



Année : 2021/2022

N°: MM432022

MEMOIRE DE MASTER

MASTER DE «**Biotechnologie Médicale**»

OPTION: «**Biomédicale**»

Intitulé

Etude moléculaire du gène de la dystrophine chez les patients atteints de Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) et de Becker (DMB) de la région de l'Oriental.

Soutenu par :

MESSAOUDI Maryam

Soutenu Le :

23 juillet 2022

BENTAYEBI Kaoutar (Pr. A la la Faculté de médecine et de pharmacie, Rabat et Pr. à la faculté de médecine de l'Imperial College, London)

Présidente

BOULOUIZ Redouane (Pr. à l'Institut Supérieure des Professions Infirmières et Techniques de Santé, Oujda)

Examineur

CHARIF Majida (Pr. à la Faculté des Sciences, Oujda)

Encadrante

ELIDRISSI ERRAAHALI Mounia (Dr. à la Faculté de médecine et de pharmacie, Oujda)

Examinatrice

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

سبحانك لا علم لنا إلا ما علمتنا
إننا أنت العليم الحكيم

سورة البقرة: الآية: 31

بِسْمِ اللَّهِ
الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Remerciements

Au Professeur **OUADGHIRI MOUNA**

Professeur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat.

Pour avoir conçu le master Biotechnologie médicale, qui m'a permis d'acquérir une grande connaissance scientifique.

Toute ma gratitude.

Au Professeur **AZZEDINE Ibrahimi**

Directeur du laboratoire de Biotechnologie médicale à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat.

A mes **enseignants** durant les 2 ans de master.

Tout mon respect.

Au Professeur **BELLAOUI Mohammed**

Directeur du laboratoire de recherche en sciences médicales, Unité de Génétique à la Faculté de Médecine et de Pharmacie d'Oujda.

Qui m'a accueilli avec gentillesse dans son laboratoire et d'avoir accepté de porter son jugement.

Mes sincères respects.

Au Professeur **CHARIF Majida**

Professeur à la Faculté des Sciences d'Oujda.

Pour m'avoir encadré dans ce travail et pour son aide et ses conseils avisés tout au long de sa réalisation.

Qu'elle trouve ici l'expression de mes plus sincères remerciements

Au Professeur **BOULOUIZ Redouane**

Professeur à l'Institut Supérieure des Professions Infirmières et Techniques de Santé d'Oujda.

Qui a gentiment accepté de consacrer son temps pour examiner ce travail.

Tout mon respect.

Au Professeur **BENTAYEBI Kaoutar**

Professeur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat et Professeur à Imperial
College London.

Qui a gentiment accepté de consacrer son temps pour examiner ce travail.

Toute ma gratitude.

Au Docteur **ELIDRISSI ERRAHALI Mounia**

Qui m'avoit encadré et conseillé tout au long de mon stage.

Au doctorante **BENZINE Halima** et **RAMDANI Sara**

Pour l'aide et le soutien qu'elles ont apporté tout le long du déroulement de ce stage.

A atout **l'équipe de l'Unité de Génétique**

Qui nous ont fournis tous les moyens nécessaires et les conditions favorables à la réussite de
ce stage.

A mes très chers parents **ABDELOUAHABI SIHAM** et **MESSAOUDI Mostapha** pour
votre patience et vos encouragements durant tout mon parcours scolaire.

Je vous suis redevable. Je vous aime.

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. Ces maladies sont dues à un large spectre de mutations du gène de la dystrophine (*DMD*).

L'objectif de cette étude est de rapporter les différents aspects cliniques et moléculaires des patients recrutés au sien de la biobanque de la région de l'Orientale présentant un phénotype de dystrophinopathie.

L'ADN de 35 patients a été analysé par PCR multiplex pour déterminer les exons délétés dans le gène *DMD*, afin d'estimer la fréquence de cette anomalie et aussi d'évaluer les résultats obtenus par une comparaison entre le génotype et le phénotype clinique. En résultat, 31% des patients présentent des délétions du gène *DMD* dont 90,9% sont de phénotype DMD. La région hotspots 3' est la plus fréquemment délétée (85,7%), de préférence au niveau de séquence 49-50 (42,86%).

Cette étude a permis d'identifier les délétions du gène de la dystrophine les plus fréquentes chez les patients de la région de l'Orientale. Ces résultats avaient généré des données considérables sur les réarrangements mutationnels susceptibles de promouvoir de futures thérapies expérimentales au Maroc.

Mots clés : Dystrophinopathie – Duchenne – Becker – PCR Multiplex– délétion.

Abstract

Dystrophinopathies represented mainly by Duchenne muscular dystrophy (DMD) and its allelic variant, Becker muscular dystrophy (BMD) are the primary causes of myopathy in male children. They are transmitted in a recessive mode linked to X. These diseases are due to a wide spectrum of mutations of the dystrophin gene (*DMD*).

The objective of this study is to report the different clinical and molecular aspects of patients recruited at the biobank of the Oriental region with a phenotype of dystrophinopathy.

The DNA of 35 patients was analysed by multiplex PCR to determine the exons released into the *DMD* gene, in order to estimate the frequency of this abnormality and also to evaluate the results obtained by a comparison between genotype and clinical phenotype. As a result, 31% of patients have *DMD* gene deletions, 90.9% of which are phenotype DMD. The hotspots 3' region is the most frequently deleted (85.7%), preferably at the 49-50 sequence level (42.86%).

This study identified the most common dystrophin gene deletions in patients in the Oriental region. These results had generated considerable data on mutational rearrangements likely to promote future experimental therapies in Morocco.

Keywords: Dystrophinopathy – Duchenne – Becker –multiplex PCR – deletion.

الملخص

تعتبر اعتلالات ضمور العضلات التي يمثلها بشكل أساسي الحثل الدوشيني (DMD) وكذلك ضمور بيكر العضلي البديل (DMB) من الأسباب الرئيسية للاعتلال العضلي عند الأطفال الذكور. تنتقل هذه الأمراض عن طريق الوضع المتنحي التناسلي الذي ينتج عنه طفرات في مورثة *الديستروفين* الواقعة على الصبغي X.

تهدف هذه الدراسة إلى البحث مع وضع تقارير حول الجوانب السريرية والجزئية المختلفة لبيانات وعينات المرضى المخزنين في البنك الحيوي للجهة الشرقية والذين يعانون من النمط الظاهري لاعتلال ضمور العضلات.

