

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université Larbi Ben M'Hidi. Oum El Bouaghi
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie
Département des sciences de la nature et de la vie



N° d'ordre :

N° de série :

Thèse

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en sciences

Option : Génétique des pathologies humaines

Présentée et soutenue par : M^{me} HAMDOUCHE NADIRA

Aspects cliniques et génotypiques des dystrophinopathies "Duchenne de Boulogne et Becker" dans l'Est Algérien

Soutenue le : 11/02/2021

Président de jury : Pr. ARHAB Rabeh	Univ. Oum El Bouaghi
Directeur de thèse : Pr. SIFI Yamina	Univ. Constantine 3.
Co-encadreur : Pr. Mahdi DJahida	Univ. Oum El Bouaghi
Examineurs : MCA. Benslama Wided	Univ. Oum El Bouaghi
Pr. Fekraoui Ab Seddik	Univ. Consrantine 3
MCA. Boulefkhad Assia	Univ. Constantine 3

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2020-2021

Remerciements

Mes sincères remerciements anticipés s'adressent :

*En premier lieu, je tiens à adresser mes plus vifs remerciements à ma directrice de thèse, Professeur **Sifi Yamina**, pour m'avoir fait confiance malgré les connaissances plutôt légères que j'avais. Un grand merci pour la qualité de votre encadrement, votre disponibilité, votre bienveillance, votre soutien en toutes circonstances, vos conseils y compris dans des domaines parfois très éloignés de votre activité habituelle.*

*J'exprime toute ma gratitude à ma co directrice de thèse, madame, la professeur **Mahdi Djahida**. Ce travail n'aurait pas vu le jour sans ses conseils précieux, ses encouragements et la confiance qu'elle m'a accordé. Je voudrais la remercier pour sa présence, son soutien sans faille, sa disponibilité, de m'avoir guidé et de m'avoir fourni les meilleures conditions pour la réalisation de ce travail.*

*En préambule, à monsieur le professeur **Nouredine Abadi**, directeur du laboratoire de Génétique et Biologie Moléculaire de l'université Constantine3, homme de sciences, exemple de simplicité, de gentillesse, de générosité et de sympathie. Merci de m'avoir ouvert les portes de votre laboratoire, pour me permettre la réalisation de ce travail. Vous avez donné à la génétique, ses moments de gloire. Je serais bien ingrate si je ne vous exprimerai pas ma reconnaissance et mon profond respect. C'est un honneur de travailler avec quelqu'un d'aussi passionné, compétent et droit que vous.*

*Un grand merci à madame la Professeur **Sifi Karima**, pour l'intérêt marqué avec lequel elle a dirigé et suivi le déroulement pratique de ce travail, je vous remercie pour votre gentillesse, votre écoute et vos précieux conseils.*

*Je tiens également à exprimer toute ma reconnaissance à et ma profonde gratitude au Professeur **Dalila Satta**.*

*Je tiens à remercier les membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon Travail. J'adresse mes plus sincères remerciements au Professeur **Arhab R**, au docteur **Benslama W** et au Docteur **Fekraoui AS** ainsi qu'au docteur **Boulefkhrad A** pour leur participation à ce jury. Très chers professeurs merci pour tout, et j'espère avoir exprimé ici mon fidèle attachement et mon inaltérable gratitude.*

Mes remerciements vont également à l'Association Algérienne contre les Myopathies et les laboratoires GENPHARM, ce travail n'aurait pas vu le jour sans leur soutien financier.

*Mes remerciements s'adressent aussi à **Camilia Mosbahi** pour son aide indispensable à la réalisation de ce travail et qui m'a apporté un soutien moral à ses suggestions et ses conseils précieux montrant l'intérêt qu'elle portait à cette étude.*

Je remercie chaleureusement tous les membres du laboratoire de Biochimie du CHU et le laboratoire de recherche « Biologie et génétique moléculaire », pour les inoubliables bons moments et l'ambiance qui a été le bon compagnon de route au cours de la réalisation de ce travail, en particulier mesdames Dadsî Yasmina, Boucherb Massouda et maya.

Dédicaces

A MA MERE, mon pilier, à qui je dois tout ce que je suis, merci d'être ce que tu es, par tes encouragements, tes prières, ta sagesse, tu as permis que ce travail s'accomplisse. Que Dieu te préserve et t'accorde longue vie.

A MON PERE, la personne la plus chère à mon cœur, pour son amour, sa confiance, son soutien moral et matériel durant toutes mes années d'étude

Je dédie ce travail à, mon mari RIAD qui n'a cessé de m'encourager tout au long de ces années, d'être à mes côtés dans les moments les plus difficiles. Merci pour ta patience, ta tolérance, ta présence et ton aide précieuse durant toute cette période d'angoisse.

Je dédie ce travail à mes petits anges Mohammed Lokmen et Saad, mes rayons de soleil qu'Allah les bénissent. Puissent-ils être toujours fiers de leur maman.

À mes chères et adorables sœurs Souad et Radia, ma vie sans vous ne vaut rien, jamais je ne pourrais vous remercier de tout ce que vous avez fait pour moi, je vous aime. A mes neveux et mes nièces : Abd el nour, Khadidja, mohammed el chafie, Batoul, Manassa, Abd elrahman et Abd el rafour

À mes chers frères Tahar, Ali et Abbas, je vous souhaite prospérité et succès. A leurs femmes Ahlem et Kahina et leurs enfants Abd el raouf, Tasnim nour el yakin, Abd el ouadoud, Chames, Nour

À toutes mes amies : Saida, Kamilia, Yasmina, Naima, Djalila, Wissem, Warda, Amel, Abba, Adem et Aziz, je me rappellerai toujours de tous les bons moments que nous avons partagés ensemble et qui resteront gravés dans ma mémoire.

Ces années de thèse ont été riches en émotions et en rencontres, tant sur le plan professionnel que personnel. Durant cette période, j'ai rencontré des personnes formidables. Un grand Merci. À tous ceux qui ont participé de près ou de loin dans la réalisation de ce travail, et que j'aurais oublié de citer.

*À tous ceux que j'aime et qui m'aiment, je dis : **Merci***

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Manifestation Musculaire chez les patients DMD	6
Figure 2	Biopsie musculaire d'un patient atteint de myopathie de Duchenne.	9
Figure 3	Etude de dystrophine à partir d'une biopsie musculaire par immunofluorescence	10
Figure 4	Localisation du gène DMD sur le bras court du chromosome X	11
Figure 5	Représentations des exons du gène de la dystrophine et sites potentiels d'épissage en vue d'une correction par saut d'exon	12
Figure 6	Schéma du gène DMD codant pour différentes isoformes	13
Figure 7	Schéma des domaines protéiques de Dp427	14
Figure 8	Domaines de liaison de la dystrophine	16
Figure 9	Coupe microscopique montrant les complexes glycoprotéiques de la cellule musculaire	16
Figure 10	Exemple de mutations hors phase et en phase	19
Figure 11	Représentation du mécanisme du saut d'exon chez un patient DMD ayant une délétion de l'exon 50 permettant la restauration du cadre de lecture et conduisant à une dystrophine incomplète et un phénotype BMD	22
Figure 12	Répartition des patients selon le phénotype.	36
Figure 13	Répartition des familles selon la consanguinité	37
Figure 14	Répartition des familles selon caractère familial ou sporadique	37
Figure 15	Répartition des cas selon l'âge du diagnostic	38
Figure 16	Répartition des cas selon l'âge de premiers signes cliniques	38
Figure 17	Répartition des patients selon les premiers signes cliniques	39
Figure 18	Répartition des patients selon le développement psychomoteur.	39
Figure 19	Répartition des patients selon l'atteinte respiratoire et cardiaque	40
Figure 20	Répartition des patients selon les résultats de l'examen neuroclinique.	41
Figure 21	Les signes associés observés chez nos patients	42
Figure 22	Répartition des patients selon l'âge de la perte de la marche	43
Figure 23	Répartitions des patients selon le résultat du dosage du CPK	44
Figure 24	Distribution des mutations chez nos patients	45
Figure 25	Identification des délétions dans le gène DMD par PCR multiplexe	48
Figure 26	Fréquence des délétions chez nos patients	48
Figure 27	Représentation schématique de type de délétions retrouvées chez nos patients.	49

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Conditions d'amplification du gène DMD	31
Tableau 2	Répartition des patients selon le phénotype	36
Tableau 3	Répartition des patients selon les résultats de l'examen neurologique.	41
Tableau 4	Fréquence des délétions du gène DMD chez les patients	45
Tableau 5	Les mutations ponctuelles identifiées chez nos patients.	51
Tableau 6	Corrélation phénotype/génotype.	52
Tableau 7	Les mutations ponctuelles identifiées chez nos patients.	58
Tableau 8	L'applicabilité du saut thérapeutique de l'exon 43, de l'exon 55, de l'exon 46, de l'exon 51 et de l'exon 53 pour les patients atteints de DMD avec mutation de délétion.	63

Les acronymes

ABD	Actin Binding Domain
ABS	Actin Binding Site
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	Acide Désoxy ribo nucléique complémentaire
AON	Oligo Nucléotide Antisens
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
BMD	Dystrophies Musculaires de Becker
CaMBSI	Calmoduline Binding Site
CG	Conciel Génétique
CPK	Créatine PhosphoKinase
CR	Domain Riche en Cystéine
Ct	C- terminal
CV	Capacité Vitale
DAPC	Complexe Protéique Associe à la Dystrophine
DBD	Domain Binding Dystroglucane
DGC	Complexe Dystrophine-Glycoprotéines
DMD	Dystrophies Musculaires de Duchenne
DMSO	Dimethyle Sulfoxyde
DO	Densité Optique
DPM	développement psychomoteur
DyB	Dystrobrevines
ECG	Electrocardiogramme
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétracétique.
EFH1 et 2	EF-Hands
EFR	Exploration Fonctionnelle Respiratoire
EMG	Electromyographie
ESE	Exonic Splicing Enhancer
ESS	Exonic Splicing Silencer
FDA	Association fransaise de dystrophinopathies

IEC	Inhibiteurs de l'Enzyme de Conversion
IF	In-frame
IHC	Immuno Histo Chimie
IMD	Intermédiaire Dystrophie Musculaire
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
kb	kilobase
kDa	kiloDalton
LBD	Lipide Binding Domain
LDH	Lactate déshydrogénase
MAPH	Multiplex amplification and Probe Hybridization
Mb	Megabase
MLPA	Multiplex Ligation dependent Probe Amplification
NGF	Facteur de Croissance Nerveuse
nNOs	neuronal Nitric Oxide synthase
NSG	Séquençage de nouvelle génération
Nt	N-terminal
OF	Out-of-Frame
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
pb	paire de base
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pm	Promoteur Musculaire
PMO	Oligo Morpholino Phosphorodiamidate
PTT	Protein Truncation Test
RT-PCR	Real Time-PCR
SBS	Site de liaison à la Syntrophine
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SG	Sarcoglucane
SH	Src Homology Domains
SMA	Spinal Muscular Atrophy
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
SSPN	Sarcospane
SYN	Syntrophine
TBE	Tris Buffered EDTA
	Tris EDTA

TE	
TREAT-	Translational Research in Europe for the Assessment and Treatment
NMD	of Neuromuscular Diseases
UMD	Universal Mutation Database
ZZ	Domain riche en Zinc
α -DG	α - Dystroglucane
β -DG	B- Dystroglucane

TABLE DES MATIERES

<i>REMERCIEMENTS ET DÉDICACES</i>	<i>I</i>
<i>LISTE DES FIGURES</i>	<i>IV</i>
<i>LISTE DES TABLEAUX</i>	<i>V</i>
<i>LISTE DES ABREVIATIONS</i>	<i>VI</i>
INTRODUCTION	1
<i>CHAPITRE I CADRE THEORIQUE</i>	
1. Rappel historique	4
2. Epidémiologie	5
3. Présentations cliniques	5
3.1 Dystrophie musculaire de Duchenne	5
3.1.1 Déficit moteur	6
3.1.2 Atteinte cardiaque	6
3.1.3 Atteinte respiratoire	7
3.1.4. Troubles cognitifs	7
3.1.5. Troubles digestifs	7
3.2 Forme intermédiaire de DMD	7
3.3 Dystrophie musculaire de Becker	8
4. Moyens diagnostiques	8
4.1. Dosages des créatinines phosphokinases	8
4.2. Electroneuromyogramme	8
4.3. Biopsie musculaire	9
4.3.1. Immunohistochimie et Western blot	9
5.4 Diagnostic moléculaire	10
5.4.1. Recherche des grands remaniements	10
5.4.2. Recherche des mutations ponctuelles	10
5.4.3. Etude des transcrits	11
5. Gène <i>DMD</i>	11
5.1. Localisation et structure	11
5.2. Les transcrits	12
6. Protéine : dystrophine	13
6.1. Structure de la dystrophine	13
6.2. Interactions de la dystrophine : le complexe dystrophine – associated glycoprotéines (DAG)	15
6.2. Rôles de la dystrophine	17
7. mutations du gène <i>DMD</i>	17
8. Corrélation génotype/phénotype	18
9. Traitement actuel et essais thérapeutiques géniques dans la dystrophie de	19

Duchenne de Boulogne et Becker	
9.1 Translecture du codon stop	20
9.2 Saut d'exons par des oligonucléotides antisens	20
10. Conseil génétique et diagnostic prénatal	22
10.1 Conseil génétique	22
10.2 Diagnostic prénatal	23

CHAPITRE II PATIENTS ET METHODES

1. Type et période d'étude	24
1.1 Etude rétrospective	24
1.2 Etude prospective	24
1.2.1 Patients	24
1.2.1.1 Période de l'étude	24
1.2.1.2 Description de la population de l'étude	25
2. Analyse clinique	25
2.1 Examen des cas index	25
2.2 Les antécédents familiaux	26
2.3 Les antécédents personnels	26
3. Examens complémentaires	26
3.1 Bilan Biologique	26
3.2 Électroneuromyographie ENMG	27
3.3 Biopsie Musculaire	27
3.4 Electrocardiogramme et Echographie du cœur	27
3.5 Les explorations fonctionnelles respiratoires	27
4. Analyse moléculaire	27
4.1 Stratégie de diagnostic adoptée	27
4.2 Prélèvement sanguin	28
4.3 Extraction de l'ADN	29
4.4 Contrôle qualitatif et quantification de l'ADN	29
4.4.1 Contrôle qualitatif	29
4.4.2 Contrôle quantitatif	30
4.5 Amplification de l'ADN par PCR multiplex pour la recherche des macro délétions du gène de la dystrophine	30
4.6 Recherche d'autres délétions et duplications par multiplex ligation-dépendant probe amplification (MLPA), PCR semi-quantitative et PCR digital	32
4.7 Séquençage de nouvelle génération pour la recherche des mutations ponctuelles.	33
4.8 Bases de données et confirmations des mutations du gène DMD	34
4.9 Analyses statistiques	34

CHAPITRE III RESULTATS

1. Analyse phénotypique des patients	36
2. Résultats clinique et généalogique	37
2-1 Consanguinité	37

2.2 Antécédents familiaux	37
2.3 Age du diagnostic	38
2.4 Age du premier signe clinique	38
2.5 Signes de début	39
2.6 Cardiomyopathie et atteinte respiratoire	39
2.7 Examens neurologiques	40
2.8 Age de la perte de la marche et décès	43
2.9 Corticothérapie	43
3. Résultats des examens complémentaires	43
3.1 Taux de créatine phosphokinase (CPK)	43
3.2 L'électroneuromyogramme (ENMG)	44
3.3 Biopsie musculaire	44
4. Résultats génétiques	44
4-1 Analyse des grandes délétions et duplications	45
4-2 Mutations ponctuelles	49
4-3 Nouvelles mutations	50
4-4 Corrélation génotype/phénotype	51
<i>CHAPITRE IV DISCUSSION</i>	53
1. Donnés phénotypiques	53
1.1 Donnés cliniques	53
1.2 Donnés para cliniques	55
2. Données génétiques	57
2.1 Les antécédents familiaux et consanguinité	57
2.2 Analyse des mutations	57
3. Corrélations phénotype / génotype	60
4. Thérapie	62
<i>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</i>	64
<i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i>	
<i>ANNEXES</i>	
<i>RÉSUMÉS</i>	

Introduction Générale

Depuis l'avènement de la génétique moléculaire, les gènes des maladies héréditaires à transmission mendélienne sont devenus accessibles. Ce nouvel éclairage a permis d'asseoir les diagnostics sur une base objective, celle de l'étiologie génétique.

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 de l'enfant avec une absence complète de la dystrophine secondaire à des mutations hors cadre de lecture ou out of frame (OF) du gène de la dystrophine avec une incidence d'environ 1 sur 3600 à 5000 naissances mâles (Emery, 1991). Les patients atteints de DMD sont généralement diagnostiqués à l'âge de 5 ans, deviennent dépendants d'un fauteuil roulant avant l'âge de 13 ans et meurent d'une insuffisance cardiaque ou respiratoire au cours de leur deuxième ou troisième décennie de vie. La BMD, en revanche, a une incidence de 1/20 000 naissances mâles, c'est la forme la plus bénigne d'évolution tardive et plus lente. Elle est secondaire à des mutations qui maintiennent le cadre de lecture ou in-frame (IF) codant la synthèse d'une protéine raccourcie et partiellement fonctionnelle (Annexstad et al., 2019 ; Malhotra et al., 1988).

Ces deux affections ont un tableau clinique similaire, caractérisé par des difficultés à courir et à monter les escaliers, des chutes fréquentes, un déficit musculaire prédominant à la racine des membres inférieurs avec une hypertrophie des mollets. Le signe de Gowers est présent à partir de l'âge de 5 ans (Sifi, 2017).

Les DMD/BMD se transmettent sur le mode gonosomique récessif et sont consécutives à des mutations affectant le gène de la dystrophine, localisé sur le bras court du chromosome X en Xp21 (Koenig et al., 1988).

En fait, le gène *DMD* est l'un des plus grands gènes humains connus couvrant 2,5 Megabases (Mb) de séquence génomique, contenant 79 exons dont la taille varie de 9 à 320 pb soit au total 11424 pb, avec des introns inhabituellement de taille élevée allant de 107 à 248000 pb (taille moyenne des introns 27 kb). Ce gène est transcrit en un ARNm de 14 kb produisant une protéine de 427 kDa, composée de 3685 acides aminés appelée dystrophine (Koenig et al., 1987 ; Koenig et al., 1988) impliquée dans l'ancrage des protéines du sarcolemme aux protéines cytosquélétiques qui relie à travers la membrane cellulaire,

l'intérieur de la fibre musculaire (cytosquelette) à l'extérieur (matrice extracellulaire). L'absence de la dystrophine déstabilise cette interaction et par conséquent fragilise la fibre musculaire et sa membrane aboutissant à la dégénération musculaire (**Gumerson et al., 2011**). La dystrophine stabilise le sarcolemme et protège les fibres musculaires des dommages induits par la contraction musculaire. Il protège également de la dégénérescence et de la nécrose musculaire progressive (**Gumerson et al., 2011 ; Abdelhady et al., 2019**).

Généralement, la majorité des mutations responsables des phénotypes DMD / BMD 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 (**Bladen et al., 2015 ; Mohammed et al., 2018**). Les délétions se trouvent préférentiellement dans deux régions du gène, le hotspot majeur se situe entre les exons 45 à 55 (74%), et le hotspot mineur se situe entre les exons 2 et 20 (15%) comme décrit par **Tuffery-Giraud et al., (2009)**. Les duplications sont rares. Elles sont retrouvées chez 13% des DMD et 6% BMD. Elles sont plus fréquemment regroupées au début du gène (**Takeshima et al., 2010**).

Afin de détecter la plupart des mutations à l'origine de la DMD / BMD, diverses techniques génétiques ont été développées. La plus utilisée est l'amplification multiplex de sonde dépendante de la ligature (MLPA), qui est très sensible et permet la détection des délétions et des duplications de tous les exons du gène. En plus de la MLPA, la PCR multiplex (mPCR) est également une technique efficace cependant, elle ne détecte que les délétions (98%) et ne délimite pas leur étendue (**Gatta et al., 2005 ; Wang et al., 2019**). Enfin, le séquençage de nouvelle génération (NGS pour Next Generation Sequencing) est devenu un outil utile pour le diagnostic clinique car il fournit une recherche complète de mutations, des grandes délétions / duplications aux petites mutations, y compris les mutations ponctuelles et les insertions / délétions courtes sur une seule plateforme (**Wei et al., 2014**).

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

Aucun traitement curatif n'est actuellement disponible, pour les dystrophinopathies, mais grâce à l'amélioration des connaissances du gène DMD et son produit, la dystrophine, les premiers essais cliniques ont pu être réalisés chez l'être humain en utilisant les techniques

du saut d'exon ou de la translecture des codons stop (**Bushby et al., 2014 ; Miskew et al., 2016**).

Dans notre pays où ces affections sont relativement fréquentes du fait du taux élevé de consanguinité, mettre au point et appliquer une démarche diagnostique fondée sur l'étiologie moléculaire serait d'une grande aide permettant de résoudre le problème des polymorphismes cliniques rencontrés dans les dystrophies musculaires progressives, affections fréquentes d'évolution très handicapante, constituant actuellement un problème majeur de santé publique.

L'objectif principal de notre travail est de rapporter les différents aspects cliniques et moléculaires des patients présentant un phénotype de dystrophinopathies et de rechercher, en vue de la grande hétérogénéité clinique et mutationnelle, les corrélations entre le phénotype et le génotype.

CADRE THEORIQUE

1. Rappel historique

Plusieurs descriptions succinctes de pathologies ressemblant à la DMD furent probablement rapportées dès 1830 mais pas suffisamment détaillées sur le plan pathologique pour conclure qu'elles relataient la DMD telle qu'on la connaît aujourd'hui.

En 1851, Edward Meryon décrit le premier examen clinique et pathologique de DMD dans un article sous le nom de « progressive muscular weakness ». Son premier patient était issu d'une famille de dix enfants dont les quatre garçons présentaient une faiblesse musculaire progressive. Meryon fut le premier à faire une autopsie sur un patient DMD et à examiner les fibres musculaires au microscope (**Meyron, 1851**).

En 1868, le médecin et le physiologiste Guillaume-Ben-Jamin Armand Duchenne décrit dans les Archives Générales de Médecine l'origine musculaire de la maladie "paralysie musculaire pseudo-hypertrophique". Il associa la pseudo-hypertrophie musculaire à l'invasion du tissu musculaire par du tissu conjonctif et adipeux (**Duchenne, 1868**). Il est le premier à obtenir une biopsie musculaire faite sur un patient vivant grâce à son « emporte-pièce histologique ». Duchenne fut le premier à décrire les critères de diagnostic cliniques de la DMD :

- faiblesse musculaire au début de la maladie, généralement dans les membres inférieurs
- lordose et marche dandinante
- hypertrophie des muscles (second stade)
- aggravation progressive et généralisation de la maladie (troisième stade)
- diminution ou absence de contractions musculaires aux stimuli électriques à un stade avancé).

En 1886, Richard Gowers signale la fréquence des cas familiaux par rapport aux cas isolés et le mode de transmission maternelle. Il observe aussi que les garçons étaient plus touchés par cette myopathie, et il décrit la façon de se relever du sol qui portera son nom (**Gowers, 1879**).

En 1891, Erb précisa les signes histologiques et signale des patients DMD avec une atteinte cognitive (**Erb, 1891**). Schapira découvre l'élévation de l'aldolase sérique et Ebashi celle de la créatine phosphokinase sérique est augmentée chez les patients souffrant de

diverses dystrophies musculaires, en particulier la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD). (Schapira et al., 1953 ; Ebashi et al., 1959).

En 1955, Becker et Kierner distinguèrent une forme très proche de la dystrophie musculaire de Duchenne mais moins sévère, appelé par la suite dystrophie musculaire de Becker (BMD) de transmission également liée au sexe avec une incidence 10 fois moindre que la DMD (Becker et Kierner, 1955).

En 1985, le gène responsable des dystrophinopathies fut localisé sur le chromosome X (Kunkel et al., 1986) et son produit, la protéine dystrophine, fut identifiée en 1987 (Koenig, 1987 ; Hoffman et al., 1987).

2. Epidémiologie

L'incidence des dystrophinopathies est d'environ 1 naissance vivante de sexe masculin sur 4000. La DMD est la plus fréquente et l'une des plus graves des dystrophies musculaires. Son incidence se situe aux alentours d'un cas pour 5000 naissances males (Aartsma-Rus et al., 2016). L'incidence de la dystrophie musculaire de Becker (BMD), Son incidence mondiale est d'un garçon atteint sur 20 000. (Aartsma-Rus et al., 2016)

Une revue de la littérature scientifique, publiée en juin 2020, a évalué la prévalence de la myopathie de Duchenne dans le monde à 7,1 cas pour 100 000 hommes et de 2,8 cas pour 100 000 dans la population générale avec une prévalence à la naissance de 19,8 pour 100 000 naissances masculines vivantes (Crisafulli et al., 2020).

3. Présentation Clinique

3.1. Dystrophie musculaire de Duchenne de Boulogne (DMD)

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) résulte de l'absence de dystrophine en raison de mutations dans le gène DMD. La maladie débute classiquement entre 3 et 5 ans avec une perte progressive de la force musculaire. Cette faiblesse musculaire proximale et symétrique touche d'abord les membres inférieurs, avec des difficultés à se lever, à courir et à monter les escaliers (Connolly et al., 2013). La faiblesse des muscles des cuisses et des genoux explique la manœuvre de Gowers (figure 1 : A). Le déficit moteur proximal, aux membres inférieurs est responsable d'une hyperlordose et d'une marche dandinant (figure 1 : B). Une pseudohypertrophie des mollets est présente dans presque tous les cas (figure1 : B). Elle est habituellement observée entre 3 et 6 ans et est concomitante à la prolifération du tissu conjonctif observé dans les biopsies musculaires. La perte de la marche survient entre 7 et 12

ans, avec un âge moyen entre 9 et 10 ans, l'utilisation d'un fauteuil roulant est alors nécessaire. Des rétractions musculo-tendineuses multiples apparaissent très fréquemment au niveau des membres inférieurs. L'atteinte de la musculature axiale entraîne des déformations rachidiennes de type scoliose et cyphoscoliose (**Brook et al., 1981**). Le décès survient en général à la fin de la première décennie ou au début de la seconde, par insuffisance respiratoire et/ou cardiaque.

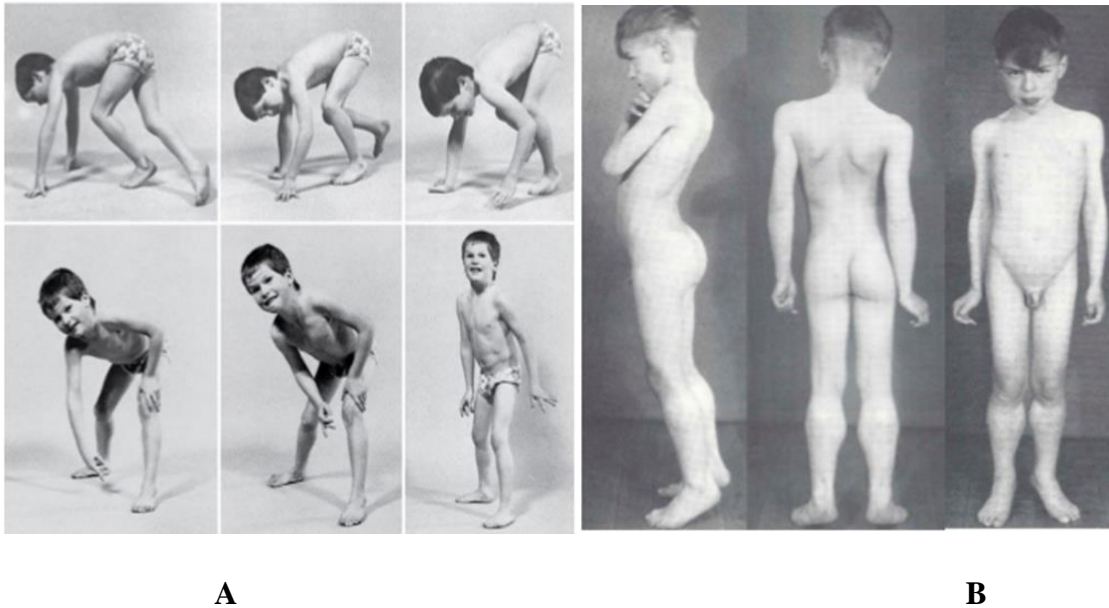


Figure 1 : Manifestation Musculaire chez les patients DMD : **A.** Ensemble de postures décrites par Gower, **B.** Garçon avec un phénotype DMD. Pseudohypertrophie des muscles du mollet, porte de la pointe des orteils, bassin incliné vers l'avant avec hyperlordose, scoliose, ventre saillant dû à une faible force musculaire abdominale, muscles de la cuisse et des fessiers fins et faibles et les épaules et les mains qui sont tenues en arrière sont généralement observées (**Engel et al. 1994**).

3.1.1. Déficit moteur

Chez ces enfants le déficit moteur est bilatéral, symétrique et prédomine en proximal, il débute par les muscles des membres inférieurs et s'étend progressivement aux muscles du tronc et des membres supérieurs (**Sifi, 2017**).

3.1.2. Atteinte cardiaque

L'atteinte cardiaque aboutissant à une cardiomyopathie dilatée avec insuffisance cardiaque congestive ou arythmies ventriculaires reste un facteur clé de décès prématuré dans la DMD. En général 40 % à 50 % des patients atteints de DMD décédant en conséquence directe d'une atteinte cardiaque (**Bourke et al., 2018**). Elle est expliquée sur le plan histologique, par le remplacement des cardiomyocytes, par du tissu conjonctif et fibreux qui

touche d'abord le segment postéro-basal du ventricule gauche. Quatre-vingt-dix pour cent (90%) des DMD présentent à l'échocardiographie une cardiomyopathie dilatée (Hsu, 2010).

3.1.3. Atteinte respiratoire

L'insuffisance respiratoire au cours de la DMD est causée par une faiblesse musculaire respiratoire progressive, en particulier le diaphragme, qui conduit à une maladie respiratoire restrictive et à une charge supplémentaire sur le système respiratoire (Khirani et al., 2013). L'atteinte respiratoire est la cause la plus fréquente de décès avant l'âge de 20 ans chez 90% des malades DMD. Elle est caractérisée par une diminution progressive des volumes pulmonaires et notamment la capacité vitale (CV) (Mayer et al., 2015).

La fonction respiratoire évolue de façon normale pendant les dix premières années de la vie. Au cours de cette étape, la CV augmente avec la croissance somatique jusqu'à atteindre un plateau. Ensuite l'évolution reste constante après l'arrêt de la marche et jusqu'à environ 16 ans. L'aggravation du déficit musculaire entraîne une dégradation progressive de celle-ci avec, en moyenne, une CV égale à 8.8 % /an (Chiou et al., 2017).

3.1.4. Troubles cognitifs

L'atteinte cognitive est fréquente (60 % des cas de DMD), prédominant sur les capacités verbales ((Dubowitz, 1977 ; Desguerre, 2014). Elle est liée à l'absence ou à la diminution des transcrits de la dystrophine dans le système nerveux central. Les patients DMD présentent le plus souvent des troubles du spectre autistique et des troubles déficitaires de l'attention (Sifi, 2017).

3.1.5. Troubles digestifs

Le muscle lisse, présent dans la paroi du tube digestif, est également touché. Ce qui entraîne des troubles du transit intestinal (constipation, fécalome, voire occlusion intestinale). L'atteinte des muscles de la gorge est inconstante et généralement très tardive. Elle se traduit par des troubles de la déglutition (Archer et al., 2013).

3.2. Forme intermédiaire de DMD

Cette Forme est considérée comme un phénotype intermédiaire entre la DMD et la BMD (DMD légère ou BMD sévère) décrite par Emery (Emery, 1994), avec une dégradation motrice plus lente. Les seuils de diagnostic clinique sont les patients qui sont ambulatoires après l'âge de 13 ans mais qui perdent leur capacité à marcher avant l'âge de 16 ans (Sifi,

2017). Les différentes atteintes décrites plus haut pour la DMD sont aussi observées dans cette forme intermédiaire (Griggs et al., 1995).

3.3. Dystrophie musculaire de Becker

La dystrophie musculaire de Becker (BMD) a été décrite pour la première fois en 1955 par le médecin Allemand Emil Becker (Becker et Kiener, 1955). Sa prévalence est 10 fois plus faible que celle de la myopathie de Duchenne (Bushby et al., 1991). Résulte de l'expression d'une dystrophine plus faiblement et/ou sous une forme tronquée avec une fonction altérée. Elle se différencie de la DMD par une atteinte clinique débutant après l'âge de 12 ans et une dépendance au fauteuil après 16 ans. Certains patients BMD débutent leur maladie après l'âge de 30 ans et peuvent rester ambulant jusqu'à l'âge de 60 ans (Yazaki et al., 1999). La topographie de l'atteinte musculaire des patients BMD est similaire dans sa répartition à celle constatée dans la DMD, à la différence que l'évolution est plus lente et moins sévère. Chez les patients BMD, elle associe typiquement un déficit des ceintures, une hypertrophie des mollets, des crampes, des myalgies et une cardiomyopathie dilatée. Certains patients rester pauci-symptomatiques tout au long de leur vie (Maggot et al., 2015).

4. Moyens de diagnostics

4.1. Dosages des créatinines phosphokinases (CPK)

La créatine phosphokinase est une enzyme que l'on trouve essentiellement dans les muscles, et qui intervient dans la phosphorylation de la créatine, substance présente dans l'organisme et jouant un rôle dans la contraction musculaire.

L'élévation des CPK est très précoce ; elle peut survenir en anténatal et s'observe avant l'apparition des signes cliniques (Grounds et al., 2020). Avant même l'âge de 5 ans, le taux des CPK est toujours 50 à 200 fois la valeur normale chez le DMD (Bushby et al., 1999). Un résultat normal de CPK ne constitue nullement un argument pour éliminer le diagnostic. L'élévation des CPK permet d'évoquer le diagnostic de dystrophinopathies lorsqu'il s'agit d'un cas atteint isolé, et quasiment de le confirmer chez les cas familiaux.

4.2. Electroneuromyogramme (ENMG)

L'ENMG est un examen qui permet d'évaluer l'activité électrique des muscles lors d'une contraction. Dans le cas de DMD/BMD, le tracé électromyographique oriente vers une atteinte musculaire (tracé myogène)

4.3. Biopsie musculaire

La biopsie musculaire est un élément essentiel de la démarche diagnostique de la pathologie musculaire en général et des dystrophinopathie en particulier. Les muscles habituellement prélevés sont le deltoïde, le biceps brachial ou le quadriceps. Dans les dystrophinopathies, l'étude microscopique montre des anomalies dystrophiques caractérisées par une grande variation de la taille des fibres, des fibres nécrotiques et des fibres régénératives (Figure 2). L'évolution comporte une infiltration adipeuse du muscle et l'apparition d'une fibrose extensive. Généralement les données histologiques sont en fonction du stade évolutif de la maladie.

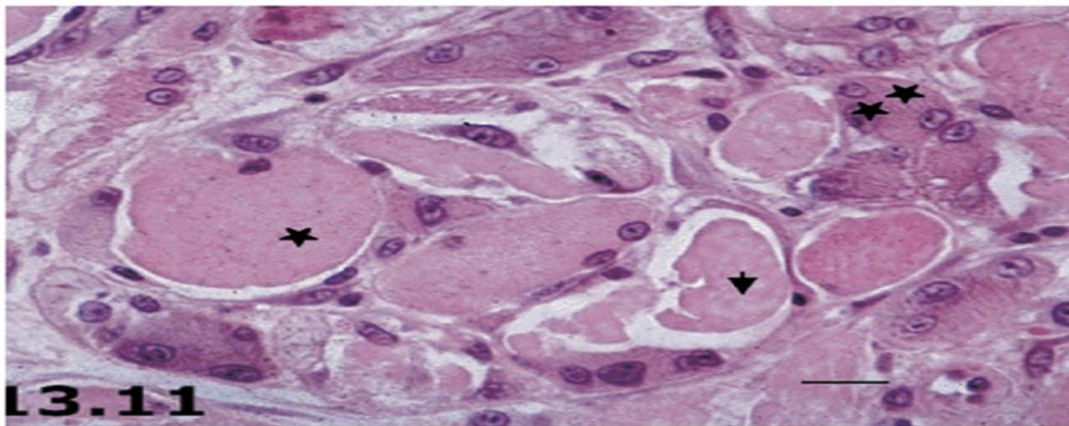


Figure 2. Biopsie musculaire d'un patient atteint de myopathie de Duchenne. Les fibres musculaires dégénérées ou nécrotiques (flèches) sont souvent observées en clusters entourées par des macrophages et des lymphocytes CD4+ (étoiles). De petites fibres immatures avec un noyau central sont présentes (étoile double) (Deconinck 2007).

4. 3.1 Immunohistochimie (IHC) et Western blot (WB)

Il est possible de visualiser la dystrophine au moyen de technique l'immunohistochimie en utilisant des anticorps dirigés contre celle-ci. L'immunohistochimie se pratique sur des coupes de muscles congelé, grâce à différents anticorps monoclonaux ou polyclonaux dirigés contre les différents segments de la protéine. L'immunohistochimie permet d'établir la présence, la localisation et dans certaines mesures, l'abondance de la dystrophine (Figure 3).

Sur un muscle témoin normal, la dystrophine apparaît sous forme d'un liseré fluorescent contigu à la membrane plasmique. Chez le patient DMD, on note une absence totale ou quasi-totale de la dystrophine du fait de l'anomalie génétique qui conduit soit à l'absence de production de la dystrophine, soit à la synthèse d'une protéine très instable (Arechavala et

al., 2010). Chez le patient BMD, il peut exister une diminution de la fluorescence et parfois des images de discontinuité membranaire de l'expression de la dystrophine.

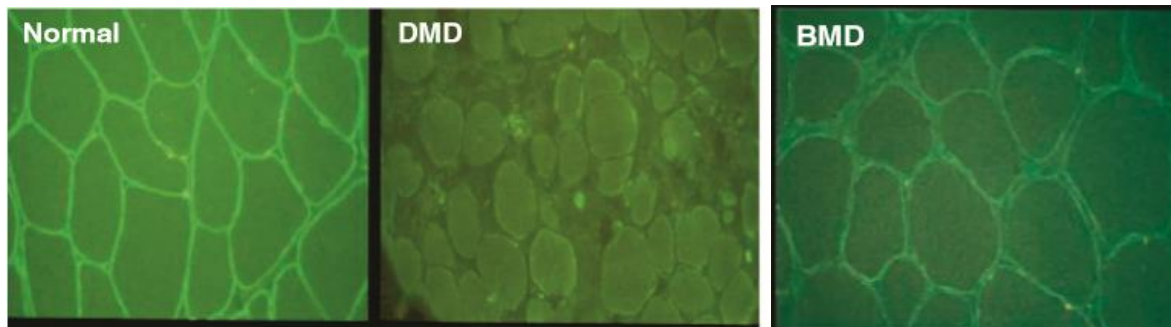


Figure 3. Étude de dystrophine à partir de la biopsie musculaire. Par immunofluorescence : marquage avec un anticorps monoclonal (NCL DYS1, Novocastra)(**Leturcq et Tuffery Giraud, 2015**).

Le Western blot confirme le déficit en dystrophine observé en immunohistochimie, il précise les anomalies de la dystrophine en termes de quantité et de taille dans les cas avec BMD, chez qui la coloration fluorescence peut être normale du sarcolemme sur IHC, dans ce cas le western blot montre des bandes de quantité anormale ou de taille diminuée de dystrophine (**Na et al., 2013**).

4.5. Diagnostic moléculaire

Le diagnostic génétique est obligatoire même après une biopsie musculaire positive. Le diagnostic moléculaire permet en plus de la confirmation définitive du diagnostic, d'établir des corrélations phénotype/génotype, le conseil génétique, le diagnostic prénatal. Il permet par ailleurs de stratifier les patients pour les essais cliniques de thérapies spécifiques à la mutation.

4.5.1 Recherche des grands remaniements

La détection d'une délétion / duplication par PCR ou Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) et l'hybridation de sonde amplifiable multiplex (MAPH) constituent la première étape du diagnostic génétique (**Suh et al., 2017**).

4.5.2 Recherche des mutations ponctuelles

Le séquençage à haut débit, ou NGS (Next Generation Sequencing) est une nouvelle stratégie efficace dans le diagnostic moléculaire des DMD/BMD. Elle 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**).

4.5.3 Etude des transcrits

Certaines variations sont indétectables même par NGS, c'est le cas des mutations introniques profondes. Par conséquent, l'analyse des transcrits (ARNm) sera nécessaire chez tous les patients négatifs après analyse NGS. L'ARNm est transcrit en ADN complémentaire (ADNc) par RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction), puis séquencé par la méthode Sanger. 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**).

5. Le gène *DMD*

5.1 Localisation et structure

D'une longueur de 2,5 Mb, le gène *DMD* est le plus long gène humain (100 fois plus grand qu'un gène humain moyen). Ce gène doit son nom à la maladie dont il est responsable lorsqu'il est muté : DMD pour Dystrophie Musculaire de Duchenne (**Montoni 2003**).

Historiquement, c'est en 1886, William Richard Gowers constata que dans les familles touchées par cette dystrophie, l'hérédité provenait du côté maternel, suggérant alors une maladie génétique liée au chromosome X. Le gène *DMD*, quant à lui, a été découvert en 1987 par l'équipe du **Pr. Kunkel en 1987** par génétique inverse (**Hoffman et al., 1987**). Ce gène est porté par le chromosome X au niveau de la bande Xp21 (Figure 4). La séquence codante, est composée de 79 exons, d'une taille de 100 pb en moyenne (**Koenig et al., 1987**), séparés par des introns de taille variable, jusqu'à plus de 250 kb (intron 44) (**Mandel, 1989**) (Figure 5). Leur structure est très complexe car il existe plusieurs promoteurs à l'origine de cinq isoformes principales avec également plusieurs épissages alternatifs (Figure 6).



Figure 4. Localisation du gène *DMD* sur le bras court du chromosome X (Source : Genetics Home Reference).

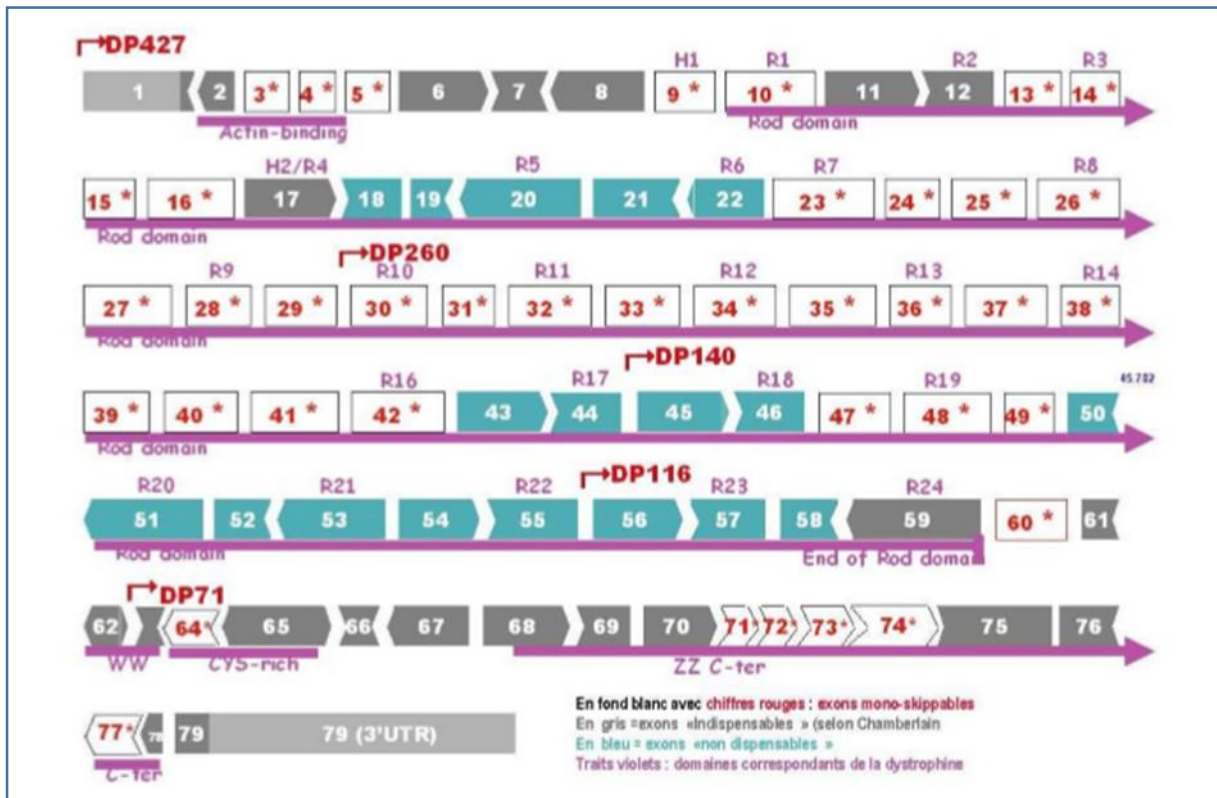


Figure 5. Représentations des exons du gène de la dystrophine et sites potentiels d'épissage en vue d'une correction par saut d'exon (Kaplan et al., 2008).

