dystrophy dogs. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 65(6), 667-676.

Z

- Zaharieva, I.T., Calissano, M., Scoto, M., Preston, M., Cirak, S., Feng, L., Collins, J., Kole, R., Guglieri, M., Straub, V., et al. (2013). Dystromirs as Serum Biomarkers for Monitoring the Disease Severity in Duchenne Muscular Dystrophy ; *PLOS ONE* 8, e80263.
- Zeng L, Cui J, Wu H, et al.(2014). The emerging role of circulating microRNAs as biomarkers in autoimmune diseases. *Autoimmunity* ; 47:419–429.
- Zhang, B., Wang, Q., Wang, K., Pan, X., Liu, F., Guo, T., ... & Anderson, TA (2007). Identification des microARN du coton et de leurs cibles. *Gène*, 397 (1-2), 26-37.
- Zhao HH, Sun XP, Shi MC, YiY X, Cheng H, Wang XX, et al.(2018). Molecular Analysis-Based Genetic Characterization of a Cohort of Patients with Duchenne and Becker Muscular Dystrophy in Eastern China. *Chin Med J*. 131(7):770-5.
- Zhou, C., Xie, H.Q., Zhang, S.Z., et Yang, Z.M. (2006). Current understanding of dystrophin-related muscular dystrophy and therapeutic challenges ahead. *Chin. Med. J. (Engl)* 119: 1381.