الحمض النووي لـ 35 مريضا تم تحليله بواسطة تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد (PCR multiplex) لتحديد الاكسونات المحذوفة في مورثة *الديستروفين*، بالإضافة إلى تقدير تكرار هذا الشذوذ و أيضا لتقييم النتائج المحصل عليها عن طريق المقارنة بين النمط الصبغي و النمط الظاهري السريري . نتيجة لذلك فان 31% من المرضى لديهم حذف على مستوى مورثة *الديستروفين* . 90.9% لديهم ضمور دوشين العضلي (DMD). النقطة الساخنة '3' تمثل المنطقة الأكثر تعرضا للحذف بنسبة 85.7% تحديدا على مستوى التسلسل الاكسوني 49-50 (42.86%).

حددت هذه الدراسة الحذف الأكثر شيوعا لمورثة *الديستروفين* في الجهة الشرقية. أنتج هذا البحث معطيات معتبرة حول إعادة ترتيب الطفرات التي يحتمل أن تعزز العلاجات التجريبية المستقبلية في المغرب.

كلمات المفتاح : الضمور العضلي – دوشين – بيكر - تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد – الحذف.

Liste des abréviations

Aa	:	Acide aminé
ABD	:	Actin Binding Domain
ABS	:	Actin Binding Site
ADN	:	Acide désoxyribonucléique
ADNc	:	ADN- complémentaire
ALAT	:	Alanine aminotransférase
ARNm	:	Acide ribonucléique messager
ASAT	:	Aspartate aminotransférase
ATP	:	Adénosine TriPhosphate
CPK	:	Créatine PhosphoKinase
Ct	:	C-terminal
CV	:	Capacité Vitale
dNTP	:	Désoxyribonucléotide triphosphate
DAG	:	Complexe de glycoprotéines liées à la dystrophine
DAPC	:	Complexe de glycoprotéines associé à la dystrophine
Del	:	Délétion
DGC	:	Complexe Dystrophine-Glycoprotéines
DMB	:	Dystrophie musculaire de Becker
DMD	:	Dystrophie Musculaire de Duchenne
DMI	:	Dystrophie musculaire intermédiaire
Dp116	:	Dystrophine du poids moléculaire 116KDa
Dp260	:	Dystrophine du poids moléculaire 260KDa
Dp427-B	:	Dystrophine du poids moléculaire 427KDa, dérivée du promoteur PB
Dp427-L	:	Dystrophine du poids moléculaire 427KDa, dérivée du promoteur PL
Dp427-M	:	Dystrophine du poids moléculaire 427KDa, dérivée du promoteur PM
Dp427-P	:	Dystrophine du poids moléculaire 427KDa, dérivée du promoteur PP
Dp71	:	Dystrophine du poids moléculaire 71KDa
EMG	:	Electromyogramme
IHC	:	Immunohistochimie
IRM	:	Imagerie par résonance magnétique
Kb	:	Kilobase
KDa	:	kilodalton,

LGMD	:	Limb-girdle muscular dystrophy (Dystrophie musculaire des ceintures)
mdx	:	Muscular dystrophy X-linked
MLPA	:	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
MPCR	:	Multiplex Polymerase Chain Reaction
NGS	:	Next Generation Sequencing
nNOS	:	L'oxyde nitrique synthase neuronale
NO	:	Nitric oxide (Oxyde Nitrique)
NOs	:	Nitric Oxyde synthase
Nt	:	N-terminal
pb	:	Paire de base
PB	:	Promoteur des cellules de Brain
PCR	:	Polymerase Chain Reaction (Réaction de polymérase en chaine)
PL	:	Promoteur lymphocytaire
Pm	:	Promoteur
PM	:	Promoteur Musculaire
PP	:	Promoteur des cellules de Purkije
RT-PCR	:	Reverse Transcription-PCR
ZF	:	Zone de flexibilité
ZZ	:	Domain riche en Zinc

Listes des figures

Figure 1: Dessins de William R. GOWERS représentant la manœuvre utilisée par un patient atteint de dystrophie musculaire pour se relever	5
Figure 2: Les différents types de muscles.	7
Figure 3: Classification des muscles selon l'organisation des fibres musculaires.....	9
Figure 4 : Structure du muscle squelettique	10
Figure 5 : Structure d'un sarcomère	13
Figure 6 : La différenciation de la cellule satellite en fibre musculaire	14
Figure 7: Localisation du gène <i>DMD</i> sur le bras court du chromosome X.	18
Figure 8 : Représentation schématique de la structure de la dystrophine.	20
Figure 9: Représentation schématique de la dystrophine et du complexe de glycoprotéines associé à la dystrophine (DGC)	22
Figure 10 : Enchaînement des dommages causés aux fibres musculaires chez un patient atteint de la DMD.	24
Figure 11 : Corrélation théorique génotype-phénotype.	27
Figure 12: Image de l'aspect en microscopie optique du tissu musculaire d'un patient atteint de la DMD, prélevé par biopsie	30
Figure 13: Principes de base de l'immunohistochimie	30
Figure 14: Étude de dystrophine à partir de la biopsie musculaire par immunofluorescence : marquage avec un anticorps monoclonal (NCL DYS1, Novocastra)	31
Figure 15 : Répartition des familles selon leur provenance.	46
Figure 16: Répartitions des patients selon leur sexe.	46
Figure 17 : Taux de patients issus de mariages consanguins.....	47
Figure 18: Répartition des familles selon le caractère familial ou sporadique.	47
Figure 19: Age moyen des patients au moment d'apparition des symptômes et au moment du diagnostic.	48
Figure 20 : Répartition des patients selon l'âge d'apparition des symptômes.....	48
Figure 21 : Répartition des patients selon l'âge du diagnostic.	49
Figure 22 : Répartition des patients selon les manifestations cliniques.	50
Figure 23 : Répartition des patients selon le développement psychomoteur.....	50
Figure 24 : Taux de CPK sériques.	51
Figure 25 : Résultats de l'Electromyogramme.	51
Figure 26 : Résultats de la biopsie.	52
Figure 27: Exemples de résultat des PCR multiplexes pour le Set 1,2 et 3 par électrophorèse sur gel d'agarose (3%).....	53
Figure 28 : Exemple de résultat de PCR simplexe pour l'exon 34 par électrophorèse sur gel d'agarose (2%).	53
Figure 29: Exemple de résultat de PCR simplexe pour les exons 45,46, 47, 48, 50 et 51 par électrophorèse sur gel d'agarose (2%).	54
Figure 30: Résultats de la PCR multiplex.	54
Figure 31: Différentes combinaisons de délétions du gène <i>DMD</i> retrouvées à la PCR multiplex	55
Figure 32: Fréquence des exons délétés chez les patients DMD.	56
Figure 33: Représentation schématique des délétions des domaines de la dystrophine chez nos patients.	65

Listes des Tableaux :