5.1 Les transcrits

Il existe une grande diversité des produits d'expression du gène *DMD*. Cette diversité est due d'une part à un épissage alternatif, surtout dans la région 3' du transcrit, et d'autre part à un promotion alternative (Kaplan, 2008). Le gène *DMD* comporte en effet sept promoteurs internes conduisant à l'expression de plusieurs produits, nommés en fonction de leur masse moléculaire : Dp 427 (3isoforme), Dp 260, Dp 140, Dp 116 et Dp 71 (Nouioua, 2013) (figure 6).

- La Dp260 est principalement exprimée dans la rétine, le cerveau et le muscle cardiaque (D'Souza et al., 1995).
- La Dp140 est principalement exprimée dans le cerveau et le rein (Lidov and Kunkel, 1997).
- La Dp116 est exprimée dans les cellules de Schwann et est spécifique du système nerveux périphérique (Byers et al., 1993).
- La Dp71 est exprimée dans la plupart des tissus de l'organisme, sauf dans le muscle squelettique (Ahn and Kunkel 1995).

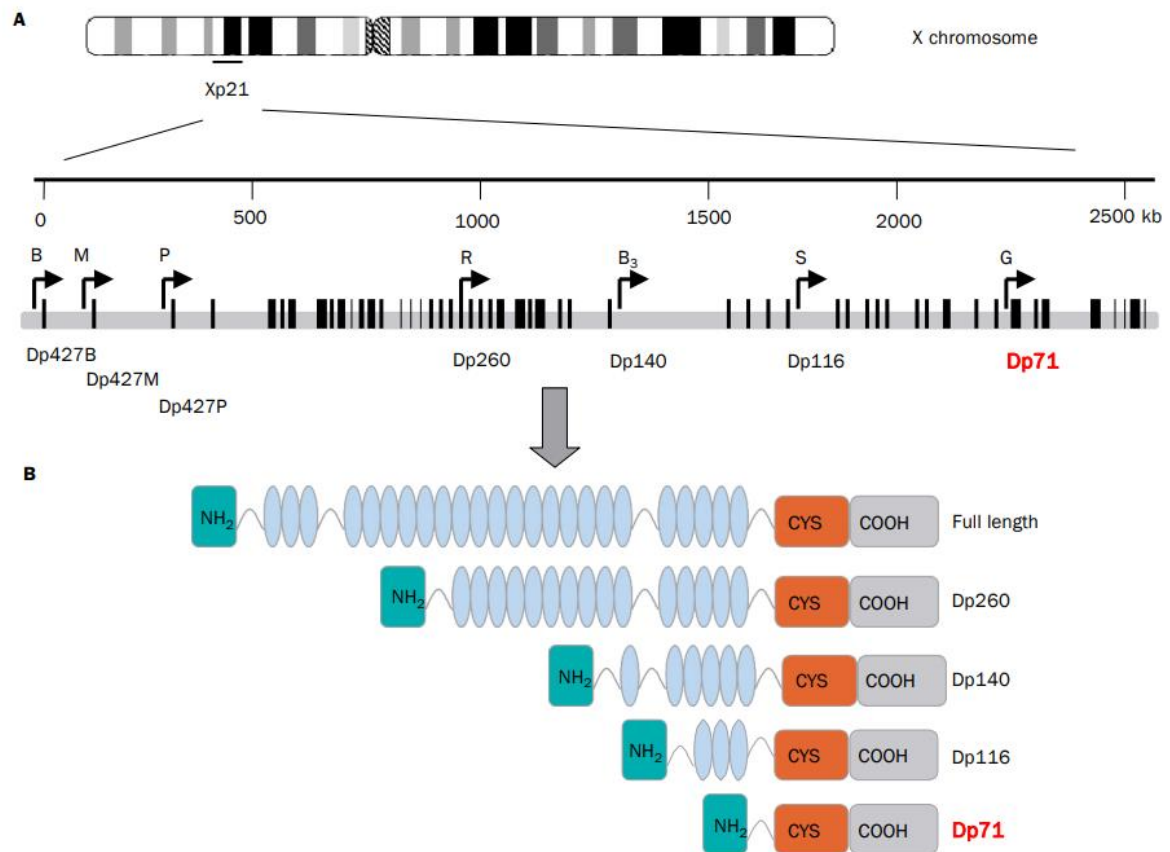


Figure 6. Schéma du gène DMD codant pour différentes isoformes (A) Les flèches indiquent la position des promoteurs les mieux décrits le long du gène DMD et les barres noires celle des exons ; (B) Représentation des isoformes les plus décrites (Nouioua, 2013).

6. La protéine : dystrophine

6.1 Structure

C'est le transcrit le plus long du gène DMD. Il existe trois promoteurs différents pour l'isoforme Dp427 avec un premier exon unique. Ils sont exprimés selon le type cellulaire : Dp427B dans le cerveau, Dp427M dans le muscle et DP427P dans les cellules de Purkinje. Il a également été décrit un autre promoteur noté Dp427L, situé à 500Kb en amont de Dp427M, dans les cellules lymphoblastoïdes (Nishio et al., 1994).

La dystrophine est une grande protéine en forme de bâtonnet, ayant un poids moléculaire de 427 kDa et comprenant 3685 acides aminés (AA) (Koenig et al., 1988). L'analyse de la structure primaire de la dystrophine permet de distinguer quatre domaines structuraux distincts : le domaine N-terminal (Nt) [AA 14-240], le grand "rod domain" central de type triple hélice "spectrine-like" [AA 253-3040], le domaine riche en cystéine (CR) [AA 3080-

3360] et le domaine C-terminal (Ct) [AA 3361-3685] (Figure 7). La dystrophine possède une grande analogie structurale avec l' α actine et la β spectrine (Ervasi et al., 1991).

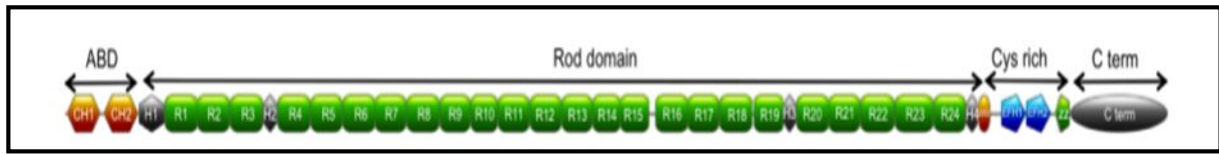


Figure 7. Schéma des domaines protéiques de Dp427 (Nouioua, 2013).

❖ *Domaine amino-terminal*

Encore appelé, domaine N-terminal présente une première séquence AA spécifique, composé d'environ 240 AA et codée par les exons 1 à 8 et possède des homologies de séquence avec la région de l' α -actinine 131 et de la β -spectrine qui ont la capacité de se lier à l'actine (ABD1, actin binding domain 1). Il contient trois sous-unités notées : ABS1, 2 et 3 (pour Actin Binding Site), qui sont capables de se fixer à l'actine du cytosquelette membranaire. Le domaine N-terminal contient également deux sites d'interaction avec la calmoduline notés : CaMBS1 et 2 (pour Calmodulin Binding Site) (Keep, 2000 ; Rybakova et al., 2000).

❖ *Domaine central*

Egalement appelé Rod Domain, constitue le corps de la dystrophine. D'une longueur de 125 à 175 nm codé par les exons 10 à 61, il représente 76% de la séquence en acides aminés de la dystrophine est composé de 2840 acides aminés répartis en 24 motifs répétés d'environ 109 résidus, homologues à la spectrine (R1 à R24). Il contient également quatre zones charnières (hinges : H1 à H4) riches en résidus prolines, qui confèrent sa flexibilité à la dystrophine (Belanto et al. 2014).

❖ *Le domaine riche en cystéine*

Est codée des exons 63 à 69, comprend 280 acides aminés dont 15 cystéines et s'étend des acides aminés 3361 à 3685. Il comprend deux modules (EF-Hands : EFH1 et 2) encadrés par deux modules WW et ZZ. Les EFH1 et 2 sont des sites potentiels de fixation au calcium et le ZZ est un site de fixation au zinc (domaine ZZ). L'ensemble de ces trois domaines permet à la dystrophine de se lier au β -dystroglycane du sarcolemme (Hnia, 2007 ; Constantin, 2014).

❖ *Domaine Carboxy-terminal*

Le domaine C-terminal appelé également le domaine coiled-coil se compose des 325 derniers acides aminés et contient le site de liaison aux protéines cytoplasmiques sous-sarcolemmales dystrobrevines et syntrophines (Newey et al., 2000). Il interagit également

avec le sarcolemme par l'intermédiaire du β dystroglycane, une glycoprotéine associée à la dystrophine.

6.2 Interactions de la dystrophine

La dystrophine est localisée à la face interne de la fibre musculaire squelettique et possède de nombreux partenaires identifiés. Elle peut être considérée comme une plateforme d'interactions. Elle interagit aussi bien avec les protéines du cytoplasme qu'avec celles de la membrane, établissant ainsi un lien structural entre l'actine du cytosquelette et la matrice extra cellulaire à travers le sarcolemme (Figure 8) :

- *interaction avec l'actine-F* : La dystrophine interagit avec l'actine au niveau de deux sites de fixation. Le premier site « Actin Binding Domain » (ABD1) dans la région N-terminale (**Le Gardinier et al., 2009**). Le deuxième site ABD2, est situé au milieu du domaine central, via les répétitions R11 à R15 (**Le Gardinier et al., 2009 ; Dominique et al., 2020**).
- *interaction avec nNOS* : Dans les cellules musculaires, les synthétases de l'oxyde nitrique neuronale (nNOS) est impliquée dans l'interaction avec la dystrophine via les répétitions R16 et R17 et plus particulièrement la région « linker » entre les deux répétitions.
- *interaction avec les microtubules* : Les interactions dystrophine/microtubule se font par l'intermédiaire des répétitions R20-23 avec une affinité plutôt élevée.
- *complexe dystrophine et glycoprotéines associées (DGC)*: la dystrophine est accolée à la membrane par l'intermédiaire d'un complexe membranaire constitué de plusieurs glycoprotéines, constituant le complexe dystrophine-glycoprotéines ou DGC (Dystrophin Glycoprotein Complex) (Figure 8) (**Ervasti et al., 2007**). Ce complexe inclut l' α et le β -dystroglycane, l' α -dystrobrevine, la syntrophine, la famille des sarcoglycanes (α -, β -, δ - et γ) et finalement le sarcospane. C'est le domaine C-terminale et le domaine riche en cystéine de la dystrophine qui sont impliqués dans la liaison aux protéines du DGC (**Dowling et al., 2019**).
- *interaction avec les lipides membranaires*
Legardinier et al, ont montré que les répétitions R1 à R3 et les répétitions R4 à R19 du domaine central de la dystrophine possèdent une forte affinité pour des phospholipides anioniques (Figure 39). Ainsi, deux domaines de liaisons aux phospholipides ont été définis, LBD1 et LBD2 (« Lipid Binding Domains 1 et 2 ») (**Legardinier et al., 2009**) (Figures 8). Récemment Zhao et al. ont identifié qu'uniquement R1-3 et R10-12 étaient des domaines de liaisons aux lipides membranaires (**Zhao et al., 2016**).

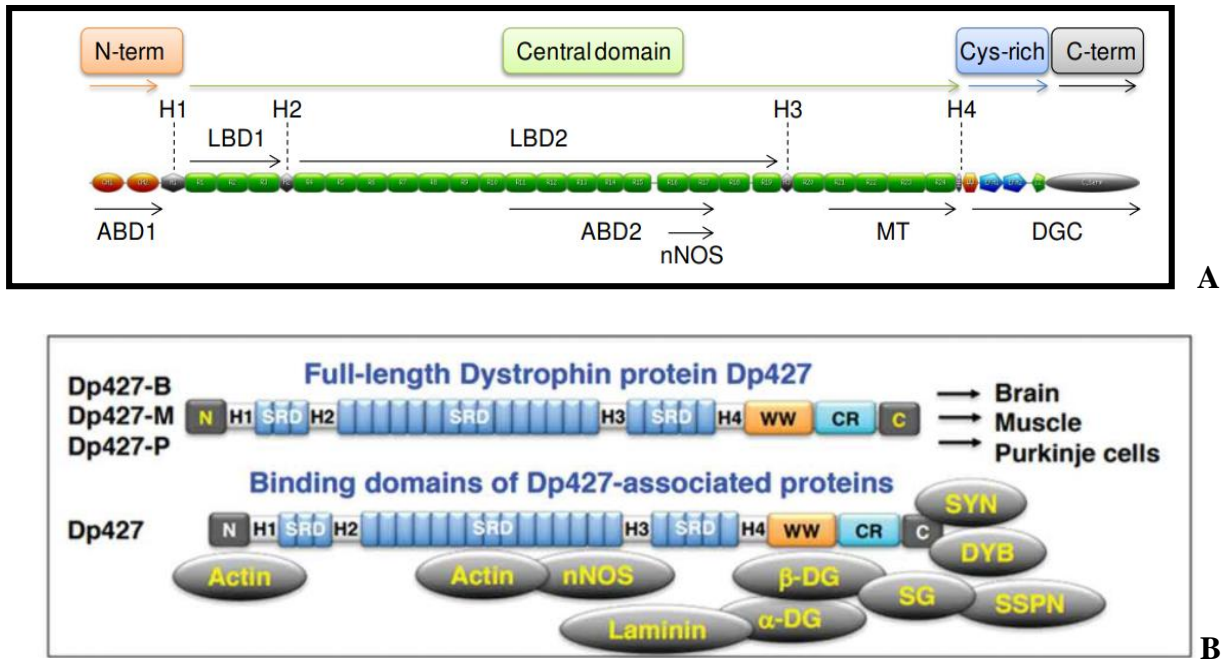


Figure 8. Représentation schématique de l'organisation de la dystrophine et des interactions avec ses partenaires majeurs. A : H1-4, charnières (« hinges »); ABD, domaine de liaison à l'actine ; LBD : domaine de liaison aux lipides. nNOS : domaine de liaison à la synthase neuronale de l'oxyde nitrique MT : domaine de liaison au microtubule, DGC : domaine de liaison au complexe dystrophine et glycoprotéines associées. (Le Rumeur, 2015), Le diagramme B fournit des informations supplémentaires sur les interactions directes avec les protéines de liaison à la dystrophine, telles que le β -dystroglycane (β -DG), l'oxyde nitrique synthase neuronal (nNOS), les syntrophines (SYN) et les dystrobrevines (DYB). Les protéines associées indirectement appartenant au complexe noyau dystrophine-glycoprotéine sont également marquées, notamment l' α -dystroglycane (α -DG), les sarcoglycanes (SG), le sarcospan (SSPN), la laminine et l'actine corticale (Dowling et al., 2019).

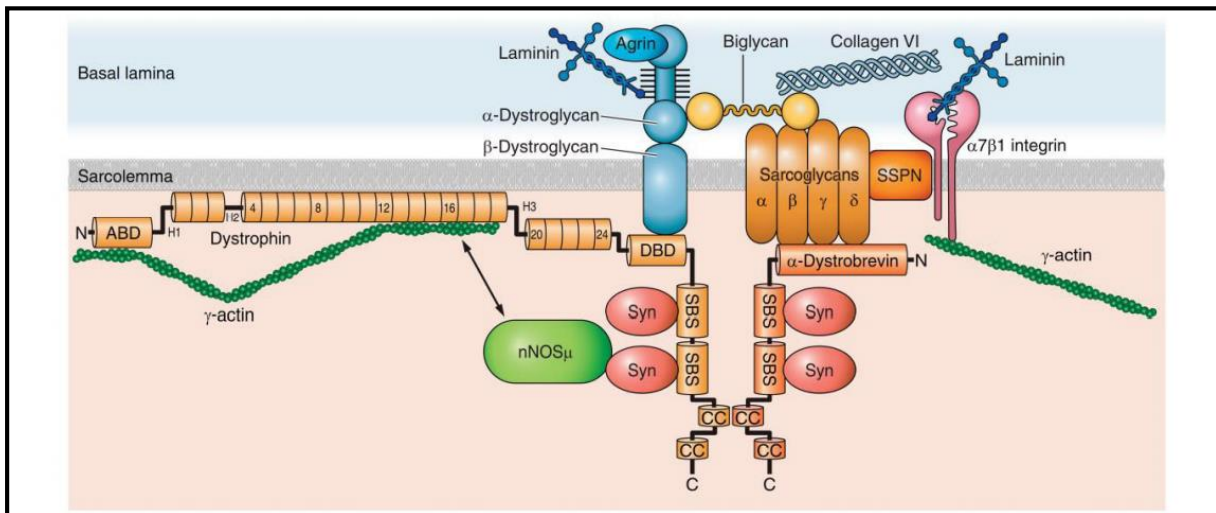


Figure 9. Représentation schématique de la dystrophine dans le contexte cellulaire avec ses partenaires. Syn, syntrophine ; SSPN, sarcospane ; ABD, domaine de liaison à l'actine ; DBD, domaine de liaison au dystroglycane ; SBS, site de liaison à la syntrophine (Allen et al., 2016).

6.3 Rôles de la Dystrophine

La dystrophine est un composant clé, du complexe protéique associé à la dystrophine (DAG pour dystrophine associated glycoprotéine) qui est composé de plusieurs protéines différentes et agit comme un lien entre le cytosquelette intercellulaire et la matrice extracellulaire. Ce complexe protéique participe également au maintien de l'intégrité structural et la stabilité de la fibre musculaire face au stress mécanique durant la contraction musculaire, où il joue le rôle d'un ressort tendu entre la membrane et la myofibrilles (**Abdullah et al., 2020**).

Le DAG a également été proposé pour constituer un complexe de signalisation cellulaire putatif en conférant l'échafaudage pour de nombreuses protéines de signalisation. Par exemple, les modules ZZ dans le domaine riche en cystéine de la dystrophine peuvent représenter un site fonctionnel de liaison à la calmoduline qui pourrait moduler la liaison d'une autre protéine associée à la dystrophine d'une manière dépendante du calcium. (**Constantin, 2014 ; Lombardi et al., 2017**).

La dystrophine contribue à la stabilisation indirecte des récepteurs TrkA de facteurs neurotrophiques NGF (facteur de croissance nerveuse ; nerve growth factor) et elle participe également à la stabilisation des récepteurs de neurotransmetteurs et des canaux ioniques comme les canaux calciques (**Persiconi et al., 2020**).

7. Les mutations du gène *DMD*

En raison de sa grande taille, le gène est sujet à différentes mutations. Dans 70% des cas DMD/BMD, la mutation est transmise par la mère porteuse saine (selon un mode récessif lié à l'X). Cependant environ 20 à 30% des dystrophinopathies sont causées par des mutations de novo où la mère n'est pas conductrice (mutation germinale). Si cette mutation germinale se produit chez les mâles, ils risquent d'avoir une fille porteuse. Alors que si cette mutation germinale se produit chez les femmes, elles courent un risque substantiel au moins 7 à 10% d'avoir un enfant de sexe masculin atteint de DMD ou de BMD (avec une probabilité de 50%).

D'après **Aartsma-Rus et al (2016)**, la majorité des mutations DMD / BMD sont des délétions intra géniques d'un ou de plusieurs exons (~68%) ou des duplications d'un ou plusieurs exons (~11%), mais aussi de petites mutations ou des mutations ponctuelles tel que les petites délétions, les insertions et les substitutions (~20%). Dans <1% des cas, d'autres

types de mutations sont retrouvées comme exemple les mutations introniques profondes (Deep intrinsic mutation).

Concernant les délétions et les duplications exoniques, elles débutent au niveau du point de cassure dans l'intron précédent le premier exon délété ou dupliqué et se termine au point de cassure dans l'intron suivant le dernier exon délété ou dupliqué.

Les délétions et les duplications touchant préférentiellement deux régions du gène, appelées « point chauds » situées dans la région 3' du gène (domaine central) entre les exons 45–55 et dans la région 5' (N terminale) entre les exons 2–10 (Aartsma-Rus et al. 2016). Les mutations ponctuelles sont réparties uniformément dans le gène et n'ont pas de points chauds (Flanigan et al., 2009). La fréquence du type de mutation varie au sein des sous-groupes phénotypiques (Tuffery- Giraud et al., 2009).

8. Corrélation génotype/phénotype

Les mutations géniques qui aboutissent à une dystrophine avec une certaine fonction protéique conservée sont compatibles avec la BMD. Ces mutations sont généralement des mutations qui maintiennent le cadre de lecture. Même si la dystrophine produite soit modifiée en taille et / ou réduite en quantité, elle est encore partiellement fonctionnelle car elle contient les domaines N-terminal ou C-terminal cruciaux pour connecter le cytosquelette d'actine à la matrice extracellulaire. Les mutations qui entraînent une absence partielle (<5%) ou complète de dystrophine fonctionnelle sont cohérentes avec la DMD (figure 10). Ces mutations sont généralement hors cadre de lecture. Souvent, des mutations hors cadre entraînent des codons stop conduisant à une terminaison prématurée de la protéine, inhibant ainsi la production de dystrophine qui contient le domaine N-terminal et / ou C-terminal crucial (Monaco 1988).

Bien que les corrélations entre génotype et phénotype s'appliquent à la règle du cadre de lecture susmentionnée chez 96% des patients DMD et chez 93% des patients BMD selon Tuffery-Giraud et al. (2009) et 92% pour la DMD et la BMD selon Koenig et al. (1989). Il existe des exceptions connues à cette règle : (1) mutation non-sens avec BMD, (2) délétion hors phase et tableau clinique de BMD, (3) délétions en phase et DMD (Koenig et al., 1989). Conformément à la règle du cadre de lecture, la taille ou l'emplacement de la délétion ou de la duplication conduisant à une mutation hors cadre ne doit pas affecter le phénotype clinique car ils se manifesteront tous sous forme de DMD. Néanmoins, trois exceptions à cette hypothèse étaient bien documentées : (1) Les mutations hors cadre avant l'exon 8 entraînent un phénotype BMD, (2) les patients présentant des mutations non-sens dans les exons 23-42

peuvent se présenter sous forme de phénotype BMD, et (3) les mutations hors cadre flanquant l'exon 44 montrent un phénotype DMD plus léger (Aartsma-Rus et al., 2016). De même, la taille et l'emplacement des délétions ou des duplications qui entraînent des mutations dans le cadre, ne peuvent prédire le phénotype clinique que dans une certaine mesure. (1) Si une mutation dans le cadre affecte les trois domaines N-terminaux (exons 2-10 et 32-45) ou le domaine C-terminal (exons 64-70), un phénotype DMD se développera, (2) la préservation du troisième domaine N-terminal alors que les deux autres sont perdus se manifestera par un phénotype de BMD sévère et, (3) des mutations entre les exons 10 et 40 provoquent des phénotypes plus légers et même asymptomatiques (Leturcq et Tuffery Giraud, 2015).

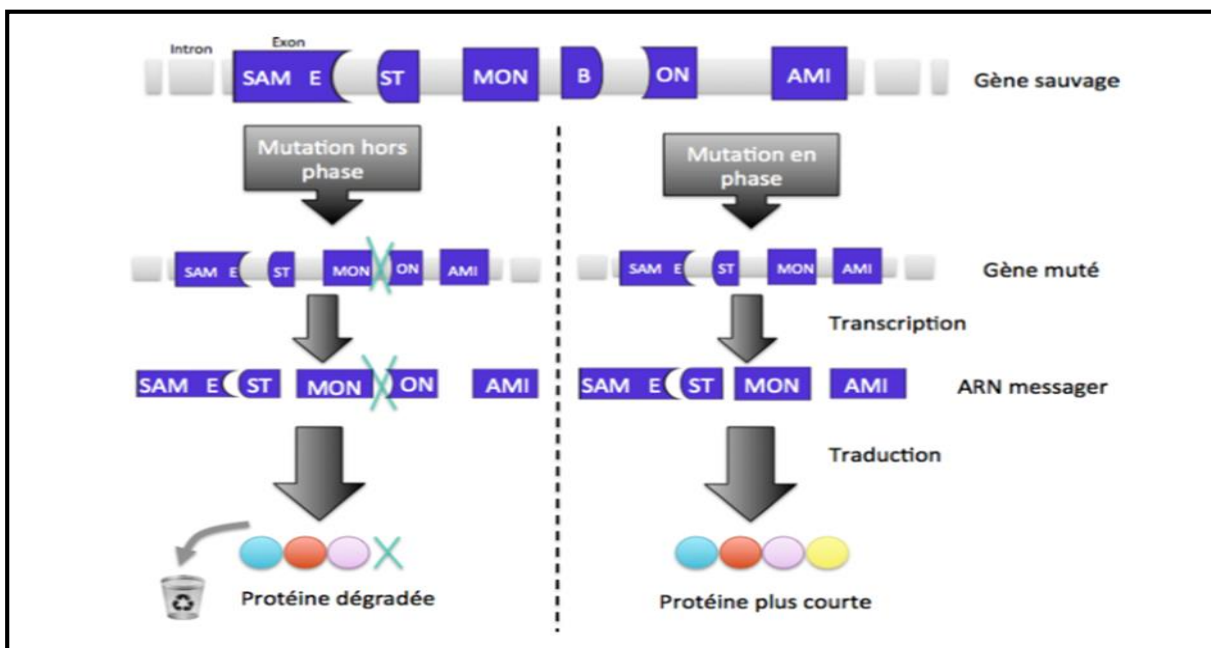


Figure 10. Exemple de mutations hors phase et en phase (Ben Yaou et al. 2016).

9. Traitement actuel et essais thérapeutiques géniques de la dystrophie musculaire Duchenne de Boulogne et Becker

Le patient DMD souffre de nombreuses conséquences de sa maladie. La surveillance et la prise en charge médicales contribuent à réduire les complications et à améliorer le confort de vie des patients. Pour cela, la prise en charge des patients à différents stades doit être considérée : - suivi de l'atteinte musculaire ; - suivi de l'atteinte cardiaque et respiratoire ; - suivi orthopédique ; - suivi des troubles urinaires ; - suivi nutritionnel ; - suivi de la douleur.

Les traitements consistent en des soins préventifs et/ ou des traitements symptomatiques.

Les glucocorticoïdes sont prescrits pour ralentir l'évolution de la maladie et retardant l'âge de

la perte de la marche. Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC), tel le perindopril ont démontré leur efficacité sur la prévention de l'insuffisance cardiaque (**McDonal et al., 2013**).

Sur la base des types de mutations, plusieurs stratégies ciblant la restauration de la dystrophine ont été proposées et sont actuellement en cours d'exploration.

9.1. Translecture de codons stop

Les mutations non-sens sont détectées chez environ 10% des patients atteints de DMD (**Bladen et al., 2015**) et produisent généralement une dystrophine non fonctionnelle. De plus, l'ARNm généré à partir de mutations non-sens est déstabilisé et dégénéré (**Wu et al., 2007**). Les thérapies de lecture directe utilisent de petites molécules pour interagir avec le ribosome, qui conduit à l'insertion d'un autre acide aminé au niveau de codon de terminaison prématurée pour permettre une lecture traductionnelle, de sorte qu'une protéine de dystrophine relativement fonctionnelle puisse être générée (**Tagushi et al., 2017**). Ce phénomène est appelé le « read through » des codons stops. Plusieurs médicaments ont été développés sur la base de ce principe (**Hamada et al., 2019 ; Sun et al., 2020**).

- **Lecture du codon stops médiée par Ataluren**

Ataluren (acide 3- (5- (2-fluorophényl) - (1,2,4] oxa-diazol-3-yl) -benzoïque), un composé anciennement appelé PTC124, permettant aussi le « read through » des codons stop avec une faible toxicité (**Mercuri et al., 2020 ; Muntoni et al., 2019**).

En 2014, Translarna (ataluren) a obtenu une licence dans l'Espace économique européen pour le traitement de mutations DMD non-sens chez les patients ambulatoires âgés de 2 ans et plus. En avril 2019, Translarna a obtenu une autorisation de mise sur le marché de l'Agence nationale brésilienne de surveillance de la santé pour le traitement des enfants DMD ambulatoires âgés de 5 ans et plus (**Mercuri et al., 2020**).

9.2. Saut d'exon ou "exon skipping" par des oligonucléotides antisens

Le saut d'exons, une approche ciblant les exons affectés avec des molécules prédéfinies pour produire une version plus courte mais fonctionnelle de la dystrophine. Ces molécules sont des petits ARNs artificiels de 20 à 30 pb anti-sens qu'on appelle oligonucléotides anti-sens (AON pour anti-sens oligonucleotid). Les AON ont la capacité d'hybrider spécifiquement aux motifs d'épissage exoniques ou introniques essentiels pour la maturation du pré-ARNm et masquent les signaux d'épissage sur l'ARN (**Mohammed et al., 2018**). Lors de l'excision-épissage, l'exon ainsi masqué ne sera pas transcrit, il sera éliminé de l'ARN messenger mature

(Figure 11) (**ErikH et Aartsma-RusA, 2017 ; Miskew et al., 2016**). Ainsi, un ARNm dans le cadre sans l'exon ciblé est généré, et une dystrophine tronquée mais encore partiellement fonctionnelle peut être traduite. Cette approche peut traiter 55% des patients atteints de DMD (**Bladen et al., 2015**).

Les 5 principaux exons mutés trouvés chez les patients atteints de DMD sont l'exon 51 (21% des délétions), l'exon 53 (15%), l'exon 45 (13%), l'exon 44 (11%) et l'exon 43 (11%) (**Bladen et al., 2015**). Ainsi, les médicaments ciblant l'exon 51 (Eteplirsén, Drisapersén), l'exon 53 (Golodirsén, Viltolarsén) et l'exon 45 (Casimersén) sont testés dans des essais cliniques. Parmi eux, Eteplirsén, Golodirsén et Viltolarsén sont disponibles pour les patients DMD (**Asher et al., 2020**).

L'oligomère morpholino-phosphorodiamidate (PMO) Eteplirsén augmentait la production de dystrophine chez les patients DMD de 0,16% à 0,44% sur une thérapie de 48 semaines et de 0,28% à 0,93% après 188 semaines de traitement (**Aartsma-Rus et Krieg, 2017**).

Le Casimersén, un oligonucléotide qui ignore l'exon 45, est également en développement. En 2015, un essai de phase III avec 99 patients a été mené pour évaluer l'efficacité du SRP-4045 (Casimersén) et SRP-4053 (Golodirsén) pendant 48, 96 et 144 semaines de traitement. Les principaux résultats mis à jour en 2018 ont montré une augmentation statistiquement significative de la protéine dystrophine chez les patients traités (**Sun et al., 2020**). Plus tard, En décembre 2019, le Golodirsén intraveineux a été approuvé aux États-Unis pour traiter les patients atteints de DMD (**Heo, 2020**). Dans l'étude de phase II ayant duré 168 semaines et ayant porté sur 25 patients, tous les participants ont montré une réponse de saut d'exon 53 à la semaine 48, ainsi qu'une augmentation de l'expression de la dystrophine (de 0,095% à 1,109%) (**Frank et al., 2020**).

Viltolarsén, qui cible l'exon 53, a été testé au Japon (20, 40 et 80 mg / kg par semaine par perfusion intraveineuse) et aux États-Unis (40 et 80 mg / kg par semaine par perfusion intraveineuse). Après 24 semaines de traitement, il a été noté une augmentation de 5,8% de la protéine de dystrophine par rapport à la valeur initiale dans les biopsies musculaires. En mars 2020, le Viltolarsén intraveineux a obtenu sa première approbation au Japon pour le traitement des patients atteints de DMD présentant des mutations susceptibles de sauter l'exon 53. Actuellement, les essais cliniques sur le Viltolarsén sont menés aux États-Unis et au Canada (**Dhillon, 2020**).

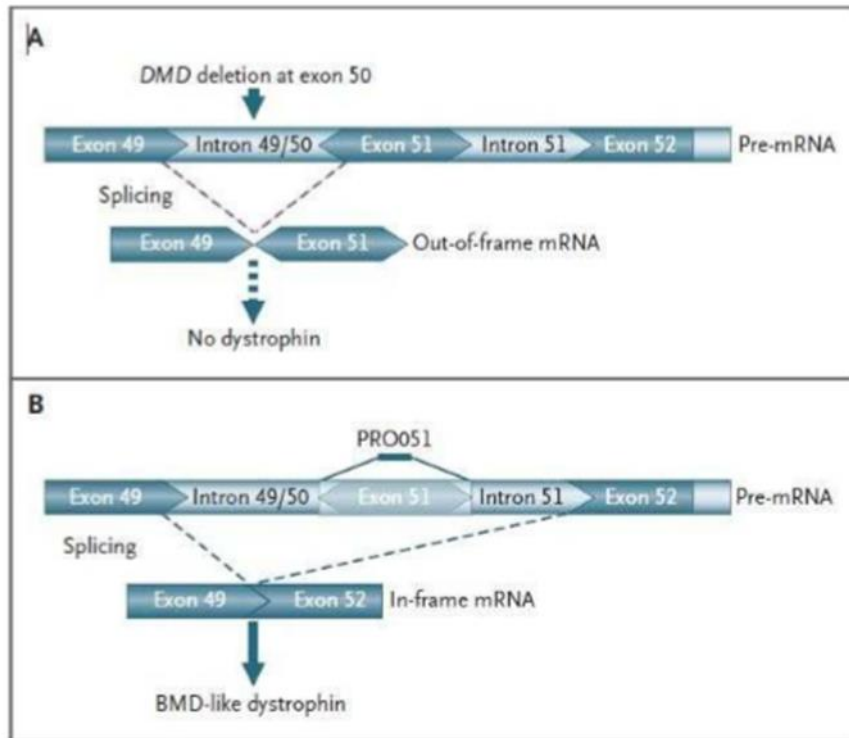


Figure 11. Représentation du mécanisme du saut d'exon chez un patient DMD ayant une délétion de l'exon 50 permettant la restauration du cadre de lecture et conduisant à une dystrophine incomplète et un phénotype BMD (Van Deuteckom, 2007)

10. Conseil génétique et diagnostic prénatal

10.1 Conseil génétique

Le conseil génétique (CG) implique que le médecin soit parfaitement informé sur la maladie en cause, son mode de transmission, sur le désir de maternité ou de paternité mais aussi sur l'environnement familial, culturel et religieux. Tous ces éléments entrent en jeu lorsque l'intéressé doit prendre la décision qui convient le mieux à son cas. Dans la DMD et la BMD le conseil génétique est fondamental et doit être une précoce. Les mères des enfants atteints sont transmettrices dans 2/3 des cas alors que le taux de néo-mutation est évalué à 1/3. Etant donné l'âge du diagnostic de la maladie, le risque d'avoir un deuxième enfant atteint est élevé. Le dépistage d'autres conductrices potentielles dans la famille est fondamental. Les CK sont élevées chez 1/3 des conductrices. Le cas particulier des filles d'un sujet Becker doit être souligné car elles sont transmettrices obligatoires. Si une mutation (délétion /duplication, mutation ponctuelle) est présente chez les cas index, la recherche de cette mutation sera réalisée chez les femmes à risque (Sifi, 2017).

Le conseil génétique est très important : le risque d'avoir des garçons atteints par une femme conductrice est de 50% et celui d'avoir des filles conductrices est de 50% (**Nouioua, 2013**).

10.2 Diagnostic prénatal

Il est indiqué lorsque la femme enceinte présente un risque non négligeable après un calcul de Bayes. Le prélèvement fœtal peut être fait sur villosités chorales vers la onzième semaine d'aménorrhée(SA) ou par amniocentèse vers la seizième semaine. Le diagnostic du sexe est alors pratiqué et l'analyse de l'AND est indiquée s'il s'agit d'un fœtus de sexe masculin. Le diagnostic est direct par PCR multiplex si une délétion ou duplication est connue chez le propos tus ou par séquençage. Si la mutation du gène DMD n'est pas connue chez le cas index, l'analyse est indirecte par une étude des polymorphismes intra-génétiques (**Parks et al., 2016**). Elle doit rechercher l'haplotype hérité par le fœtus. Le délai nécessaire au diagnostic est d'environ 2 semaines (**Sifi, 2017**).

PATIENTS

ET

METHODES

Notre étude est une étude rétro et prospective. Elle a porté sur 102 patients de phénotype DMD/BMD. L'échantillonnage a été recruté au sein du service de neurologie du Centre Hospitalier Universitaire Ben Badis de Constantine (CHUC), et la réalisation pratique du travail s'est effectuée ;

- au niveau du laboratoire de recherche de Biologie et de Génétique Moléculaire (Université Constantine 3).
- au niveau de l'unité de génétique médicale située au Département de Sciences Médicales Université Ferrara, Italie.
- au niveau du laboratoire de biologie et biologie moléculaire de l'Hôpital Cochin de Paris, France.

1. Type et période d'étude

Notre travail a comporté deux parties :

1.1 Etude rétrospective :

Une étude rétrospective réalisée à partir de dossiers de patients atteints de DMD/BMD connus du service de neurologie du CHU de Constantine et diagnostiqués uniquement sur des bases phénotypiques et/ou génotypique de Janvier à Avril 2016. Les informations étaient recueillies à partir des dossiers de malades et des fiches de consultation. Dans ce cadre nous avons consulté les archives du service de neurologie et de sa consultation externe de maladies neuromusculaires. Nos critères d'inclusion étaient représentés essentiellement par une faiblesse musculaire proximale d'évolution progressive associée à une hypertrophie des mollets avec ou sans macroglossie, documentée par un EMG généralement en faveur d'une atteinte musculaire et un taux de CPK élevé supérieur ou égal à 10 fois la valeur normal.

Nous avons tenu compte uniquement des dossiers complets répondant aux critères sus cités. Il s'agissait de 32 patients.

Les malades étaient convoqués, réinterrogés, réexaminés et prélevés après consentement pour une étude génétique.

1.2 Etude prospective réalisée à partir de cas nouvellement recrutés.

1.2.1 Patients

1.2.1.1 Période de l'étude Il s'agit d'une étude descriptive à visée analytique. Les malades étaient recrutés de manière prospective du service de neurologie du CHU de Constantine de

Septembre 2015 à Avril 2017.

1.2.1.2 Description de la population d'étude

Notre étude est une étude clinique et génétique ayant porté sur une série de 70 patients appartenant à 50 familles avec un ou plusieurs membres atteints, originaires, en majorité de l'Est Algérien.

Des critères d'exclusion et d'inclusion ont été établis pour cette population

Critères d'inclusion

- patients de sexe masculin : cas sporadiques ou familiaux appartenant à des familles consanguines ou non.
- mode de transmission récessif ou récessif lié à l'X.
- faiblesse musculaire symétrique du tronc et des membres.
- faiblesse musculaire progressive proximale que distale.
- aspect myogène révélé par ENMG.
- Une élévation du taux des CPK.

Critères d'exclusion

Les critères d'exclusion

Sont exclus de cette étude les patients avec :

- un mode de transmission autosomique (dominant).
- un début néonatal.
- un déficit moteur distal isolé.
- une atteinte faciale, oculopharyngée ou un phénomène myotonique
- tout patient non consentant.

Au total, étaient inclus pour une analyse clinique et génétique 102 patients de phénotype DMD/BMD appartenant à 82 familles.

2. Analyse Clinique

2.1 Examen des cas index

- ❖ Le cas index ou propositus est l'individu qui permet le recrutement d'une famille.
- ❖ Il doit dans tous les cas répondre aux critères d'inclusion et d'exclusion sus cités.

- ❖ Tous nos patients (cas index et secondaire) étaient soumis à un interrogatoire minutieux et à un examen clinique complet selon un questionnaire préalablement établi pour cette étude (voir annexe 3) qui a comporté plusieurs étapes :
 - les données anamnestiques essentielles (antécédents personnels et familiaux des patients et l'histoire de leur maladie).
 - les données de l'examen clinique.
 - les critères de diagnostic.
 - l'évolution de la maladie.
 - les examens complémentaires.
 - l'arbre généalogique pour chaque famille à la recherche d'autres cas atteints (Annexe 5).

2.2 Les antécédents familiaux

- La consanguinité parentale a été recherchée dans tous les cas.
- Un arbre généalogique a été établi pour chaque famille par l'interrogatoire des patients et/ou des parents du jeune enfant à la recherche d'autres membres de la famille atteints.
- Une enquête a été systématiquement réalisée sur les décès, les avortements et les maladies survenues dans la famille et chez les ascendants.

2.3 Les antécédents personnels

- 1- Les différentes étapes du développement psychomoteur (DPM) ont été recueillies
- 2- Le carnet de naissance des enfants nés à l'hôpital a été consulté attentivement.
- 3- Les renseignements concernant le déroulement de la grossesse et les circonstances de l'accouchement ont été recherchés systématiquement.

L'examen neurologique a été réalisé attentivement par un neurologue spécialisé dans la prise en charge des maladies neuromusculaires.

3. Examens Complémentaires

3.1 Bilan Biologique

Le bilan effectué consiste à doser la créatine phosphokinase (CPK) et le lactate déshydrogénase (LDH) parfois dans le sérum pour confirmer l'atteinte musculaire et éliminer les autres étiologies d'autre part. Les valeurs normales de CPK sont comprises entre 25 et 170UI/L et entre 220 et 450 UI/L pour LDH. Une autre application importante dans le

dosage de la CPK qui permet de diagnostiquer très précocement de la dystrophinopathie dans la fratrie d'un myopathe confirmé ou cas index.

3.2 Électroneuromyographie ENMG

ENMG a été réalisé chez tous les patients pour confirmer l'atteinte musculaire.

3.3 Biopsie Musculaire

La biopsie musculaire a été réalisée uniquement chez 9 patients. Tous les autres patients n'ont pas bénéficié de biopsie musculaire par manque de structures spécialisées en neuropathologie dans notre région.

3.4. Electrocardiogramme et Echographie du cœur

Un ECG et une échographie du cœur sont demandées systématiquement chez tous les patient et répétés chaque année à la recherche d'une atteint cardiaque.

3.5 Les explorations fonctionnelles respiratoires (EFR)

Ont été réalisées chez tous les patients puis répété une fois par an.

4 Analyse Génétique

4.1 Stratégie de diagnostic adoptée

Le gène *DMD* est le siège de plusieurs types de mutations que l'on subdivise classiquement en trois grandes groupes : les délétions intragéniques, affectant un ou plusieurs exons observées dans environ 60-65% des cas ; des duplications dans près de 5-10% des cas et enfin les mutations ponctuelles pouvant concerner la totalité de la séquence codante du gène et observées dans environ 10-20% des cas.

Dans un 1^{er} temps, nous avons exploré les délétions d'exons au niveau des points chauds connus dans le gène *DMD* par PCR multiplex.

Dans un 2^{ème} temps, les patients négatifs au test précédent avaient bénéficié d'une analyse de délétions supplémentaires des autres exons codant du gène *DMD* ainsi que d'une analyse des duplications par les techniques MLPA, PCR semi-quantitave et PCR digitale.

Enfin un séquençage de nouvelle génération a été mise au point, afin de rechercher des mutations ponctuelles.

L'étude moléculaire a été effectuée selon deux étapes : une étape d'extraction d'ADN suivie d'une recherche des mutations dans le gène *DMD*.

4.2 Prélèvement Sanguin

Les prélèvements de sang total pour l'analyse moléculaire du gène *DMD* ont été réalisés au niveau du pli du coude sur deux tubes vacuténaires K3 EDTA (Ethylen Diamin tetra acetic Acid) de (5 ml), comme anticoagulant qui de plus est un inhibiteur de l'action des enzymes DNase ou nucléase (l'héparine comme anticoagulant ne doit pas être utilisée car c'est un inhibiteur de la Taq polymérase).

4.3 Extraction de l'ADN

De très nombreux procédés d'extraction des acides nucléiques ont été décrits et des kits sont actuellement proposés par un certain nombre d'industriels, cependant la méthode d'extraction d'ADN utilisée dans notre étude est celle utilisant des solvants non organiques. L'ADN de chaque patient est extrait à partir de leucocytes du sang périphérique recueillis sur tube EDTA selon la technique au NaCl (Miller et al., 1988).

➤ Principe

Les leucocytes sanguins représentent la source majeure d'ADN, pour pouvoir les isoler, le sang doit être initialement mélangé à une solution hypotonique pour permettre la lyse des globules rouges. Après récupération des leucocytes, ces derniers vont être traités par un mélange représenté par un détergeant Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) et la protéinase K et ce, dans le but de dégrader tout ce qui est protéine. L'ADN nucléaire est libéré dans le milieu et les protéines qui lui sont associés sont éliminées par précipitation au NaCl. Le surnageant ainsi récupéré est traité par l'éthanol dans lequel une pelote d'ADN se forme par précipitation.

➤ Technique

- La lyse des globules rouges et la préparation des leucocytes
 - Dans un tube Falcon de 50 ml ; le sang total complété à 50 ml avec du TE 20 :5 et laissé 10 min dans la glace puis centrifugé pendant 10 min à 3800 tour/min. (TE 20 :5 : tris 20 mM mélangés à l'EDTA 5mM, complété avec l'eau distillée jusqu'à 1000 ml à pH = 7,5).
 - Le surnageant est ensuite déversé.

- Le TE 20 :5 est ajouté jusqu'à 30 μ L au culot, le tout est agité et laissé 10 min dans la glace puis centrifugé dans les mêmes conditions précédentes.
- Ensuite le surnageant est encore une fois déversé pour obtenir du culot de leucocytes.
- Enfin du TE 10 :1 est ajouté et le culot est conservé à (-20°C) dans le congélateur. (TE 10 :1 :10 mM de tris mélangés à 1mM d'EDTA à pH = 7,5)

- Extraction de l'ADN génomique total

- Les leucocytes sont décongelés puis centrifugés pendant 10 minutes à 4000 tour/min et le culot de leucocytes est repris dans un tube Falcon de 15 ml.
- Au culot leucocytaire sont ajoutés 3 ml de tampon de lyse (Tris 1M mélangé à l'EDTA 0,5 M, complété jusqu'à 100 ml d'eau à pH = 8,2). Ensuite 200 μ L de SDS à 10%, puis 100 μ L de protéinase K (10 mg / ml).
- Le tube, sur une roue, est ensuite agité à 37°C pendant une nuit.
- Le lendemain ; il est refroidi dans la glace, auquel l'on rajoute du NaCl 4 M. Le tout est agité rigoureusement à la main.
- Le surnageant, après centrifugation, est repris dans un tube Falcon de 15 ml où il faut ajouter 2 fois son volume d'éthanol absolu préalablement refroidi. Par retournement, la pelote d'ADN se forme. Si elle n'apparaît pas, on laisse 30 min à -20°C.
- La pelote d'ADN est récupérée avec une pipette pasteur et rincée en deux reprises dans l'éthanol à 70%. Enfin la pelote est mise dans un tube Nunc.

- Solubilisation

Selon la grosseur de la pelote et la concentration souhaitée, on ajoute entre 300 et 1000 μ l de TE10:1 et on laisse le tube nunc durant une nuit sur un agitateur rotateur à 37°C puis à température ambiante jusqu'à dissolution complète (1 à 2 jours).

4.4 Contrôle qualitative et quantification de l'ADN

4.4.1 Contrôle qualitative

La qualité et la pureté des acides nucléiques comptent parmi les facteurs les plus critiques pour l'analyse PCR. La pureté de l'ADN extrait est appréciée en mesurant la densité optique des extraits à 260 et 280 nm qui correspondent, respectivement, aux longueurs d'onde d'absorption des acides nucléiques et des protéines, en effectuant le rapport de DO à 260 nm sur la DO à 280 nm. Ce rapport constitue un bon indicateur de la pureté de l'ADN.

- Si le rapport DO₂₆₀/DO₂₈₀ est compris entre 1,6 et 2 => l'ADN est suffisamment pure.

- Si le rapport $DO_{260}/DO_{280} > 2 \Rightarrow$ l'ADN est contaminé par les ARN.
- Si le rapport $DO_{260}/DO_{280} < 1,6 \Rightarrow$ l'ADN est contaminé par les protéines.

Dans le cas où l'ADN est contaminé, un bon résultat est à écarter dans les étapes suivantes de son analyse par PCR. Il est donc indispensable de procéder par la réextraction de la pelote de l'ADN afin d'obtenir la pureté souhaitée. Les échantillons d'ADN purs sont conservés à + 4°C jusqu'à utilisation.

4.4.2 Quantitification de l'ADN

La concentration des ADN extraits est estimée par la mesure de l'absorbance à 260 nm. Sachant qu'une unité de DO à 260 nm est équivalente à 50 µg /ml d'ADN, il est possible d'évaluer la quantité d'ADN d'un échantillon par la formule :

$$\boxed{[\text{ADN}] \mu\text{g} / \mu\text{l} = \text{facteur de dilution} \times \text{DO } 260 \times 50 \mu\text{g} / \mu\text{l}}$$

En prenant en considération que l'ADN obtenu est dilué à 1/100, la quantité obtenue est multipliée par 100.

Exemple : Un ADN solubilisé dans 1000 µl de l'eau distillée ayant une DO_{260} nm de 0,120.

Considérant que l'ADN est dilué à 1/100 (10 µl de l'ADN dilué dans 990 µl d'eau stérile), donc le facteur de dilution est égal au rapport de volume total (1000µl) sur le volume d'ADN (10µl) soit un facteur de dilution égal à 100. Donc le résultat portant la concentration finale est de 600µg/µl.

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

Le terme de "PCR multiplex" désigne une mise au point de la technique PCR autorisant l'amplification, en une seule réaction, de plusieurs segments d'ADN distincts. Les couples d'amorces correspondant aux différents locus à analyser sont introduits dans le même tube réactionnel. Les conditions d'amplification étant fixées pour un même tube dans lequel ont lieu plusieurs réactions différentes. L'amplification par PCRm est une technique très utile pour le diagnostic de la DMD. Les principaux avantages de cette adaptation technique est la réduction du coût et la diminution du temps de réalisation et, éventuellement, d'analyse des résultats.

La recherche de délétions dans le gène de la dystrophine a été réalisée par deux PCR multiplex, selon Chamberlain et Beggs (**Chamberlain et al., 1988 ; Beggs et al., 1991**), explorant les 19 exons correspond aux zones les plus fréquemment délétées (les deux points chauds délétionnels). Cette technique permet de détecter 98 % des délétions retrouvées dans 70 % des cas de dystrophinopathies.

Afin d'amplifier les 19 exons simultanément du gène de la dystrophine, la réaction s'effectue dans deux mix I et II. Les amorces sont choisies de telle façon que les différents produits d'amplification obtenus au sein d'une seule réaction aient des tailles différentes et soient donc facilement individualisés (Annexe 6).

- mix I amplifie les exons : 4, 8, 12, 17, 19, 44, 45, 46, 48, 51
- mix II amplifie les exons : 3, 6, 43, 50, 52, 60, 13, 47 et DP427m promoteur

Chaque réaction de PCR est réalisée dans un volume final de 50 µl, contenant 10 µl de tampon Phusion HF 5X, 1 mM de chaque amorce, 1 mM de mélange de désoxy nucléotides (dNTP), 1,5 µl de sulfoxyde de diméthyle (DMSO), 3 µl de MgCl₂ (25 mM), 0,5 µl d'ADN polymérase de phusion (Thermo-scientific EU) et l'eau stérile.

La quantité de chaque composant est multipliée par le nombre de tubes voulu plus un, il s'agit du témoin négatif dans lequel ne se trouve que le mix sans ADN. Pour les autres tubes, 100 ng d'ADN génomique est mélangé à 47 µl du mix.

Déroulement de cycle de PCR

Tous les tubes sont placés dans un thermocycler (Techne) pour amplification selon les conditions présentées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 1 : Conditions d'amplification du gène *DMD*

Nombre de cycles	Étapes	Températures (°C)	Durée
X1	Dénaturation initiale	95	6 min
X 30	Dénaturation	95	30 sec
	Hybridation	53	30 sec
	Elongation	65	4 min
X1	Élongation finale	65	7 min

Préparation du gel nusieve/agarose

Les produits de PCR sont ensuite analysés après électrophorèse sur un gel d'agarose Nusieve à 3% (2 Nusieve +1 g d'agarose dans 100 ml de TBE 1X (Tris Borate EDTA) (Tris base 45 mM, Acide Borique 25 mM, EDTA 12,5 mM, pH 8) additionné de 10 µl du Bromure d'Ethidium (BET). Le gel est déposé sur la plaque d'une cuve horizontale.

Contrôle des produits PCR

Le contrôle des produits d'amplification sur gel permet de confirmer la bonne réussite de l'amplification, de vérifier si une éventuelle contamination de l'ADN est survenue grâce au contrôle négatif (apparition de bande dans le puits du blanc), et d'apprécier qu'il n'existe pas d'amplifications parasites. Dans chaque puits du gel, nous déposons 10 µl de produits PCR en présence de 3µl du Bleu de Bromophénol (BBP) qui permet de suivre le front de migration. Les fragments d'ADN chargés négativement migrent dans un champ électrique et la migration de la cathode et vers l'anode dépend de leurs tailles. Le système est soumis sous un courant de 60 à 100 volts pendant 3 heures. Après la migration, le gel est soumis au rayon UV et photographié. Les molécules de BET s'intercalent entre les bases nucléotidiques de l'ADN et émettent une coloration rouge. Les fragments amplifiés sont visibles sous forme de bandes fluorescentes.

4.6 La recherche d'autres délétions et duplications par multiplex ligation-dependant probe amplification (MLPA), PCR semi-quantitative et PCR Digitale

➤ *multiplex ligation-dependant probe amplification (MLPA)*

D'après **Schouten et al (2002)**, la technique MLPA (multiplex ligation-dependant probe amplification) permet d'analyser le nombre de copies de chacun des 79 exons du gène *DMD*, détectant ainsi les délétions comme les duplications chez l'individu atteint ou les femmes apparentées. Cette technique aujourd'hui utilisée par la très grande majorité des laboratoires dans le monde permet également de délimiter l'étendue des grands réarrangements en termes d'exon (**Suh et al., 2017**) (**annexe 7**).

L'ADN des patients DMD a été analysé pour détecter les délétions et les duplications importantes dans 79 exons du gène *DMD* à l'aide des kits (MRC-Holland, Amsterdam, Pays-Bas) selon les instructions du fabricant. Les produits de réaction ont été analysés à l'aide d'un analyseur d'ADN [ABI 3130 XL; Applied Biosystems] et l'analyse des données a été réalisée à l'aide des logiciels Coffalyser [MRC Holland, Amsterdam, Pays-Bas] et Gene Marker [Softgenetics] pour MLPA.

Lorsque le résultat MLPA suggérait une seule délétion ou duplication d'exon, le résultat était toujours confirmé par une technique moléculaire alternative. Il s'agissait de séquençage d'exons uniques délétés et de la PCR en temps réel spécifique à l'exon pour les duplications d'exons uniques, conformément aux directives de diagnostic DMD actuelles (**Fratte et al., 2020**).

➤ **PCR Multiplex semi-quantitative**

PCR Multiplex semi-quantitative (QF-PCR ABI-Genescan) Deux réactions de PCR explorant simultanément les 50 exons les plus fréquemment délétés ou dupliqués situés dans deux régions du gène *DMD* :

- PCR multiplex QF5 couvrant les exons de la région 5' du gène (QF-PCR 5') : exons : 1-9, 11-13, 17, 19, 21, 24-25, 29-30, 32 et 37.
- PCR multiplex QF3 couvrant les exons de la région 3' du gène (QF-PCR3') : exons 42-56, 58, 60, 62-63, 68, 71 et 75. et migration par électrophorèse capillaire

La PCR semi-quantitative permet de répondre rapidement à environ deux tiers des cas des anomalies quantitatives, pour les cas index. Cette technique, basée sur la détection de la taille du fragment amplifié, peut donc aussi révéler de petites délétions ou duplications d'une à plusieurs bases. Une amplification isolée des exons entourant la délétion mise en évidence est parfois nécessaire pour en préciser les bornes (**Annexe 7**).

➤ **PCR digitale**

Cette approche ciblée permet la quantification relative d'une région d'intérêt de DMD (un exon de DMD), par comparaison avec une région de référence. Les échantillons ont été analysés sur Systeme QX100, Biorad à l'aide d'un essai tampon spécifique (**Annexe 7**).

➤ **Séquençage de nouvelle génération pour la recherche des mutations ponctuelles.**

Des mutations ponctuelles dans l'ADN génomique ont été détectées par le séquençage de nouvelle génération (NGS) en utilisant le test DMD MASTR (Multiplicom) pour seulement les patients montrant des résultats négatifs pour les délétions et les duplications par les deux méthodes précédentes. Les échantillons ont été analysés sur MiSeq (Illumina) et les données ont été analysées à l'aide du pipeline Sophia Genetics. Toutes les variants détectés ont été confirmés par séquençage Sanger (**Annexe 7**).

4.7 Bases de données et confirmations des mutations dans le gène DMD

Toutes les mutations enregistrées dans cette étude ont été vérifiées selon les normes établies par la Human Genome Variation Society (HGVS, www.hgvs.org), les pages de Leiden Muscular Dystrophy (<http://www.dmd.nl>), Leiden Open Variation Base de données 3.0 (<http://www.lovd.nl/3.0/home>) et UMD-DMD (<http://www.umd.be/DMD/>).

5. Analyses statistiques

Les données ont été analysées à l'aide du logiciel SPSS 24.0 (IBM, Armonk, NY, États-Unis). Le Microsoft Excel 2013 (Microsoft, Redmond, Washington, DC, États-Unis) a également été utilisé pour tracer des informations.

- Les variables qualitatives étaient obtenues par estimation de la fréquence en pourcentage tandis que les variables quantitatives ont été exprimées en moyennes et médianes.
- Analyse Bi variées :
 - Test Khi-deux de Pearson pour la comparaison des pourcentages
 - Test de Wilcoxon- Mann-Whitney pour la comparaison des moyennes

RESULTATS

Au total, nous avons analysé le phénotype et le génotype de 102 patients appartenant à 83 familles de phénotypes DMD/BMD, tous originaires de l'Est de l'Algérie.

La base génétique du diagnostic a été établie pour tous les patients ; 102 garçons de 83 familles. Afin d'éviter une présentation asymétrique des variations du génotype, un seul patient de chaque famille a été inclus dans l'analyse du génotype.

- 1) les cas qui ont des dossiers et des fiches de consultation ont tous été inclus dans l'analyse clinique, car il y avait des signes de variabilité phénotypique même chez les frères avec des mutations identiques.
- 2) Neuf patients ont été exclus de l'étude clinique en raison de l'absence d'informations et des données cliniques nécessaires dans leurs dossiers et leurs fiches de consultation.

1. Analyse phénotypique des patients

L'analyse génétique de l'ensemble des patients a permis de les répartir en 4 classes : soixante-quatre patients (77,1%) de phénotype Duchenne vingt-neuf (34,9%) de phénotype Becker, deux (2,4%) de phénotype intermédiaire. Les 7 derniers patients étaient classés «dystrophinopathie». Dans ces cas les technique de immunohistochimie et Western blot est indispensable pour confirmer le diagnostic, malheureusement nous ne l'avons pas fait, et cela est dû au manque de laboratoires spécialisés réalisant ces technologies en Algérie.

(Figure 12, Tableau 2).

Tableau 2 : répartition des patients selon le phénotype

Phénotype	N de patients	(%)
DMD	64	(62,74)
BMD	29	(28,43)
IMD	2	(1,96)
ND	7	(5,86)
Total	102	(100)

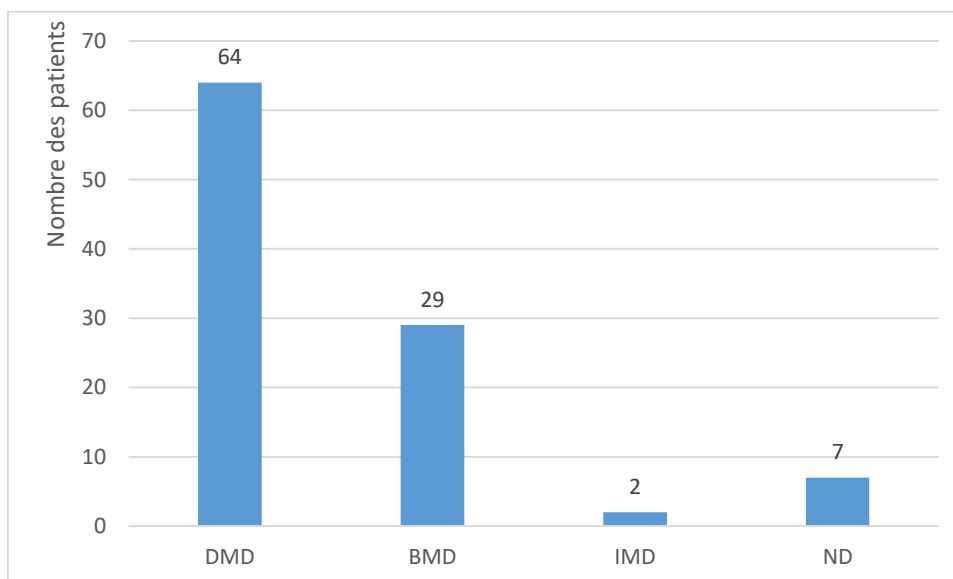


Figure 12. Répartition des patients selon le phénotype.

2. Résultats clinique et généalogique

2.1. Consanguinité

Le taux de consanguinité était de 32,87% (**Figure 13**).

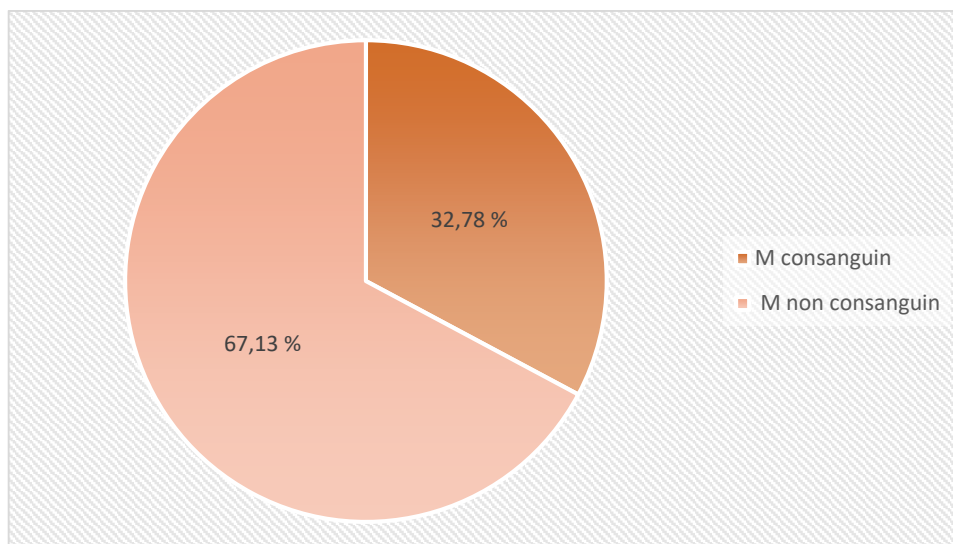


Figure 13. Répartition des familles selon la consanguinité

2.2. Antécédents familiaux

Les antécédents familiaux (les cas similaires dans la famille) sont retrouvés dans 28 familles (37,8%). Il s'agit d'un (ou plusieurs) frère(s) dans 22 (29,7%) famille, un (ou plusieurs) autre(s) homme (s) (cousins et oncles) dans 6 (8,1%) famille. Ces patients présentent les mêmes signes cliniques et présentaient un tableau clinique de type DMD ou BMD. Le nombre de cas sporadiques était de 45 soit 60,8% (**Figure 14**).

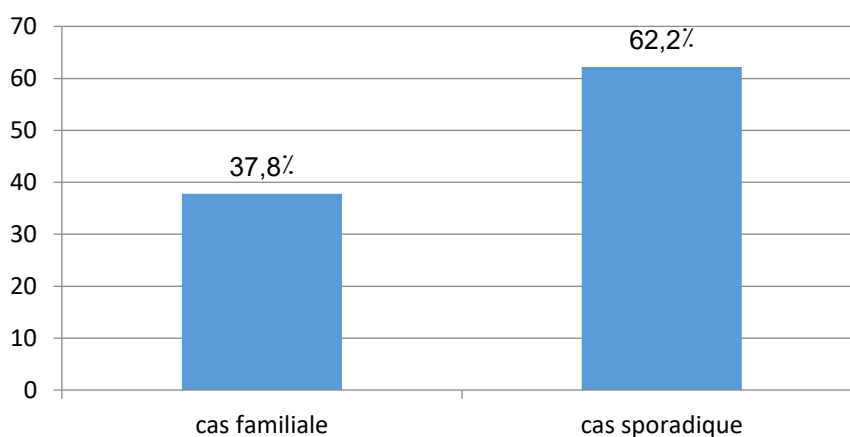


Figure 14. Répartition des familles selon le caractère familial ou sporadique

2.3. Age du diagnostic

L'âge du diagnostic correspond à l'âge où un médecin a pour la première fois évoqué le diagnostic de DMD sur des arguments cliniques et le dosage de CPK. Dans notre étude l'âge moyen du diagnostic était de 10 ans et 8 mois avec des extrêmes allant de 3 à 37 ans. Le diagnostic a été réalisé dans l'enfance, avant l'âge de 5 ans, chez 11 (11,8%) patients. Trente-deux patients (34,4%) ont été diagnostiqués entre l'âge de 5 et 10 ans (**Figure 15**).

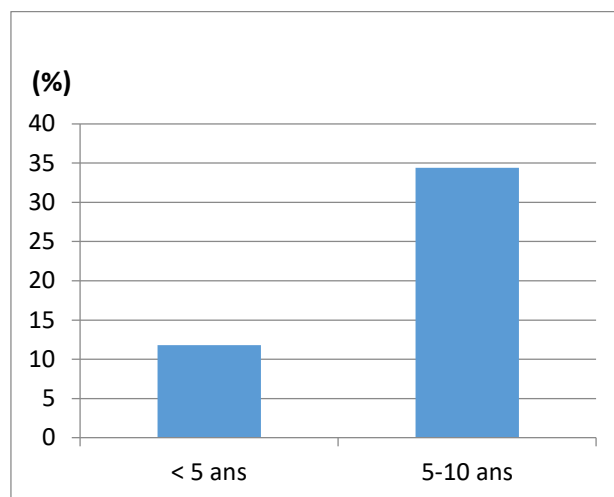


Figure 15. Répartition des cas selon l'âge du diagnostic

2.4. Age du premier signe clinique

L'âge du premier signe clinique correspond à l'âge où la famille déclare avoir remarqué pour la première fois des troubles chez l'enfant. Dans notre série les premiers signes cliniques sont apparus à l'âge moyen de 4 ans et 9 mois avec des extrêmes entre de 18 mois à 24 ans, il était avant l'âge de 5 ans chez 40 patients (43%) et à l'âge de 5 à 10 ans chez 36 patients (38,7%) (**Figure 16**).

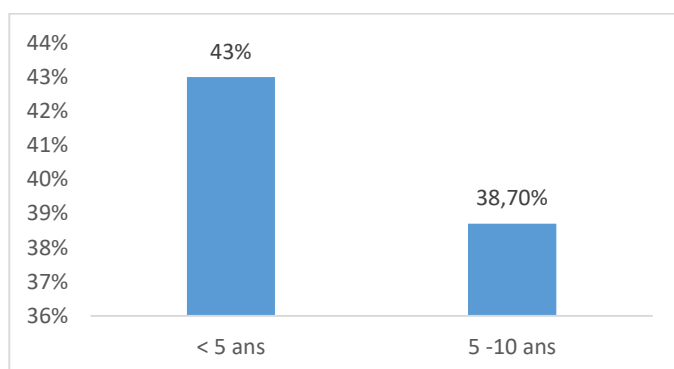


Figure 16. Répartition des cas selon l'âge de premier signe clinique

2.5. Signes de début

Dans notre cohorte, les premiers signes cliniques présentés par les patients sont le plus souvent liés au déficit moteur 78,4 %. Il s'agit le plus souvent de troubles de la marche, de difficultés à monter les escaliers, de signe de Gowers, de difficultés à courir. L'hypertrophie musculaire ou hyperckémie ont constitué le signe de début dans 4,3%. Autres signes d'atteinte motrice peuvent également être révélateur, comme le retard d'acquisition de la marche (4,3%) (Figure 17).

Chez nos patients, Il existe un retard d'acquisition de la marche (après l'âge de 18 mois) chez 34 (36,55%) de patients. Un retard d'acquisition du langage est signalé chez 6 (6,45%) des enfants de notre cohorte (figure 18).

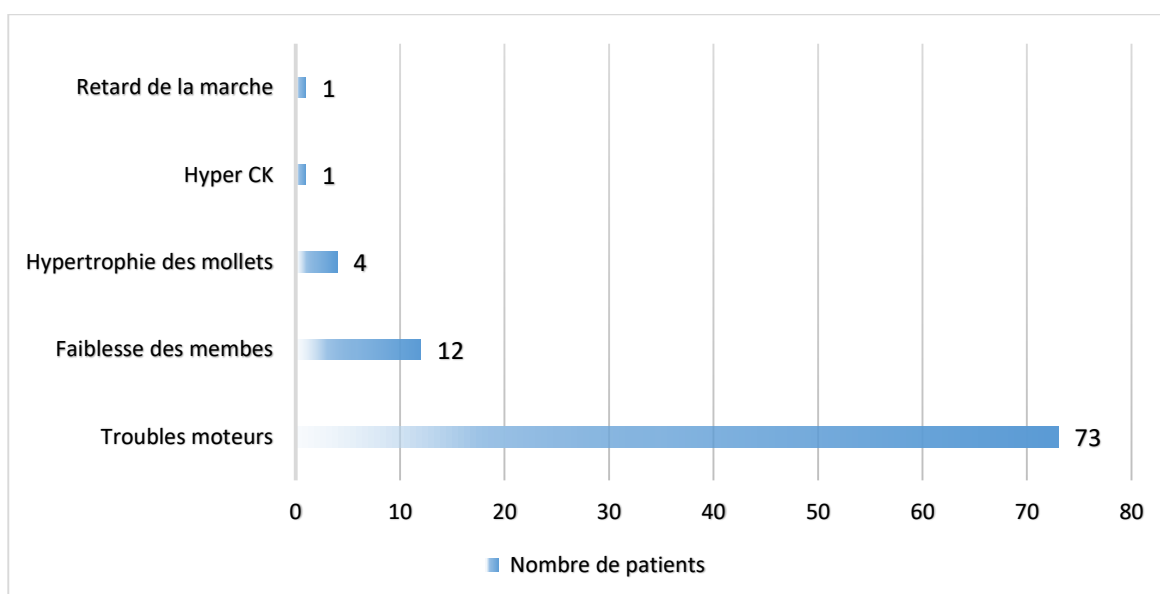


Figure 17. Répartition des patients selon les premiers signes cliniques.

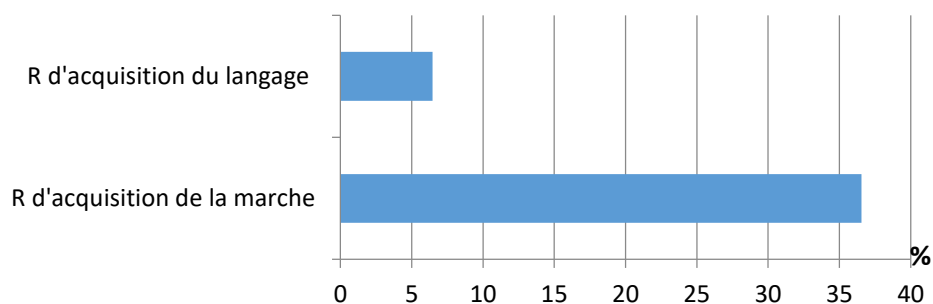


Figure 18 : Répartition des patients selon le développement psychomoteur.

2.6. Cardiomyopathies et atteinte respiratoire

L'échographie est l'examen non invasif de référence, permettant l'évaluation de la fonction cardiaque. Le diagnostic de cardiomyopathie a été retenu dans 14 cas (15%), à un âge de $12,64 \pm 8,07$ avec des extrêmes allant de 4 à 27 ans. Chez les patients DMD l'atteinte cardiaque a été notée chez 10 patients (15,6%) à un âge moyen de $8,9 \pm 4,5$. L'âge d'apparition de l'atteinte cardiaque chez les 3 patients BMD était tardif, après l'âge de 24 ans avec une moyenne de $25 \pm 2,5$. Chez les patients atteints de formes IMD, l'atteinte cardiaque a été notée chez un seul (**Figure 19**).

Les troubles ventilatoires détectés par le calcul de la capacité vitale respiratoire (CV) exprimée en pourcentage, ont été retrouvés chez 26 patients (27,95%). Il s'agissait de 10 patients DMD, huit (8) patients BMD et deux (2) patients IMD (**Figure 19**).

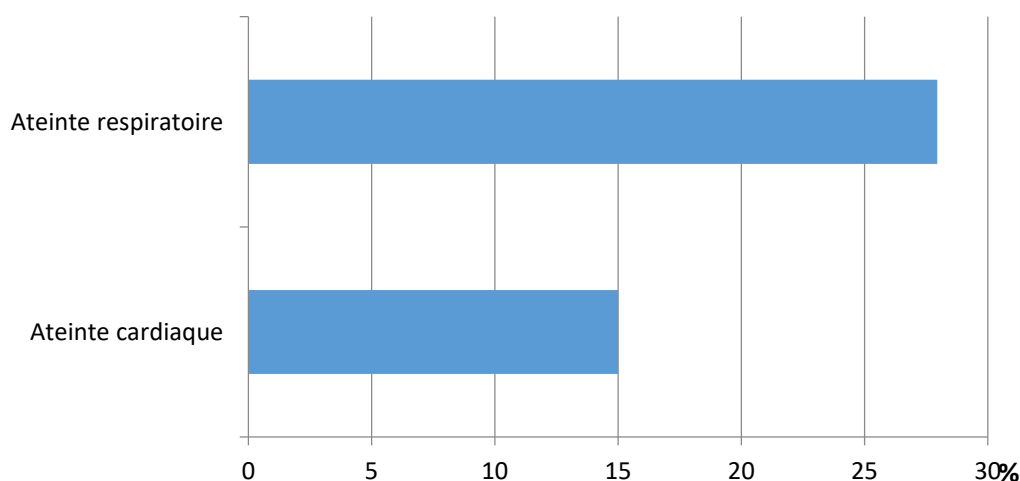


Figure 19. Répartition des patients selon l'atteinte respiratoire et cardiaque.

2.7. Examens neurologiques

L'examen clinique et l'évaluation fonctionnelle de la capacité motrice chez nos patients a montré dans tous les cas un déficit moteur particulièrement proximal que distal des 4 membres associé à une hypertrophie des mollets chez 77 patients (82,79%), à une macroglossie chez 36 patients (38,70%), à une hyperlordose chez 31 (33,33%). Les résultats montrent également que 11 patients (11,82%) ont développé une scoliose. Les rétractions musculotendineuses ont été détectées chez 39 patients (41,93%) à partir de l'âge de 10,2 ans avec des extrêmes allant de 4 –37 ans. Les contractures aux tendons d'Achille ont été trouvées

chez 11 patients (28,20%), aux chevilles 10 patients (25%). aux genoux chez 4 patients (10,25%) et des rétractions multiples ont été notées chez 14 patients (35,89%) (**Tableau 3, Figure 20 et 21**).

Tableau 3 Répartition des patients selon les résultats de l'examen neurologique.

	Nombre de patients	%
Déficit moteur proximal des 4 membres		100
Hypertrophie de mollets	77	82.79
Macroglossie	36	38.70
Hyperlordose	31	33.33
Scoliose	11	11.82
Contractures	39	41.93
genoux	4	10.25
tendons d'Achille	11	28.20
chevilles	10	25
diffusé	14	35.89

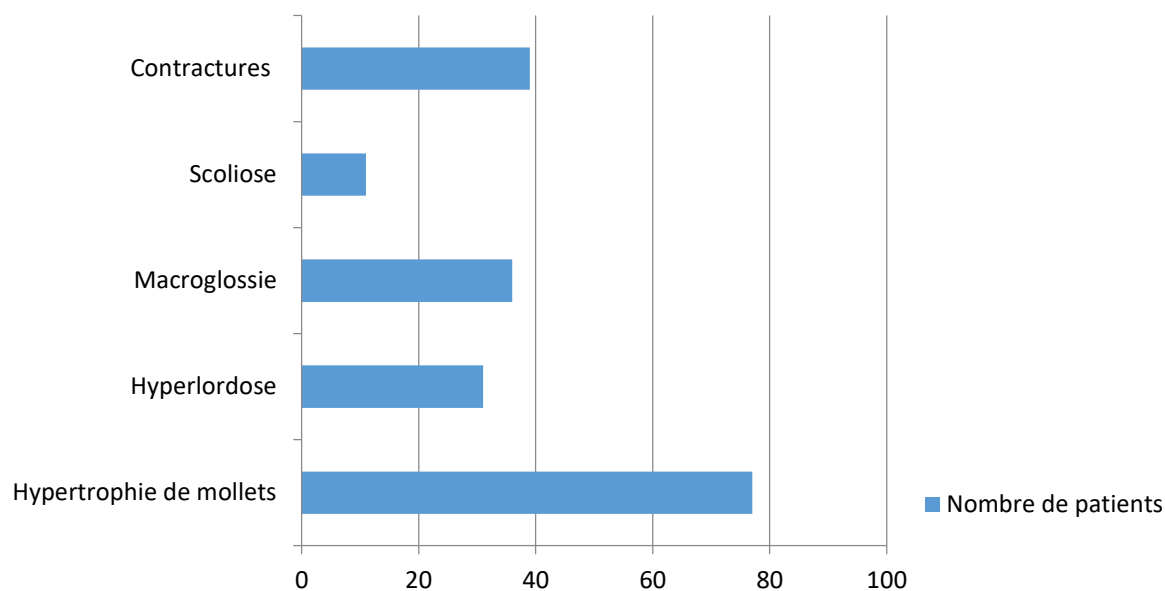


Figure 20. Répartition des patients selon les résultats de l'examen neurologique.

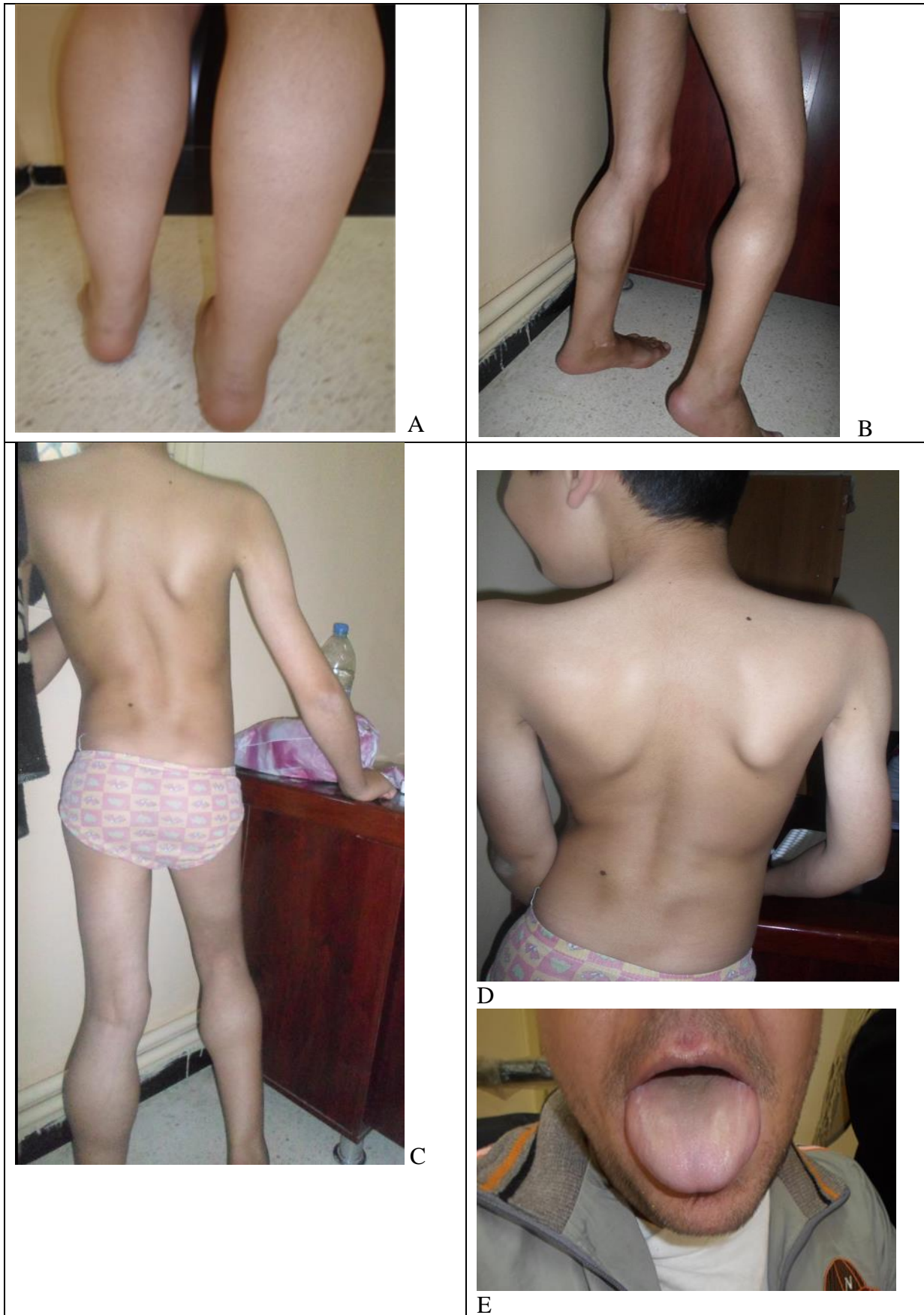


Figure 21. Signes cliniques observés chez nos patients ; A et B Hypertrophie des mollets, C et D scoliose et hyperlordose, E macroglossie

2.8. Perte de la marche et décès

La perte de la marche est un évènement important dans l'évolution des patients DMD/BMD, en effet 37 (39,78%) de nos patients ont perdu la marche, trente patients ont perdu la marche avant l'âge de 13 ans, deux patients entre l'âge de 13 et 16 ans et 5 après l'âge de 17 ans. Six patients marchent encore après l'âge de 17 ans (**figure 22**).

Le décès est survenu chez 4 patients, à un âge moyen de 16 ans, deux patients à l'âge de 18 ans, un patient à l'âge de 21 ans et un autre patient à un âge plus précoce (8 ans). Dans les 4 cas, le décès était secondaire à une insuffisance cardiaque ou respiratoire restrictive sévère.

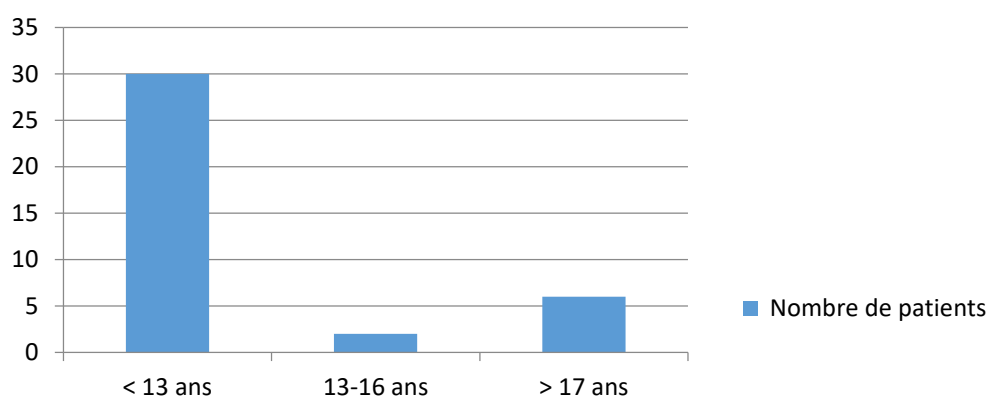


Figure 22. Répartition des patients selon l'âge de la perte de la marche

2.9 Corticothérapie

Sur l'ensemble de notre cohorte, une corticothérapie a été prescrite chez 28 patients (30%), dans l'objectif de retarder l'âge de la perte de la marche.

2 Résultats des examens complémentaires

3.1 Taux de créatine phosphokinase (CPK)

Le taux sérique des CPK est largement au-dessus de la normale chez la plupart de nos patients (94,6%), avec une moyenne de 5929 UI/litres avec des extrêmes allant 212 à 23370 UI/l, soit 3 à 123 fois la normale (seuil pathologique $\geq 190 - 300$ UI / litres selon les laboratoires). Cependant, Cinq patients ont des taux sérique de CPK normaux (**Figure 23**).

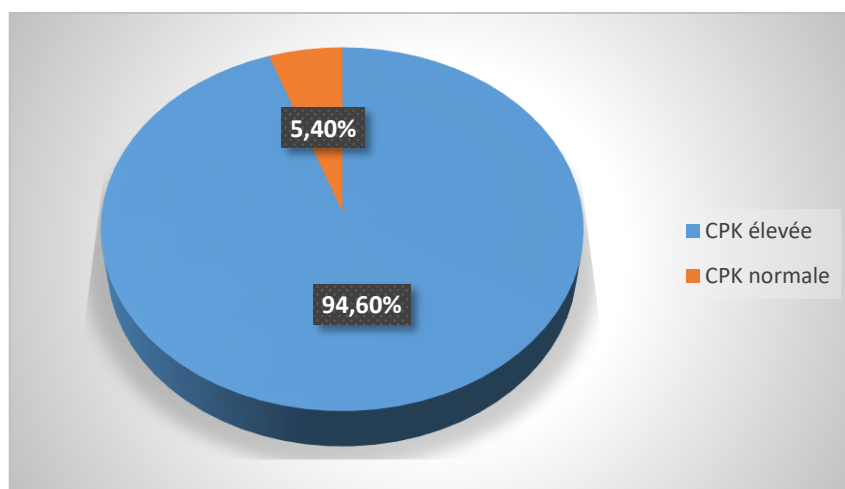


Figure 23. Répartitions des patients selon le résultat du dosage du CPK

3.2 Électroneuromyographie (ENMG)

Chez la totalité de nos patients, l'électromyogramme (EMG) était en faveur d'une atteinte musculaire avec des tracés riches en unités motrices et des potentiels polyphasiques de courte durée et de faible amplitude.

3.3 Biopsie musculaire

La biopsie musculaire a été réalisée chez seulement 9 patients. L'examen en microscopie montre un l'aspect dystrophique avec association à des degrés variables de nécrose, régénérations, fibrose et adipose des fibres musculaires.

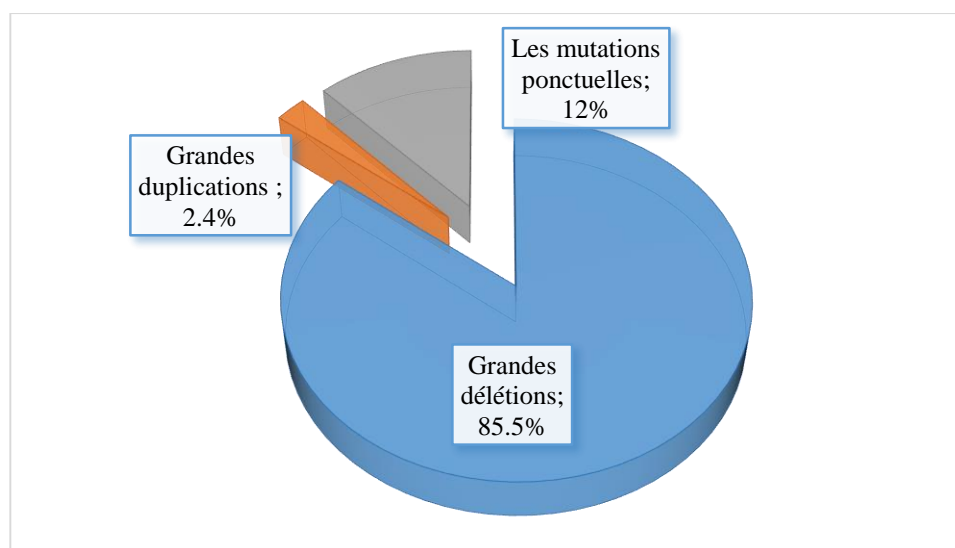
4 Résultats génétiques

Le diagnostic moléculaire des dystrophinopathies est complexe du fait de la taille du gène et la variété du type de mutations rencontrées (grandes délétions, duplications, mutations ponctuelles).

L'analyse moléculaire du gène DMD réalisée à l'aide des techniques mPCR, MLPA, PCR semi quantitative, PCR digitale et NGS a mis en évidence des délétions d'un ou plusieurs exons chez 71 patients (85,5%). Seuls 2 patients (2,4%) avaient des duplications et 10 patients (12%) avaient des mutations ponctuelles (**Figure 24 et Tableau 4**).