Tableau I : Caractéristiques fonctionnelles des muscles.	8
Tableau II: Les différents isoformes longues et courtes de la dystrophine	21
Tableau III: Mode d'action des principaux traitements par thérapie génique en cours d'essai.	37
Tableau IV : Représentation des amorces DMD utilisées dans les réactions PCR.....	43
Tableau V: Conditions d'amplification du gène <i>DMD</i> pour le Set 1 et 2.	43
Tableau VI: Conditions d'amplification du gène <i>DMD</i> pour le Set 3.....	44
Tableau VII : Etendue des délétions caractérisées dans notre panel.	57
Tableau VIII : Schéma de délétions identifiées sur deux régions hotspots.	57
Tableau IX : Présentation des différents effets des délétions sur le gène <i>DMD</i>	59
Tableau X : Panel d'étude présentant les délétions les plus fréquentes.	63

Table des matières

Liste des abréviations

Listes des figures

Listes des Tableaux

I.	Introduction	1
II.	Revue bibliographique	4
1.	Historique :.....	4
2.	Épidémiologie :	6
3.	Physiopathologie :	6
3.1.	Rappels physiologiques et anatomiques :	6
3.1.1.	Les différents types de muscles et leurs caractéristiques fonctionnelles :	6
3.1.2.	Structure du muscle squelettique :	8
3.1.2.1.	Structure macroscopique :	8
3.1.2.2.	Structure microscopique :	11
3.1.3.	Régénération musculaire :	13
3.2.	Mécanismes physiopathologiques dans la maladie de DMD :	14
3.2.1.	La nécrose des cellules musculaire striées :	14
3.2.1.1.	Hypothèse mécanique :	14
3.2.1.2.	Hypothèse calcique :	15
3.2.1.3.	Hypothèse vasculaire :	15
3.2.1.4.	Hypothèse de la régulation génique :	15
3.2.2.	Le remodelage tissulaire des muscles :	15
3.2.2.1.	Hypothèse inflammatoire :	15
4.	Manifestations cliniques :	16
4.1.	Manifestations musculosquelettiques :	16
4.1.1.	Age de perte de la marche	16
4.2.	Manifestations cardiaques.....	17
4.3.	Manifestations respiratoires :	17
4.4.	Troubles cognitifs et digestifs :	17
4.4.1.	Age de décès :	17
4.5.	La dystrophie musculaire de Becker :	18

5.	Génétique de la maladie de DMD :	18
5.1.	Le gène de la dystrophine :	18
5.2.	La dystrophine:.....	19
5.2.1.	Structure de la dystrophine :	19
5.2.2.	Isoformes de la dystrophine :	20
5.2.3.	Rôle de la dystrophine :	22
5.2.4.	Dysfonctionnement de la dystrophine et le complexe protéique associé :	23
5.3.	Les principaux types de mutations du gène <i>DMD</i> :	24
5.3.1.	Grandes délétions et duplications :	25
5.3.2.	Mutations ponctuelles :	25
5.3.3.	Les autres types mutationnels :	25
5.4.	Corrélation génotype – phénotype :	25
6.	Diagnostic :	28
6.1.	Diagnostic clinique :	28
6.1.1.	Biochimiques :	28
6.1.2.	L'électromyogramme (EMG) :	29
6.1.3.	Technique d'imagerie médicale :	29
6.1.4.	La biopsie musculaire	29
6.1.5.	Diagnostic moléculaire :	31
6.1.6.	Diagnostic différentiel :	32
6.1.7.	Dépistage de la famille :	34
7.	Traitement :	34
7.1.	La thérapie actuelle :	34
7.1.1.	Corticothérapie :	34
7.1.2.	Traitements contre l'insuffisance cardiaque :	35
7.1.3.	Autres traitements :	35
7.2.	Possibilité thérapeutique	36
7.2.1.	La Thérapie cellulaire :	36
7.2.2.	Thérapie génique :	36
III. Patients et Méthodes		39
1.	Description de l'étude:.....	39
2.	Patients :	39
3.	Méthodes :	40

3.1.	Analyse génétique :	40
3.1.1.	Prélèvement Sanguin :	40
3.1.2.	Extraction de l'ADN :	40
3.1.3.	Contrôle quantitatif et qualitatif de l'ADN extrait :	41
3.1.4.	Amplification génique:	42
3.2.	Analyses bioinformatiques :	44
IV.	Résultats	46
1.	Résultats cliniques et épidémiologiques:	46
2.	Résultats des examens complémentaires :	50
3.	Résultats de l'analyse moléculaire :	52
3.1.	Analyse de la fréquence des exons délétés identifié dans le gène <i>DMD</i> :	55
3.2.	Analyse moléculaire de l'étendu des délétions du gène <i>DMD</i> :	55
3.3.	Analyse de l'effet des délétions du gène <i>DMD</i> :	58
V.	Discussion	59
VI.	Conclusion et Perspectives	65
	Bibliographie	67
	ANNEXES	80

INTRODUCTION :

Les dystrophinopathies, principalement représentées par la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) et de Becker (BMD), sont la cause la plus grave et la plus fréquente des myopathies chez l'enfant de sexe masculin [1].

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 du gène *DMD*, avec une incidence d'environ 1 sur 3500 naissances homme [2]. Les patients atteints de DMD sont généralement diagnostiqués à l'âge de 5 ans. Avant l'âge de 13 ans, ils deviennent dépendants d'un fauteuil roulant et meurent d'une insuffisance cardiaque ou respiratoire au cours de leur deuxième ou troisième décennie de vie.

En revanche, l'incidence de la BMD est de 1/31 000 naissances de sexe masculin. C'est la forme la plus inoffensive d'évolution lente. Elle est secondaire à des mutations qui maintiennent le cadre de lecture (in-frame) codant la synthèse d'une protéine tronquée et partiellement fonctionnelle [2-4].

Ces deux affections partagent un tableau clinique similaire qui se caractérise par des difficultés à courir et à monter les escaliers, des chutes fréquentes, un déficit musculaire prédominant à la racine des membres inférieurs avec hypertrophie des mollets [5].

Les DMD/BMD est le résultat d'une mutation qui se transmettent selon un mode récessif lié à l'X et affecte le gène de la dystrophine [6].

La dystrophine relie l'intérieur de la fibre musculaire (cytosquelette) à l'extérieur (matrice extracellulaire) à travers la membrane cellulaire. L'absence de la dystrophine déstabilise cette interaction fragilisant ainsi la fibre musculaire et sa membrane et provoquant la dégénérescence musculaire [7, 8].

La majorité des mutations responsables des phénotypes DMD/BMD sont des délétions d'un ou de plusieurs exons (60-68%), environ 5-15% de duplication et des mutations ponctuelles dans les 20-35% restants [11-13]. Diverses techniques ont été développées pour détecter la plupart des mutations à l'origine de la DMD/BMD. Le plus largement utilisé est l'amplification de sonde dépendante de la ligature multiplex (MLPA), qui est extrêmement sensible et peut détecter les délétions et les duplications de tous les exons du gène *DMD*. En plus de la MLPA, la PCR multiplex (M-PCR) est également une technique efficace, mais elle ne reconnaît que les délétions.

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

Les principaux objectifs de ce projet de fin de master sont:

- Etablir une étude bibliographique sur les dystrophinopathies ;
- Faire des analyses des données cliniques, paracliniques et génétiques des patients DMD/DMB recrutés au sein de la Biobanque de la Région de l'Oriental « BRO Biobank » ;
- Rechercher et étudier les macrodélétions au sein du gène *DMD* par PCR multiplex ;
- Etablissement des corrélations possibles entre l'anomalie moléculaire et le phénotype clinique.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE :

1. Historique

Les dystrophies musculaires forment un groupe hétérogène de maladies génétiques, ayant en commun l'évolution clinique, caractérisée par une perte progressive du tissu musculaire. Le premier descriptif de cette maladie, estimée en tant qu'atteinte neurologique, a été rendue publique en 1830 par Dr Bell dans son ouvrage « The Nervous System of the Human Body » [18].

Le premier clinicien a reconnu la maladie comme étant une pathologie musculaire, était Pr. Conte qui, en 1836, a décrit deux frères avec un tableau symptomatologique évoquant une dystrophie musculaire dont le phénotype est évolutif [18].

La première description macroscopique a été effectuée en 1847 par le Dr. Partridge qui a présenté un rapport d'autopsie d'un enfant de 14 ans souffrant d'une perte musculaire et d'une faiblesse progressive depuis l'âge de neuf ans. L'autopsie a révélé une dégénérescence lipidique des muscles deltoïdes, sterno-cléido-mastoïdien et gastrocnémiens. Aucune lésion nerveuse ou tendineuse n'a été trouvée [18].

La première description clinique approfondie de la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) a été publiée en 1851 par le Dr Meryon chez neuf garçons issus de 3 familles. Il a décrit un groupe de quatorze patients masculins atteints d'une myopathie proche de la maladie de Duchenne dont la sœur, de l'un de ces patients, était atteinte, bien qu'elle n'ait eu qu'une faiblesse musculaire sans hypertrophie des mollets [18].

Suite aux travaux du Dr Duchenne (1868) sur la présentation clinique et l'aspect microscopique de la DMD, Von Leyde et Mobiu ont proposé que les patients décrits par Duchenne fussent un groupe de pathologies hétérogènes. Ils ont ainsi mis en place, entre 1876 et 1840, la première tentative pour classer les dystrophies musculaires, en distinguant entre la dystrophie musculaire des ceintures et la dystrophie musculaire de Duchenne [1].

Le tableau clinique ainsi que les critères diagnostiques de la DMD, ont été fixés par William Gowers. Entre 1879 et 1909, il a établi l'évolution de la maladie, avec un âge de début, de perte de la marche et de décès similaires aux données cliniques connues aujourd'hui. Il décrit en 1886 la manœuvre typique que les patients atteints de dystrophie musculaire utilisent pour

passer d'une position allongée à la position debout qui portera son nom (Figure 1) [18].



Figure 1: Dessins de William R. GOWERS représentant la manœuvre utilisée par un patient atteint de dystrophie musculaire pour se relever [19].

En 1955, Becker, a été le premier à déterminer que les formes bénignes décrites par Meryon et Duchenne étaient en fait des pathologies distinctes. Cela dit, Kingston a rapporté dans les années 80 que les deux pathologies étaient causés par différents variantes [18].

Durant les années 50s, la transmission récessive liée à l'X de la DMD était bien établie par Kundel et al [20]. Toutefois, le diagnostic paraclinique de la maladie, ainsi que le diagnostic prédictif du statut des femmes porteuses, posaient toujours un problème. Ce problème fut partiellement réglé en 1958 par Sugita et Ebashi qui ont montré que le dosage de CPK sériques est non seulement sensible pour la maladie, mais leur taux peut être aussi élevé chez les femmes porteuses [18].

En 1986, il a constaté que la plupart des cas de dystrophies de Duchenne et de Becker étaient due à une délétion. Hoffman a identifié en 1987 la protéine de la « Dystrophine ». Devant la nature des mutations identifiées, Monaco a proposé l'hypothèse « du cadre de lecture » comme facteur expliquant la corrélation génotype-phénotype.

En 1988, l'ARN messager ainsi que le cDNA du gène *DMD* ont été séquencés.

En 1989, Campbell a identifié le rôle de la protéine comme faisant partie du complexe Dystrophine-glycoprotéine et jouant un rôle dans la structure des myocytes striés [18].

Le diagnostic moléculaire des dystrophinopathie a évolué en parallèle avec le développement technologique de la biologie moléculaire depuis les années quatre-vingt-dix. Au Maroc, le premier test génétique par PCR, dans le but de diagnostiquer la dystrophie musculaire de Duchenne, a été réalisé en 1993 au sein du Département de Génétique Médicale de l'Institut National d'Hygiène de Rabat [21].

2. Épidémiologie

Les dystrophinopathies sont des myopathies de transmission récessive liés à l’X affectant 1 sur 5 000 à 1 sur 6 000 naissances vivantes de sexe masculin. 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 3500 naissances masculines. Un phénotype moins sévère de cette maladie existe et est dénommé dystrophie musculaire de Becker (DMB), dont l’incidence est de 1 sur 31 000 naissances masculines [2].

Une revue de la littérature scientifique publiée en février 2022, a évalué la prévalence à l’échelle mondiale de la dystrophie musculaire qui a été estimée à 3,6 pour 100 000 personnes, dont la prévalence de la DMD et la DMB est 4,8 et 1,6 pour 100 000 personnes, respectivement [22].

La DMD chez les femmes est très rare (inférieur à 1 par million) et se limite aux rapports de cas d’individus atteints du syndrome de Turner, d’une translocation impliquant la DMD ou de mutations bi-alléliques de la DMD. Les femmes porteuses (c’est-à-dire celles qui ont une mutation *DMD* sur un chromosome X) sont généralement asymptomatiques, en effet, on ne peut pas prévoir l’incidence et la prévalence chez elles, mais dans de rares cas, ressemblent à la DMB [2].

3. Physiopathologie

3.1. Rappels physiologiques et anatomiques

3.1.1. Les différents types de muscles et leurs caractéristiques fonctionnelles

Les formes classiques de dystrophinopathies (DMD et DMB) sont des pathologies qui touchent primitivement et progressivement le muscle squelettique, cardiaque et lisse entraînant ainsi une symptomatologie diverse et variée qui exige la connaissance du muscle dans sa structure et son fonctionnement.