Tableau 4. Fréquence des mutations du gène DMD chez les patients

Type de mutation	Cas index n (%)
Grandes réarrangements	73 (87.9%)
Grandes délétions	71 (85.5%)
Grandes duplications	2 (2.4%)
Mutations ponctuelles	10 (12%)
Faux- sens	3
Non- sense	2
Site d'épissage	2
Insertion	1
Variation intronique	2

**Figure 24.** Distribution des mutations chez nos patients.

4.1 Analyse de grandes délétions et duplications

La combinaison de la PCR m décrite par **Chamberlain et al., (1988)** et **Beggs et al., (1990)** (**Figure 25**), la PCR semi quantitative, PCR digitale et la technique de MLPA pour l'analyse de 79 exons du gène DMD a permis de révéler la présence de réarrangements complexes dans le gène DMD (**figure 24**).

Les grands réarrangements (définis par une délétion ou une duplication touchant au moins un exon dans sa totalité) ont été retrouvés chez 73 patients, représentant 87.9% des mutations identifiées chez nos patients (**Tableau 4**). L'analyse des délétions chez les patients

a montré que leur nature était très hétérogène, en effet on a identifié 38 types de délétions, les plus fréquentes étaient les délétions isolée de l'exon 45, observées chez 7 patients (9.8%), suivies de délétions des exons 45-48 (7%). Les exons fréquemment ciblés par les délétions étaient les exons 48, 47, 46, 50 avec un nombre respectif de 29/71, 27/71, 26/71 et 25/71 fois, correspondant à des fréquences de délétions de 40.8%, 38%, 36.6% et 35.2% respectivement (**Figure 26**).

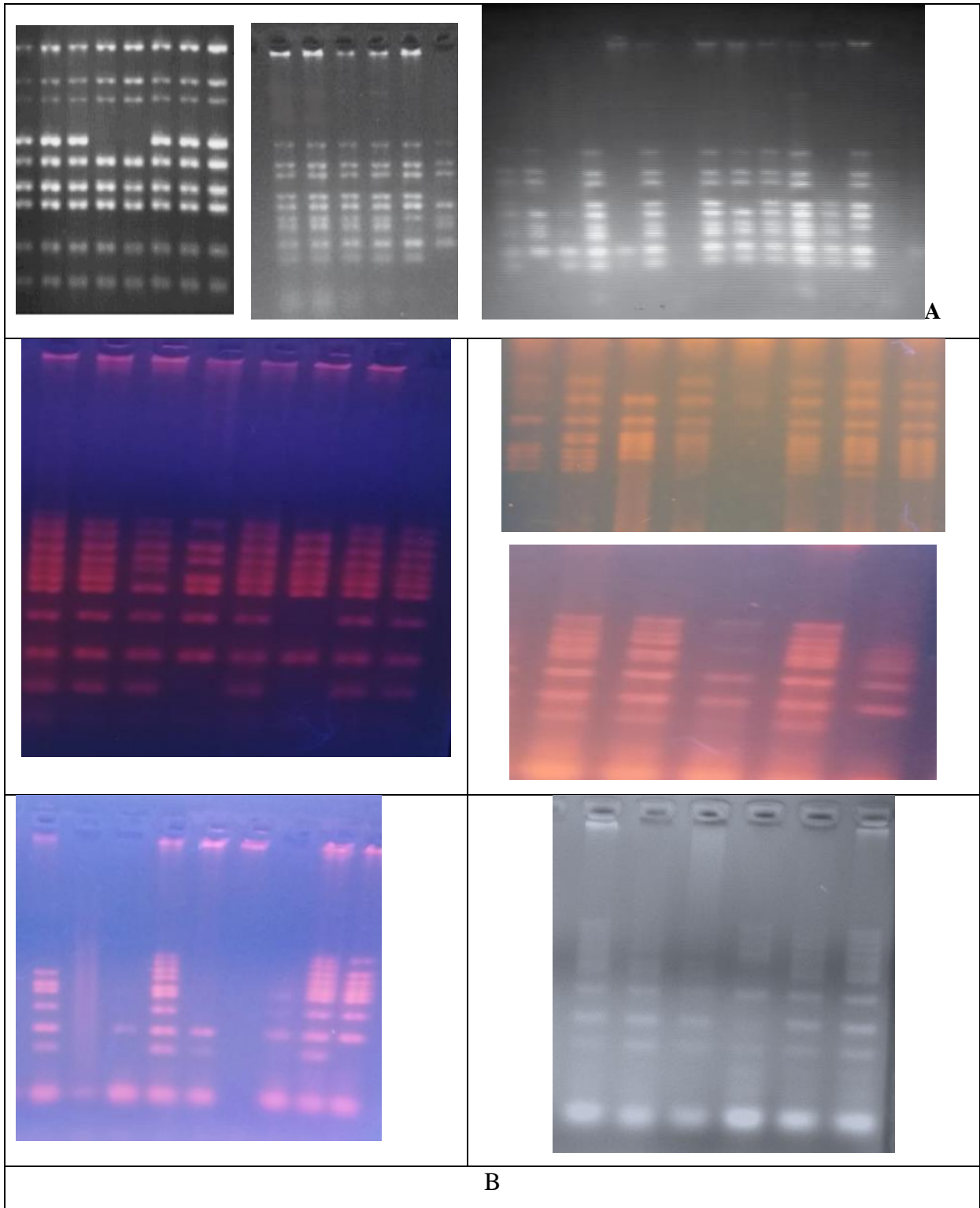
L'étendue des délétions varie de la délétion d'un seul exon jusqu'à un maximum de 50 exons (délétions allant de promoteur Pm 427 à l'exon 50). Elles sont répartir comme suit ;

- Délétion d'un exon unique présente chez 14 patients (19,71%) dont 50% avaient une délétion de l'exon 45.
- Délétions multiples d'exons présentes chez 57 patients (80,28%) dont (22,80%) ayant une délétion de 4 exons, suivi par l'absence de 3 exons 19,29% et 2 exons 17,54%.

La distribution des délétions au sein du gène n'est pas aléatoire (**Figure 26, Figure 27**). On distingue deux points chauds délétionnels, l'un distal (exons 45 à 55) et majoritaire regroupant 83% des délétions, et un second minoritaire situé dans la région proximale du gène (exons 2 à 20) où l'on retrouve 19,7% des délétions. L'atteinte en dehors de ces deux points chauds est rare. Deux patients présentaient une grande délétion couvrant les deux points chauds du gène *DMD*. De plus, la technique MLPA a permis de révéler la présence de deux cas de délétions non contiguës, l'une se trouvant dans les exons 35-37 et 40-43, et l'autre se trouvant dans l'exon 4 et l'exon 48.

Les résultats montrent également que la longueur de la région délétée dans le site proximale (point chaud proximal) était relativement importante, tandis que pour le site distal (point chaud distal) les délétions étaient de moins grande importance avec seulement 3-4 exons en moyenne.

Dans notre étude, les duplications ne représentaient que 2,4% des mutations, les deux localisées au début du gène *DMD*, l'une était une duplication de l'exon 2 et a donné lieu à un décalage de cadre de lecture, l'autre était une duplication des deux exons 3 et 4 mais sans effet (restauré) sur la phase de lecture (in frame).



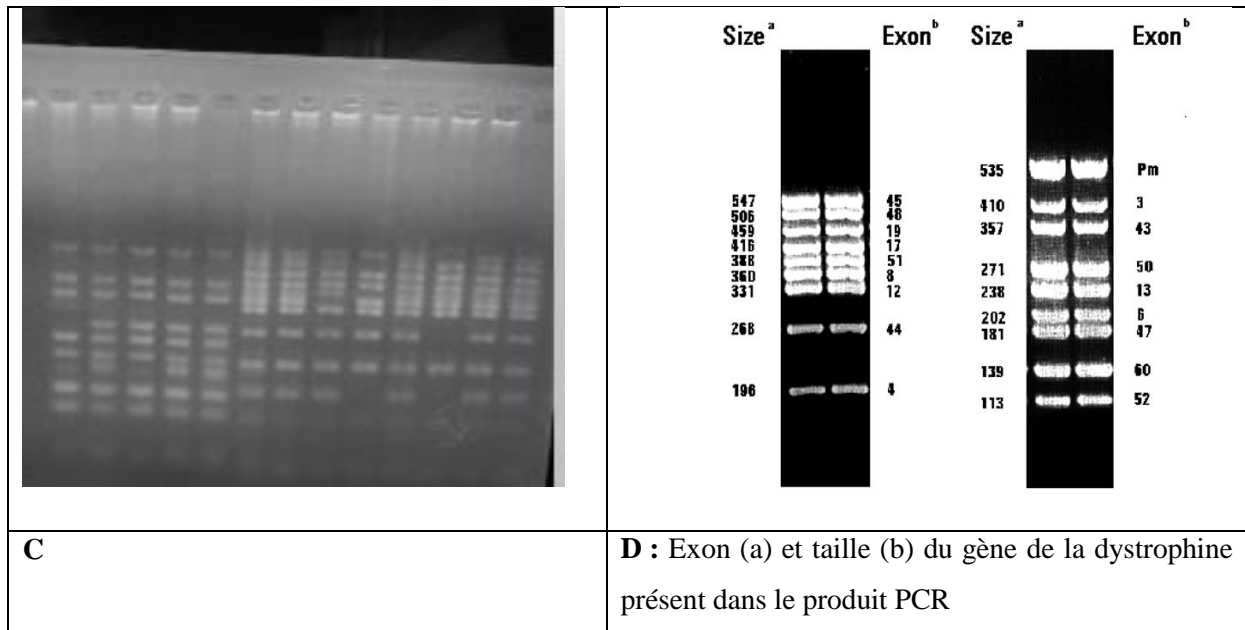


Figure 25. Identification des délétions dans le gène DMD par PCR multiplexe. (A) Analyse des exons 3, 43, 50, 13, 6, 47, 60, 52 et Pm (MIX II), (B) Analyse des exons 45, 48, 19, 17, 51, 8, 12, 44, 4 et 46 (MIX I). (C) Analyse des deux MIX I et MIX II. (D) Les exons fréquemment délétés amplifiés par PCR multiplex selon Chamberlain et Beggs dans le diagnostic de DMD/BMD (**Chamberlain et al., 1988 ; Beggs et al., 1990**).

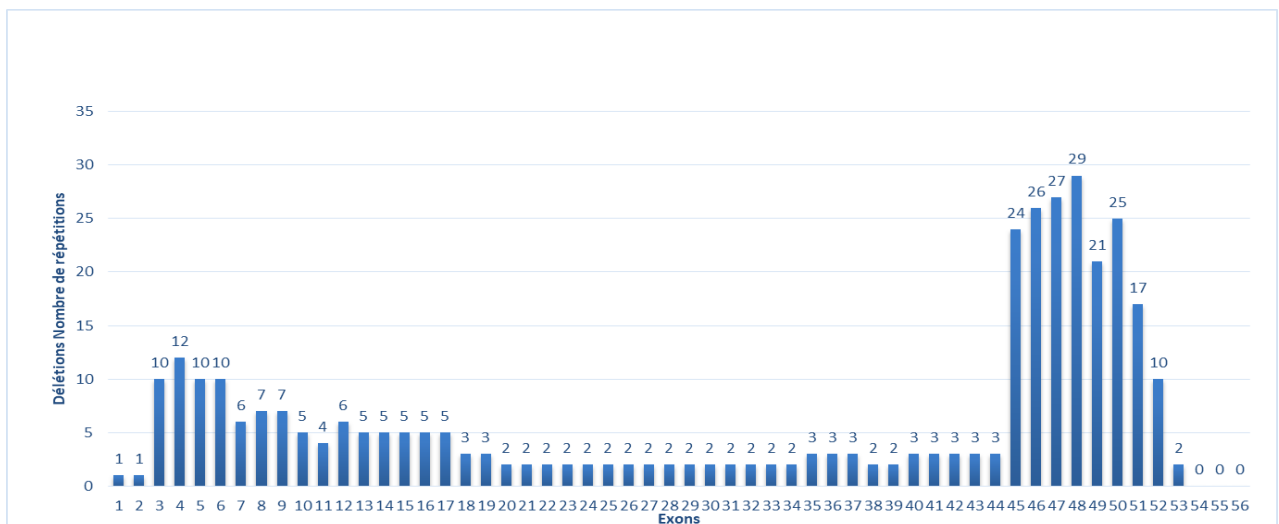


Figure 26. Fréquence des délétions chez nos patients

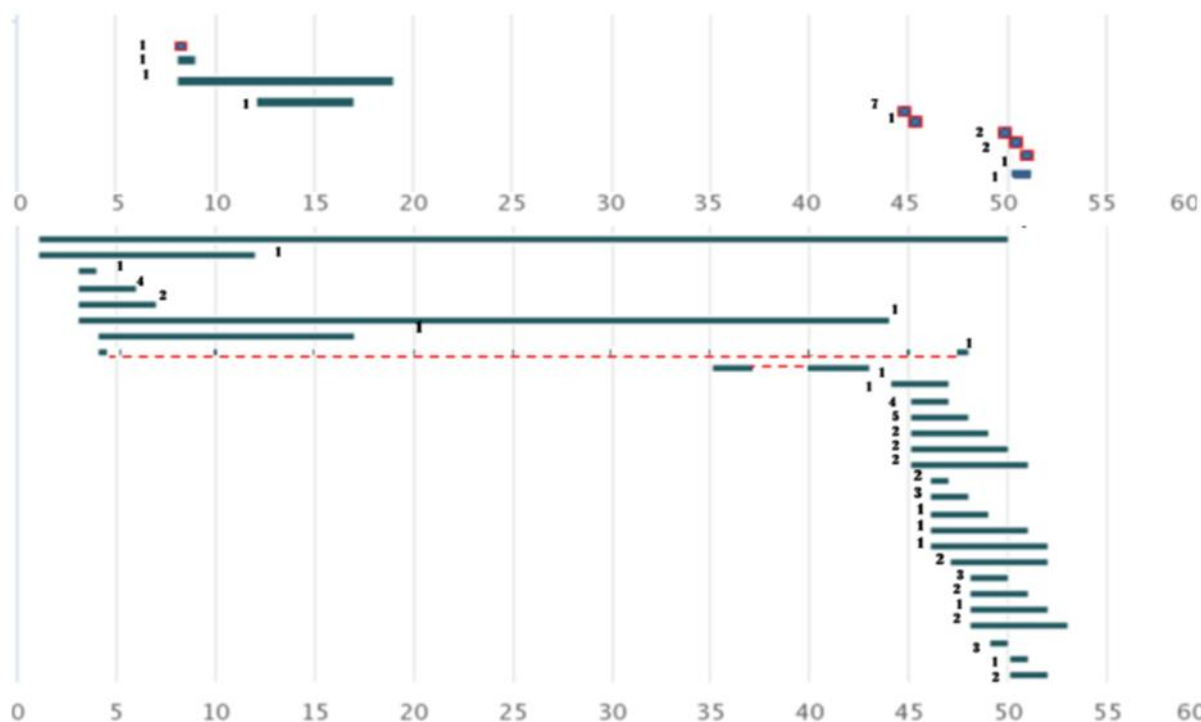


Figure 27. Représentation schématique de type de délétions retrouvées chez nos patients. Les exons délétés sont représentés par des barres horizontales. Le nombre à la fin de chaque barre représente le nombre de cas avec une délétion identique. Les délétions sont regroupées en deux points chauds : dans la région proximale du gène s'étendant des exons 2 à 20 et l'autre dans la région centrale s'étendant des exons 45 à 55.

4.2 Mutations ponctuelles

Les patients sans délétions et duplications ont été soumis à une analyse directe et complète de tous les exons par NGS pour la détection des mutations ponctuelles. Les résultats montraient que les mutations ponctuelles concernaient 10 patients (12%). Nous avons noté tous les types de mutations ponctuelles. Elles étaient réparties tout au long du gène, ce qui impose de cribler la totalité des 79 exons (soit 11kb de séquence codante) pour les identifier (**Tableau 5**).

Les mutations non-sens représentaient 20% des petites lésions. Il s'agissait dans tous les cas d'une transition, qui implique une substitution cytosine par une thymine (C→T). Les résultats montrent également la présence de 2 mutations de sites d'épissage (20%) situées dans les dinucléotides hautement conservés du site (site consensus) respectivement AG / GT des sites d'épissage naturels au niveau des introns 21 (c.2840+2A>C) et 65 (c.9563+1 G>T).

Les mutations faux-sens représentaient 30% de mutations ponctuelles, Elles sont localisées au niveau du domaine N-terminal de la dystrophine (aa 14 à 20 codés par les exons

2 à 8) impliqué dans la liaison avec l'actine-F, ou au niveau de la région C-terminale dans le domaine riche en cystéine (aa 3056 à 3408 codés par les exons 62 à 70), et notamment le domaine ZZ (exons 68 à 70) qui participe à l'interaction de la dystrophine avec le beta-dystroglycan (**Figure 1**). Dans la région C terminale, les mutations faux-sens sont principalement associées à un phénotype DMD.

L'étude des mutations montre la présence d'une insertion d'un nucléotide A dans l'exon 44. Cette duplication a produit un décalage de cadre de lecture (hors-phase ou frameshift) en position 6386 et a provoqué l'apparition d'un codon stop au codon 2130 (p.Thr2130AspfsX) dans le domaine distal du gène (**tableau 5**).

L'analyse par NGS a permis de détecter également des événements plus exceptionnels, tels que les variations introniques (20%) dans les introns 38 (c.5448+9G>T) et 58 (c.8668+26C>A).

4.3 Nouvelles mutations

L'analyse de la séquence de l'exon 39 a montré la présence d'une mutation faux-sens survenue au nucléotide 5464, il s'agit d'une substitution, G en A à la position 5464 (5464G>A), changeant l'acide aminé Gly en sérine (Gly1822Ser) dans le domaine centrale du gène au niveau de la répétition : R14 (liaison à l'actine - ABD2). Cette mutation nucléotidique a été la première décrite dans le cadre de cette étude et n'est pas connue dans les bases de données internationales (**Leiden data base** <http://www.dmd.nl/>). Cette variation serait en accord avec le phénotype BMD (**Tableau 5**).

L'analyse par MLPA a révélé un manque d'amplification des exons 35-37 et 40-43 correspondant à la délétion non contiguë c.4846-?_5325+?del et c.5587-?_6290+?del (délétion des exons 35-37 et 40-43) dans le gène *DMD*. Cette délétion cause un décalage du cadre de lecture (frameshift ou out of frame). En introduisant un codon stop prématuré dans le gène *DMD*. Ce génotype identifié est compatible avec le phénotype DMD.

Le NGS a révélé la variation hémizygote 5448 + 9G> T dans l'intron 38 du gène *DMD*. Cette variation intronique n'a pas été décrite auparavant dans les pages de la base de données Leiden sur la dystrophie musculaire (**Tableau 5**).

Tableau 5. Mutations ponctuelles identifiées chez nos patients.

N°	Age De début	Phenotype	Exon/ Intron	Modification nucléotidique	Type de mutation	Acide amine
1	24	BMD	E 9	c.883C>T	Nonsense	p.Arg295X
2	4	DMD	E 13	c.1594C>T	Nonsense	p.Gln 532X
3	11	BMD	E 39	c.5464G>A	Faux-sens*	p.Gly1822Ser
4	2	DMD	E 19	c.2378A>G	Faux-sens	p.Asn793Ser
5	11	BMD	E 6	c.503 C>A	Faux-sens	p.Ala168Asp
6	4	DMD	I 65	c.9563+1 G>T	Canonical splice site	/
7	3	DMD	E 44	c.6386dup A	Insertion (frameshfting)	p.Thr2130AspfsX5
8	3	-	I 58	c.8668+26C>A	Subdeepintronic variation	-
9	2	DMD	I 38	c.5448+9G>T	Subdeepintronic variation	-
10	5	DMD	I 21	c.2840+2A>C	Canonical splice site	-

* Nouvelles mutations non reportées dans la base Leiden Open Variation Database.

4.4 Corrélations phénotype/génotype (Tableau 6)

Dans notre série l'étendue de la délétion ou le nombre d'exons concernés est sans rapport avec la gravité de la maladie puisque de très grandes délétions peuvent être observées dans la forme modérée de type BMD, et qu'à l'inverse la délétion d'un seul exon peut entraîner une forme grave de type DMD, notamment la délétion de l'exon 45, délétion la plus fréquente chez les patients avec DMD.

Selon la règle de Monaco, nous avons observé 54 mutations out of frame (OF) et 26 mutations in frame (IF). Dans notre cohorte, la règle de Monaco s'est avérée justifiée appliquée à 98.7 %. Une exception de la règle a été notée chez un patient de phénotype DMD présentant une mutation qui maintient le cadre de lecture (in frame). Il s'agit d'une délétion des exons 8 – 19, cette mutation maintient le cadre de lecture, mais le patient présentait un phénotype DMD avec un âge de début à 3 ans, avec un retard de l'acquisition de la marche, un déficit moteur précoce (âge de 3 ans) et un âge de la perte de la marche à 8 ans. Ce patient a un frère

qui présente la même mutation mais la progression de la maladie est plus bénigne (marche encore à l'âge de 13 ans).

Tableau 6. Corrélation phénotype/génotype.

	DMD/IMD	BMD	<i>P</i> value
Nombre de patients	66	29	
Age moyen de début	4.19±1.71	7.27±4.98	0.001
Perte de la marche	48.5% (32)	17.2% (5)	0.004
Age de la perte de la marche	9,68 ± 2,52	23,4 ± 7,4	
Hypertrophie des mollets % (n)	81.8% (54)	68.9% (20)	0.164
Macroglossie % (n)	37.8% (25)	31% (9)	0.522
Scoliose % (n)	15.1% (10)	3.4% (1)	0.101
Hyperlordose % (n)	33.3% (22)	31% (9)	0.826
Rétractions musculo-tendineuses % (n)	43.9% (29)	31% (9)	0.237
Troubles respiratoire % (n)	18.1% (12)	27.5% (8)	0.300
Troubles cardiaque % (n)	16.6% (11)	10.3% (3)	0.423

(n) nombre des cas.

La comparaison clinique entre les 2 groupes de patients n'a montré aucune différence significative pour tout les paramètres cliniques ($P > 0.05$). Cependant, on remarque que l'âge de la perte de la marche est plus précoce dans le groupe DMD.

Discussion

Nous rapportons l'analyse phénotypique et génotypique de 102 patients de phénotype DMD/BMD appartenant à 83 familles toutes de l'Est Algérien avec une proportion majoritaire de la wilaya de Constantine.

1. Données phénotypiques

Trois formes cliniques ont été identifiées avec une proportion élevées de DMD (77.1 %), suivie de BMD (34.9%) et de IMD (2.4%) rejoignant ainsi les grandes séries de la littérature (**Bensghier, 2006 ; Mohammed et al. 2018 ; Elhawary et al.2018**).

1.1 Données cliniques

Dans notre étude, la plupart des patients ont signalé leurs premiers symptômes à un âge moyen de 4 ans et 9 mois avec des extrêmes allant de 1.8 à 24 ans (4.19 ± 1.72 ans chez les patients DMD et 7.27 ± 4.98 ans chez les patients BMD). L'âge moyen de diagnostic était de 10 ans et 8 mois et variait de 3 à 37 ans (8.88 ± 4.14 ans chez les patients DMD et 16.39 ± 7.99 chez les patients BMD). Dans une étude menée sur 68 enfants atteints de DMD nés en Autriche orientale, **Hauser et al. (1993)** ont rapporté un âge moyen de début des symptômes de 3,1 ans. Cependant **Dey et al. (2015)** ont rapportés que chez 80% des patients, l'âge des premiers symptômes est de 5 ans. Une autre étude réalisée sur 356 patients marocains de phénotype DMD/BMD a rapporté un âge moyen de début des signes à 5.53 ans tandis que l'âge de diagnostic était de 10,38 ans. Le délai de diagnostic de nos patients est de 4.80 ± 3.07 ans avec un retard de diagnostic de 4.35 ± 2.75 chez les patients DMD et 5.72 ± 3.02 chez les patients BMD. De nombreuses autres études ont également signalé de longs retards dans le diagnostic des DMD / BMD, avec un retard moyen compris entre 2 et 5 ans (**Araujo 2004 ; Soim et al., 2018**). Les données de la littérature, provenant de différents pays, montrent que l'âge moyen au diagnostic se situe toujours en moyenne entre 4,2 et 5 ans chez les patients DMD. Dans une étude italienne, l'âge moyen au moment du diagnostic était plus précoce de 41 mois (3,5 ans), environ 10 à 12 mois de moins que l'âge rapporté dans les autres études (**D'amico et al., 2017**).

La différence entre nos résultats et les données précédemment publiées est probablement liée au fait qu'en Italie par exemple, les tests sanguins, y compris les transaminases, et souvent les CPK, sont fréquemment dosés chez les enfants. Une fois que le niveau élevé de CPK est détecté, les garçons sont souvent référés directement à un centre de

soins spécialisé et cela explique probablement la durée plus courte pour atteindre le diagnostic dans ces cas. Même lorsque le signe de présentation était différent, comme des retards de la marche, les niveaux de CPK étaient la première et souvent la seule enquête effectuée par des médecins, et cela a rapidement conduit à l'enquête appropriée pour la DMD (**D'amico et al., 2017**). La réalisation d'un dosage sérique du taux de CPK a donc été proposée dans le bilan d'évaluation standard de retard psychomoteur chez les garçons, étant donné la simplicité et la rapidité de cet examen (**Essex et Roper, 2001 ; Cialfoni et al., 2009 ; Michalson et al., 2011**).

Il est intéressant de noter que dans notre cohorte, l'âge moyen au diagnostic des cas familiaux est inférieur à celui des cas sporadiques 31 mois (contre 41 mois dans les cas sporadiques). Cela pourrait refléter la détection précoce dans les familles du diagnostic d'un deuxième fils cadet atteint.

Dans notre étude, l'examen neurologique a mis en évidence dans tous les cas un déficit moteur des quatre membres à prédominance proximale, associé à une hypertrophie des mollets dans 82.79%. La scoliose est une complication fréquente de la DMD car les muscles du tronc s'affaiblissent, généralement après la perte de la marche. Nos résultats montrent que 11.82% des patients ont développé une scoliose. La scoliose peut être retardée par un ajustement approprié du fauteuil roulant ou un traitement stéroïdien. La correction chirurgicale de la scoliose peut améliorer la fonction respiratoire, la stabilité de la position assise dans le fauteuil roulant, la prévention des escarres et la qualité de vie (**Shapiro et al., 1992**). Pour cela, la consultation orthopédique annuelle est précieuse et vitale si la courbure vertébrale dépasse 20 degrés.

La répartition des différents signes de début dans notre cohorte est en conformité avec l'histoire et l'évolution naturelle des formes classiques de ces pathologies, il s'agit d'altération de la marche et des chutes répétitives aboutissant à la perte totale de la marche à moyen et long terme. Ces résultats sont semblables à ce qui sont décrits par plusieurs auteurs avec des fréquences plus ou moins variables (**Marshall et Galasko, 1995 ; Bushby et al., 1999 ; Mohammed et al., 2018 ; Araujo et al., 2004**). En effet le retard d'acquisition de la marche et ses difficultés constituaient les premières anomalies reconnues par les parents. De plus la fréquence relativement élevée du retard à la marche et du langage observés chez 43 % de nos patients, constituent des signes cliniques révélateurs de DMD/BMD. Motivant la réalisation systématique du dosage sérique des CPK, qui est indiqué dans le bilan d'évaluation standard du retard psychomoteur des garçons (**Bushby et al., 2010 ; D'amico et al., 2017**).

1.2 Données paracliniques

Au début de la maladie, le taux des CPK peut être extrêmement élevé, en raison de la lyse musculaire massive (**Fernandez et al., 2010**). Cependant, en fin d'évolution, lorsque le nombre de fibres musculaires restantes est faible et en raison de la grande involution fibroadipeuse, le taux des CPK est beaucoup plus faible (le taux de CPK diminue de 20% par an) (**Sifi, 2017**). Dans notre étude (94.6%) des patients avaient un taux de CPK élevé (jusqu'à 123 fois la normale).

L'EMG a été réalisé chez tous nos malades et a montré une atteinte musculaire. L'EMG reste un moyen de diagnostic non spécifique dans le diagnostic de DMD et BMD.

Ces résultats permettent de conclure que le dosage de la CPK est un examen permet de dépister toute affection musculaire quelle que soit son origine.

La biopsie musculaire reste très utile au diagnostic des DMD/BMD en l'absence de cas confirmés génotype par analyse génétique dans la famille. Elle fait partie des examens de première intention dans le diagnostic de beaucoup de maladies musculaires. La biopsie musculaire permet d'affirmer la dystrophie musculaire : c'est-à-dire l'association morphologique des lésions de nécrose (fibres pales à l'hématoxyline-eosinesafran), de régénération (fibres petites et basophiles) et d'une fibrose.

L'immunohistochimie et le Western blot possèdent une valeur diagnostique majeure pour la dystrophie musculaire de Duchenne et Becker, en particulier dans les cas où les tests de génétique moléculaire ne conduisent pas à un diagnostic définitif. En Algérie, le problème qui a limité notre étude et qui sert à retarder le diagnostic de DMD et BMD c'est le manque de structures adéquates pour la réalisation de ces examens, tandis que tous nos patients (9 patients) ont été réalisées à l'étranger.

Les manifestations cardiaques sont constantes après 20 ans (**Mertens et al., 2008 ; Sifi, 2017**). Elles sont identique dans toutes les formes de dystrophinopathies (DMD/BMD/IMD), seul le profil évolutif peut varier, ils sont présent chez environ 90% des patients DMD / BMD, Néanmoins, ne sont pas la cause de décès que chez 20% des patients DMD et 50% des patients BMD (**Finsterera, 2003**). Les manifestations cardiaques sont dominées par les cardiomyopathies dilatées (**Kamdar, 2016**). La cardiomyopathie doit être recherchée de manière biannuelle après l'âge de 10 ans. En effet elle affecte un tiers des patients à l'âge de 14 ans et est présente chez tous les patients de plus de 18 ans. Cependant,

une atteinte cardiaque préclinique est présente chez 25% des patients de moins de 6 ans (**Nigro et al., 1990, Kamdar, 2016**). Malgré la fréquence élevée de l'atteinte cardiaque, la plupart des garçons sont relativement asymptomatiques en raison de l'inactivité physique (**Yiu et al., 2015**). Une étude ayant porté sur 337 patients montre que 125 (37%) cas présentent une cardiomyopathie, elle est précoce, avant l'âge de 14 ans chez 33/125 (26,4%) patients, tardif après l'âge de 20 ans chez 32/125 (25,6%) patients (**Humbertclaude, 2011**). Nos résultats montrent un pourcentage faible de 15% de cardiopathies car nos enfants sont jeunes. Nos résultats sont en accord avec les données de la littérature dont celles de **Nouioua** à Alger (**2013**) qui a objectivé un pourcentage de 17.36% de cardiopathie (13/75 cas) (**Nouioua, 2013**).

L'insuffisance respiratoire chronique secondaire à une maladie pulmonaire restrictive est universelle chez tous les phénotypes DMD/IMD/BMD. Les troubles ventilatoires semblent corrélés avec l'âge puisque la capacité vitale augmente jusqu'à environ 12 ans, puis diminue de 4 à 8% par an chez les patients DMD (**McDonald et al., 2018**). Chez nos patients l'insuffisance respiratoire est de sévérité variable. Elle a été retrouvée dans 27.95% des cas et ayant entraîné le décès.

2. Données génétiques

2.1 Les antécédents familiaux et consanguinité

L'analyse de l'ensemble des arbres généalogique a indiqué dans tous les cas un mode de transmission récessif lié à l'X avec une fréquence de cas familiaux estimée à 37,8 % et de cas sporadique à 62,2 %.

Nos résultats ne concordent pas avec les données de la littérature qui estiment les cas sporadiques à environ 30 à 40%. Cependant, nos résultats tendent à se rapprocher à ceux de **Li et al. (2015)** avec un taux de cas familiaux de 23,1%. Il est à rappeler que les résultats d'une étude précédente réalisée par **Bensghier (2006)** sur des patients de l'Est Algérien ont montré une prévalence de cas familiaux de 61% contre 39% de cas sporadiques. La diminution du nombre de cas familiaux dans notre étude est probablement due à la connaissance et à la sensibilisation accrue des parents aux maladies génétiques.

Nous rappelons que les mutations de *novo* affectant le gène *DMD* demeurent fréquentes et devraient être intégrées dans le cadre de l'approche de dépistage qui viserait à cribler les mères porteuses conductrices dans notre population. Le taux de consanguinité dans notre étude était de 32,87 %, se rapprochant de la moyenne rapportée dans la population générale algérienne (38,3%) (**Enquête sur la consanguinité en Algérie, 2007**). Il est important de reconnaître que le pourcentage de la consanguinité reproduit dans notre étude se réfère uniquement aux relations qui remontent à la génération des grands-parents. Les mariages intrafamiliales entre couples apparentés comme cousins au deuxième degré ou plus proches représentent actuellement environ 20 à 50% de tous les mariages dans les pays arabes (**Hamamy et Bittels, 2010**), par exemple le taux global de consanguinité en Arabie Saoudite est de 57,7%, allant de 34 à 80,6% (**Mohammed et al., 2018**).

2.2 Analyse des mutations

L'analyse mutationnelle de nos patients a montré un taux de mutation relativement élevé avec un spectre de mutation extrêmement hétérogène. Cette forte hétérogénéité mutationnel est due à la taille énorme du gène *DMD* du fait de la présence de très grands introns. En effet le taux de délétion a été observé dans 71/83 familles (85,5%). Nos résultats sont similaires aux résultats d'**Abdelhady et al. (2019)**, qui ont mis en évidence un taux de délétion de 86% chez les patients saoudiens. Cependant, les résultats d'autres pays arabes ont rapporté un taux de délétions plus faible comparativement aux résultats de notre étude (**El**

kadri et al., 2020 ; El Sherif et al., 2007 ; Effet et al.,2002 ; Mohammed et al.,2018). En outre, d'autres études menées dans d'autres pays non arabes ont révélé un taux de délétion plus élevé chez leurs patients (**tableau 7**). Ceci pourrait être expliqué par de nombreux arguments, telle que la méthode d'analyse génétique car la majorité des études arabes n'utilisent que la méthode par PCRm qui n'explore que les 20 exons considérés comme point chauds nous rappelons l'étude égyptienne de El Sherif en 2007 (**El Sherif et al.,2007**) et **Effet en 2002 (Effet et al., 2002)**, ainsi que l'étude marocaine de Sbiti réalisée en 2002 (**Sbiti et al., 2002**). La différence dans les fréquences pourraient également être secondaire à la région géographique, à la race et à la taille de l'échantillon (**Li Y et al., 2016 ; Lee et al., 2012**), mais ces hypothèses devraient être confirmées par d'autres études détaillées.

Tableau 7. Fréquence de délétions, de duplications et des mutations ponctuelles des DMD/BMD dans le monde.

Pays	N patients	Délétion %	Duplication %	Mutations ponctuelles %
France Tuffery-Giraud et al., 2009	2046 DMD/BMD	68.6%	10.5%	22.7%
Singapour Tomar et al., 2019	140 DMD/BMD	65.5%	9.7%	21.4%
Japan Nakamura et al.,2013	1497 DMD/BMD	DMD/BMD 61.4% / 79%	DMD/BMD 13.6% / 4.8%	DMD/BMD 24.5% / 14.3%
India Manjunath et al., 2015	83 DMD/BMD	79.5%	7.2%	/
Spain Juan-Mateu et al., 2015	576 DMD/BMD	70.5%	11.1%	18.2%
Notre étude	73 DMD/BMD	83.5%	2.7%	13.7%
Chine				
Ma P et al., 2018	1042 DMD/BMD	72.2%	8.8%	18.9%
Wang D et al., 2019	70	75.8%	6.5%	17.7%
Kong X et al., 2019	1051	70.41%	8.28%	19.12%
Norway Annexstad EJ.,2019	94	64%	18%	18%

Contrairement aux données de la littérature telle que la base de données Leiden, base de données TREAT-NMD DMD Global, base de données UMD-DMD et d'autres études (**Elhawary et al., 2018 ; Ma et al., 2018 ; Vieitez et al., 2017**) nos résultats ont révélé un faible taux de duplications (2,7%),

Conformément aux études précédentes (**Zhao et al., 2018 ; Bladen et al., 2015**), nous avons noté une distribution non aléatoire des grandes délétions. En effet elles étaient regroupées en deux régions du gène ; hotspots, dans la région proximale (19,7%) et 83% dans la région distale du gène. De nombreuses études ont montré que les délétions dans le gène DMD étaient plus susceptibles d'être dans le point chaud distal, mais les duplications se produisaient le plus souvent près de l'extrémité 5' du gène (**Mohammed et al., 2018 ; Takeshima et al., 2010**).

Dans notre échantillon, les délétions d'un seul exon représentaient 19,7% des cas. **Zhao et al. (2018), Vengalila et al. (2017) et Magri et al. (2011)** ont constaté que les délétions d'un seul exon du gène DMD constituaient 21,3%, 24%, 26% des cas respectivement. Dans notre travail, l'exon 45 a été l'exon unique le plus fréquemment délété, tandis que les exons 48, 47, 46 et 49 étaient globalement les plus fréquemment affectés par les délétions. Parmi les délétions multiexons observées, les délétions des exons 48-50 et des exons 45-47 étaient les plus fréquemment impliquées. Le dépistage d'un panel égyptien a rapporté les mêmes résultats, identifiant la délétion de l'exon 45 comme la plus récurrente (**Elhawary et al., 2004**). Dans une étude récente réalisée chez les patients Marocains, il a été montré que la délétion de l'exon 50 est la plus fréquente suivie par la délétion de l'exon 48 (**El kadri et al., 2020**).

L'analyse des séries Indiennes a révélé que les délétions d'exons uniques les plus fréquentes impliquaient sont celles des exons 45 et 51 (**Vengalila et al., 2017**). Une autre étude sur des patients chinois a indiqué que les délétions les plus fréquentes étaient celles de l'exon 45 et 51 (exons uniques) et 48-50 (multi exon 6,25%), l'exon 47 et l'exon 50 étant les exons les plus fréquemment affectés par les délétions suivis de l'exon 48 (**Zhao et al., 2018**). Nos résultats se rapprochent de ces données.

Dans notre cohorte, les mutations ponctuelles ont été observées chez 12 % des patients ce qui est en accord avec d'autres rapports d'études, ces mutations étaient uniformément réparties sur toute la longueur du gène *DMD* (**Vieitez et al., 2017 ; Magri et al., 2011**).

Dans notre série, plusieurs types de petites mutations ont été objectivées ; comme les mutations non sens, les mutations faux sens, petites insertions qui provoquent un décalage de cadre de lecture, les mutations du site d'épissage qui entraînent un saut d'exon ou une activation du sites d'épissage cryptiques (**Juan-Mateu et al., 2013**). Étant donné que, l'exon pour lequel le site d'épissage accepteur ou donneur est muté ne sera plus reconnu par la machinerie d'épissage, conduisant à l'exclusion de l'exon de l'ARNm (**Juan-Mateu et al., 2013**).

Nous avons également identifié deux mutations introniques dans l'intron 58 et l'intron 38 ; ces variations doivent être confirmées par analyse de transcription et par analyse de contrôles normaux. Récemment, il a été démontré que des mutations introniques profondes peuvent conduire à la reconnaissance d'une région intronique comme exon par la machinerie d'épissage (cryptique ou pseudo-exons) conduisant à son inclusion dans l'ARNm (**Zaum et al., 2017**).

3. Corrélations phénotype / génotype

La règle de Monaco décrit en 1988 (**Monaco, 1988**) a montré que le phénotype de dystrophinopathies n'était pas corrélé à la taille de la délétion mais à la conséquence de la délétion sur le cadre de lecture, les mutations qui maintiennent un cadre ouvert de lecture dans le transcrit muté permettent la synthèse en quantité normale ou réduite d'une dystrophine tronquée partiellement fonctionnelle, ceci conduit à un phénotype plus modéré de type Becker. Cependant, dans le phénotype DMD, les mutations perturbant le cadre de lecture donnaient un ARN instable et la production d'un niveau presque indétectable de dystrophine tronquée (**Annexstad et al., 2019**). Dans notre étude, nous avons observé 54 mutations hors cadre de lecture et 26 mutations en cadre de lecture. Dans notre cohorte la règle de Monaco s'est appliquée à 98.7 % des mutations DMD /BMD. Nos résultats soutiennent également les conclusions selon lesquelles le phénotype final dépend de la préservation du cadre de lecture ouvert plutôt que de la taille de duplication ou de délétion. Des exceptions à la règle du cadre de lecture ont été signalées et expliquée par certaines délétions qui ne modifient pas le cadre de lecture mais touchent les domaines fonctionnels de la dystrophine tel que les domaines de liaison à l'actine N-terminal ou le domaine riche en Cys affectant la liaison de la dystrophine à la F-actine ou au β -dystroglycane, respectivement, ce qui altérerait gravement la fonctionnalité de cette protéine (**Juan Mateu et al., 2015 ; LeRumeur, 2015**). D'autres auteurs montrent que les exceptions à la règle du cadre de lecture peuvent en grande partie

être expliquées par l'effet de la seconde mutation somatique ou d'autres mécanismes post-transcriptionnels tels que : décalage du cadre ribosomal, promoteur cryptique, épissage alterné et édition d'ARN qui peuvent modifier l'impact d'une mutation sur l'expression du transcrit muté du gène, la majorité de ces mécanismes conduisant à la maintenir le cadre de lecture (**Winnard et al., 1993 ; Gangopadhyay et al., 1992**). D'autres raisons possibles de corrélations discordantes génotype – phénotype incluent les duplications en tandem ou la présence de points de rupture de délétion sur les exons eux-mêmes (**Tomar et al., 2019**).

Dans cette étude une exception de la règle est notée chez un patient DMD présentant une mutation qui maintient le cadre de lecture, il s'agit d'un patient avec une délétion 9-18. Une explication possible de cette divergence de la délétion des exons 3-44 est que les délétions dans le cadre à l'extrémité 5' du gène qui code pour l'extrémité N-terminale de la dystrophine, y compris le domaine de liaison à l'actine, ainsi que celles comprenant à la fois le domaine N-terminal et le domaine central est connu pour être associé à un phénotype plus sévère semblable à la DMD. Nos résultats concordent avec de nombreuses études précédentes où des exceptions à la règle du cadre de lecture ont été signalées (**Aartsma-Rus et al., 2016 ; Tomar et al., 2020**).

Les mutations non-sens ajoutent un signal d'arrêt prématuré qui empêche toute traduction ultérieure du gène *DMD*, aboutissant généralement à un allèle nul et sont généralement associées au phénotype DMD. Cependant, dans notre étude, un cas de mutation non-sens a provoqué le phénotype BMD. Cette observation a été également rapportée par d'autres chercheurs, qui ont identifié que les mutations non-sens qui provoquent le phénotype BMD étaient probablement en rapport avec un saut d'exon. Ces auteurs confirmant que les mutations non-sens qui affectent le site d'initiation de l'exon (la perturbation critique de l'ESE « exonic splicing enhancer motifs » ou la création de l'ESS « Exonic Splicing Silencer motifs » peuvent jouer un rôle significatif dans la détermination du phénotype (**Flanigan et al., 2011 ; Juan-Mateu et al., 2013 ; Okibo et al., 2020**).

Une grande étude ayant porté sur 2593 patients, montre une distribution non aléatoire des mutations associées à la BMD au sein d'exons sélectionnés et que la position de mutation nonsense peut être prédictive du phénotype (**Torella et al., 2020**). L'analyse des données de l'étude de **Torella et al.**, a montré que certaines mutations non-sens dans les extrémités 5' et 3' du gène provoquent un phénotype BMD et que les mutations dans les exons adjacents dans la partie centrale du gène, avaient des conséquences phénotypiques complètement différentes. Par exemple : les mutations non-sens dans les exons 25, 31, 37 et 38 provoquent la BMD,

tandis que les mutations qui touchent les exons 30, 32, 34 et 36 provoquent un phénotype DMD (Torella et al., 2020).

En théorie, les mutations faux-sens n'affectent pas l'hypothèse du décalage de cadre de lecture et sont associées au phénotype Becker. Tandis que trois mutations faux-sens distinctes ont été identifiées chez nos patients de phénotype DMD : une localisée dans le domaine ABD (domaine de liaison à l'actine) et deux dans le domaine CRD de la protéine. Des rapports antérieurs ont montré que les mutations faux-sens dans le domaine de liaison à l'actine de la dystrophine (la région N-terminale), induisaient une instabilité thermodynamique des molécules de dystrophine et une agrégation de protéines (Deburgrave et al., 2007). De plus, Henderson et al. (2010) ont démontré que la mutation faux-sens p.Ala168Asp et d'autres mutations localisées dans CH2 (domaine ABD), associées à la BMD, augmentaient l'agrégation et la dénaturation des protéines sans altérer l'affinité de liaison à l'actine.