Etant responsables du maintien de la posture du corps, la respiration et les mouvements, les muscles représentent 40 à 50 % de la masse totale du corps humain. Il existe trois types de muscle en fonction de leur rôle et de leur localisation (Figure 2) :

- **Les muscles squelettiques** : sont striés pouvant se contracter sous l’influence de la volonté (contraction réflexe possible). Ils mobilisent en particulier le système

squelettique. Solidaires du squelette, ils représentent environ 43% du poids du corps dont on compte plus de 600 muscles squelettiques différents. Ils peuvent se contracter rapidement mais se fatiguent facilement. Leur couleur rouge provient du pigment appelé la myoglobine. Le tissu musculaire squelettique est formé de cellules très allongées, cylindriques et multi-nucléées.

- **Les muscles lisses** : sont non striés et échappent à l'influence de la volonté. Ils sont localisés dans les viscères du tube digestif, du système urinaire, du système respiratoire, de l'appareil reproducteur, de la peau et de l'appareil circulatoire. À la différence des muscles striés, ils sont pâles et fins. Le tissu musculaire lisse est formé de cellules fusiformes et mononucléées qui forment des feuilletts.
- **Les muscles mixtes** : le muscle cardiaque et les muscles de l'ouïe. Ce sont des muscles striés, mais indépendants de l'influence de la volonté. Ils possèdent une activité motrice ininterrompue et automatique [23].

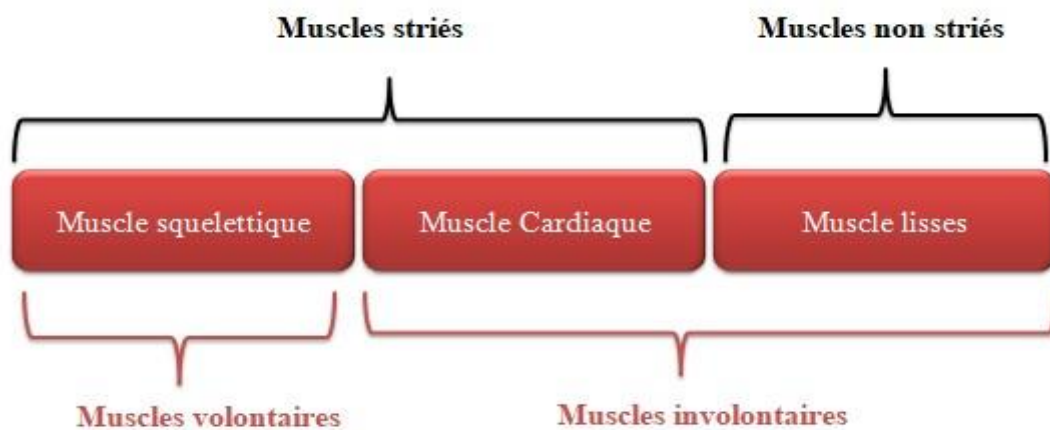


Figure 2: Les différents types de muscles.

Différentes caractéristiques permettent aux muscles de pleinement remplir leurs fonctions et d'acquérir certaines capacités (Tableau I). En dehors de tout mouvement actif, le muscle demeure quand même dans un état de tension [23].

Tableau I : Caractéristiques fonctionnelles des muscles.

Caractéristiques	Fonction
Excitabilité	Capter des signaux électriques et d'y répondre spécifiquement.
Contractilité	Se contracter à la suite d'un signal.
Extensibilité	S'étirer sans se déchirer.
Élasticité	Reprendre la forme initiale.
Plasticité	Modifier la structure en fonction du type d'effort effectué.

3.1.2. Structure du muscle squelettique

3.1.2.1. Structure macroscopique

On décrit au niveau du muscle deux parties bien distinctes :

- Un corps, appelé ventre, volumineux rouge et contractile constitué de fibres musculaires qui s'organisent en faisceaux.
- Deux extrémités plus étroites, blanches, parties tendineuses et résistantes.

L'orientation des fibres musculaires et la structure tendineuse permettent de différencier plusieurs types de muscles [23] (Figure 3) :

- **Les muscles à faisceaux parallèles ou muscles fusiformes**, tel que le biceps brachial par exemple, possèdent des fibres musculaires qui convergent vers le tendon parallèlement à son axe. Elles s'étendent sur toute la longueur du muscle. La force qu'elles exercent est orientée dans l'axe du tendon. Ce type de muscle favorise la vitesse de contraction.
- **Les muscles à faisceaux convergents**, comme exemple le grand pectoral, leurs fibres musculaires partent de plusieurs points d'insertion et convergent pour rejoindre un seul tendon. L'orientation de la force produite par le muscle est la résultante de l'action de ses différents faisceaux.

- **Les muscles à faisceaux pennés**, le vaste latéral, les fibres musculaires sont généralement courtes. Elles s'insèrent sur les expansions du tendon et sont orientées obliquement par rapport à son axe. L'angle formé entre les faisceaux et le tendon est appelé angle de pennation. C'est dans cette direction que la force est exercée par les fibres. Cette architecture favorise le développement de la force musculaire. On peut retrouver des muscles unipennés ou pennés, bipennés comme le muscle droit fémoral de la cuisse ou multipennés, le deltoïde moyen par exemple.
- **Les muscles triangulaires** : faisceaux larges et étalés qui se regroupent en direction du fin tendon central, ces muscles présentent une forme triangulaire caractéristique.
- **Les muscles fusiformes** présentent des faisceaux quasiment parallèles qui se rejoignent sur des tendons plats.
- **Les muscles à faisceaux circulaires**, comme les muscles orbiculaires de la bouche. Ils présentent des faisceaux circulaires dont les extrémités se joignent au niveau du tendon unique formant une boucle fermée [23].