D'autres études biologiques sont nécessaires pour clarifier la base sous-jacente aux phénotypes inattendus chez nos patients.

4. Thérapie

Ces dernières années ont vu le développement de nombreuses thérapies spécifiques de mutation afin de restaurer la production de protéines de dystrophine. Ces thérapies comprennent des stratégies de saut d'exon, d'arrêt de lecture de codons et de modulateurs d'utrophine.

Le ciblage des exons 8, 43, 45,46, 50, 51, 52, 53 et 55 individuellement a été prédit pour aider à sauver le cadre de lecture chez les patients atteints de DMD. Nous avons trouvé que 43,6% (31/71) des patients dystrophinopathiques algériens porteurs de délétions étaient éligibles pour interventions thérapeutiques ciblant le saut d'exon 43, 46, 51, 53 et 45 (Tableau 8)

Il convient également de noter qu'une proportion importante de nos patients, c'est-à-dire 4.9 % avec des mutations non-sens, pourraient potentiellement bénéficier de thérapies de translecture des codons stops utilisant des composés à petites molécules comme Ataluren ou Translarna TM (PTC Therapeutics, États-Unis). Ataluren avait une activité clinique et un profil de sécurité favorable et représentait une avancée importante dans le traitement personnalisé et génétique des mutations non-sens (Bushby et al., 2014 ; Muntoni et al., 2019 ; Gogou et al., 2020).

Tableau 8 L'applicabilité du saut thérapeutique de l'exon 43, de l'exon 55, de l'exon 46, de l'exon 51 et de l'exon 53 pour les patients atteints de DMD avec mutation de délétion

Saut d'exon	Nombre de patients	applicabilité de Thérapie (%)
Exon 43	1	1.4 %
Exon 45	7	9.8 %
Exon 46	7	9.8 %
Exon 51	10	14 %
Exon 53	6	8.4 %

Conclusion et Perspectives

La dystrophie musculaire de Duchenne et de Becker (DMD/BMD) sont secondaires à une anomalie quantitative ou qualitative de dystrophine codée par le gène DMD. Il est localisé sur le bras court du chromosome X en Xp21 de transmission récessifs liés à l'X. Elles affectent 1/4000 garçons dans le monde. Les garçons DMD sont généralement affectés par des mutations hors cadre qui n'entraînent aucune production de dystrophine, tandis que les garçons qui souffrent de BMD sont généralement affectés par des mutations en phase qui se traduisent par de faibles quantités de dystrophine partiellement fonctionnelle.

L'analyse histochimique, le western blot de la dystrophine du gène DMD permettent de confirmer définitivement le diagnostic de dystrophinopathies et de différencier la DMD de la BMD dans la plupart des cas

Les résultats de notre étude, sont classiques et corroborent les grandes séries mondiales rapportées dans la littérature en termes de symptômes initiaux, d'âge de la perte de la marche et d'atteinte cardiaque et respiratoire.

La recherche des mutations dans le gène DMD par les trois techniques ; PCRm, MLPA et NGS, a permis de poser un diagnostic direct de DMD/BMD chez nos patients.

- la technique de PCR multiplex : reste une bonne stratégie de première ligne dans le système de santé publique avec un bon rapport coût / bénéfice
- Le MLPA, PCR multiplex semi quantitative et la PCR digitale soit des techniques sensiblent pour la détection des mutations et particulièrement les délétions et les duplications.
- la stratégie NGS ciblée utilisant différentes plates-formes qui avérée être un test particulièrement utile et plus précis pour diagnostiquer les dystrophinopathies grâce à la détection du spectre de mutation du gène DMD malgré sa grande taille. Il présente les avantages d'un débit élevé, de données abondantes et d'un temps d'analyse réduit par rapport aux méthodes de criblage conventionnelles.

L'analyse moléculaire montre qu'il existe une grande hétérogénéité mutationnelle dans le gène DMD chez nos patients et que les délétions constituent le groupe majoritaire avec un taux de 85.5%. De plus les résultats ont permis de conclure que les délétions avaient une distribution non aléatoire et sont concentrée dans deux régions (points chauds), la première de l'exon 44 à 53 (région distale) avec un pourcentage de 81%, la deuxième se situe entre l'exon 1 et 20 (région proximale) avec un pourcentage de 12%.

Nous avons pu souligner que ni le type de mutation (délétion, duplication ou mutation ponctuelle) ni la taille de délétion ne pouvaient à eux seuls rendre compte de la variabilité du phénotype DMD ou BMD ou d'une quelconque corrélation phénotype / génotype. Cependant la recherche a permis d'établir des liens étroits entre l'anomalie moléculaire et le tableau clinique (hypothèse de Monaco). Selon cette hypothèse, les délétions perturbant le cadre de lecture entraînant un phénotype sévère (DMD) alors que les délétions respectant le cadre de lecture, entraînerait un phénotype Becker.

Les corticoïdes par voie générale en particulier la Prédnisolone et le Deflazacort semblent améliorer d'une manière transitoire les fonctions motrices et cardiaques. Plus récemment, les premiers essais cliniques réalisés chez l'être humain en utilisant les techniques du saut d'exon ou de la translecture des codons stop semblent très encourageants. L'amélioration de la prise en charge de ces deux affections a fortement amélioré la qualité et l'espérance de vie des patients.

Nos perspectives sont nombreuses

- 1- Recruter un plus grand échantillon de patients
- 2- Participer à la mise en place des techniques génétiques gold standard dans le diagnostic des dystrophinopathies à savoir la MLPA et le NGS, surtout que l'Algérie fait partie des pays au monde ayant des taux de consanguinité élevés et donc un risque élevé de maladies héréditaires récessives. En plus, nous devons peut-être choisir de passer directement du PCRm au NGS malgré son exigence élevée pour un diagnostic génétique plus précis des dystrophinopathies. Dans le même temps, les prix des panneaux NGS et des consommables diminuent, devenant de plus en plus abordables. L'introduction de la technologie NGS et MLPA pour le diagnostic des dystrophinopathies a augmenté la détection des mutations du gène de la dystrophine chez les patients avec mPCR négatif et a réduit le délai d'exécution et le coût de plusieurs tests de diagnostic.
- 3- Participer à mettre en place des méthodologies alternatives telles que l'immunohistochimie et le Western blot pour la confirmation de diagnostic.
- 4- Participer à mettre en place un registre des dystrophinopathies à Constantine, ce registre recense les données cliniques et génétiques des patients atteints de dystrophie musculaire de Duchenne suivis en consultation pluridisciplinaire neuromusculaire en Algérie. L'établissement de registre est utile pour augmenter les connaissances sur les antécédents naturels de la maladie, pour le conseil génétique et pour le recrutement de

patients atteints de dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker dans des essais cliniques.

- 5- Participer à mettre en place une base de données génétique afin de répertorier toutes les mutations observées en Algérie.
- 6- Créer un réseau international dans le diagnostic des maladies neuromusculaires (MNM).

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

-A-

Aartsma-Rus A, Ginjaar IB, Bushby K. The importance of genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy. *J Med Genet.* 2016;53(3):145-51.

Aartsma-Rus A, Krieg A M. FDA Approves Eteplirsen for Duchenne Muscular Dystrophy: The Next Chapter in the Eteplirsen Saga. *Nucleic Acid Ther.* 2017; 27: 1–3.

Abdelhady A, Abdelhady S, Rashed H Patterns of Dystrophin Gene Deletion/Duplication in a Sample of Saudi Patients with Duchenne Muscular Dystrophy. *Biomedical Journals.* 2019 ;8:252. doi: 10.35248/2168-975X.19.8.252.

Abdullah M, Hassan A, Rashid S, Naeem M. Tyrosine phosphorylation as a regulator of dystrophin and beta-dystroglycan interaction: A molecular insight. *Journal of Molecular Graphics and Modelling.* 2020 ;99:107623. doi:10.1016/j.jmgm.2020.107623.

Ahn A H, Kunkel L M. Syntrophin binds to an alternatively spliced exon of dystrophin. *J. Cell Biol.* 1995 ;128: 363–371.

Allen D G, Whitehead N P, Froehner S C. Absence of Dystrophin Disrupts Skeletal Muscle Signaling: Roles of Ca²⁺, Reactive Oxygen Species, and Nitric Oxide in the Development of Muscular Dystrophy. *Physiol Rev.* 2016 ; 96 (1) :253–305.

Annexstad EJ, Fagerheim T, Holm I, Rasmussen M. Molecular and Clinical Characteristics of a National Cohort of Paediatric Duchenne Muscular Dystrophy Patients in Norway. *J Neuromuscul Dis.* 2019; 6(3):349-359. doi: 10.3233/JND-190402.

Araujo APdQC, Deco MCd, Kloh BdS, Costa MRd et al. Diagnosis delay of Duchenne Muscular Dystrophy. *Brazilian Journal of Mother and Child Health.* 2004; 4:179–83.

Archer SK, Garrod R, Hart N, Miller S. Dysphagia in Duchenne muscular dystrophy assessed by validated questionnaire. *Int J Lang Commun Disord.* 2013; 48: 240– 46.

Arechavala-Gomez V, Kinali M, Feng L, et al. Immunohistological intensity measurements as a tool to assess sarcolemma-associated protein expression. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2010; 36: 265– 274.

Asher DR, Thapa K, Dharia SD, Khan N, Potter RA, Rodino-Klapac LR, Mendell JR. Clinical development on the frontier: Gene therapy for duchenne muscular dystrophy. *Expert Opin Biol Ther.* 2020;20:263–274.

-B-

Becker PE, Kiener F. Eine neue X-chromosomale Muskeldystrophie. *Arch Psychiatr Nervenkr.* 1955; 193(4):427-428.

Beggs AH, Hoffman EP, Snyder JR, Arahata K, Specht L, Shapiro F, et al. Exploring the molecular basis for variability among patients with Becker muscular dystrophy: dystrophin gene and protein studies. *Am J Hum Genet* 1991;49(1):54-7.

Belanto, J.J., Mader, T.L., Eckhoff, M.D., Strandjord, D.M., Banks, G.B., Gardner, M.K., Lowe, D.A., and Ervasti, J.M. Microtubule binding distinguishes dystrophin from utrophin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2014;111, 5723–5728.

Bensghier Salima. Diagnostic moléculaire des dystrophinopathies (étude phénotypique et génotypique). Thèse Pour obtenir le grade de Magister en génétique. université constantine 1 2006.

Bladen CL, Salgado D, Monges S, Foncuberta ME, Kekou K, Kosma K, et al. The TREAT-NMD DMD Global Database: analysis of more than 7,000 Duchenne muscular dystrophy mutations. *Hum Mutat.* 2015;36(4):395-402. <https://doi.org/10.1002/humu.22758>.

Botstein D, R L White, M Skolnick, and R W Davis. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet.*1980; 32(3): 314–331.

Bourke JP, Bueser T, Quinlivan R. Interventions for preventing and treating cardiac complications in Duchenne and Becker muscular dystrophy and X-linked dilated cardiomyopathy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2018;10(10):CD009068. doi:10.1002/14651858.CD009068.

Brooke MH, Griggs R, & Mendel JR. Clinical trial in Duchenne dystrophy: The design of the protocol. *Muscle and Nerve* 1981;4:186– 197.

Bushby K M , M Thambyayah, D Gardner-Medwi .Prevalence and incidence of Becker muscular dystrophy. *Lancet.*1991 27;337(8748):1022-4. doi: 10.1016/0140-6736(91)92671-n PMID: 1673177.

Bushby K M, A Hill, J G Steele. Failure of early diagnosis in symptomatic Duchenne muscular dystrophy *Lancet.*1999: 353(9152):557-8 DOI: 10.1016/s0140-6736(98)05279-9

Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol.* 2010;9(1):77-93.

Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: implementation of multidisciplinary care. *Lancet Neurol.* 2010 Feb;9(2):177-89.

Bushby K, Finkel R, Wong B, Barohn R, Campbell C, Comi GP, et al. Ataluren treatment of patients with nonsense mutation dystrophinopathy. *Muscle Nerve.* 2014;50(4):477-487. <https://doi.dog/10.1002/mus.24332>.

Byers TJ, Lidov H G W, Kunkel L M. An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve. *Nature Genet.*1993;4: 77–8

-C-

Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(23):11141-56.

Chiou M, Bach JR, Jethani L, Gallagher FM. Active lung volume recruitment to preserve vital capacity in Duchenne muscular dystrophy. *J Rehabil Med* 2017;49(1):49–53

Ciafaloni E, Fox DJ, Pandya S, Westfield CP, et al. Delayed diagnosis in duchenne muscular dystrophy: data from the Muscular Dystrophy Surveillance, Tracking, and Research Network (MD STARnet). *J Pediatr.* 2009; 155(3):380–5. [PubMed: 19394035].

Connolly Anne M, Julaine M, Florence Mary M, Cradock Kate Bushby Michelle. 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.* 2013
DOI:<https://doi.org/10.1016/j.nmd.2013.04.005>.

Constantin B. Dystrophin complex functions as a scaffold for signalling proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes.* 2014;1838(2):635–642.
doi:10.1016/j.bbamem.2013.08.023

Crisafulli S, Sultana J, Fontana A, Salvo F, Messina S, Trifirò G. Global epidemiology of Duchenne muscular dystrophy: an updated systematic review and meta-analysis. *Orphanet J Rare Dis.* 2020;15(1):141. Published 2020 Jun 5. doi:10.1186/s13023-020-01430-8.

-D-

D'Amico Adele, Catteruccia Michela, Baranello Giovanni, Politano Luisa, Govoni Alessandra, Previtali Stefano Carlo et al. Diagnosis of duchenne muscular dystrophy in italy in the last decade: critical issues and areas for improvements. *Neuromuscular Disorders.*2017; <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.nmd.2017.02.006>.

Deburgrave N, Daoud F, Llense S, Barbot JC, Recan D, Peccate C, et al. Protein and mRNA based phenotype-genotype correlations in DMD/BMD with point mutations and molecular basis for BMD with nonsense and frameshift mutations in the DMD gene. *Human Mutat.* 2007;28(2):183-95. <https://doi.dog/10.1002/humu.20422>.

Deconinck N et Dan B. Pathophysiology of duchenne muscular dystrophy: current hypotheses. *Pediatr Neurol.* 2007 ; 36(1) : 1–7.

Desguerre I. Atteinte cognitive dans la dystrophie musculaire de Duchenne. *Médecine thérapeutique pédiatrie* 2014 ;17(3) :156-159.

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. <https://doi.org/10.1007/s13312-015-0660-8>.

Dhillon S. Viltolarsen: First Approval. *Drugs* 2020; 80: 1027–1031.

Dominique Mias-Lucquin, Raphael Dos Santos Morais, Angélique Chéron, Mélanie Lagarrigue, Steve J. Winder, Thomas Chenuel, et al. How the central domain of dystrophin acts to bridge F-actin to sarcolemmal lipids. *Journal of Structural Biology*. 2020;209(1):107411, <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2019.107411>.

Dowling P, Murphy S, Zweyer M, Raucamp M, Swandulla D, Ohlendieck K. Emerging proteomic biomarkers of X-linked muscular dystrophy. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2019;19(8):739-755, doi:10.1080/14737159.2019.1648214.

D'Souza Vinita N, Nguyen thi Man, Glenn E Morris, Wolfram Karges, De-Ann M Pillers, Peter N. Ray. A novel dystrophin isoform is required for normal retinal electrophysiology. *Human Molecular Genetics*. 1995;4(5):837–842, <https://doi.org/10.1093/hmg/4.5.837>.

Dubowitz V. Mental retardation in Duchenne muscular dystrophy in pathogenesis of human muscular dystrophy LP Rowland (ed) *Excerpta-medica*, Amesterdan. 1977;688-698.

Duchenne GBA. Recherches sur la paralysie musculaire pseudo-hypertrophique ou paralysie myo-sclerosique. *Archives Generales de Medicine*. 1868 ;11: 5-25, 179-209, 305-321, 421-448, 552-588.

-E-

Ebashi S, Toyokura Y, Momoi H, Sugita H. High creatine phosphokinase activity of sera of progressive muscular dystrophy. *J Biochem*. 1959;46: 103–104.

Effat LK, El-Harouni AA, Amr KS, El-Minisi TI, Abdel Meguid N, El-Awady M. Screening of dystrophin gene deletions in Egyptian patients with DMD/BMD muscular dystrophies. *Dis Markers*. 2002;16(3-4):125-29.

El Sherif RM, Fahmy NA, Nonaka I, Etribi MA. Patterns of dystrophin gene deletion in Egyptian Duchenne/Becker muscular dystrophy patients. *ActaMyol*. 2007;26(3):145-50.

Elhawary NA, Jiffri EH, Jambi S, et al. Molecular characterization of exonic rearrangements and frame shifts in the dystrophin gene in Duchenne muscular dystrophy patients in a Saudi community. *Hum Genomics*. 2018;12(1):18. <https://doi.org/10.1186/s40246-018-0152-8>.

Elhawary NA, Rabah MS, Nemat H. Frameshift deletion mechanisms in Egyptian Duchenne and Becker muscular dystrophy families. *Mol Cells*. 2004;(2)18: 141-149.

El Kadiri Y, Selouani Y, Ratbi I, Lyahyai J, Zrhidri A, Sahli M, et al. Molecular diagnosis of dystrophinopathies in Morocco and report of six novel mutations. *Clin Chim Acta*. 2020 Jul;506:28-32. doi: 10.1016/j.cca.2020.03.018.

Emery AE. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases a world survey. *Neuromuscular Disord*. 1991;1(1):19-29.

Emery AEH. Diagnostic criteria for neuromuscular disorders. European Neuromuscular Centre, Baarn, The Netherlands 1994.

Engel AG, Yamamoto M, Fischbeck KH. Dystrophinopathies. In: A.G. Engel, C. Franzini-Armstrong (eds). *Myology*. 1994:1133–1187

Enquête sur la consanguinité en Algérie, “Fondation national pour la promotion de la sante et le d’veloppement de la recherche (FOREM),” Septembre 2007].

Erb W H. Dystrophia muscularis progressiva. Klinische und pathologisch-anatomische Studien. *Dtsch Z Nervenheilkd.* 1891:113–94.

ErikH, Aartsma-RusA. Exon skipping: a first in class strategy for Duchenne muscular dystrophy. *Expert Opinion on Biological Therapy.* 2017;17(2):225-36. <https://doi.dog/10.1080/14712598.2017.1271872>.

Ervasti JM, Campbell KP. Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell* 1991;66 (6): 1121–1131.

Essex C, Roper H. Lesson of the week - Late diagnosis of Duchenne's muscular dystrophy presenting as global developmental delay. *British Medical Journal.* 2001;323(7303):37-8.

-F-

Fernandez C, Halbert C, Maues de Paula A, Figarella-Branger D, Chabrol B, Pellissier F. Dystrophies musculaires liées au gène DMD : myopathie de Duchenne, myopathie de Becker, formes féminine et atypiques. *Neurologie.* 2010. Doi : 10.1016/S0246-0378(10)43869-5 04/08/10.

Finsterera Josef et Claudia Stöllbergerb. The Heart in Human Dystrophinopathies. *Cardiology.* 2003;99:1–19 DOI: 10.1159/000068446.

Flanigan KM, Dunn DM, von Niederhausern A, Soltanzadeh P, Gappmaier E, Howard MT, et al. Mutational spectrum of DMD mutations in dystrophinopathy patients: application of modern diagnostic techniques to a large cohort. *Hum Mutat.* 2009;30(12):1657-66.

Flanigan KM, Dunn MI, Niederhausern AV, Soltanzadeh P, Howard MT, Sampson JB, et al. Nonsense mutation-associated Becker muscular dystrophy: interplay between exon definition and splicing regulatory elements within the DMD gene. *Hum Mutat.* 2011;32(3):299-308. <https://doi.dog/10.1002/humu.21426>.

Frank DE, Schnell FJ, Akana C, El-Husayni SH, Desjardins CA, Morga J, Charleston JS, et al. Increased dystrophin production with golodirsén in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 2020; 94:e2270–e2282.

Fratter C, Dalgleish R, Allen SK, Abbs S, Tuffery-Giraud S, Ferlini A. EMQN best practice guidelines for genetic testing in dystrophinopathies. *Eur J Hum Genet* 28, 1141–1159 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41431-020-0643-7>

-G-

- Gangopadhyay SB, Sherratt TG, Heckmatt JZ, Dubowitz V, Miller G, Shokeir M, et al.** Dystrophin in frameshift deletion patients with Becker muscular dystrophy. *Am J Hum Genet.* 1992;51(3):562-70.
- Gatta V, Scarciolla O, Gaspari AR, Palka C, De Angelis MV, Di Muzio A, et al.** Identification of deletions and duplications of the DMD gene in affected males and carrier females by multiple ligation probe amplification (MLPA). *Hum Genet.* 2005;117(1):92-8. <https://doi.org/10.1007/s00439-005-1270-7>.
- Gogou M, Pavlou E, Haidopoulou K.** Therapies that are available and under development for Duchenne muscular dystrophy: What about lung function? *Pediatr Pulmonol.* 2020 ;55(2):300-315. doi: 10.1002/ppul.24605.
- Gowers WR.** Pseudo-hypertrophic muscular paralysis : a clinical lecture. *London* 1879:1845-1915.
- Griggs R. C., MD. J. R. Mendell. MD, and R. G. Miller, MD Philadelphia, PA, F. A. Davis Co.** Evaluation and treatment of myopathies. Philadelphia: Davis Company .1995 . <https://doi.org/10.1002/ana.410380325>.
- Grounds MD, Terrill J R, Al-Mshhdani B A, Duong M N, Radley-Crabb H G, Arthur P G.** Biomarkers for Duchenne muscular dystrophy: myonecrosis, inflammation and oxidative stress. *Disease Models & Mechanisms.*2020;13(2), dmm043638. doi:10.1242/dmm.043638.
- Gumerson JD, Michele DE.** The dystrophin- glycoprotein complex in the prevention of muscle damage. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011:210797. <https://doi.org/10.1155/2011/210797>.

-H-

- Hamada K, Omura N, Taguchi A, Baradaran-Heravi A, Kotake M, Arai M, Takayama K, et al.** New Negamycin-Based Potent Readthrough Derivative Effective against TGA-Type Nonsense Mutations. *ACS Med. Chem. Lett.* (2019); 10:1450–1456.
- Hamamy H, Bittles A.** Genetic Disorders Among Arab Populations. *Genetic Disorders Among Arab Populations.* 2010; 85–108. [10.1007/978-3-642-05080-0_4](https://doi.org/10.1007/978-3-642-05080-0_4).
- Hauser E, Toifl K, Mad A, Bittner R.** The incidence of Duchenne muscular dystrophy in eastern Austria. The controversy regarding CK screening. *Wien Klin Wochenschr.* 1993; 105(15):433–6. [PubMed: 8104369].
- Henderson DM, Lee A, Ervasti JM.** Disease-causing missense mutations in actin binding domain 1 of dystrophin induce thermodynamic instability and protein aggregation. *PNAS* 2010;107:9632-7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001517107>.
- Heo Y A.** Golodirsen: First Approval. *Drugs.* 2020; 80:329–333.

HniaK, Zouiten DS, Cantel D, Chazalette G, Hugon JA, Fehrentz A, et al. ZZ domain of dystrophin and utrophin: topology and mapping of a beta-dystroglycan interaction site. *Biochem J.* 2007;401(3):667–77.

Hoffman EP, Brown Jr RH, Kunkel LM. Dystrophin: The protein product of the duchenne muscular dystrophy locus. *Cell.* 1987;51: 919–928 ().

Hsu DT. Cardiac manifestations of neuromuscular disorders in children. *Paediatric Respiratory Reviews.* 2010;11(1):35–38. doi:10.1016/j.prrv.2009.10.004.

Humbertclaude V, et al., Motor and respiratory heterogeneity in Duchenne patients: Implication for clinical trials. *European Journal of Paediatric Neurology.* 2011. doi:10.1016/j.ejpn.2011.07.001.

-J-

Juan-Mateu J, González-Quereda L, Rodríguez MJ, Verdura E, La'zaro K, et al. Interplay between DMD Point Mutations and Splicing Signals in Dystrophinopathy Phenotypes. *PLoS ONE.* 2013;8(3): e59916. doi:10.1371/journal.pone.0059916.

Juan-Mateu J, Gonzalez-Quereda L, Rodriguez MJ, Baena M, Verdura E, Nascimento A, et al. DMD Mutations in 576 Dystrophinopathy Families: A Step Forward in Genotype-Phenotype Correlations. *PLoS One.* 2015;10(8):e0135189.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135189>.

-K-

Kamdar MD, Daniel J, Garry MD. PHD Dystrophin-Deficient Cardiomyopathy. *Journal of The American College Of Cardiology.* 2016; 67:21,
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2016.02.081>.

Kaplan JC, Chelly J, Garcia L. Un saut symbolique mais encourageant dans le traitement de la myopathie de Duchenne [Effective exon skipping in humans: a symbolic but promising jump into DMD therapy]. *Med Sci (Paris).* 2008;24(2):215-7. doi: 10.1051/medsci/2008242215. PMID: 18272087.

Keep NH. Structural comparison of actin binding in utrophin and dystrophin. *Neurol Sci.* 2000;21(5):929-37.

Khirani Sonia, Adriana Ramirez, Guillaume Aubertin, Michèle Boulé, Chrystelle Chemouny, Véronique Forin, Brigitte Fauroux Respiratory muscle decline in Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr Pulmonol.* 2013 ;49(5):473-81 .doi: 10.1002/ppul.22847.

Koenig M, Beggs AH, Moyer M, Scherpf S, Heindrich K, Bettecken T, et al. The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Genet.* 1989;45(4):498-506

Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic

organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell*. 1987;50(3):509-17. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90504-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90504-6).

Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 1988;53(2):219-28. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90383-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90383-2).

Kong, X, Zhong X, Liu L, Cui S, Yang Y & Kong L. Genetic analysis of 1051 Chinese families with Duchenne/Becker Muscular Dystrophy. *BMC Medical Genetics*. 2019;20(1). doi:10.1186/s12881-019-0873-0.

Kunkel L M, Hejtmancik J F, Caskey C T, Speer A, Monaco A P, Middlesworth W, et al. Analysis of deletions in DNA from patients with Becker and Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 1986 3-9;322(6074):73-7. doi: 10.1038/322073a0.

-L-

Lee BL, Nam SH, Lee JH, KiC S, Lee M, Lee J. Genetic analysis of dystrophin gene for affected male and female carriers with Duchenne/Becker muscular dystrophy in Korea. *J Korean Med Sci*. 2012;27(3):274-80. <https://doi.org/10.3346/jkms.2012.27.3.274>.

Le Rumeur E. Dystrophin and the two related genetic diseases, Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Bosn J Basic Med Sci*. 2015;15(3):14-20. doi:10.17305/bjbm.2015.636.

Leturcq et Tuffery Giraud. Aspects génétiques et moléculaires de dystrophinopathies. *Archives de pédiatrie*. 2015;22:12S3-12S11.

Lidov HGW, Kunkel L M. Dp140: Alternatively Spliced Isoforms in Brain and Kidney. *Genomics*. 1997;45(1):132-139. doi:10.1006/geno.1997.4905.

Legardinier Sébastien, Céline Raguénès-Nicol, Christophe Tascon, Chantal Rocher, Serge Hardy, Jean-François Hubert, Elisabeth Le Rumeur. Mapping of the Lipid-Binding and Stability Properties of the Central Rod Domain of Human Dystrophin. *Journal of Molecular Biology*. 2009;389(3):546-558, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.04.025>.

Li Xihua, Zhao Lei, Zhou Shuizhen, Hu Chaoping, Shi Yiyun, Shi Wei et al. A comprehensive database of Duchenne and Becker muscular dystrophy patients (0-18 years old) in East China Orphanet. *Journal of Rare Diseases*. 2015;10:5 DOI 10.1186/s13023-014-0220-7.

Li Y, Liu Z, Ou Yang S, Zhu Y, Wang L, Wu J. Distribution of dystrophin gene deletions in a Chinese population. *Journal of International Medical Research*. 2016;44(1): 99-108. <https://doi.org/10.1177/0300060515613223>.

Liu C, Deng H, Yang C, Li X, Zhu Y, Chen X, Li H, et al. 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*. 2018;32(8):e22575

Lombardi L, Persiconi I, Gallo A, Hoogenraad CC, De Stefano M E. NGF-dependent axon growth and regeneration are altered in sympathetic neurons of dystrophic mdx mice. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2017 ;80: 1–17. doi:10.1016/j.mcn.2017.01.006.

-M-

Ma P, Zhang S, Zhang H, Fang S, Dong Y, Zhang Y, et al. Comprehensive genetic characteristics of dystrophinopathies in China. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2018;13(1)109. <https://doi.org/10.1186/s13023-018-0853-z>.

Maggot A, Mercier S, Péréon Y. Specific features of Becker muscular dystrophy patients and female carriers of Duchenne muscular dystrophy. *Archives de pédiatrie*. 2015;22:12531 – 12536.

Magri F, Del Bo R, D'Angelo MG, Govoni A, Ghezzi S, Gandossini S, et al. Clinical and molecular characterization of a cohort of patients with novel nucleotide alterations of the Dystrophin gene detected by direct sequencing. *BMC Medical Genetics*. 2011;12.<https://doi.org/10.1186/1471-2350-12-37>.

Malhotra SB, Hart KA, Klamut HJ, Thomas NS, Bodrug SE, Burghes AH, et al. Frame-shift deletions in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Science* 1988;242:755-9.<https://doi.org/10.1126/science.3055295>.

Mandel JL. Dystrophin. The gene and its products. *Nature*. 1989; 339 (6226)584-6.

Manjunath M, Kiran P, Preethish-Kumar V, Nalini A, Singh RJ, Gayathri N. A comparative study of mPCR, MLPA, and muscle biopsy results in a cohort of children with Duchenne muscular dystrophy: a first study. *Neurol India*. 2015;63(1):58-62. <https://doi.org/10.4103/0028-3886.152635>.

Marshall PD et Galasko CSB. No improvement in delay in diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. *Lancet*. 1995;345(8949):590-1.

Mayer OH, Finkel RS, Rummey C, et al. Characterization of pulmonary function in Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr Pulmonol*. 2015;50(5):487–94.

McDonald CM, Henricson EK, Abresch RT, Han JJ, Escolar DM, Florence JM, et al. The cooperative international neuromuscular research group Duchenne natural history study-- a longitudinal investigation in the era of glucocorticoid therapy: design of protocol and the methods used. *Muscle Nerve*. 2013;48(1):32-54. doi:10.1002/mus.23807.

McDonald CM, Gordish-Dressman H, Henricson EK, et al. Longitudinal pulmonary function testing outcome measures in Duchenne muscular dystrophy: long-term natural history with and without glucocorticoids. *Neuromuscul Disord*. 2018;28:897-909.

Mercuri E, Muntoni F, Osorio AN, Tulinius M, Buccella F, Morgenroth LP, et al. Safety and effectiveness of ataluren: Comparison of results from the STRIDE Registry and CINRG DMD Natural History Study. *J Comp Eff Res*. 2020;9:341–360.

- Mertens Luc , Javier Ganame, Piet Claus, Nathalie Goemans, Daisy Thijs, Bénédicte Eyskens, et al . .** Early regional myocardial dysfunction in young patients with Duchenne muscular dystrophy. *J Am Soc Echocardiogr.* 2008 21(9):1049-54. doi: 10.1016/j.echo.2008.03.001.
- Meyron E.** On fatty degeneration of the voluntary muscles. *Lancet*, 1851. 2: p. 588-589. 50.
- Michelson DJ, Shevell MI, Sherr EH, Moeschler JB, et al.** Evidence report: Genetic and metabolic testing on children with global developmental delay: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology.* 2011; 77(17):1629–35. [PubMed: 21956720].
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16:1215.
- Min Y L, Bassel-Duby R, Olson EN.** CRISPR Correction of Duchenne Muscular Dystrophy. *Annu Rev Med.* 2019, 70, 239–255.
- Miskew NB, Aoki Y, Kuraoka M, Lee JJ, Takeda S, Yokota T.** Multi-exon Skipping Using Cocktail Antisense Oligonucleotides in the Canine X-linked Muscular Dystrophy. *J VisExp.* 2016;(111):e53776. <https://doi.dog/10.3791/53776>.
- 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.dog/10.1371/journal.pone.0197205>.
- Monaco A P, Neve R L, Colletti-Feener C, Bertelson C J, Kurnit D M, Kunkel L M.** Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature.* 1986;323(6089):646–50.
- Muntoni F, Desguerre I, Guglieri M, Osorio AN, Kirschner J, Tulinius M, Mercuri E.** Ataluren use in patients with nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy: patient demographics and characteristics from the STRIDE Registry. *Journal of Comparative Effectiveness Research.* 2019. doi:10.2217/cer-2019-0086.
- 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.
- Nakamura H, Kimura E, Mori-Yoshimura M, Komaki H, Matsuda Y, Goto K, et al.** Characteristics of Japanese Duchenne and Becker muscular dystrophy patients in a novel Japanese national registry of muscular dystrophy (Remudy). *Orphanet. J Rare Dis.* 2013 ;19(8):60. doi: 10.1186/1750-1172-8-60. PMID: 23601510; PMCID: PMC3639029.
- Newey SE, Benson MA, Ponting CP, Davies KE, Blake DJ.** Alternative splicing of dystrobrevin regulates the stoichiometry of syntrophin binding to the dystrophin protein complex. *Curr. Biol.* 2000;10:1295–1298.

Nigro G, Comi LI, Politano L, et al. The incidence and evolution of cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy. *Int J Cardiol.* 1990;26:271–7.

Nishio H, et al. Identification of a novel first exon in the human dystrophin gene and of a new promoter located more than 500 kb upstream of the nearest known promoter. *J. Clin. Invest.* 1994;94:1037–1042.

Nouioua Sonia les dystrophinopathies et les dystrophies musculaires des ceintures de transmission autosomique recessive (LGMD2) : étude clinique, histologique, génétique et prise en charge thérapeutique. Thèse de doctorat. 2013.

-O-

Okubo M, Noguchi S, Hayashi S, et al. Exon skipping induced by nonsense/frameshift mutations in DMD gene results in Becker muscular dystrophy. *Hum Genet.* 2020;139: 247–255 . <https://doi.org/10.1007/s00439-019-02107-4>.

-P-

Parks M, Court S, Cleary S, et al. non-invasive prenatal diagnosis of duchenne and becker muscular dystrophies by relative haplotype dosage. *Prenat Diagn.* 2016; 36:312-320. doi:10.1002/pd.4781.

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. doi:10.3389/fnins.2020.00760.

-R-

Roucher Boulez F, Menassa R, Streichenberger N, et al. A splicing mutation in the DMD gene detected by next-generation sequencing and confirmed by mRNA and protein analysis. *Clinica Chimica Acta.* 2015; 448: 146- 149.

Rybakova IN, Patel JR, Ervasti JM. The dystrophin complex forms a mechanically strong link between the sarcolemma and costameric actin. *J Cell Biol.*2000;150(5):1209-14.

-S-

Sbiti A, El Kerch F, Sefiani AE. Analysis of Dystrophin Gene Deletions by Multiplex PCR in Moroccan Patients. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2002;2(3):158-60.<https://doi.org/10.1155/S1110724302205069>.

Schapira G, Dreyfus JC, Schapira F. L'élévation du taux de l'aldolase sérique; test biochimique des myopathies. *Sem Hop.* 1953;29(38):1917–1920.

Shapiro F, Sethna N, Colan S, Wohl ME, Specht L. Spinal fusion in Duchenne muscular dystrophy: a multidisciplinary approach. *Muscle Nerve.*1992;15:604–614.

Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(12):e57. doi: 10.1093/nar/gnf056. PMID: 12060695; PMCID: PMC117299.

Sifi Y. Les dystrophies musculaires progressives. 2017 :31-71. LIVRE

Soim Aida, Smith Michael G, Kwon Jennifer M, Mann Joshua R, Thomas Shiny, Ciafaloni Emma. Muscular Dystrophy Surveillance, Tracking, and Research Network (MD STAR net) .*J Child Neurol.* 2018 Jul;33(8):537-545. doi: 10.1177/0883073818773029.

Suh MR, Lee KA, Kim EY, Jung J, Choi WA, Kang SW. Multiplex ligation dependent probe amplification in X-linked recessive muscular dystrophy in Korean subjects. *Yonsei Med J* 2017;58(3):613-8. <https://doi.dog/10.3349/ymj.2017.58.3.613>.

Sun C, Shen L, Zhang Z, Xie X. Therapeutic Strategies for Duchenne Muscular Dystrophy: An Update. *Genes* (Basel). 2020;11(8):837. Published 2020 Jul 23. doi:10.3390/genes11080837.

-T-

Taguchi A, Hamada K, Shiozuka M, Kobayashi M, Murakami S, Takayama K, Taniguchi A, et al. Structure-Activity Relationship Study of Leucyl-3-epi-deoxynegamycin for Potent Premature Termination Codon Readthrough. *ACS Med. Chem. Lett.* 2017, 8, 1060–1065.

Takehima Y, Yagi M, Okizuka Y, Awano H, Zhang Z, Yamauchi Y, et al. Mutation spectrum of dystrophin gene in 442 Duchenne/Becker muscular dystrophy cases from one Japanese referral center. *JHum Genet*2010;55(6):379-88.<https://doi.dog/10.1038/jhg.2010.49>.

Tomar S, Moorthy V, Sethi R, Chai J, Low Poh, Hong S, Lai P. Mutational spectrum of dystrophinopathies in Singapore: Insights for genetic diagnosis and precision therapy. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics.* 2019. 181. 10.1002/ajmg.c.31704.

Torella A, Zanobio M, Zeuli R, del Vecchio Blanco F, Savarese M, Giugliano T, et al. The position of nonsense mutations can predict the phenotype severity: A survey on the DMD gene. *PLoS One.* 2020;15(8):e0237803. doi:10.1371/journal.pone.0237803.

Tuffery- Giraud S, Bérout C, Leturcq F, Yaou RB, Hamroun D, Michel-calemard L, et al. Genotype-phenotype analysis in 2,405 patients with a dystrophinopathy using the UMD-DMD database: a model of nationwide knowledgebase. *Hum Mutat.* 2009;30(6): 934-45. <https://doi.dog/10.1002/humu.20976>.

-V-

Van Deutekom JC, Janson AA, Ginjaar IB, Frankhuizen WS, Aartsma Rus A, Bremmer Bout M et al. Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *Engl J Med.* 2007 ; 357(26) :2677-86.

Vengalila S, Preethish-Kumarb V, Polavarapub K, Mahadevappaa M, Sekarc D, Purushottamc M, et al. Duchenne Muscular Dystrophy and Becker Muscular Dystrophy Confirmed by Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification: Genotype-Phenotype Correlation in a Large Cohort. *J Clin Neurol.* 2017;13:(1) 91-97. <https://doi.dog/10.3988/jcn.2017.13.1.91>.

Veitez I, Gallano P, González-Quereda L, Borrego S, Marcos I, Millán JM, et al. Mutational spectrum of Duchenne muscular dystrophy in Spain: study of 284 cases. *Neurología.* 2017;32(6):377-85. <https://doi.org/10.1016/j.nrleng.2015.12.004>.

-W-

Wang D, Gao M, Zhang K, et al. Molecular Genetics Analysis of 70 Chinese Families With Muscular Dystrophy Using Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification and Next-Generation Sequencing. *Front Pharmacol.* 2019;10:814. doi:10.3389/fphar.2019.00814.

Wei X, Dai Y, Yu P, Qu N, Lan Z, Hong X, et al. Targeted next-generation sequencing as a comprehensive test for patients with and female carriers of DMD/ BMD: a multi population diagnostic study. *Eur J Hum Genet.* 2014;22(1):110-8. <https://doi.dog/10.1038/ejhg.2013.82>.

Winnard AV, Klein C, Coovert DD, Prior T, Papp A, Snyder P et al. Characterization of translational frame exception patients in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Hum Mol Genet.* 1993;2(6):737-744.

Wu RP, Youngblood D S, Hassinger J N, Lovejoy C E, Nelson M H, Iversen P L, Moulton, H.M. Cell-penetrating peptides as transporters for morpholino oligomers: Effects of amino acid composition on intracellular delivery and cytotoxicity. *Nucleic Acids Res.* 2007, 35, 5182–5191.

-Y-

Yazaki M, Yoshida M, Nakamura A, Koyama J, Nanba T, Ohori N, Ikeda S. Clinical characteristics of aged Becker muscular dystrophy patients with onset after 30 years. *Eur. Neurol.* 1999;42:145–149.

Yiu Eppie M and Andrew J Kornberg. Duchenne muscular dystrophy.2015 doi:10.1111/jpc.12868.

-Z-

Zaum AK, Stüve B, Gehrig A, Kölbel H, Schara U, Kress W. Deep intronic variants introduce DMD pseudoexon in patient with muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders.* 2017;27(7):631-4. <https://doi.dog/10.1016/j.nmd.2017.04.003>.

Zhao HH, Sun XP, Shi MC, YiY X, Cheng H, Wang XX, et al. Molecular Analysis-Based Genetic Characterization of a Cohort of Patients with Duchenne and Becker Muscular Dystrophy in Eastern China. *Chin Med J.* 2018;131(7):770-5. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.228237>.

Zhao J, Kodippili K, Yue Y, Hakim C H, Wasala L, Pan X, Zhang K, et al. Dystrophin Contains Multiple Independent MembraneBinding Domains. *Hum Mol Genet.* 2016; 25 (17):3647–3653.