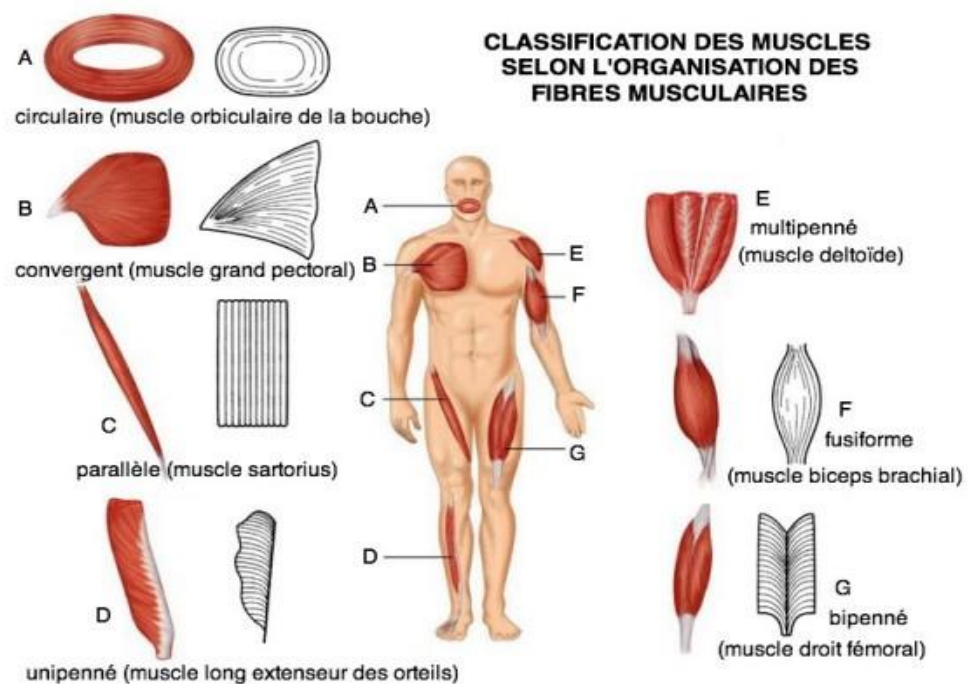


Figure 3: Classification des muscles selon l'organisation des fibres musculaires [24].

3.1.2.1.1. Organisation générale du muscle squelettique

Les muscles striés squelettiques présentent une grande variété structurelle mais chacun d'entre eux sera constitué selon un même modèle. Celles, représentées sur des coupes transversales, présentent une structure à trois niveaux, chacun étant isolé des autres par un tissu conjonctif de soutien. Le muscle dans son intégralité est bordé par l'épimysium qui permet d'ancrer le tissu musculaire aux tendons se trouvant à chaque extrémité du muscle, de protéger les muscles contre les frottements. L'épimysium, à son tour, est constitué de fascicules qui sont délimités par le péri-mysium assurant le passage des nerfs et de la circulation sanguine. Le péri-mysium est lui-même composé de fibres musculaires qui sont séparées les unes des autres par l'endomysium (Figure 4) [23].

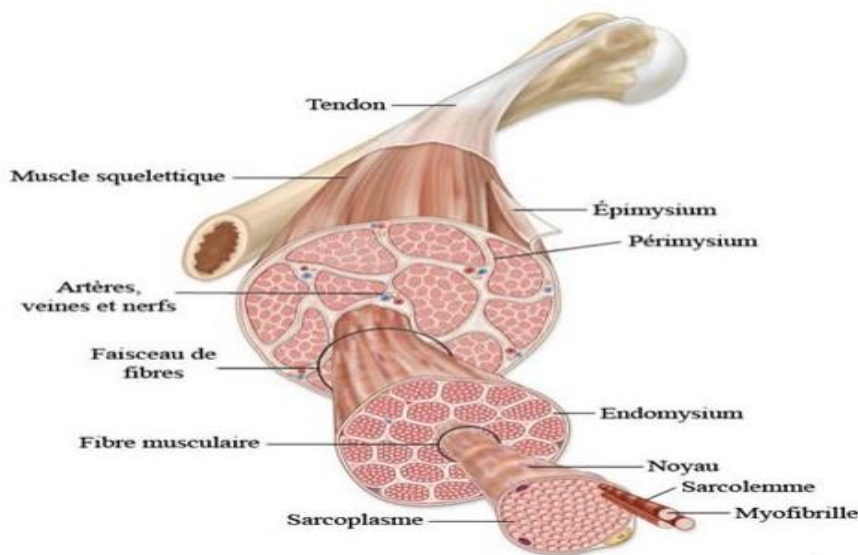


Figure 4 : Structure du muscle squelettique [25].

3.1.2.1.2. Composition chimique

Outre les 75 à 80 % d'eau qui constitue la masse des muscles, trois grandes catégories de protéines peuvent être décrites.

- **La myoglobine**, pigment donnant la couleur rouge aux muscles et permettant d'emmagasinier de l'O₂ ;
- **La myosine**, filament épais permettant la contraction ;
- **L'actine**, filament fin permettant également la contraction.

S'y ajoutent en quantité plus faible (autour de 5 %), des éléments minéraux comme le potassium, le zinc, le calcium, le sodium, des sels inorganiques, des phosphates, de l'urée ainsi que des enzymes [23].

3.1.2.1.3. Vascularisation des muscles

Le bon état de fonctionnement d'un muscle est étroitement lié à sa vascularisation. Les muscles étant de "gros consommateurs d'énergie", cette vascularisation doit être performante. Elle est dispensée par des artères et des veines.

Les artères apportent au tissu musculaire les nutriments et l'oxygène dont il a besoin pour son fonctionnement. Les veines parcourent le chemin opposé à celui des artères assurant l'élimination des déchets issus du travail musculaire, comme l'acide lactique ou le dioxyde de carbone. Les fibres musculaires sont enveloppées dans un réseau de capillaires à mailles rectangulaires dont chaque fibre est entourée en moyenne 4 à 6 capillaires [23].

3.1.2.1.4. Innervation des muscles

Les muscles sont également parcourus par des fibres nerveuses, chacune de leurs activités normales se fera en fonction du fonctionnement de l'innervation. On distingue trois types : motrice, sensitive et vaso-motrice [23].

3.1.2.2. Structure microscopique

Le tissu musculaire est constitué par des cellules musculaires ou myocytes qui sont délimitées par une membrane intitulée le sarcolemme et qui, elle-même, est entourée d'endomysium. Ces myocytes sont caractérisées par leur propriété contractile qui dépend de la présence des différents filaments (myofibrilles) dans leur sarcoplasme [23].

- Le sarcolemme :

Le sarcolemme est la membrane cytoplasmique des myocytes caractérisée par son élasticité et sa résistance. Il s'invagine de façon tubulaire dans le cytoplasme, formant des canaux étroits transverses : le système T. Interconnectés au plus près des myofibrilles, ils permettent de transmettre rapidement les impulsions nerveuses reçues par le sarcolemme et constituent également une voie d'échange pour les substances entrant et quittant la fibre musculaire [23].

- Le sarcoplasme :

Le sarcoplasme est le cytoplasme de la cellule musculaire. Il contient des protéines, dont la myoglobine, qui permet la fixation de l'oxygène. On retrouve également des

minéraux, du glycogène (en quantité beaucoup plus importante que dans la plupart des autres cellules) et des gouttelettes de lipides baignant dans du liquide [23].

- Organisation des myofibrilles :

Ce sont les éléments contractiles de la cellule. Ils sont responsables de l'aspect strié du muscle. Chaque fibre contient des centaines voire des milliers de myofibrilles, avec un diamètre de 1 à 2 μm et de longueur équivalente à la fibre musculaire, divisées en sous-unités plus petites : les sarcomères. Les myofibrilles sont constituées de deux types de microfilaments à savoir les filaments fins qui contiennent de l'actine et les filaments épais qui contiennent de la myosine. Ces deux protéines sont essentielles au fonctionnement de la contraction des sarcomères et on dénombre environ 3000 filaments d'actine et 1500 filaments de myosine dans chaque myofibrille [23, 26].