ANNEXES

Annexe 1

Séquence de la protéine dystrophine (NP_003997.2)

```

1  mlwweevedc  yeredvqkkt  ftkwvnaqfs  kfgkqhienl  fsdlqdgrrl  ldlllegltgq
61  klpkekgstr  vhalnnvnka  lrvlqnnnvd  lvnigstdiv  dgnhkltlgl  iwniilhqwv
121 knvmknimag  lqqtNSEkil  lswvrqstrn  ypqvnvinft  tswsdglaln  alihshrpdl
181 fdwnsvvcqq  satqrlehaf  niaryqlgie  klldpedvdt  typdkksilm  yitslffqvlp
241 qqvsieaiqe  vemlprppkv  tkeehfqlhh  qmhysqqitv  slaqgyerts  spkprfksya
301 ytqaayvtts  dptrspfpsq  hleapedksf  gsslmesevn  ldryqtalee  vlswwllsaed
361 tlqaqgeisn  dvevvdqdfh  thegyMMddlt  ahqgrvgnil  qlgskligtg  klsedeetev
421 qeqmnlInsr  weclrvasme  kqsnlhrvlm  dlqnqklkel  ndwltkteer  trkmeeepIlg
481 pdledlkrqv  qqhkvlqedl  eqeqrvvnsI  thmvvvvdes  sgdhataale  eqIkvlgdrw
541 anicrwtedr  wvllqdillk  wqrlteeqcl  fsawlseked  avnkihttgf  kdqnemlssl
601 qklavlkadl  ekkkqsmgkl  yslkqdllst  lknksvtqkt  eawldnfarc  wdlvlvqklek
661 staqisqavt  ttqpsltqtt  vmetvtvtvt  reqilvkhaq  eelppppppqk  krqitvdsei
721 rkrlvdvdiTe  lshwitrsea  vlqspefaif  rkegnfsdlk  ekvnaierEK  aekfrklqda
781 srsaqalveq  mvnegvnads  ikqaseqlns  rwiefcqls  erlnwleyqn  niaafynqlq
841 qleqmtttae  nwlkiqpttp  septaiksql  kickdevnrl  sdlppqierl  kiqsialkek
901 gggpmfldad  fvaftnhfkq  vfsdvqarek  elqtifdtlp  pmryqetmsa  irtwvqqset
961 klsipqlsvt  dyeimeqrlg  elqalqsslq  eqqsglyyls  ttvkemskka  pseisrkyqs
1021 efeeiegrwk  klssqlvehc  qkleeqmnkl  rkiqnhigtI  kkwmaevdvf  lkeewpalgd
1081 seilkkqlkq  crllvsdiqt  iqpslnsvne  ggqkikneae  pefasrlete  lkelntqwdh
1141 mcqqvyarke  alkgglektv  slqkdIsemh  ewmtqaeey  lerdfeyktp  delqkaveem
1201 krakeeaqqk  eakvklItes  vnsviaqapp  vaqealkkel  etlttnyqwl  ctrlngkckt
1261 leevwacwhe  llsylekank  wlnevefklk  ttenipggae  eisevldsle  nlmrHsednp
1321 ngirilaqtl  tdggvmdeli  neeletfnsr  wrelheeavr  rqkllEQsiq  saqeteksIh
1381 liqesltfid  kqlaayiAdk  vdaaqmpqea  qkiqsdlTsh  eisleemkkh  nqgkeaaqrV
1441 lsqidvaqkk  lqdvsmkfrl  fqkpanfeqr  lqeskmilde  vkmhlpalet  ksveqevvqs
1501 qlnhcvnlyk  slsevkseve  mviktgrqiv  qkkqtenpke  ldervtalkI  hynelgaktv
1561 erkqqlekcl  klsrkmrkem  nvltewlaat  dmeltkrsav  egmpsnldse  vawgkatqke
1621 iekqkvhlks  itevgealkt  vlqkktelVe  dklsllnsnw  iavtsraeew  lnllleyqkh
1681 metfdqnvdh  itkwiIqadt  lldesekkkp  qqkedvlkrl  kaelndirpk  vdstrdqaan
1741 lmanrgdhcr  klvepqisel  nhrfaaishr  iktgkasipl  keleqfnSdi  qkllEpleae
1801 iqggvnIkee  dfnkdmnedn  egtvkellqr  gdnIqqritd  erkreeikik  qqlIqtKhna
1861 lkdlrsqrrk  kaleishqwy  qykrqaddll  kclddiekkI  aslpeprder  kikeidrelq
1921 kkkeelnavr  rqaeglsedg  aamaveptqi  qlskrwreie  skfaqfrrln  faqihtvree
1981 tmmvmtedmp  leisypsty  lteithvsqa  lleveqllna  pdlcakdfed  lfkqeeslkn
2041 ikdslqqssg  ridiihskkt  aalqsatpve  rvklqealsq  ldfqwekvnk  mykdrqgrfd
2101 rsvekwrrfh  ydikifnqwl  teaEqflrkt  qipenwehak  ykwylkelqd  gigqrqtvvr
2161 tlnatgeeiI  qqssktdasi  lqeklgslnl  rwqevckqls  drkkrleeqk  nilsefqrdl
2221 nefvlwleea  dniasiplep  gkeqqIkekl  eqvklIveel  plrqgilkql  netggpvlvs
2281 apispeeQdk  lenklkqtnl  qwikvsralp  ekqgeieaqi  kdlgqlekkI  edleeqlnhl
2341 llwlspirnq  leiynqpnqe  gpfdvketei  avqakqpdve  eilskgqhly  kekpatqpvk
2401 rkledlssew  kavnrllqel  rakqpdIapq  lttigasptq  tvtlvtqpVv  tketaiskle
2461 mpssllmlevp  aladfnrawt  eltdwlslld  qviksqrvmv  gdledinemi  ikqqatmqdl
2521 eqrrpqleel  itaaqnlnkn  tsnqeartii  tdrieriqnq  wdevqehlqn  rqqqlnemlk
2581 dstqwleake  eaeqvlqgar  akleswkegp  ytvdaiqkki  tetkqlakdl  rqwqtnvdva
2641 ndlalklIrd  ysaddtrkvh  miteninasw  rsihkrvser  eaaleethrl  lqqfpldlek
2701 flawlTeaet  tanvlqdatr  kerlledskg  vkelmkqwqd  lqgeieahTd  vyhnlDensq
2761 kilrslegsd  davllqrrld  nmnfkwselr  kkslnirshl  eassdqwkrI  hlslqellvw
2821 lqlkddelsr  qapiggdfpa  vqkqndvhra  fkrelktkep  vimstletvr  iflteqpleg
2881 leklyqepre  lppeeraqnv  trllrkqaeE  vnteweklnl  hsadwqrkid  etlerlrelq

```

2941 eatdeldkl1 rqaevikgsw qpvgdllids lqdhlekvka lrgeiaplke nvshvndlar
3001 qlttlgiqls pynlstledl ntrwkllqva vedrvrqlhe ahrdfgpasq hflstsvqgp
3061 weraispnkv pyyinhetqt tcwdhpknte lyqsladlnn vrfsayrtam klrrlqkalc
3121 ldllslsaac daldqhnkq ndqpm dilqi inclt tiydr leqehnnlvn vplcvdmcln
3181 wllnvydtgr tgrirvlsfk tgiislckah ledkyryl fk qvasstgfcd qrrlglllhd
3241 siqiprqlge vasfggsnie psvrscfqfa nnkpeieaal fldwmrlepq smvwlplvhr
3301 vaaaetakhq akcnickecp iigfryrslk hfnydicqsc ffsgrvakgh kmhypsveyc
3361 tpttsgedvr dfakvlknkf rtkryfakhp rmgylpvqtv legdnmetpv tlinfwpvds
3421 apasspqlsh ddthsriehy asrlaemens ngsylndsis pnesiddehl liqhycqsln
3481 qdsp lsqprs paqilistles eergeleril adleenrnl qae ydr lkqq hehkg l splp
3541 sppem mptsp qsprdaelia eakllrqhkg rlearnqile dhnkqlesql hrlrqll eqp
3601 qaeakvngtt vsspstslqr sdssqpmlr vvg sqtsdsm geedllsppq dtstgleevm
3661 eqlnnsfpss rgrntpgkpm redtm

Annexe 2

Centre Hospitalo- universitaire
BENBADIS Constantine
Service de neurologie

Pr . SIFI

Questionnaire DMD et BMD

Date : Numéro de dossier :

Nom : Prénom :

Sexe : Age :

Date de naissance : Téléphone :

Adresse :

- Propositus : oui non

- Diagnostic :

- ATCDS :

Cas similaire dans la fratrie :

Cas similaire dans la famille :

- Retard à la marche :

- Retard du langage :

- Age de début :

- Signe de début :

Anomalie de fonction motrice :

Difficultés à la marche:

Difficultés à la montée les escaliers:

Difficultés à la course:

Signe de Gowers:

- Age de la perte de la marche :

< 13 ans

Marche possible au-delà de 16 ans

Perte de la marche entre 13 et 16 ans

- Hypertrophie des mollets :

- Macroglossie:

- Scoliose:

- Hyperlordose:

- Rétractions de membres:

- Troubles de la respiration:

Capacité vitale forcée CVF :

- Atteinte cardiaque :

Cardiomyopathie :

Trouble du rythme cardiaque :

- Troubles cognitifs :

Retard mental :

Syndrome autistique :

Troubles psychotiques :

Epilepsie :

- Echelle D'Archibald et Vignos:

CPK:

LDH

EMG:

Biopsie musculaire

Résultats génétiques:

Arbre généalogique:

Annexe 3



CONSENTEMENT ECLAIRE POUR UN EXAMEN DES CARACTERISTIQUES GENETIQUES A DES FINS MEDICALES (décret n°2008-321 du 4 avril 2008, arrêté du 27 mai 2013)

IDENTIFICATION DU PATIENT	IDENTITE DU TITULAIRE DE L'AUTORITE PARENTALE SI MINEUR
NOM :	NOM :
Prénom :	Prénom :
Date de Naissance :	Lien avec le patient :

Je soussigné(e), surnommé(e), reconnais avoir été informé(e) par le Dr.
sur les caractéristiques des examens de génétique moléculaire concernant la maladie dont je souffre ou que présente(nt) un (ou plusieurs) membre(s) de ma famille :

Inscrire clairement le nom de la maladie concernée :

Ces examens seront réalisés à partir : du prélèvement qui m'a été effectué
 du prélèvement qui a été pratiqué sur mon enfant mineur

Je donne mon consentement pour ce prélèvement et je reconnais avoir reçu l'ensemble des informations conformément à l'article R. 1131-4 du décret n° 2008-321 du 4 avril 2008 du code de la santé publique, permettant la compréhension de cet acte biologique et sa finalité.

- J'autorise la conservation illimitée des produits dérivés de ce prélèvement en vue d'études ultérieures
 Je n'autorise pas la conservation illimitée des produits dérivés de ce prélèvement

Une fois l'étude terminée, l'utilisation secondaire des produits dérivés de ce(s) prélèvements par le laboratoire peut être utile à l'analyse d'autres personnes (prélèvement témoin utile au contrôle qualité).

- J'autorise cette utilisation secondaire après anonymisation des données me concernant
 Je n'autorise pas cette utilisation secondaire

La communication à la communauté médicale et scientifique (bases de données accessibles sur internet, publications dans des journaux scientifiques...) de données médicales (comprenant éventuellement des photographies, radiographies et autres) et génétiques me concernant (ou mon enfant mineur) peut éventuellement être utile.

- J'autorise cette communication après anonymisation des données me concernant
 Je n'autorise pas cette utilisation secondaire

J'ai compris que si une anomalie génétique pouvant être responsable d'une prédisposition ou d'une affection grave est mise en évidence, je devrai permettre la transmission de cette information au reste de ma famille. J'ai été averti que mon silence pouvait leur faire courir des risques ainsi qu'à leur descendance, dès lors que des mesures de prévention, y compris de conseil génétique ou de soins, peuvent être proposées. Je devrai choisir entre assurer moi-même ou autoriser le médecin prescripteur à cette diffusion d'information génétique aux membres de ma famille.

Conformément à la loi informatique et liberté, je peux exercer mon droit d'accès aux données qui me concernent par l'intermédiaire d'un médecin de mon choix.

Fait à, le SIGNATURE :

ATTESTATION D'INFORMATION ET DE RECUEIL DE CONSENTEMENT POUR UNE ANALYSE GENETIQUE A DES FINS MEDICALES

Docteur..... certifie avoir informé le (la) patient(e) surnommé(e) sur les caractéristiques de la maladie recherchée, les moyens de la détecter, les possibilités de prévention et de traitement, et avoir recueilli le consentement du (de la) patient(e) dans les conditions de l'article n°R.1131-4	Signature et cachet :
---	-----------------------

RAPPEL CONCERNANT LA LEGISLATION

(Conformément au décret n°2008-321 du 4 avril 2008 fixant les conditions de prescription et de réalisation des examens des caractéristiques génétiques d'une personne) :

Le médecin prescripteur doit conserver le consentement écrit, les doubles de la prescription et de l'attestation, et les comptes-rendus d'analyses de biologie médicale commentés et signés (Art. R.1131-20)

Le laboratoire agréé réalisant les examens doit :

- disposer de la prescription et de l'attestation du prescripteur (Art.R.1131-20)

- adresser le compte-rendu d'analyse de biologie médicale commenté et signé par un praticien responsable agréé conformément à l'article R.1131-6 EXCLUSIVEMENT AU MEDECIN PRESCRIPTEUR qui communiquera les résultats de l'examen des caractéristiques génétiques à la personne concernée dans le cadre d'une consultation individuelle (Art.R.1131-19)

12/2/2015 - Imprimé par MAILLET Sarah - Ref: PC-GEN- PM-DE-002-01 Version : 01 - Page 1 sur 1

Annexe 4

Réactif :

- TE 20 :5 : (Tris 20 mM, EDTA 5 mM, pH 7.5) auto clavé

Tris : 2.422 g/l

EDTA : 1.86 g/l

Ajuster le pH avec HCL 1 N

- TE 10 :1 : (Tris 10 mM, EDTA 1mM, pH 7.4) autoclavé

Tris : 0.606 g

EDTA : 0.1869 g pour 500 ml

Ajuster le pH avec de l'HCL 1 N

- Tompon de lyse : NaCl 400mM

EDTA 2mM

Tris 10mM

pH 8.2

- Protéinase K :

Protéinase K : 10 mg/ml H₂O

Conservation aliquote de 1 ml à -20°C, tube entamés à +4°C

- Bleu de Bromophénol (BBP) :

BBP 20mg

Tris 0.5M : 2ml

Glycerol : 5ml

PH 7.5

Qsp 10 ml H₂O

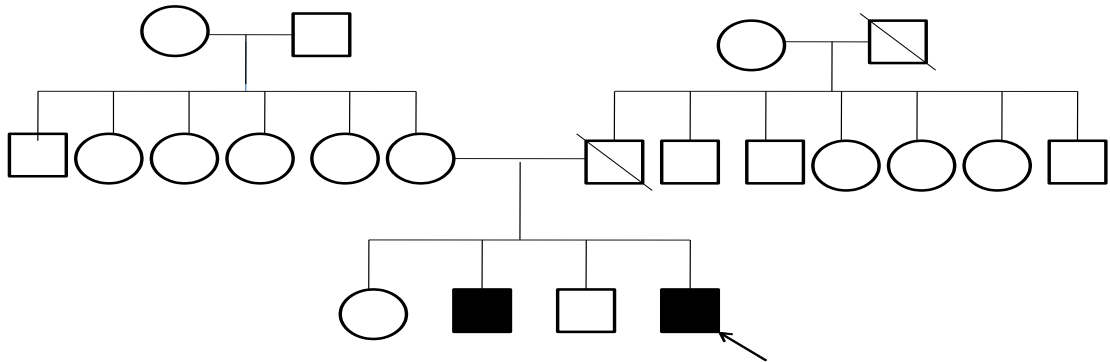
- TBE 10X:

Tris 108g

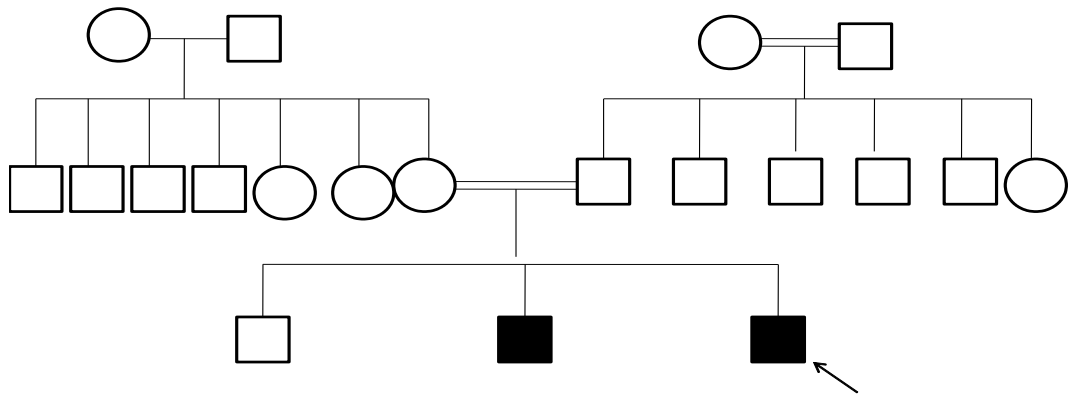
Acide borique 55g

EDTA 9.3g

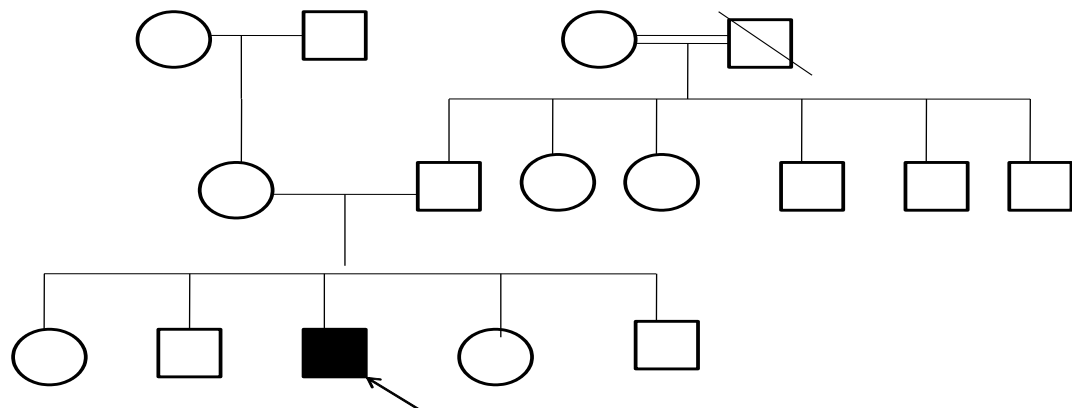
QSP 1L H₂O

Annexe 5**Arbres généalogiques (avec les numéros des familles)**

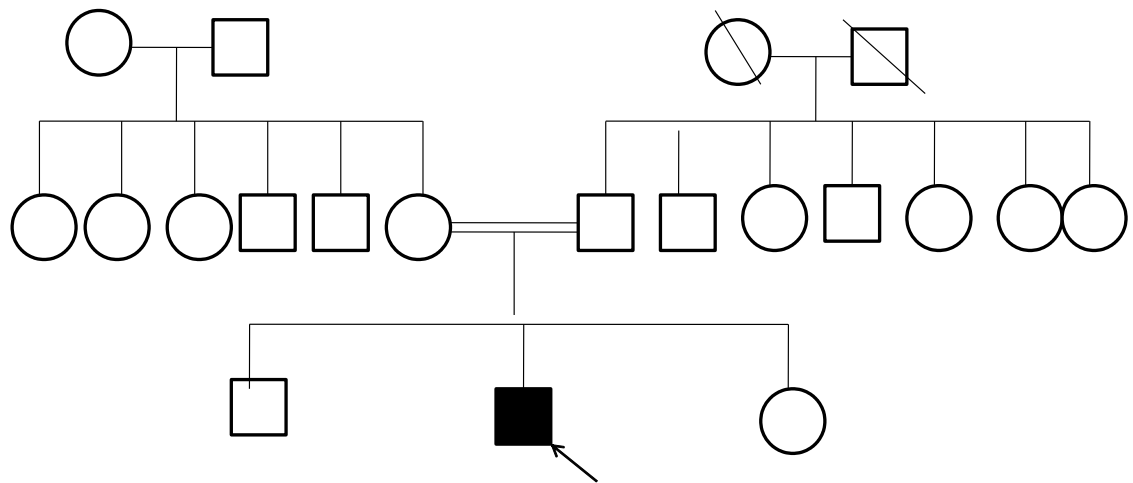
Famille N : 1



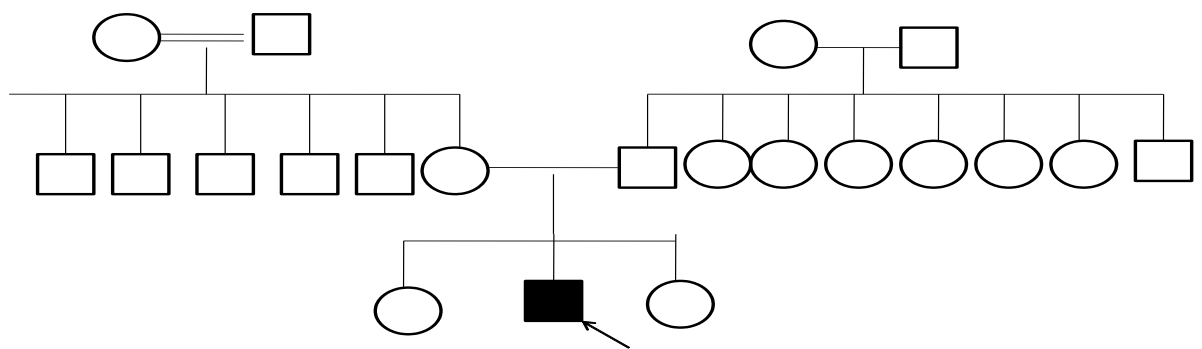
Famille N 2



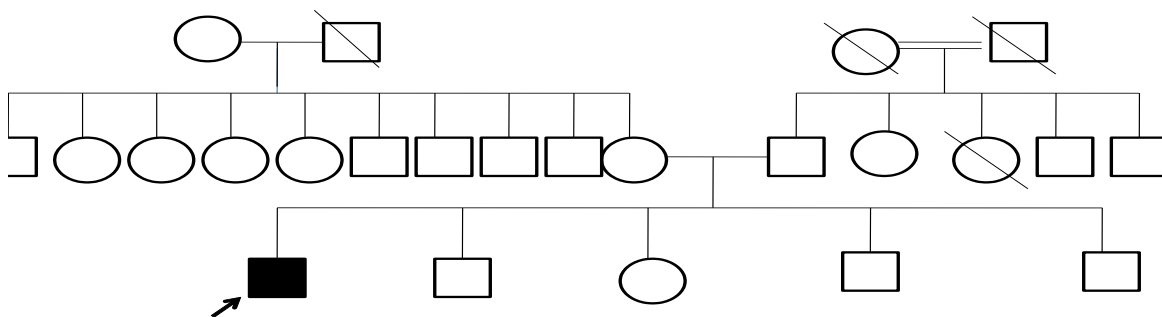
Famille N 3



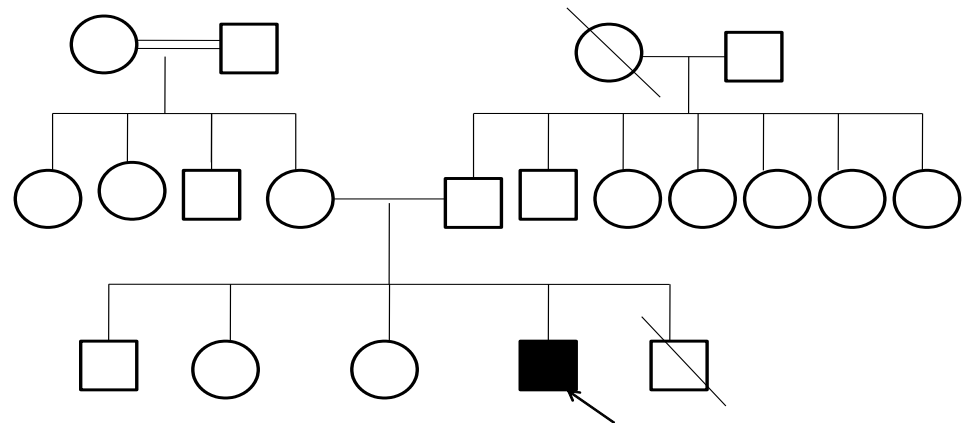
Famille N 4



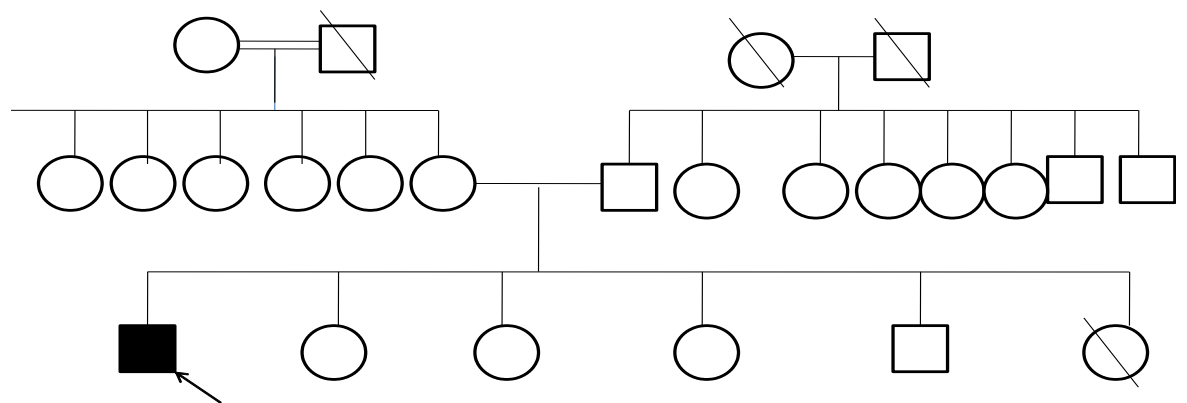
Famille N 5



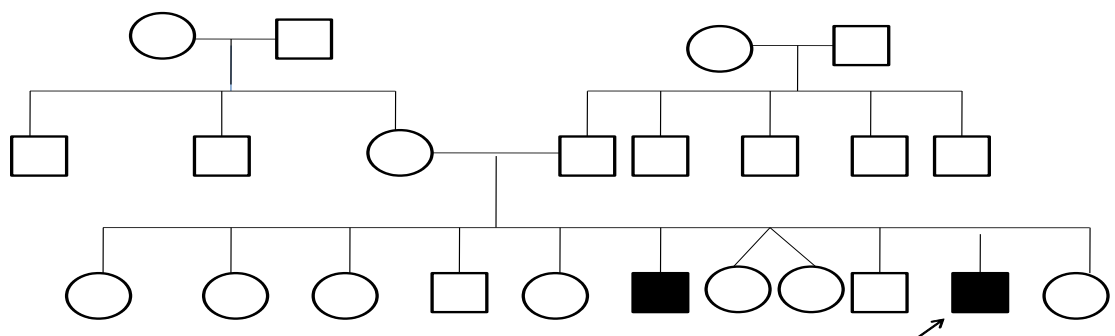
Famille N 6



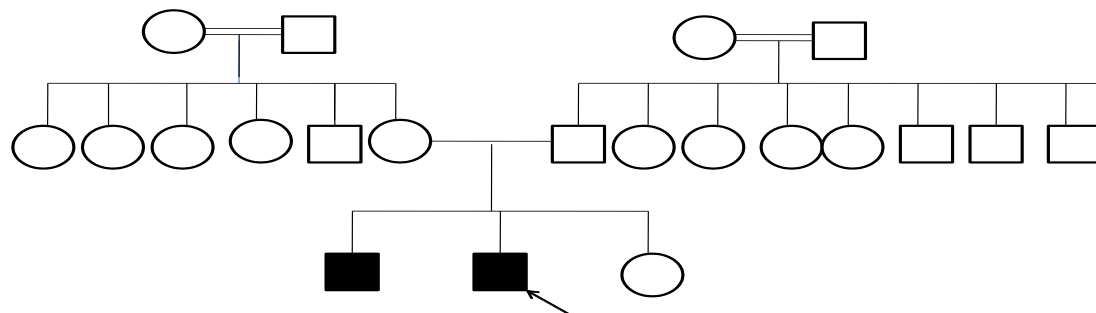
Famille N : 7



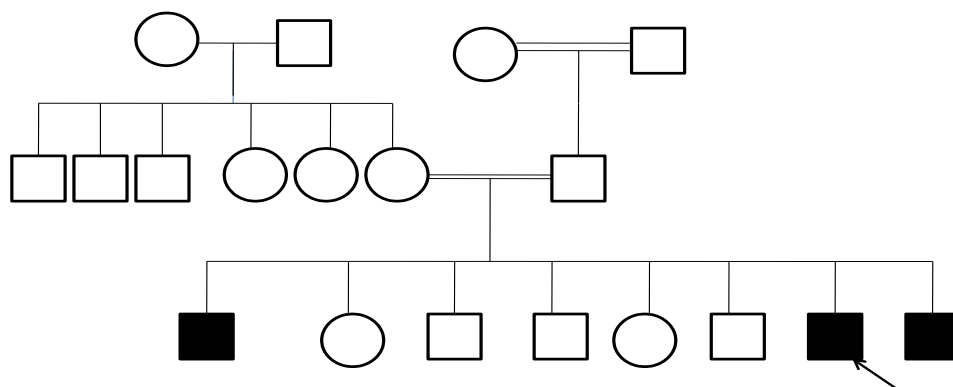
Famille N : 8



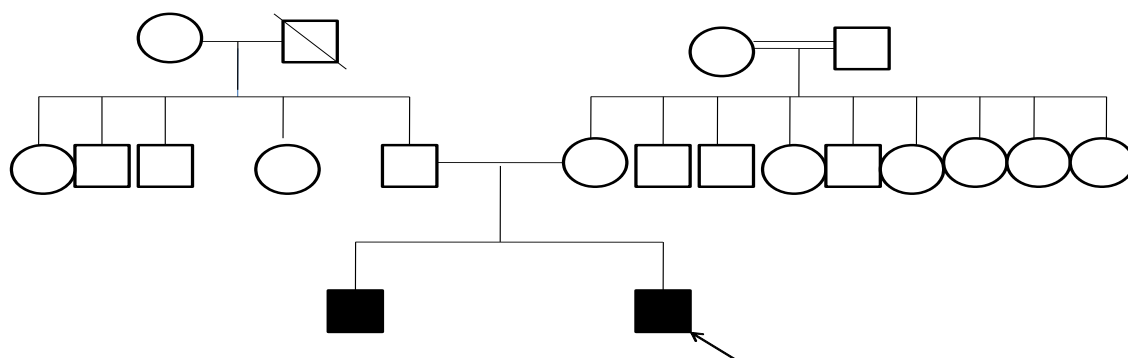
Famille N : 9



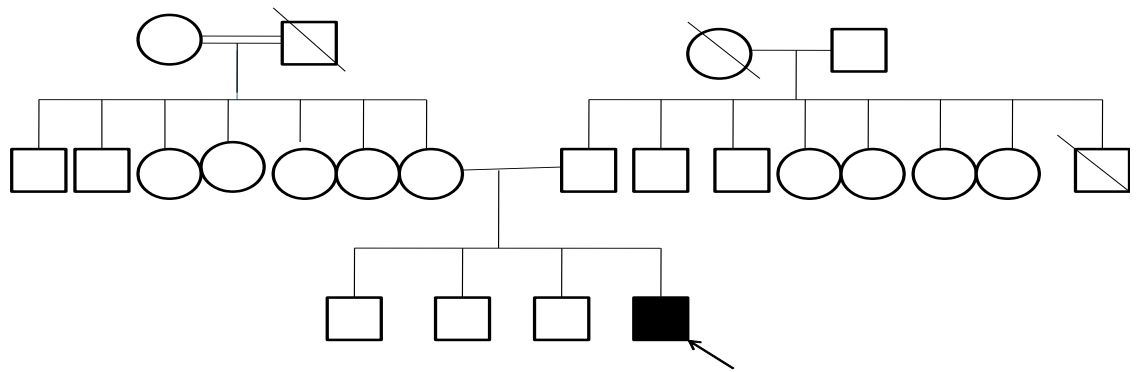
Famille N : 10



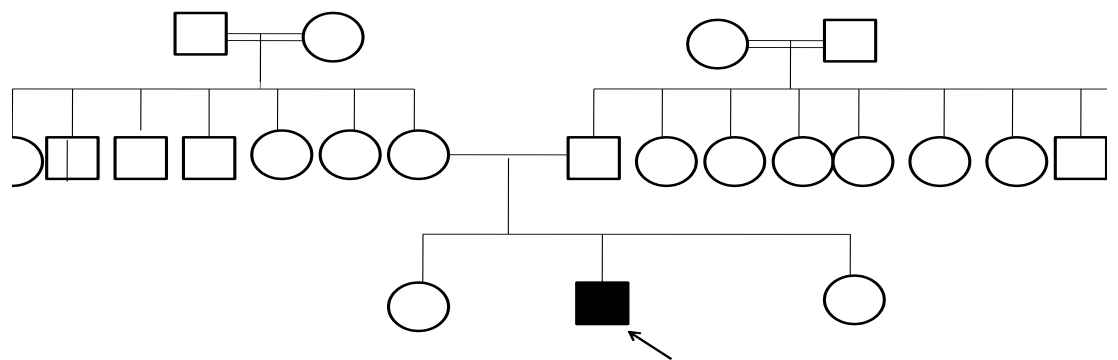
Famille N : 11



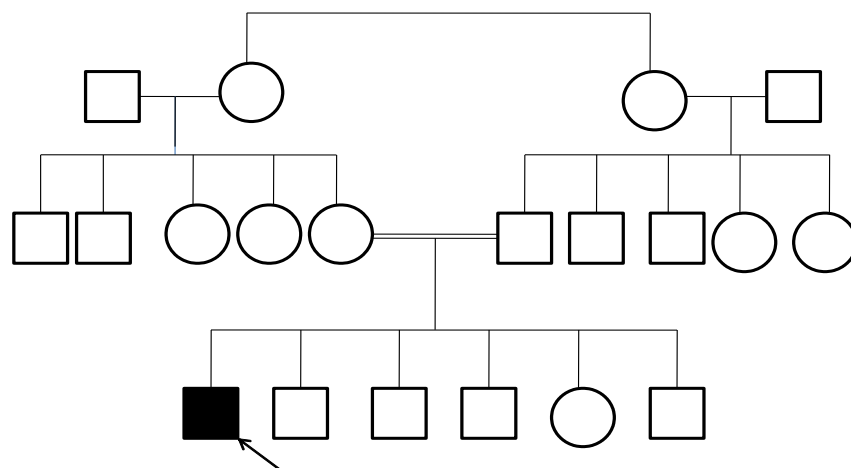
Famille N : 12



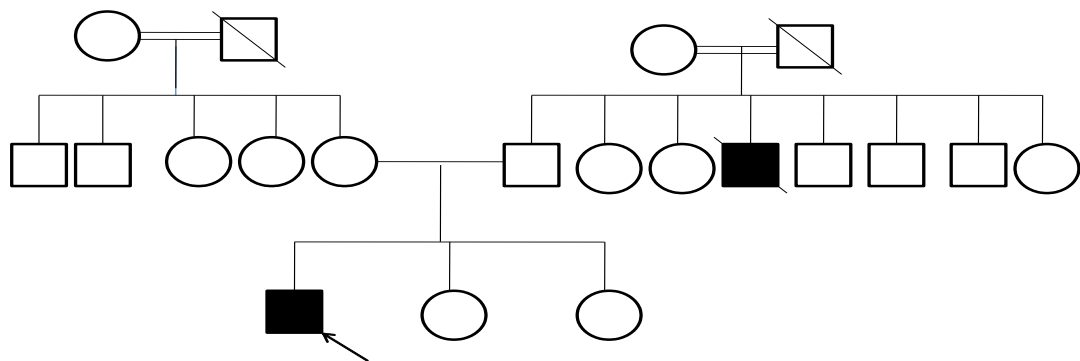
Famille N : 13



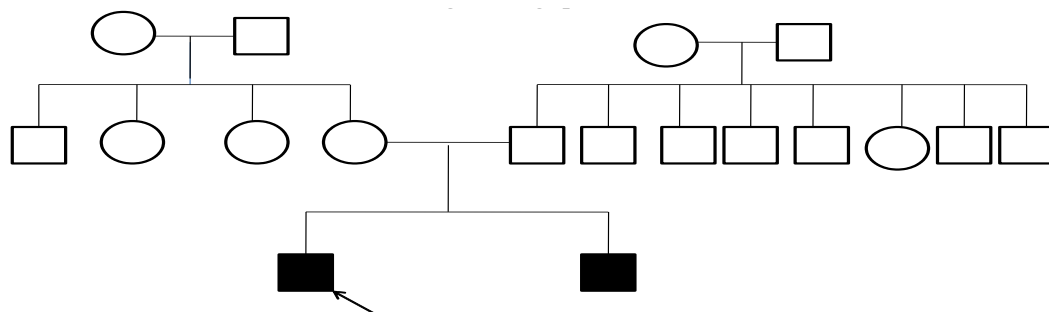
Famille N : 14



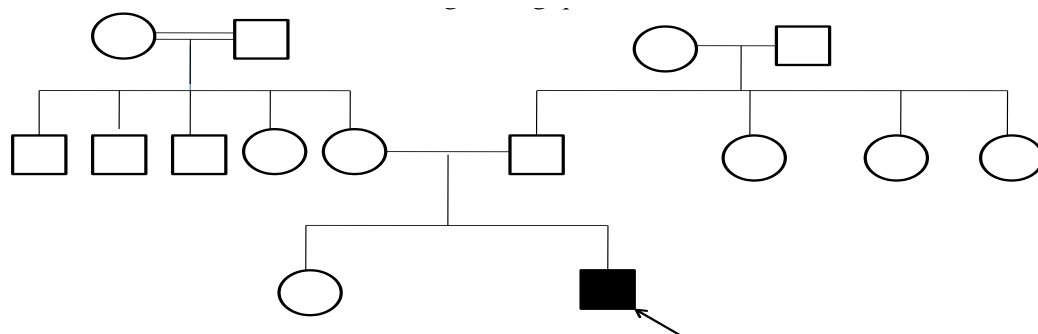
Famille N : 15



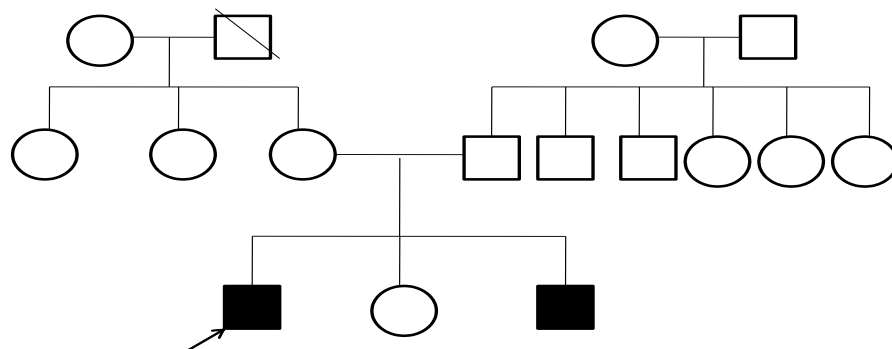
Famille N : 16



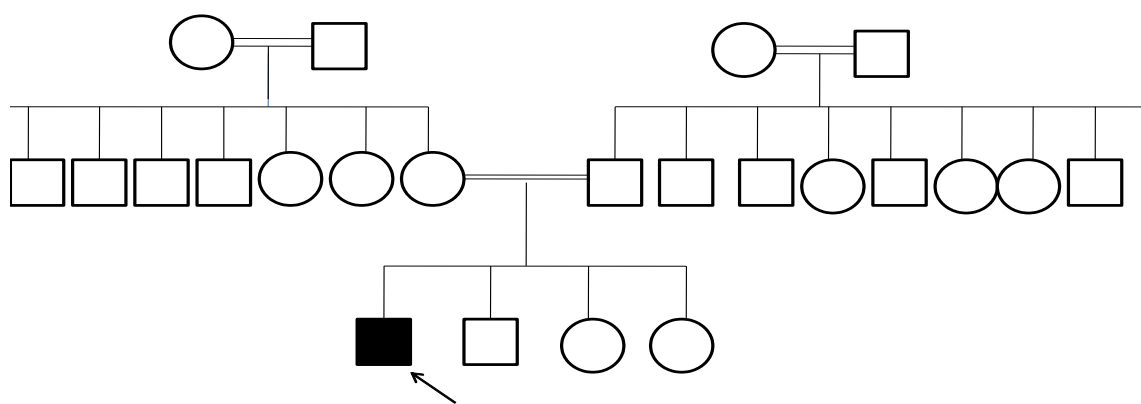
Famille N : 17



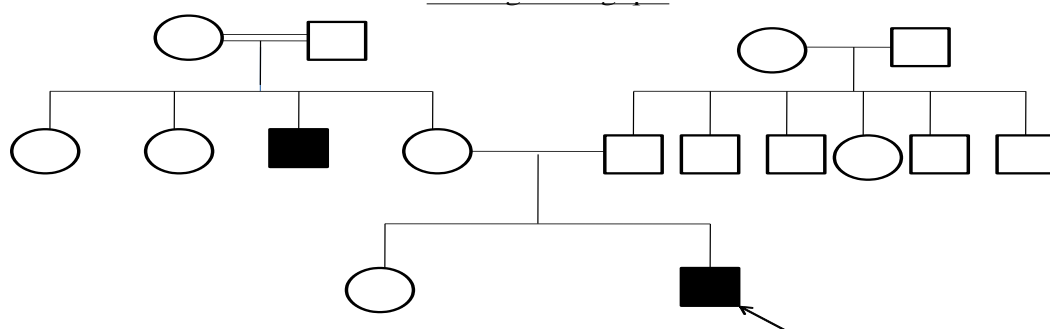
Famille N : 18



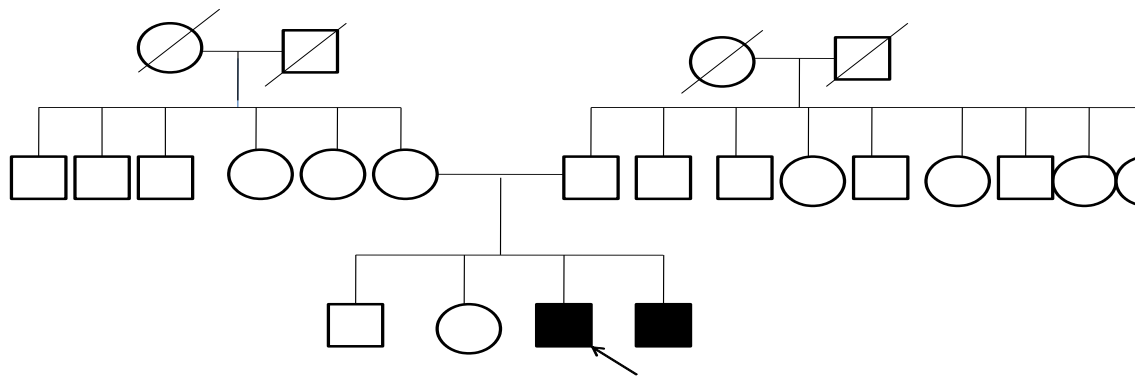
Famille N : 19



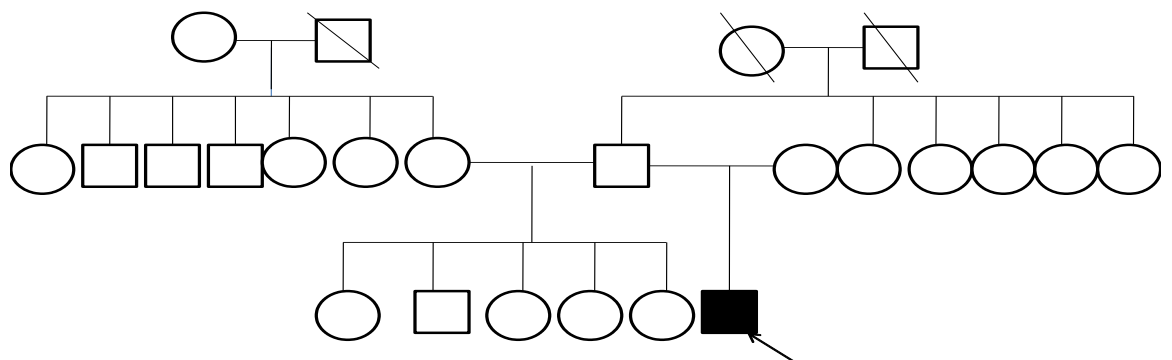
Famille N : 20



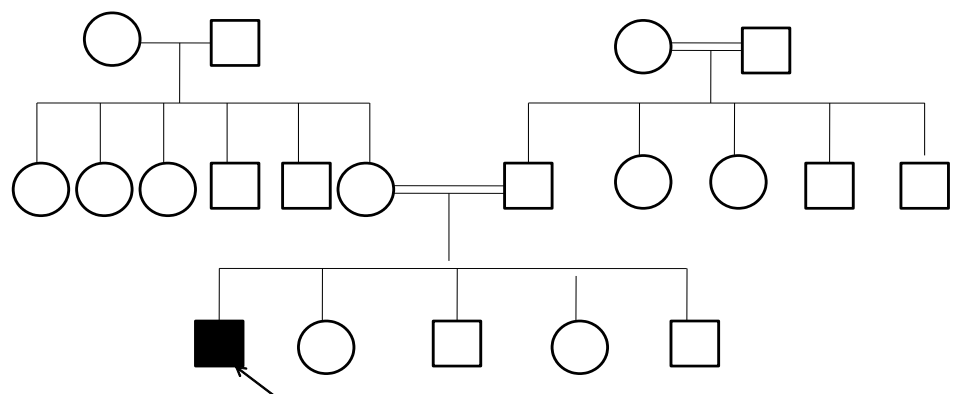
Famille N : 21



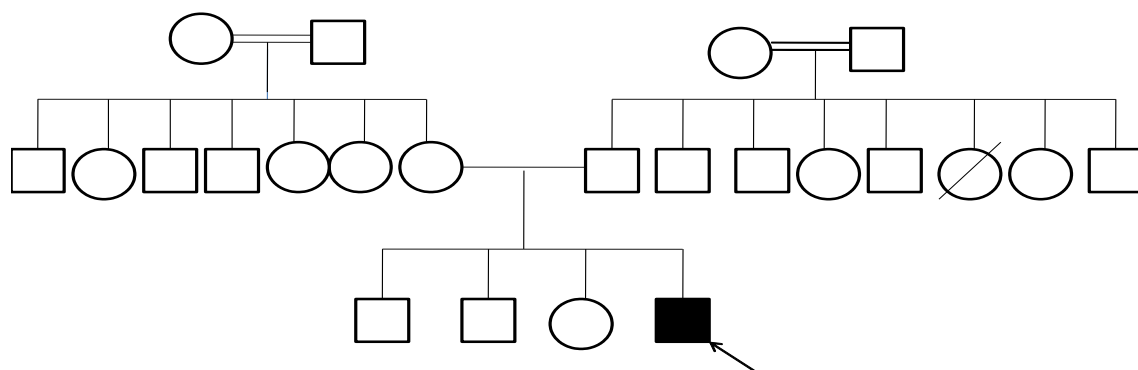
Famille N : 22



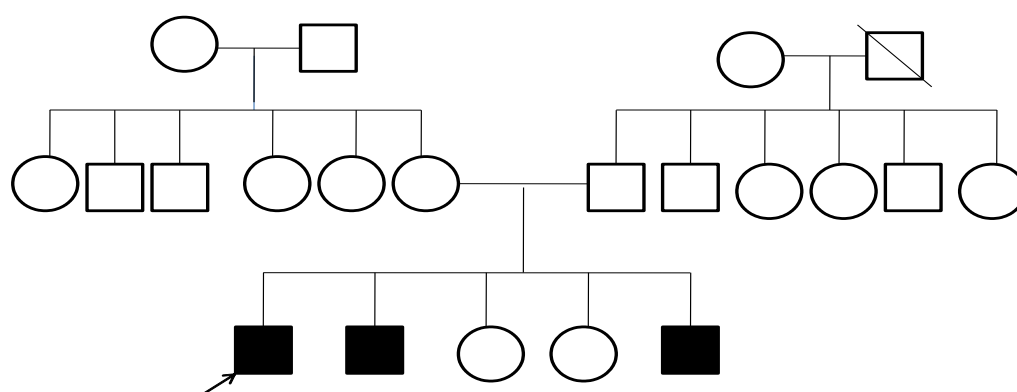
Famille N : 23



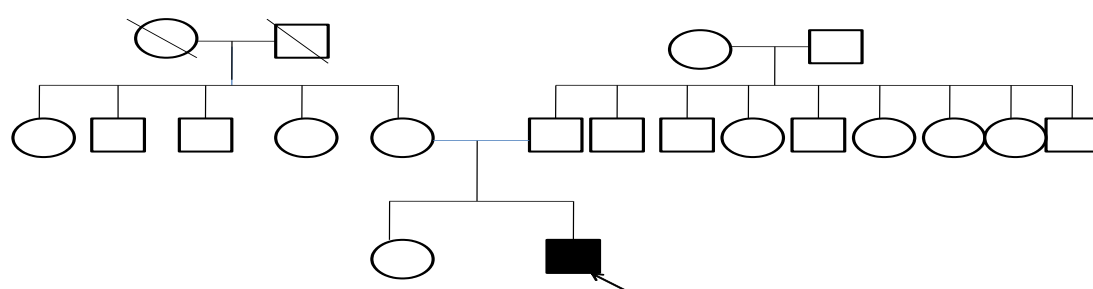
Famille N : 24



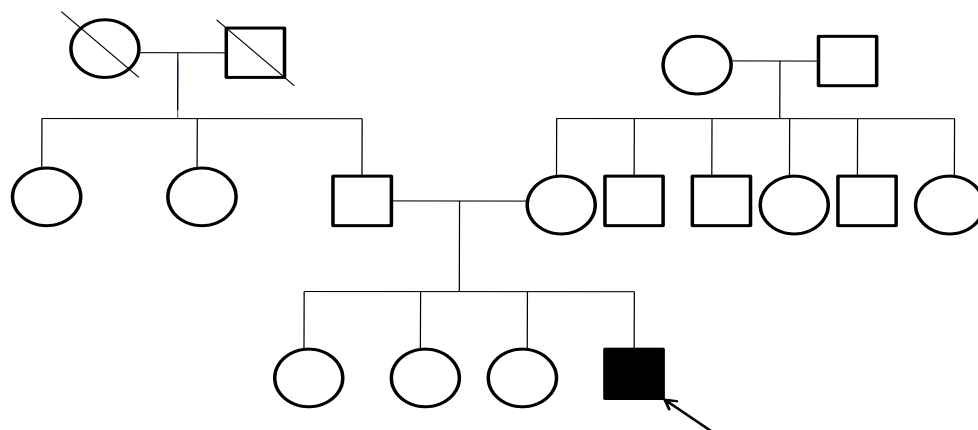
Famille N : 25



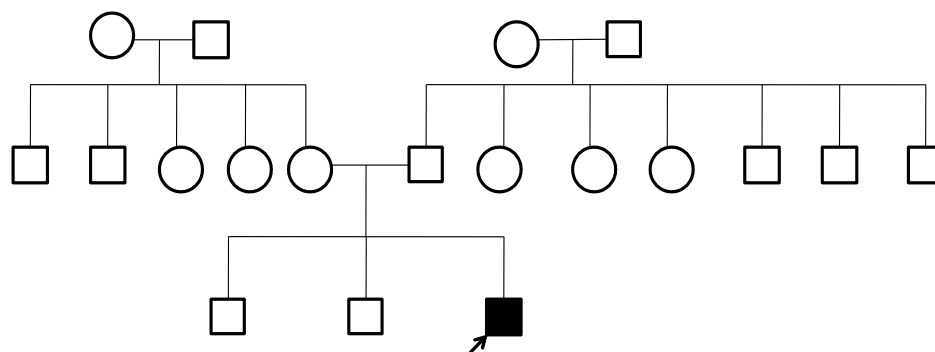
Famille N : 26



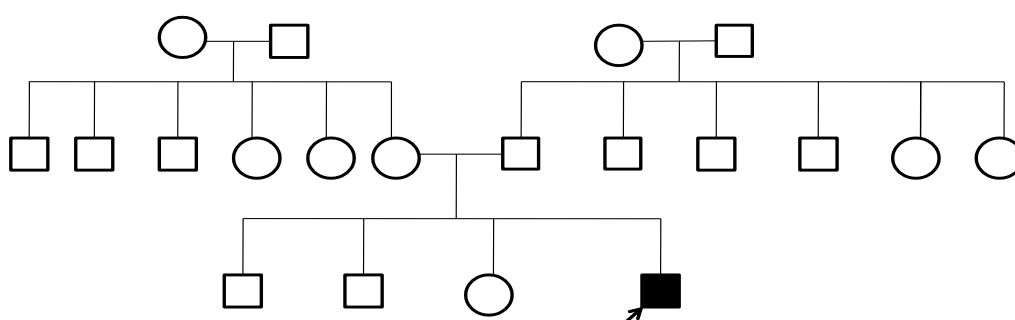
Famille N : 27



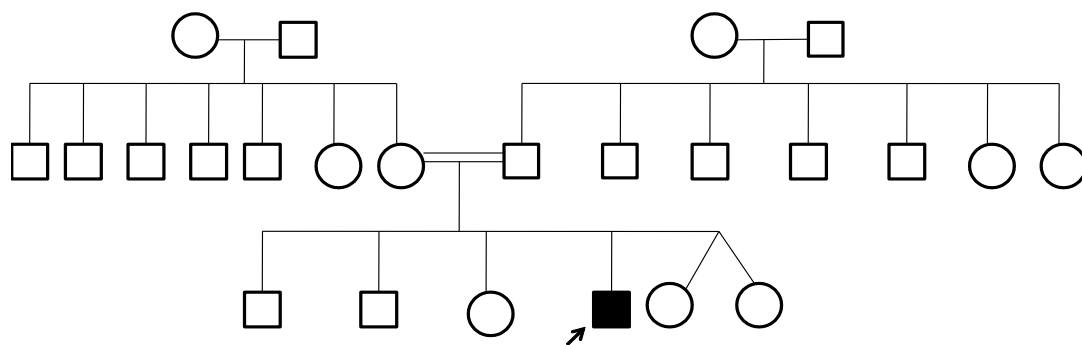
Famille N : 28



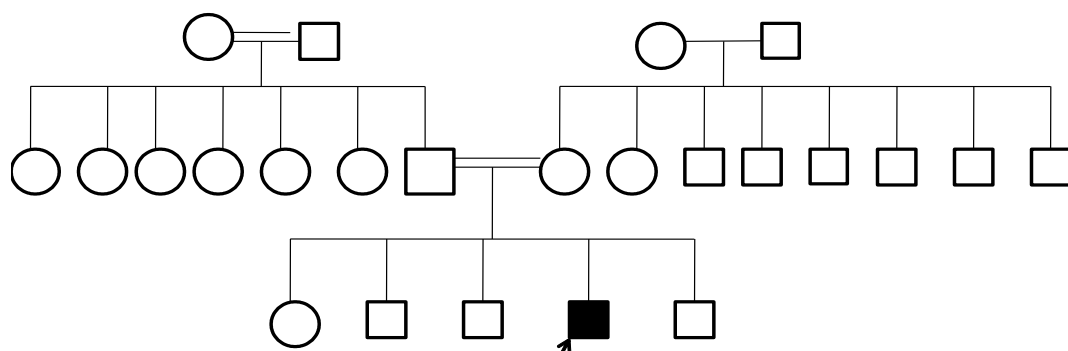
Famille N : 29



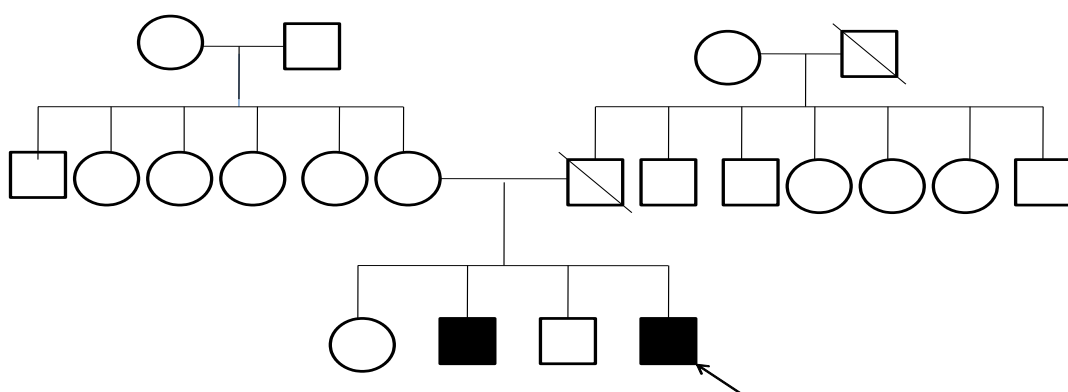
Famille N : 30



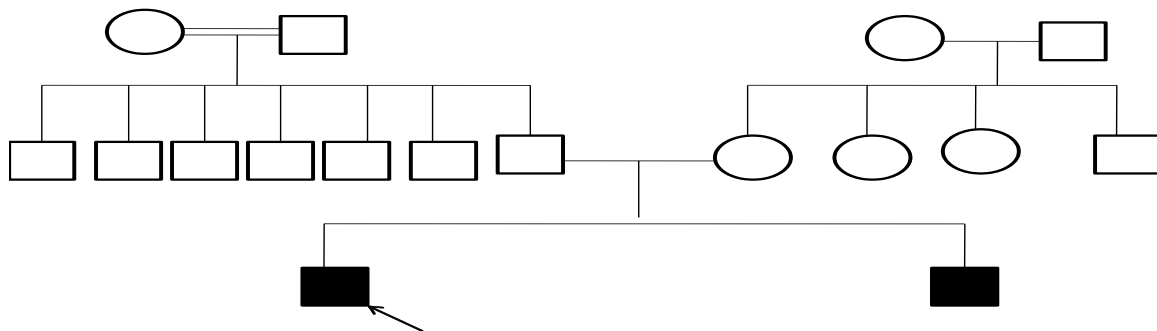
Famille N : 31



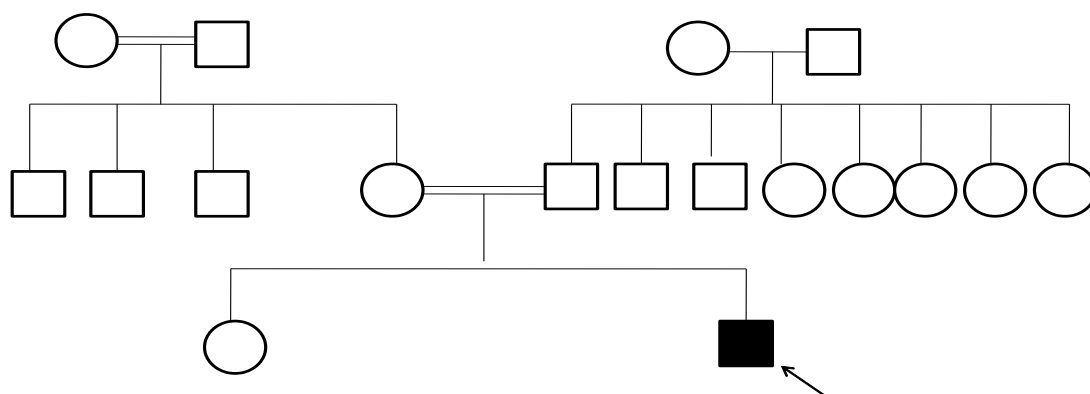
Famille N : 32



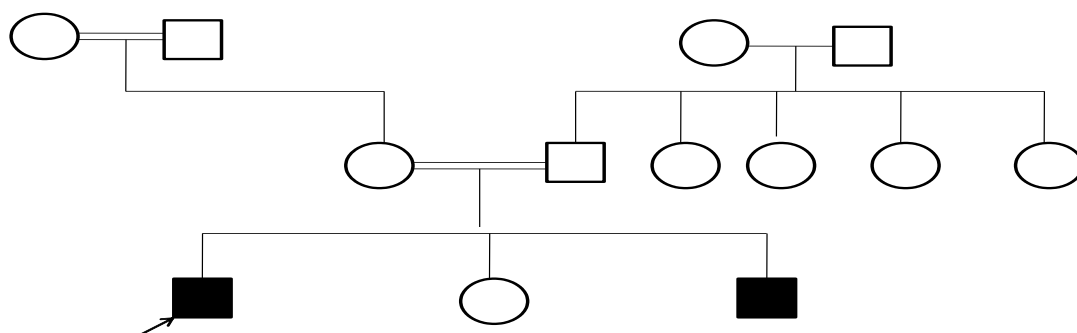
Famille N : 33



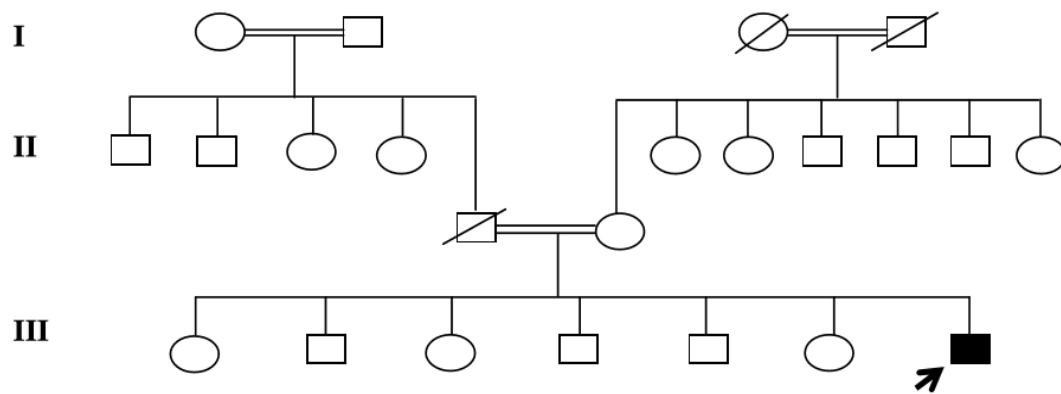
Famille N : 34



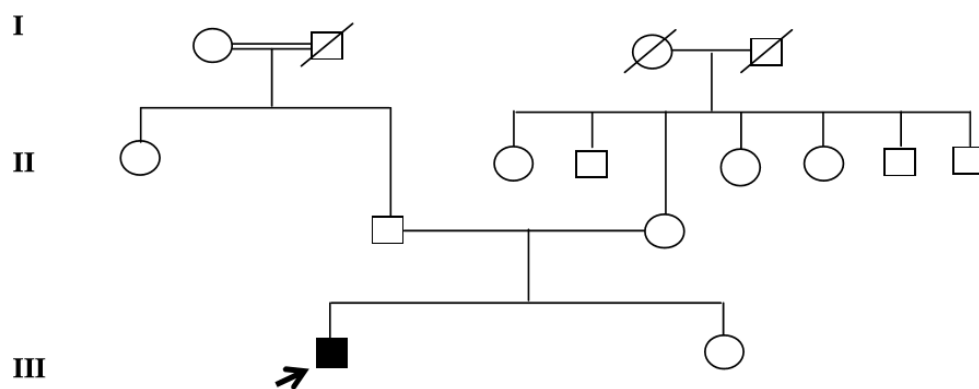
Famille N : 35



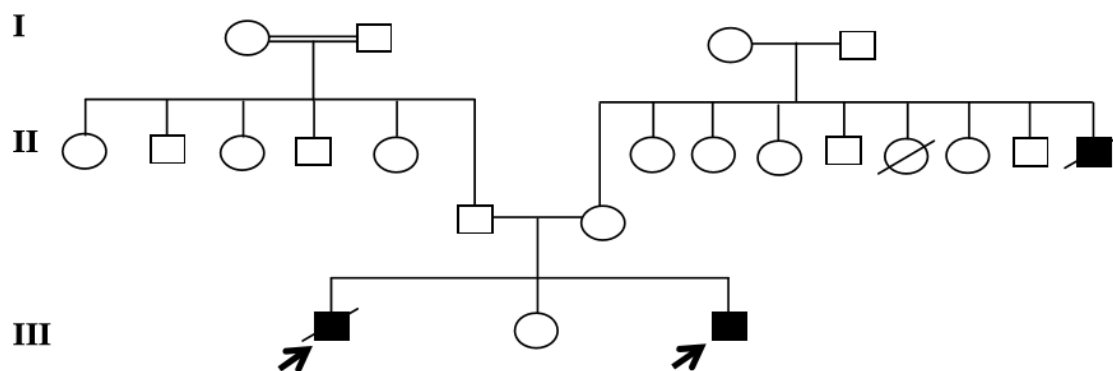
Famille N : 36



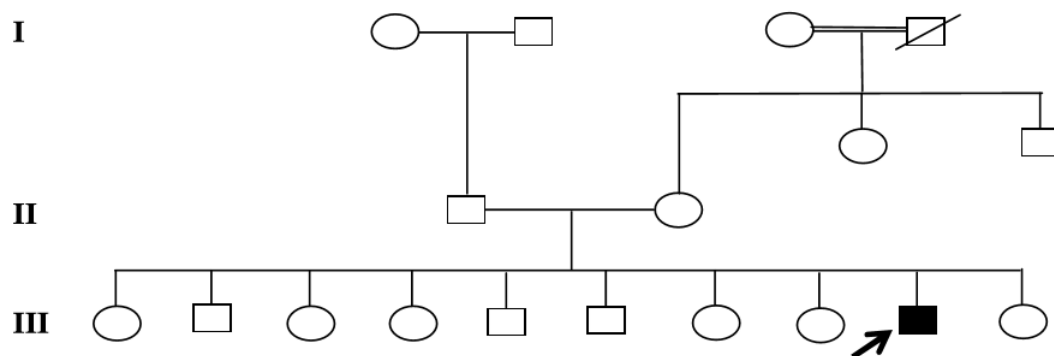
Famille N : 37



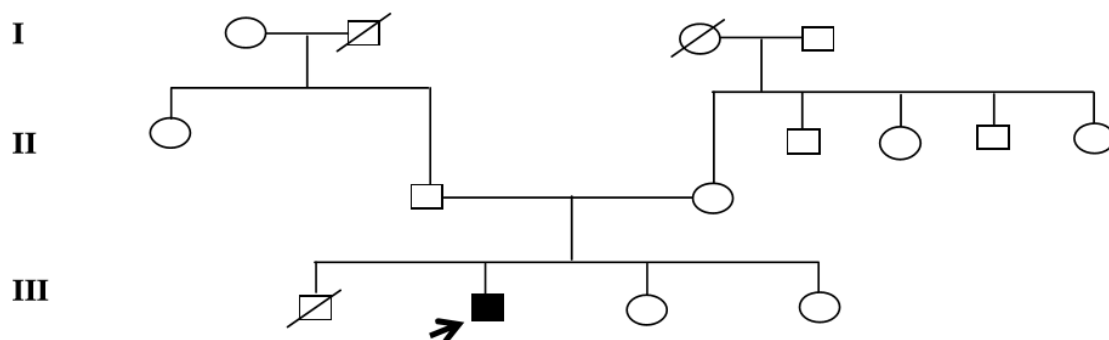
Famille N : 38



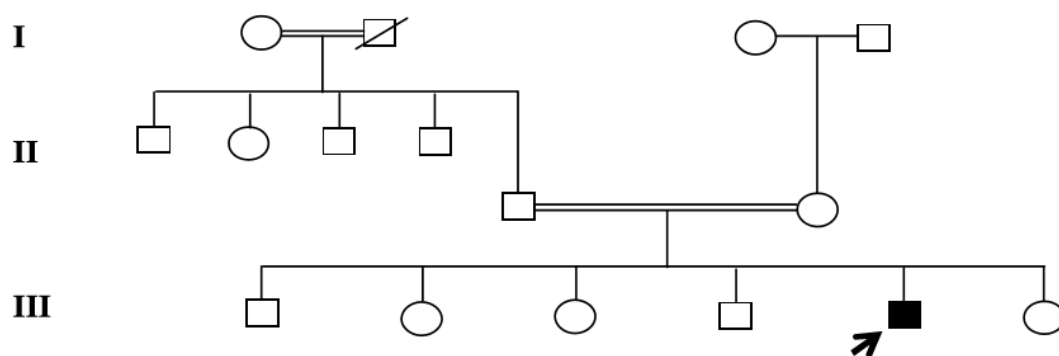
Famille N : 39



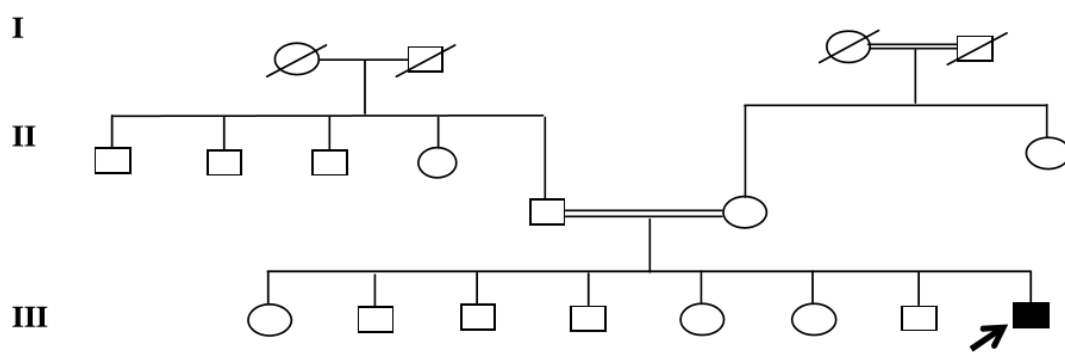
Famille N : 40



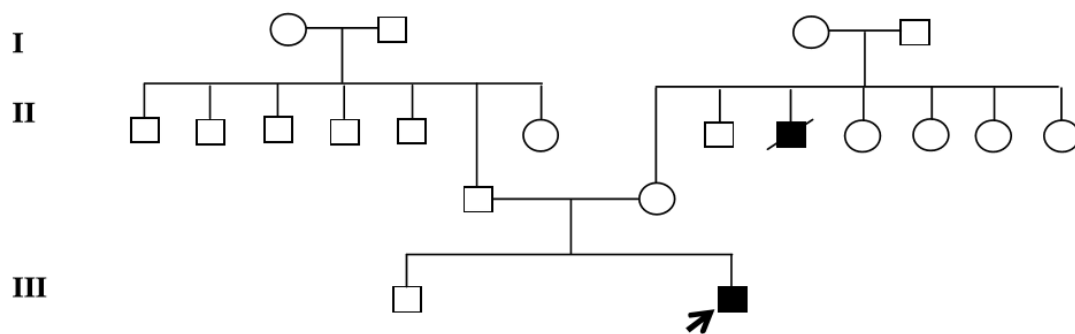
Famille N : 41



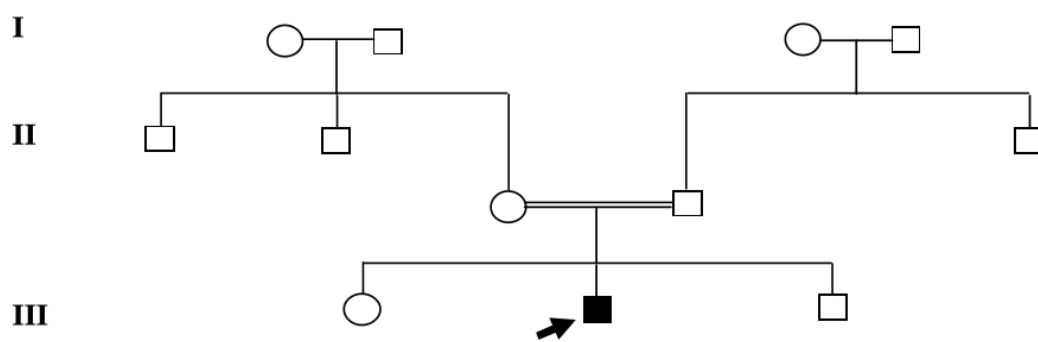
Famille N : 42



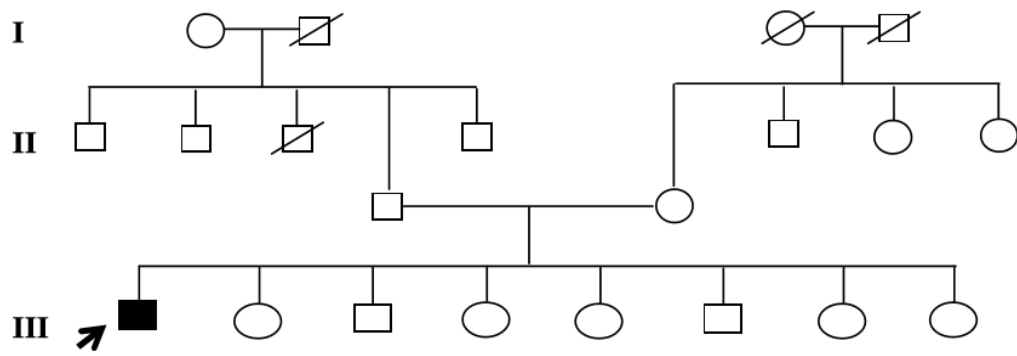
Famille N : 43



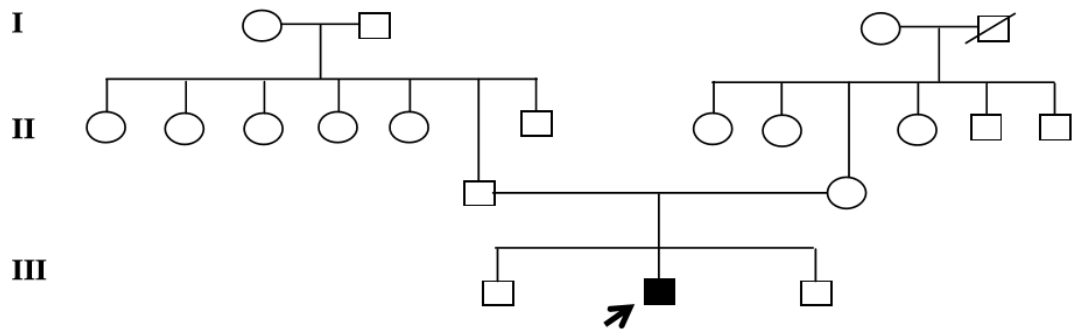
Famille N : 44



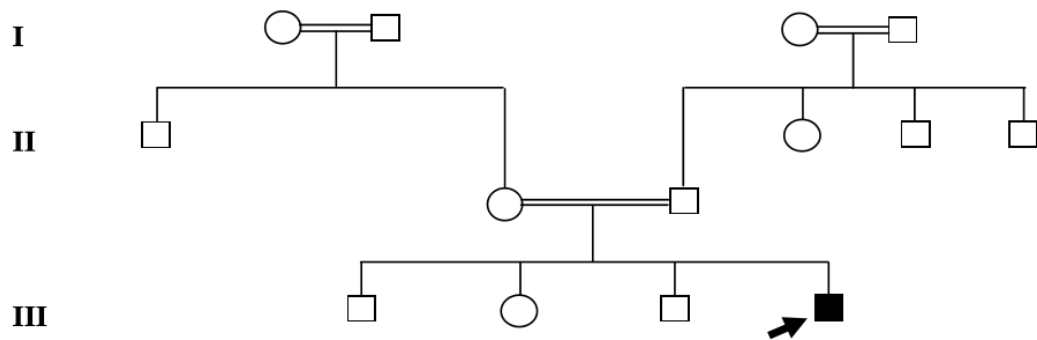
Famille N : 45



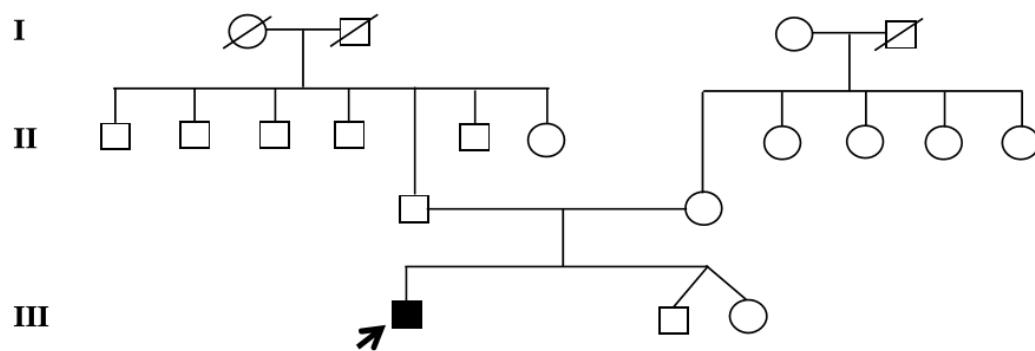
Famille N : 46



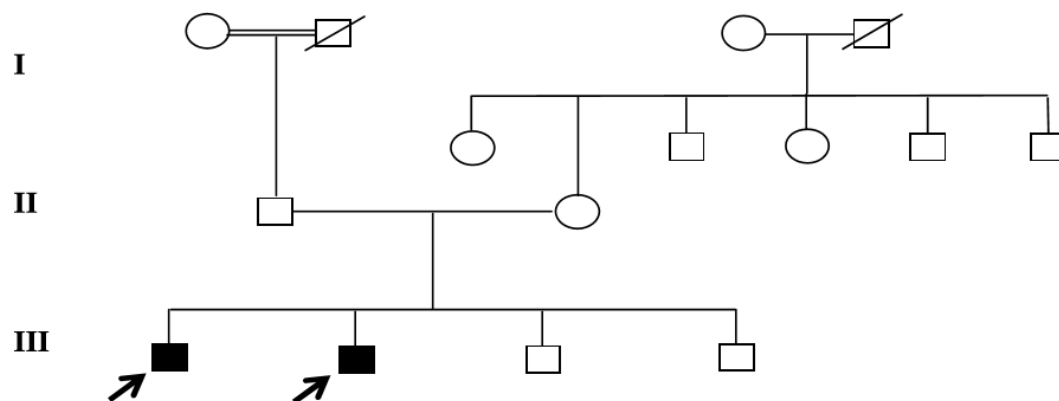
Famille N : 47



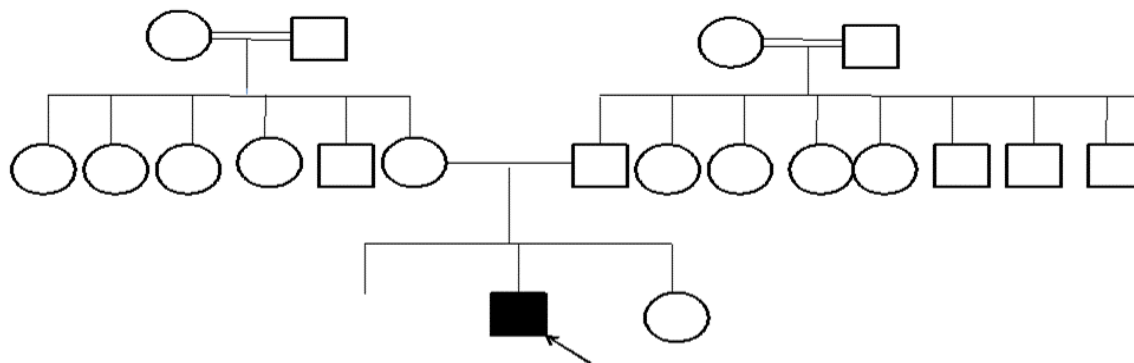
Famille N : 48



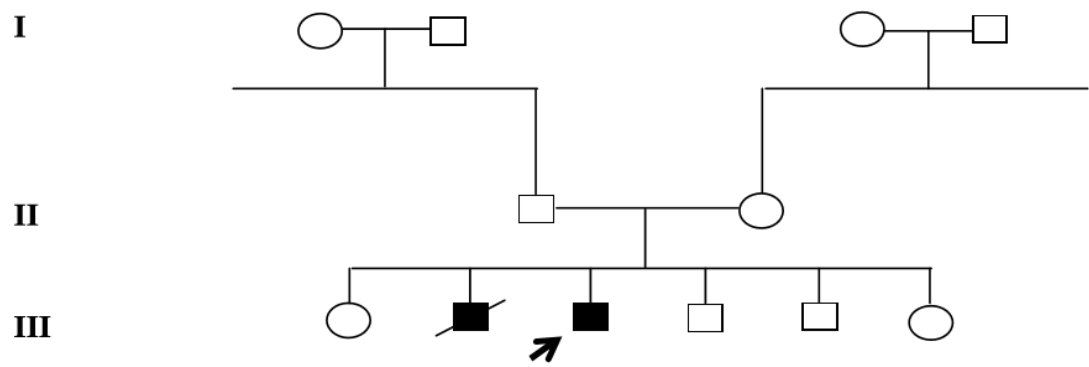
Famille N : 49



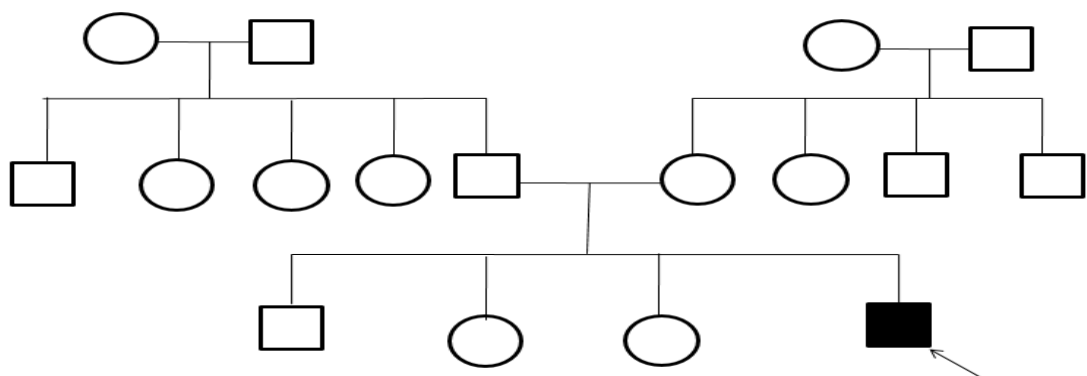
Famille N : 50



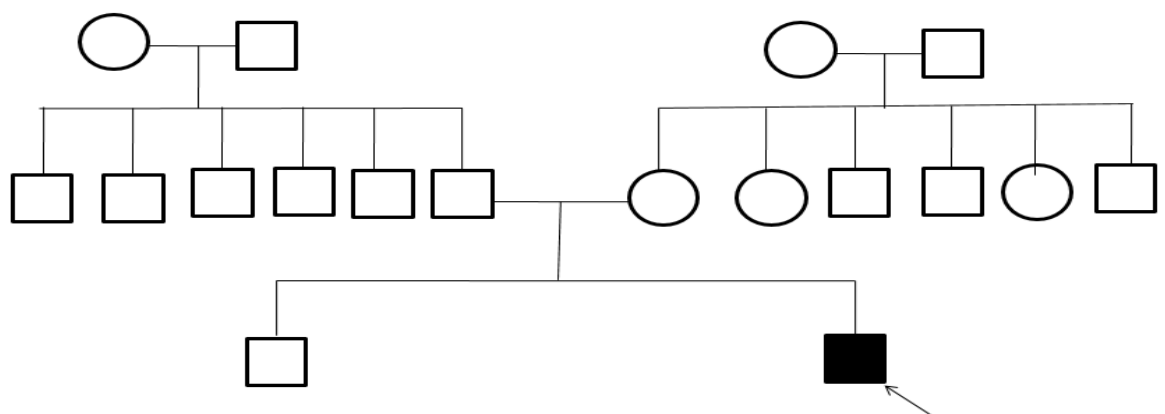
Famille N : 51



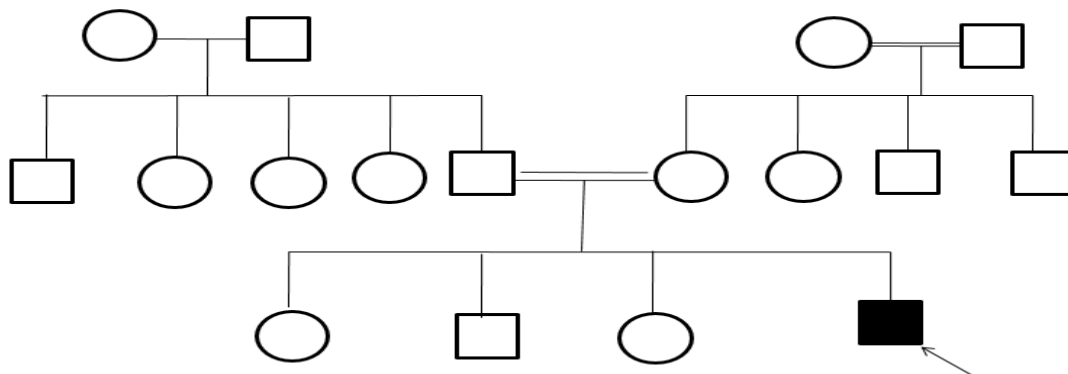
Famille N : 52



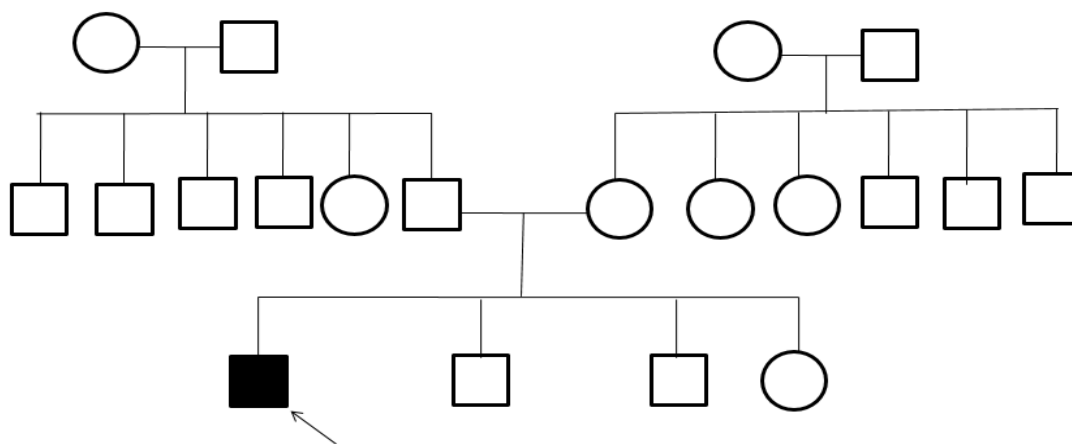
Famille N : 53



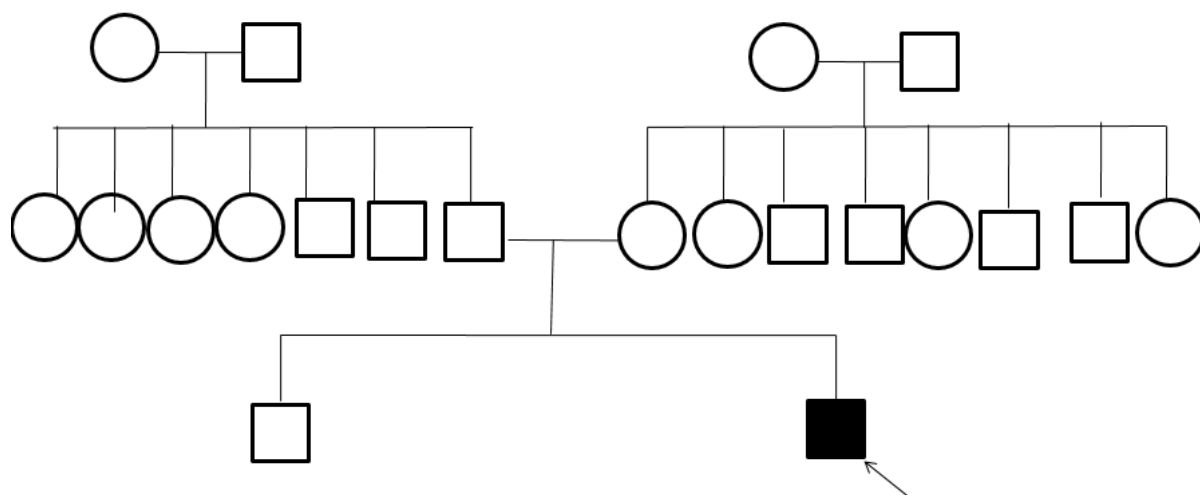
Famille N : 54



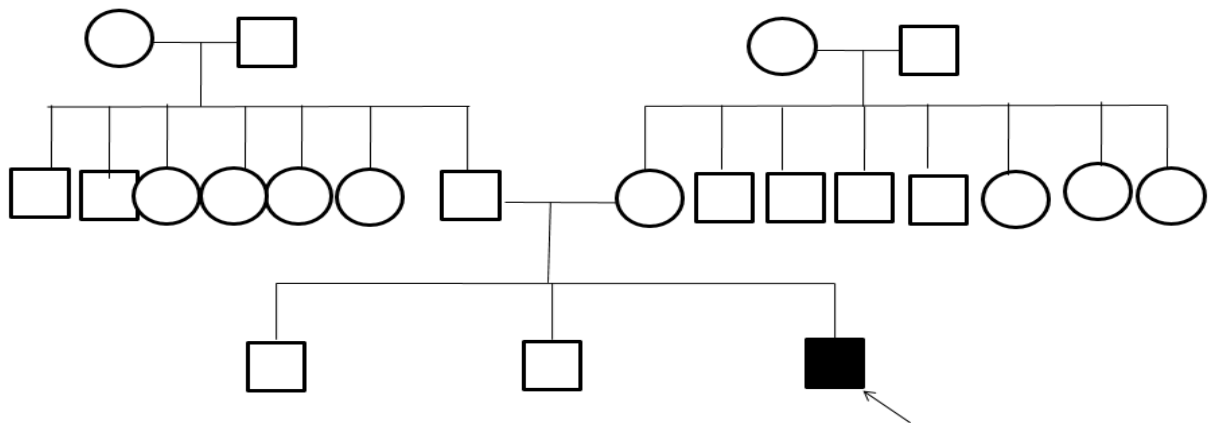
Famille N : 55



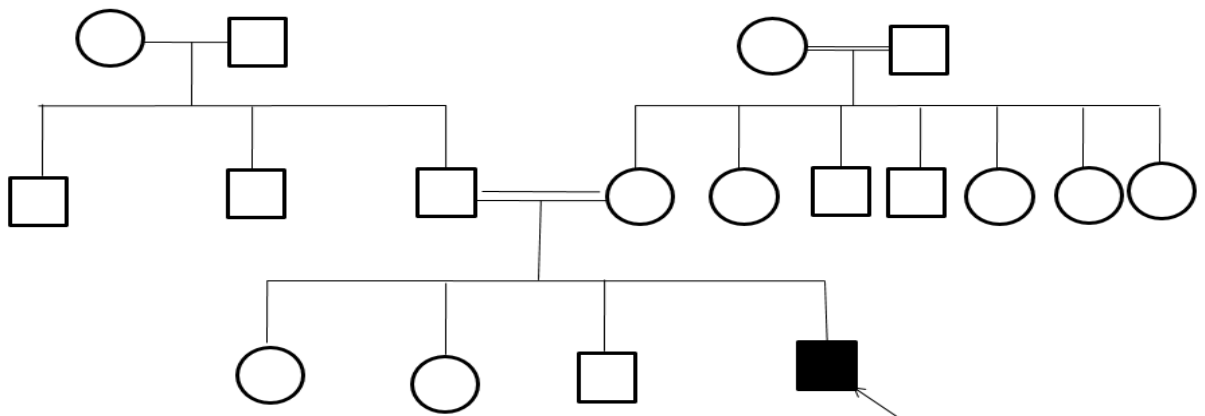
Famille N : 56



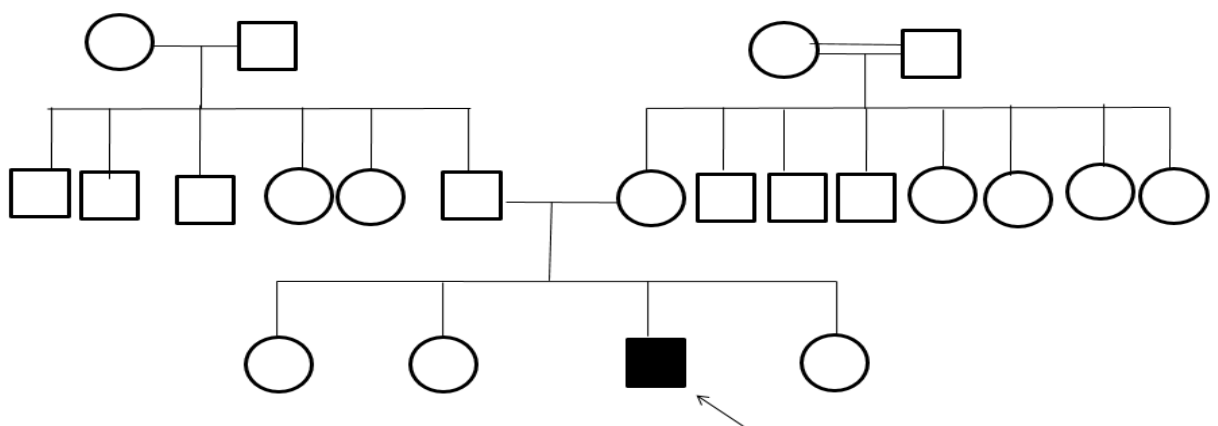
Famille N : 57



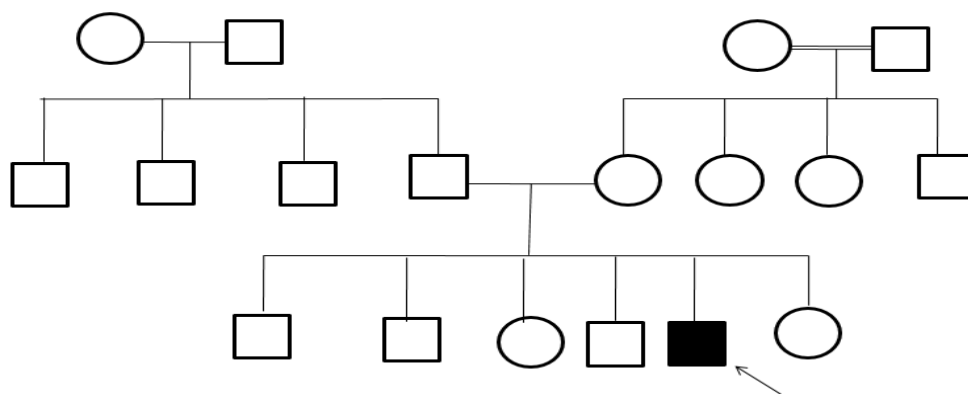
Famille N : 58



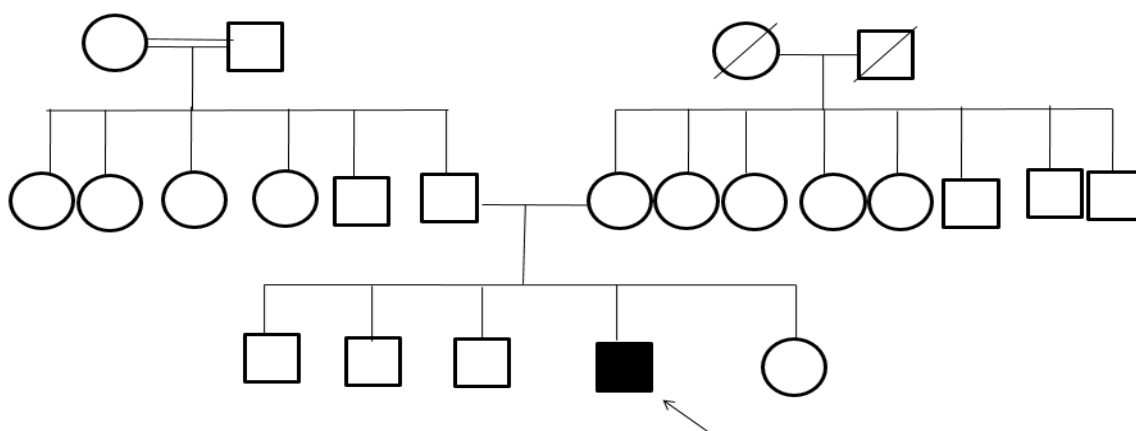
Famille N : 59



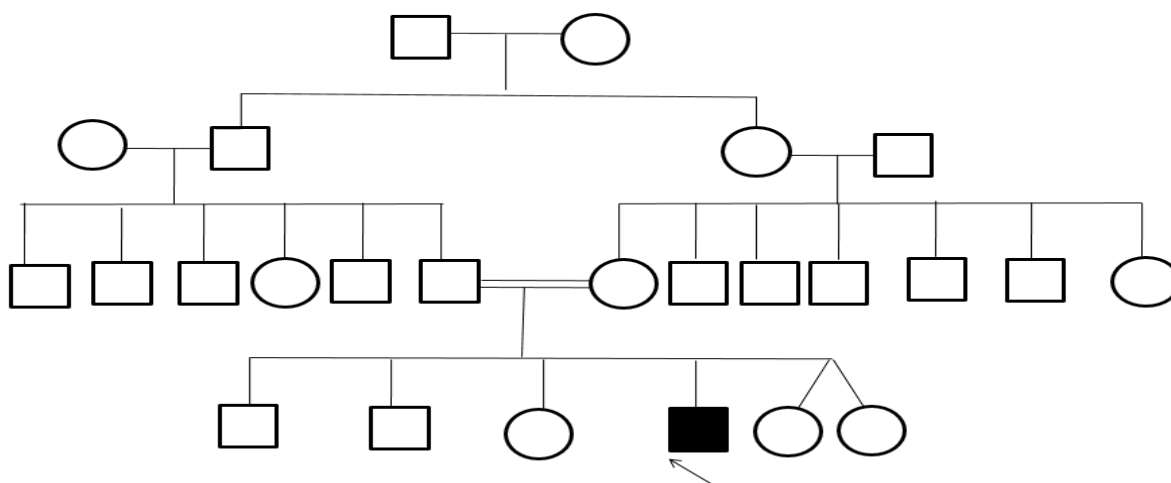
Famille N : 60



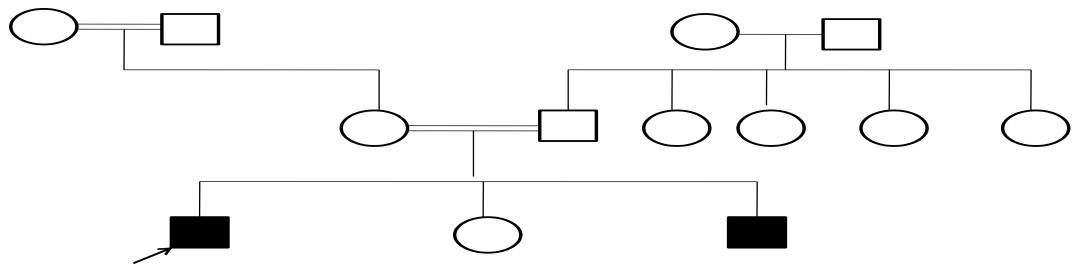
Famille N : 61



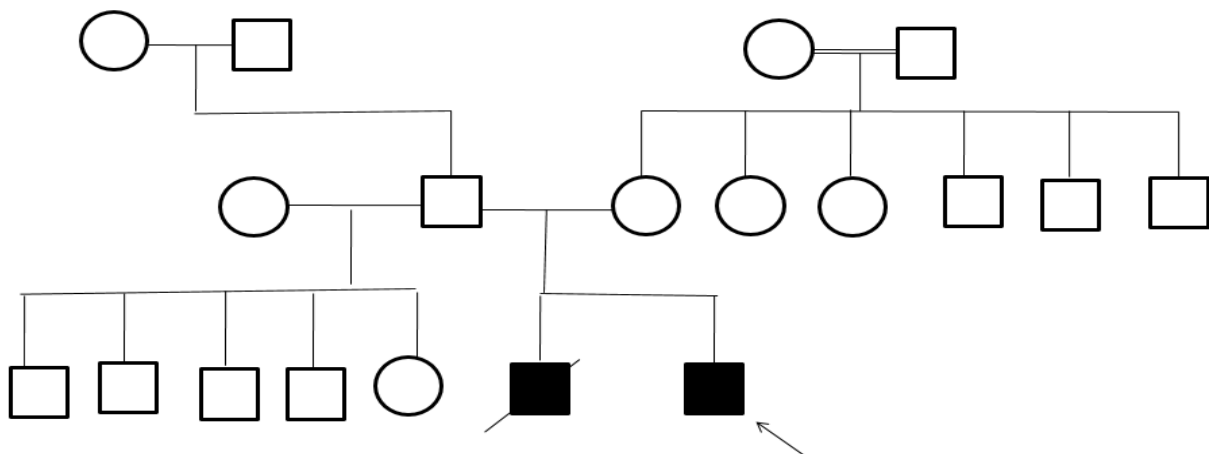
Famille N : 62



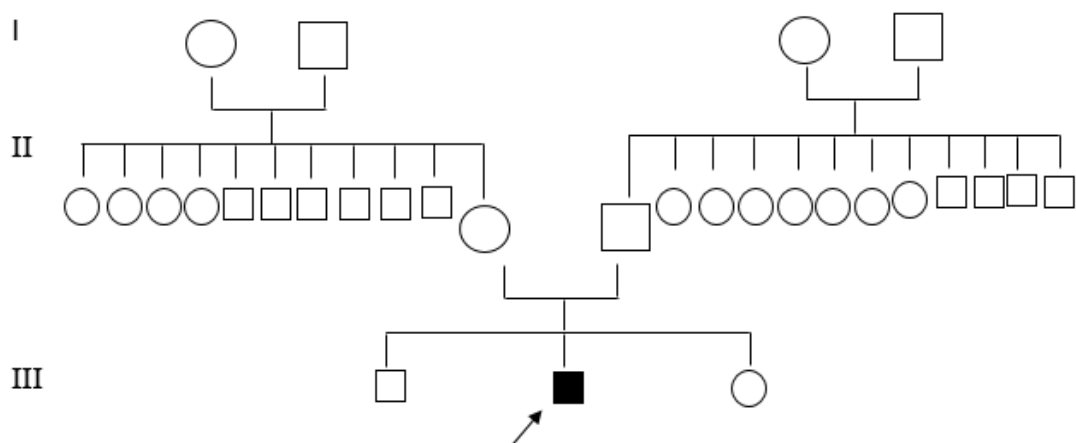
Famille N : 63



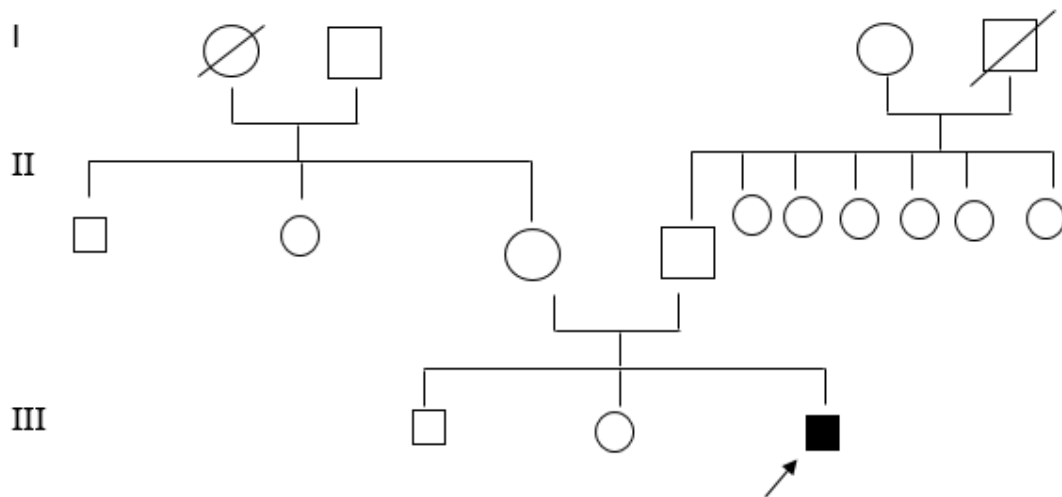
Famille N : 64



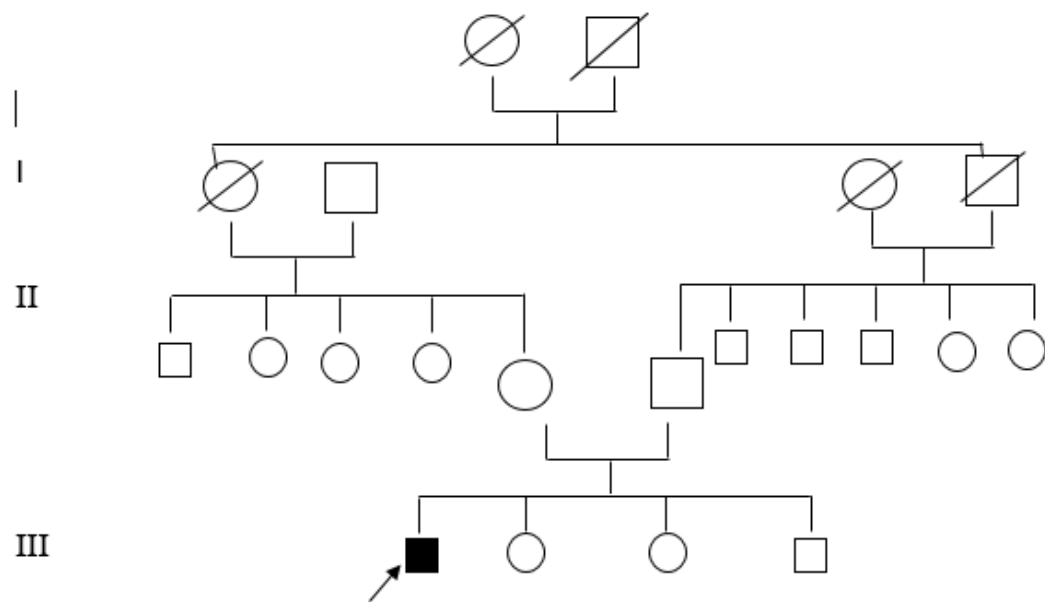
Famille N : 65



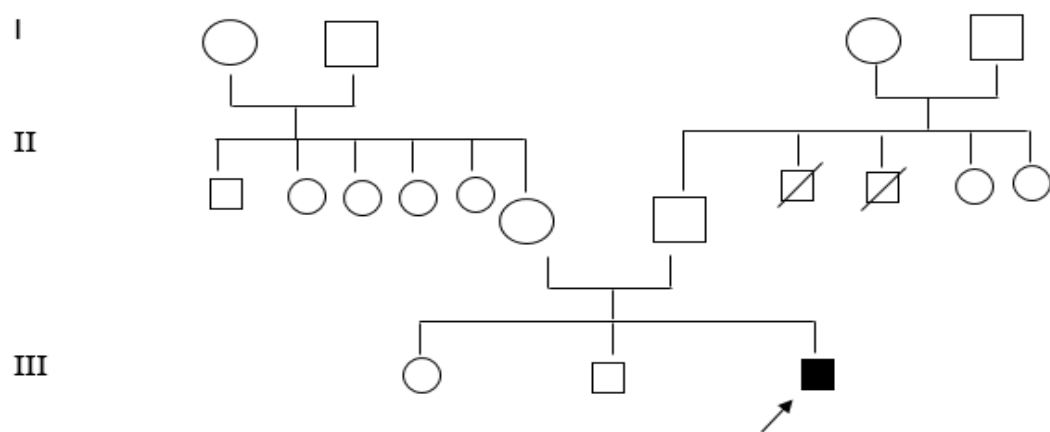
Famille N : 66



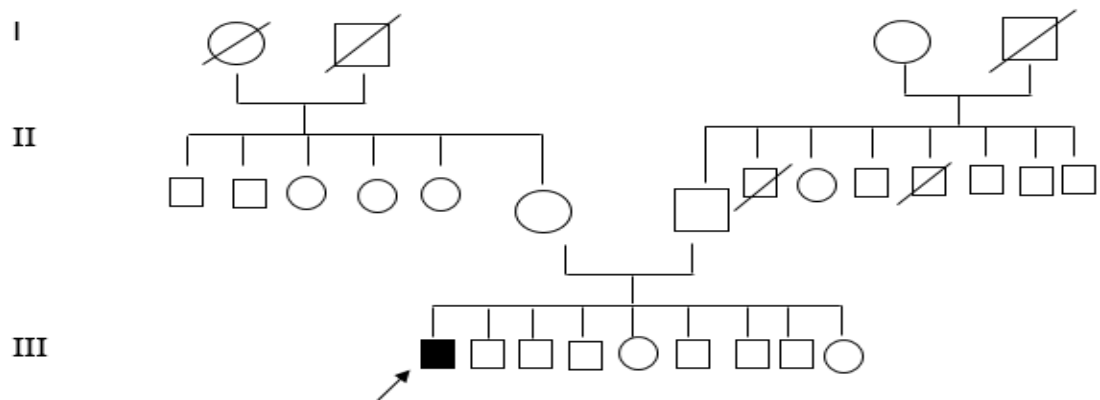
Famille N : 67



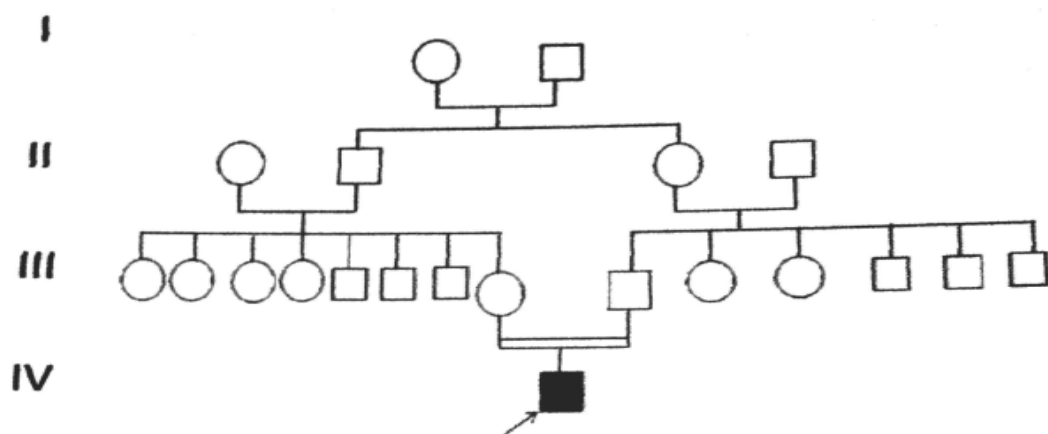
Famille N : 68



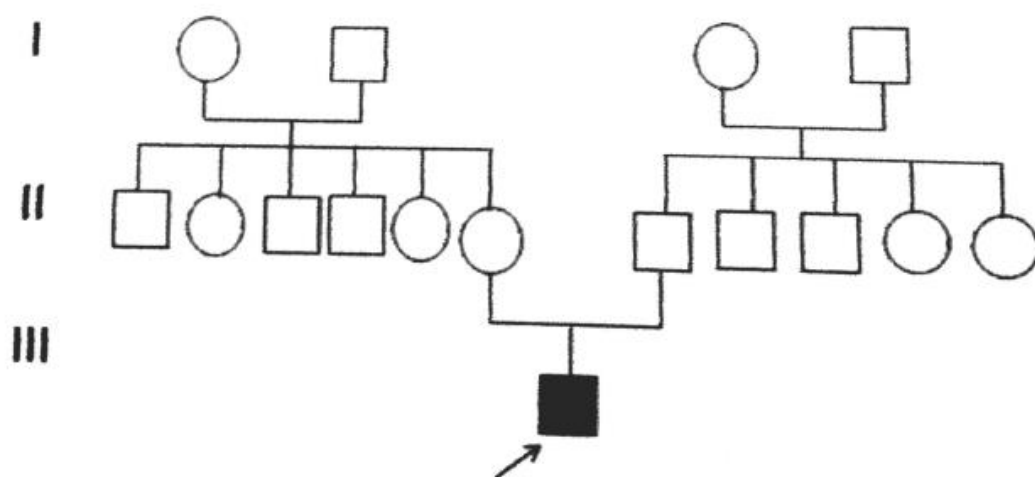
Famille N : 69



Famille N : 70



Famille N : 71



Famille N : 72

Annexe 6. séquences des amorces utilisées en PCR multiplex

Amplified exon	in set	Reference	Length (in bp)	Forward / reverse primer	Name
Dp427m exon 1	a	Beggs 1990	535	GAAGATCtagacagtgatacataacaatgcatg / ttctccgaagtaattgcctcccagatctgagtc	PmF/R
exon 3	b	Beggs 1990	410	tcatcc <u>a</u> tcatcttcggcagattaa ^b / cagggcgttagatgtagccaaatgaaaatca	ex3-F/R
exon 43	c	Beggs 1990	357	gaacatgtcaaagtcactggacttcatgg / atatatgtttacctacCCTTGTCGGTCC	ex43-F/R
exon 50	d	Beggs 1990	271	caccaatggattaagatgttcatgaat / tctctcaccagtcacacttcatag	ex50-F/R
exon 13	e	Beggs 1990	238	aataggagtacctgagatgtagcagaaat / ctgacCTTAAGTTGTTCTTCCAAAGCAG	ex13-F/R
exon 6	f	Beggs 1990	202	ccacatgtagTCAAAAATGTAATGAA / gtctcagtaactctctacCTATGACTATGG	ex6-F/R
exon 47	g	Beggs 1990	181	cggtgttcattgtctgtttcagTTAC / gtctaacCTTTATCCACTGGAGATTTG	ex47-F/R
exon 60	h	Beggs 1990	139	AGGAGAAATTGCGCCTCTGAAAGAGAACG / CTGCAGAAGCTTCCATCTGGTGTTTCAGG	ex60-F/R
exon 52	i	Beggs 1990	113	AATGCAGGATTTGGAACAGAGGCGTCC / TTCGATCCGTAATGATTGTTCTAGCCTC	ex52-F/R

Amplified exon	in set	Reference	Length (in bp)	Forward / reverse primer	Name
exon 45	a	Chamberlain 1990	547	aaacatggaacatccttgtggggac / cattcctattagatctgtcgcctac	ex45-F/R
exon 48	b	Chamberlain 1990	506	ttgaatacattggttaaatcccaacatg / cctgaataaagtcctccttaccacac	ex48-F/R
exon 19	c	Chamberlain 1990	459	gatggcaaaagtgttgagaaaagtc / ttctaccacatcccattttctcca	ex19-F/R
exon 17	d	Chamberlain 1990	416	gactttcgatgttgagattactttccc / aagcttgagatgctctcacCTTTTCC	ex17-F/R
exon 51	e	Chamberlain 1990	388	gaaattggctcttagcttgtgttc / ggagagtaaagtattggtgaaaatc	ex51-F/R
exon 8	f	Chamberlain 1990	360	ggcctcattctcatgttctaattag / gtcctttacacactttacCTGTTGAG	ex8-F/R
exon 12	g	Chamberlain 1990	331	gatagtggccttacttacatccttc / gaaagcacgcaacataagatacacct	ex12-F/R
exon 44	h	Chamberlain 1990	268	cttgatccatagctttacctgca / tccatcacccttcagaacctgatct	ex44-F/R
exon 4	i	Chamberlain 1990	196	ttgtcggctctctgctggtcagtg / caaagccctcactcaaacatgaagc	ex4-F/R

Exon46 : GCTAGAAGAACAAAAGAATATCTTGTC(ex46-F) et CTTGACTTGCTCAAGCTTTTCTTTTAG (ex46-R)

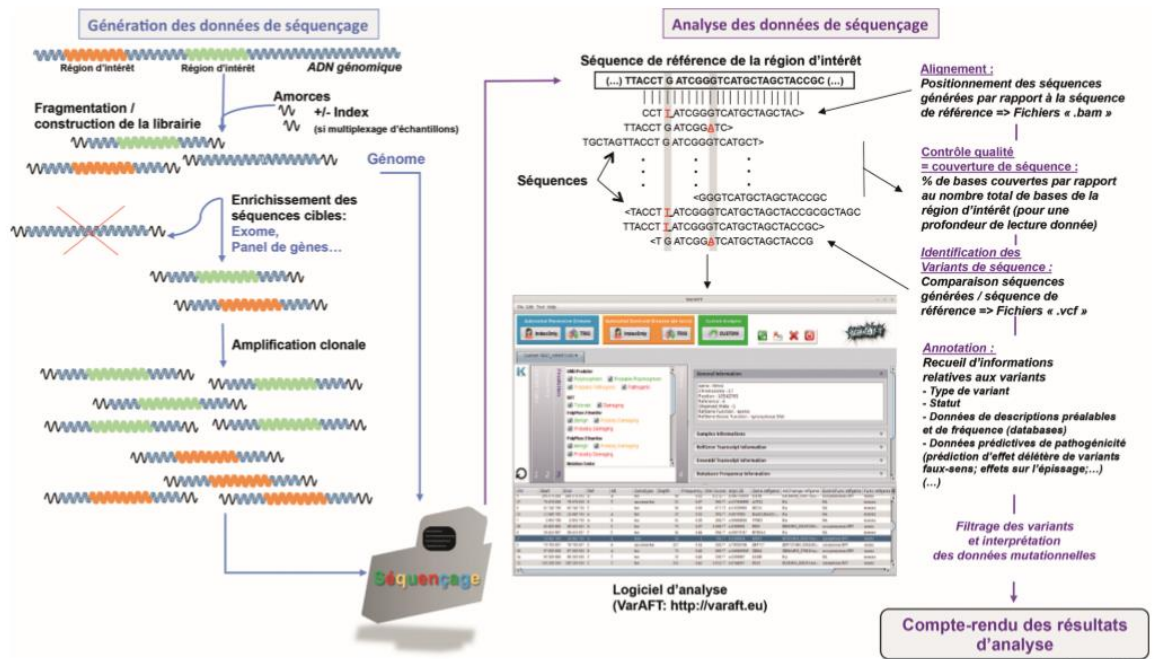
Annexe 7 : les techniques utilisées dans notre étude

1. Séquençage de nouvelle génération :

Le NGS repose sur la génération massive de données de séquences obtenues par des cycles successifs d'incorporation de nucléotides, et ainsi l'émission de signaux qui sont ensuite convertis en information de séquence. Différentes technologies existent actuellement, notamment basées sur un séquençage en parallèle de millions de molécules d'ADN.

Le NGS permet dorénavant d'effectuer l'analyse de régions d'intérêt de grande taille, ce qui n'était pas possible avec le séquençage « classique » (méthode de Sanger) utilisé depuis les années 1980, en raison de limitations de coûts et de débit de quantités de séquences pouvant être générées, ce qui restreignait son application à des approches de séquençage « gène après gène », responsable dans de nombreux cas d'une longue errance diagnostique. Avec une multiplication des capacités de séquençage dans un rapport de plusieurs dizaines voire centaines de milliers de fois par rapport au séquençage Sanger, le NGS a permis le développement de nouvelles stratégies d'analyses mutationnelles, dont trois principales sont actuellement utilisées :

- **Analyse de « listes de gènes » ou « panel de gènes »** : il s'agit de l'analyse simultanée de la séquence d'un certain nombre de gènes d'intérêt (habituellement une ou plusieurs dizaines). L'approche « panel de gènes » est actuellement la plus utilisée en diagnostic génétique, notamment pour analyser des listes de gènes connus comme étant impliqués dans un groupe de pathologies (par exemples les dystrophies musculaires, ou encore les myopathies ou les neuropathies périphériques au sens large). Certains « panels de gènes » très larges sont commercialisés et comportent la majorité des gènes répertoriés comme étant impliqués en pathologie humaine (plus de 4 000), dans la base de données OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man, www.omim.org).
- **Analyse « d'exome » (« Whole Exome Analysis/ WES »)** : cette approche consiste en l'analyse simultanée de la totalité des séquences codantes (et bornes introniques flanquantes) de tous les gènes du génome (environ 20 000), correspondant à environ 1 % du génome, soit environ 180 000 exons et 30 millions de paires de bases.
- **Analyse du génome dans son intégralité (« Whole Genome Analysis »/WGS)** soit 3 milliards de bases, comprenant les séquences codantes et non codantes



Principales étapes de génération et d'analyse de données de NGS.

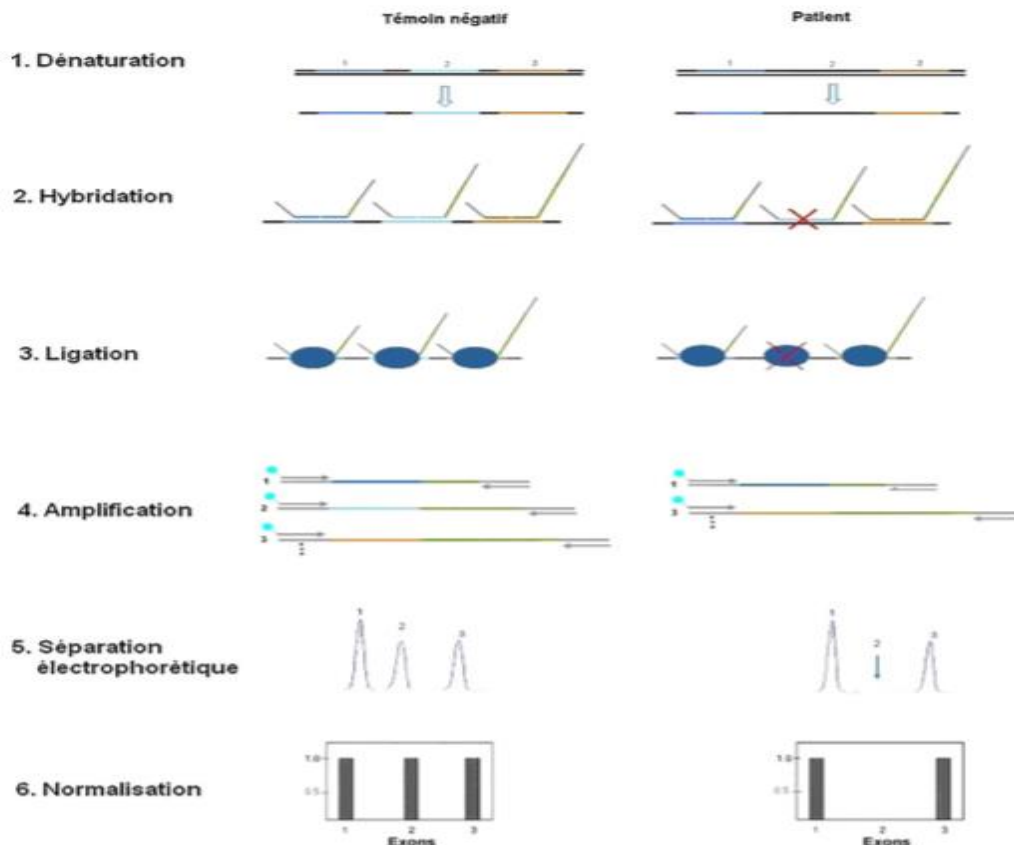
2. Multiplex Ligation dependent Probe Amplification La MLPA permet la détection de remaniements génomiques de grande taille. Cette technique est utilisée pour la recherche de perte et/ou de duplication exonique (non visible lors du séquençage).

➤ Principe de la MLPA

Est basé sur une réaction de ligation de 2 oligonucléotides adjacents, formant une sonde après leur hybridation à des séquences cibles spécifiques, ce qui permet d'obtenir pour chaque locus un fragment amplifié de taille différente et de les quantifier par électrophorèse sur un séquenceur. Chaque fragment peut alors être visualisé sous forme d'un pic qui selon son amplitude par rapport au témoin, permet la détection du nombre de copies au niveau de ce locus. MLPA comporte 4 étapes :

- 1. Hybridation** Après dénaturation, une dilution d'ADN (généralement à 50 ng/μl), est mis en contact avec un Mix de sondes (amorces de ligation) pour une hybridation passive pendant 16 heures (une nuit) à 60°C.
- 2. Ligation** la ligation ne se réalisera que si les 2 « amorces de ligation » se sont hybridées de façon spécifique et conjointe. La ligase raccordera donc la partie 3' à la partie 5' phosphorylée.
- 3. PCR** Après inactivation de la ligase par chauffage, on réalise une amplification des produits de ligation. L'amorce anti sens est marquée en 5' par un fluorophore, permettant par la suite la détection des amplifiats après séparation électrophorétique sur un automate de séquençage. Durant le premier cycle de PCR, seul l'amorce Reverse s'hybride. Au moment du second cycle la deuxième amorce s'hybride également.
- 4. Etude de fragments** Migration des produits d'amplification sur le séquenceur. Une étude de la perte et/ou délétion exonique est réalisée en comparant la hauteur des pics obtenue pour un patient avec celle des témoins normaux, grâce à l'utilisation d'un programme de calcul informatique.