- Sarcomères :

Chaque myofibrille est composée d'une chaîne d'unités contractiles répétitives : les sarcomères (figure 5). Un sarcomère est la plus petite unité de contraction du muscle. L'actine et la myosine en glissant l'une contre l'autre vont réduire la taille du sarcomère. On parle alors du « pont actine-myosine ». Ces sarcomères sont constitués de bandes sombres (bandes A alternées) de bandes claires (bandes I). Chaque bande A est composée de deux zones de chevauchement des myofilaments et d'une zone H, légèrement plus claire qui la scinde en deux. Aux extrémités d'un sarcomère se situent les disques Z, ils constituent les limites du sarcomère et ils traversent chaque zone I. Un sarcomère est donc formé d'une demi-bande I, suivie d'une bande A puis d'une autre demi-bande I. Le tout est situé entre deux stries Z [23] (Figure 5).

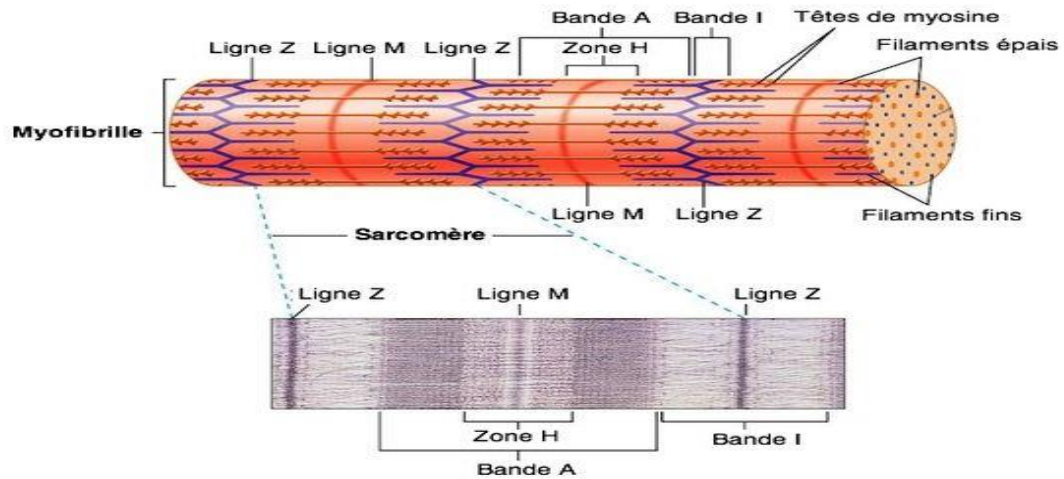


Figure 5 : Structure d'un sarcomère [24].

3.1.3. Régénération musculaire

Sous stress (mécanique, ischémique...), le muscle squelettique subit des dommages et les cellules musculaires entrent dans multiples cycles de dégénération et de régénération. Il se régénère de façon autonome et identique indépendamment de type de traumatisme en cause. Ce processus se déroule en une phase non-inflammatoire, se déclenchant après la rupture de la membrane de la fibre musculaire. L'autre phase, étant inflammatoire, est caractérisée par l'envahissement des neutrophiles suivis des macrophages qui vont phagocyter les débris cellulaires et synthétiser des facteurs chémoattractants nécessaires pour attirer les cellules satellites responsables sur la restauration de la fibre musculaire. La présence du noyau dans la fibre musculaire confirme une rénovation récente. En effet, la centronucléation prouve qu'une fibre musculaire est en pleine régénération et le retour du noyau vers la périphérie est la dernière étape de cette phase chez l'Homme.

Chez les patients atteints de la maladie de Duchenne, on peut visualiser de nombreuses fibres musculaires avec des noyaux centraux, ce qui témoigne du processus intense de régénération secondaire à l'augmentation de la fragilité musculaire [27].

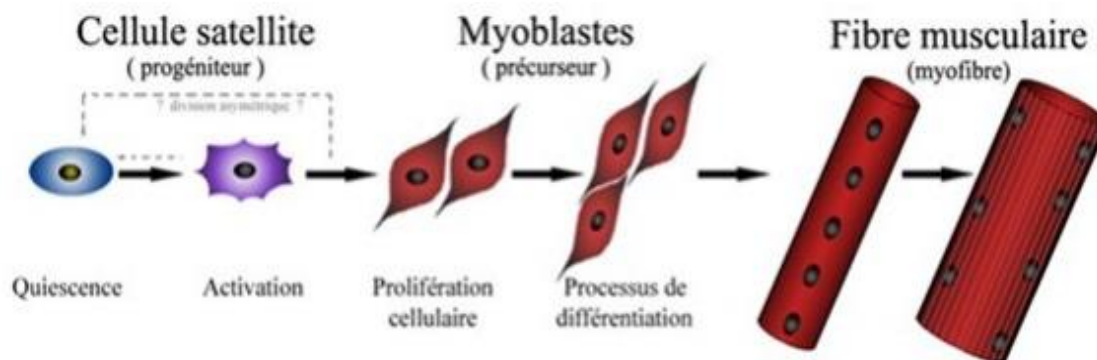


Figure 6 : La différenciation de la cellule satellite en fibre musculaire [27].

Les cellules du mésoderme se différencient en myoblastes ou en cellules satellites. Les myoblastes deviennent des myocytes avant de fusionner en myotubes et ainsi former une fibre musculaire. Les cellules satellites, une fois activée, vont proliférer et se différencier en myoblastes pour finalement former des myotubes. Elles peuvent également migrer dans le muscle entre les myotubes où elles attendent le moment opportun pour proliférer et se différencier (Figure 6) [27].

3.2. Mécanismes physiopathologiques dans la maladie de DMD

Malgré la nature systémique de sa présentation, la DMD reste une maladie musculaire. Les études des modifications histopathologiques chez les malades ont constaté que l'atteinte musculaire se constitue par deux composantes : dégénérescence musculaire (la nécrose des cellules musculaire), et régénérescence musculaire (le remodelage tissulaire des muscles). Pour expliquer ces deux composantes plusieurs hypothèses ont été proposées à travers les années [28].

3.2.1. La nécrose des cellules musculaire striées

3.2.1.1. Hypothèse mécanique

Cette hypothèse se fonde sur l'idée que la perte, partielle ou totale, de la dystrophine, cause la fragilisation du muscle, qui ne pourra plus supporter les mouvements contractiles. Cette notion est à l'origine du « exercise-induced damage », qui est l'une des bases de la prise en charge des patients DMD et DMB [28].