Les résultats sont analysés par un logiciel dédié (exemple Genemapper®, Applied Biosystems, Foster City, CA). Ces outils bioinformatiques permettent de visualiser facilement les profils obtenus, d'identifier les pics et de calculer les aires ou les hauteurs des différents pics représentés.



Les étapes de MLPA

3. PCR semi quantitative

PCR quantitative: on quantifie les produits pendant tout le déroulement de la PCR (quantitatif dans la phase exponentielle).

PCR semi quantitative utilisé pour signifier que la technique de quantification n'est pas absolue dans le sens où elle ne permet pas de donner une quantité en nombre de molécules.

- Principe général de détection: utilisation d'un (ou plusieurs) fluorochromes: l'émission de fluorescence est le reflet de la quantité d'ADN synthétisée à chaque cycle.
- Principe des appareils de Q-PCR: un thermocycleur couplé à un fluorimètre qui mesure la fluorescence émise à chaque cycle (fluorimètre= laser pour exciter les fluorochromes+ système de détection de la fluorescence émise).

4. PCR digitale

La PCR digitale permet une quantification absolue des acides nucléiques de façon indépendante de l'efficacité de PCR. Son principe est de répartir l'ADN dans plusieurs milliers de gouttelettes (10 000 à 20 000) réalisant autant de PCR indépendantes. La détection de la réaction de PCR se fait en point final, basé sur la détection d'une fluorescence. Les résultats s'analysent en comptant le nombre de gouttelettes positives par rapport à leur nombre total et permet ensuite de calculer un nombre de copie/ μL d'ADN détecté.

Résumé

Les dystrophinopathies représentées principalement par la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) et sa variante allélique, la dystrophie musculaire de Becker (BMD) sont les premières causes de myopathie de l'enfant de sexe masculin. Elles sont transmises selon un mode récessif lié à l'X et résultent de mutations dans le gène de la dystrophine situé sur le bras court du chromosome X en X p21.

L'objectif de notre étude était de rapporter les différents aspects cliniques et moléculaires des patients présentant un phénotype de dystrophinopathie de l'est Algérien et de rechercher, vue de la grande hétérogénéité clinique et délétionnelle, les corrélations entre le phénotype et le génotype. Nos patients ont été sélectionnés selon des critères d'inclusion et l'ensemble de nos patients (102) a bénéficié d'une analyse systématique du gène de la dystrophine par les techniques PCRm, MLPA et le séquençage de nouvelle génération.

Les patients avaient un âge moyen de 10 ans et 8 mois, avec un âge moyen de début des symptômes 4 ans et 9 mois. La consanguinité parentale a été estimée à 32.87%. 60.8% de nos patients étaient des cas sporadiques et 37.8% familiaux.

Nos patients ont été répartis en 64 DMD, 27 DMD, 2 IMD et 7 de phénotype indéterminé. Tous les patients ont présenté un phénotype classique dominé par un déficit moteur bilatéral et symétrique majoritairement proximal avec dans 82,7% une hypertrophie des mollets et des taux sériques de CPK très élevés.

L'analyse moléculaire du gène *DMD* à l'aide des techniques PCRm, MLPA et NGS a montré que les délétions d'un ou plusieurs exons ont été retrouvées chez 71 patients (85.5%) regroupées dans la région distale entre les exons 44 et 53 et dont la plus fréquente est celle de l'exon 45. Les duplications ont été retrouvées chez 2 patients (2.4%) et les mutations ponctuelles dans 12% des cas. Notre étude a permis d'identifier deux nouvelles mutations qui n'ont jamais été décrites auparavant. Nos résultats avaient généré des données considérables sur les réarrangements mutationnels susceptibles de promouvoir de futures thérapies expérimentales en Algérie.

Mots clés : Dystrophies musculaires de Duchenne et Becker , Patients algériens, Mutations, PCR multiplex, MLPA, NGS.

Abstract

Dystrophinopathies represented primarily by the Muscular Dystrophy Duchenne (DMD) and its allelic variant Becker muscular dystrophy (BMD) are the leading cause of myopathy of the male child, they are transmitted by recessive fashion gonosomal which result from mutations in the dystrophin gene located on the short arm of chromosome X X p21.

The aim of our study was to: Report the various clinical and molecular aspects of patients with a phenotype of dystrophinopathy of the eastern Algerian and to seek, in view of the great clinical heterogeneity and deleterious, some correlations between the phenotype and genotype

The clinical and genetic analysis of 102 Algerian Dystrophinopathies patients from unrelated families have been reported. After informed consent, multiplex polymerase chain reaction (mPCR), multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), and next generation sequencing (NGS) were established to identify mutations.

The patients had a mean age of 10 years and 8 months, with a mean age of onset of 4 years and 9 months to. Parental consanguinity was estimated at 32.87%., While 60.8% of our patients were sporadic and 37.8% familial.

Our patients were divided into 64 DMD, 27 BMD, 2 IMD and 7 undetermined phenotypes. All patients presented a classical phenotype dominated by bilateral and symmetrical motor deficit predominantly proximal with 82.7% calf hypertrophy and very high serum CK levels.

DMD gene molecular analysis showed 85.5% deletion mainly between exons 44 and 53 with exon 45 as the most common deletion and 2.4% duplication. Moreover, point mutations were found in 12 % cases. In addition, two new mutations have been described. Our study had generated considerable data on mutational rearrangements that may promote future experimental therapies in Algeria.

Keywords : Duchenne and Becker muscular dystrophy; Algerian patients; Mutations; Multiplex PCR, MLPA; NGS.

المخلص

تتمثل امراض ضمور العضلات بشكل رئيسي في الحثل العضلي الدوشيني (DMD) وكذلك ضمور بيكر العضلي البديل (BMD) الذي يمثل السبب الرئيسي للاعتلال العضلي عند الأطفال من جنس الذكور، وينتقل هذا عن طريق الوضع المتحى التناسلي الذي ينتج عنه طفرات في جين ديستروفين الواقع على الذراع القصير للكروموسوم 21 pXX .

تهدف دراستنا الى البحث مع وضع تقارير حول الجوانب السريرية والجزئية المختلفة للمرضى الذين يعانون من النمط الظاهري لاعتلال ضمور العضلات في الشرق الجزائري نظرا لعدم التجانس الكلينيكي الكبير وكذا الارتباطات بين النمط الظاهري والنمط الجيني.

تم اختيار مرضانا وفقاً لمعايير التضمين وخضع جميع مرضانا لتحليل منهجي لجين الديستروفين باستخدام تقنية m PCR و MLPA وتسلسل الجيل التالي.

تم الإبلاغ عن التحليل السريري والوراثي لـ 102 من مرضى ضمور العضلات من عائلات جزائرية غير مرتبطة وهذا بعد الموافقة المسبقة، وهذا من خلال إنشاء كل من تفاعل سلسلة البوليميراز المتعدد (mPCR) ، تضخيم المجس المعتمد على الربط المتعدد (MLPA) وتسلسل الجيل التالي (NGS) لتحديد الطفرات.

تم تقسيم مرضانا إلى 64 DMD و 27 BMD و 2 IMD و 7 أنماط ظاهرية غير محددة.

حيث قدم جميع المرضى نمطاً ظاهرياً كلاسيكياً يسيطر عليه عجز حركي ثنائي ومتماثل في الغالب، مع تضخم في ريلة الساق بنسبة 82.7% وتسجيل مستويات عالية جداً من CK في المصل.

أظهر التحليل الجزيئي لجين DMD باستخدام تقنيات mPCR و MLPA و NGS أنه تم العثور على عمليات حذف لواحد أو أكثر من exons في 71 مريضاً أي بنسبة (85.5%) تم تجميعهم في المنطقة البعيدة بين 44 و Exon 53 ، حيث يعتبر exon 45 الحذف الأكثر شيوعاً، كما تم العثور على مضاعفات في 2 مرضى بنسبة (2.4%) بالإضافة إلى ذلك ، تم العثور على طفرات نقطية في 12% من الحالات

كما حددت دراستنا طفرتين جديدتين لم يتم وصفهما من قبل، حيث أنتج هذا البحث معطيات معتبرة حول إعادة ترتيب الطفرات التي يحتمل أن تعزز العلاجات التجريبية المستقبلية في الجزائر.

الكلمات المفتاحية: الحثل العضلي دوشين وبيكر. المرضى الجزائريون، الطفرات. Multiplex PCR ، MLPA ، NGS.

Nom et prénom : HAMDUCHE NADIRA	Date de soutenance : 11/02/2021
Thème : Aspects cliniques et génotypiques des dystrophinopathies Duchenne et Becker dans l'Est algérien	
RESUME	
<p>Les dystrophinopathies représentées principalement par la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) et sa variante allélique, la dystrophie musculaire de Becker (BMD) sont les premières causes de myopathie de l'enfant de sexe masculin. Elles sont transmises selon un mode récessif lié à l'X et résultent de mutations dans le gène de la dystrophine situé sur le bras court du chromosome X en X p21.</p>	
<p>L'objectif de notre étude était de rapporter les différents aspects cliniques et moléculaires des patients présentant un phénotype de dystrophinopathie de l'est Algérien et de rechercher, vue de la grande hétérogénéité clinique et délétionnelle, les corrélations entre le phénotype et le génotype.</p>	
<p>Nos patients ont été sélectionnés selon des critères d'inclusion et l'ensemble de nos patients (102) a bénéficié d'une analyse systématique du gène de la dystrophine par les techniques PCRm, MLPA et le séquençage de nouvelle génération.</p>	
<p>Les patients avaient un âge moyen de 10 ans et 8 mois, avec un âge moyen de début de 4 ans et 9 mois. La consanguinité parentale a été estimée à 32,87%. 60,8% de nos patients étaient des cas sporadiques et 37.8% familiaux.</p>	
<p>Nos patients ont été répartis en 64 DMD, 27 DMD, 2 IMD et 7 de phénotype indéterminé. Tous les patients ont présenté un phénotype classique dominé par un déficit moteur bilatéral et symétrique majoritairement proximal avec dans 82,7% une hypertrophie des mollets et des taux sériques de CPK très élevés.</p>	
<p>L'analyse moléculaire du gène <i>DMD</i> à l'aide des techniques PCRm, MLPA et NGS a montré que les délétions d'un ou plusieurs exons ont été retrouvées chez 71 patients (85,5%) regroupées dans la région distale entre les exons 44 et 53 et dont la plus fréquente est celle de l'exon 45. Les duplications ont été retrouvées chez 2 patients (2,4%) et les mutations ponctuelles dans 12% des cas. Notre étude a permis d'identifier deux nouvelles mutations qui n'ont jamais été décrites auparavant. Nos résultats avaient généré des données considérables sur les réarrangements mutationnels susceptibles de promouvoir de futures thérapies expérimentales en Algérie.</p>	
<p>Mots clés : Dystrophie musculaire de Duchenne et Becker; Patients algériens; mutations; PCR multiplex, MLPA; NGS.</p>	
<p>Président de jury : Pr. ARHAB. R Directeur de thèse : Pr. SIFI. Y Co-encadreur : Pr. MEHDI .DJ Examineurs : Dr. Benslama. W Pr. Fakraoui .AS Dr. Boulfrad .A</p>	<p>Univ. Oum El Bouaghi Univ. Constantine 3. Univ. Oum El Bouaghi Univ. Oum El Bouaghi Univ. Consrantine 3 Univ. Constantine 3</p>
Année universitaire 2020/2021	

قال رسول الله ﷺ :

" مَنْ سَلَكَ طَرِيقًا يَبْتَغِي فِيهِ عِلْمًا سَهَّلَ
اللَّهُ لَهُ طَرِيقًا إِلَى الْجَنَّةِ "

صدق رسول الله