L'étude de l'effet de l'immobilisation sur l'évolution de la maladie, et particulièrement la vitesse et taux de nécrose musculaire chez la souris, a montré que l'immobilisation est corrélée avec une nécrose moins importante des cellules musculaires chez les souris testées.

Wirtz et al., ainsi que Brocks et al., ont prouvé que l'immobilisation avait une influence positive sur l'évolution de la symptomatologie chez les souris dystrophiques [28].

3.2.1.2. Hypothèse calcique

L'homéostasie du calcium entre le milieu intra et extra cellulaire est vitale pour la fonction et la survie du tissu musculaire. Le calcium est présent en grandes concentrations en intracellulaire et des fibres hyper-contractées dans les biopsies musculaires des patients atteints de dystrophies musculaires [28].

En effet, l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium active les protéases. Ces derniers peuvent conduire à la destruction de la membrane de la fibre musculaire, ce qui induit encore plus l'entrée de calcium dans la cellule. Cette cascade de réactions finirait par la mort de la cellule musculaire [29].

3.2.1.3. Hypothèse vasculaire

Le monoxyde d'azote (NO) joue un rôle primordial dans la vasodilatation des vaisseaux sanguins. Au niveau du muscle, certaines études ont prouvé que lors des efforts physiques, le complexe Dystrophine Glycoprotéine (DGC) jouerait un rôle dans l'augmentation de la vascularisation du tissu musculaire. Etend que la protéine synthétisant le NO fait partie du DGC, certains chercheurs ont adopté l'hypothèse disant qu'une mutation du gène *DMD* provoque la dysrégulation de la synthèse de NO, causant ainsi l'ischémie et nécrose des fibres musculaires [28].

3.2.1.4. Hypothèse de la régulation génique

En plus de l'implication de la dystrophine dans la structure musculaire, on trouve également qu'il a un rôle dans la régulation de l'expression des différents gènes face auxquelles le muscle se porte sujet. Cependant, la relation entre la dysrégulation de l'expression génétique et les symptômes de dystrophie musculaire n'a pas encore été démontrée [28].

3.2.2. Le remodelage tissulaire des muscles

3.2.2.1. Hypothèse inflammatoire

Les patients atteints de Dystrophinomyopathie de Duchenne et de Becker sont souvent sujets d'inflammation du tissu musculaire. Cette dernière pourrait participer à la dégénérescence des fibres musculaires. Un argument en faveur de cette hypothèse est l'effet bénéfique des corticoïdes (anti-inflammatoires) dans la DMD [29].

4. Manifestations cliniques

La DMD est une maladie génétique marquée sur le plan histologique par l'absence de la dystrophine. Bien que cette protéine joue un rôle dans le maintien de la structure des muscles striés, elle a aussi des rôles divers dans le fonctionnement de plusieurs tissus, tel que les muscles lisses vasculaires, la rétine, les reins et le cerveau. De ce fait, cette variabilité d'expression de la protéine, est traduite par un tableau clinique dont l'élément principal est le Dysfonctionnement musculaire, à laquelle peut s'ajouter des atteintes extra-musculaires [30-33].

L'âge moyen des manifestations cliniques est de 3.7 ± 1.9 ans selon une étude faite en Inde dont 41% avec un âge de début ne dépassant pas 3 ans [34].

4.1. Manifestations musculosquelettiques

Les enfants atteints de DMD ont un âge moyen de la marche de 18 mois (intervalle de 12-24 mois), avec un intervalle libre sans symptôme [35]. Les premiers symptômes de la maladie manifestent avant l'âge de 5 ans, après un développement moteur normal, par l'apparition d'une faiblesse musculaire symétrique progressive, qui touche les muscles proximaux plus que celle distaux. Au début, elle se débute par une incapacité de courir, puis progressivement apparait une difficulté à monter les escaliers, une tendance à la chute, une marche dandinante pour se terminer par une difficulté à se relever, secondaire à l'atteinte des muscles de la ceinture et des cuisses. Cette dernière se manifeste par le signe de Gowers, qui désigne un enfant obligé de se servir de ses mains et de ses bras, suivant des étapes précises, pour passer de la position couchée ou agenouillée à la position debout [30].

A l'inspection, une pseudo-hypertrophie bilatérale des mollets et une hyperlordose, voir une scoliose sont présentés par les patients. Il s'agit d'un remplacement du tissu musculaire par un mixte de tissu adipeux et de fibrose, à la suite de la nécrose des fibres musculaires striées (pseudo-hypertrophie). Ce phénomène a tendance à évoluer en une contracture musculaire touchant les mollets. Après la perte de la marche presque tous les patients DMD présentent une scoliose dont la principale conséquence est la réduction de la capacité vitale pulmonaire, aboutissant à une insuffisance respiratoire chronique.

4.1.1. Age de perte de la marche

Les enfants atteints de DMD perdent la capacité de marcher le plus souvent à l'âge de 12 ans [36]. D'autres études rapportent un âge moyen de 10 ans, avec un rapport entre l'âge de perte

de la marche et l'espérance de vie [37]. En effet, les études réalisées jusqu'ici ne permettent pas d'identifier les éléments biomécaniques et morphologiques tel que la faiblesse musculaire, la rétractions des muscles, le déséquilibre entre les muscles, et le volume musculaire qui sont les plus impliqués dans la perte de la marche de ces enfants [38].

4.2. Manifestations cardiaques

L'atteinte cardiaque sous forme d'une cardiomyopathie dilatée (90% des patients) [39] avec insuffisance cardiaque congestive ou arythmies ventriculaires est le facteur clé de décès prématuré dans la DMD. Généralement 40 % à 50 % des patients décèdent à cause d'une atteinte cardiaque [40]. Sur le plan histologique, elle est expliquée par la substitution des cardiomyocytes par un tissu conjonctif et fibreux touchant d'abord le segment postéro-basal du ventricule gauche.

4.3. Manifestations respiratoires

L'insuffisance respiratoire au cours de la DMD est une conséquence de la faiblesse musculaire respiratoire progressive, le diaphragme en particulier, qui conduit à une charge supplémentaire sur le système respiratoire [41]. Cette complication 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 particulièrement la capacité vitale [42].

4.4. Troubles cognitifs et digestifs

L'atteinte cognitive est très fréquente (60 % des cas de DMD), prédominant sur les capacités verbales [43, 44]. C'est à cause de l'absence ou de la diminution des transcrits de la dystrophine dans le système nerveux central, les patients présentent souvent des troubles du spectre autistique et des troubles déficitaires de l'attention [45].

Le muscle lisse de la paroi du tube digestif, est également touché causant des troubles du transit intestinal (constipation, fécalome et même occlusion intestinale). L'atteinte des muscles de la gorge est inconstante et habituellement très tardive traduite par des troubles de la déglutition [46].

4.4.1. Age de décès

La plupart des patients DMD ne survivent pas au-delà de 30 ans [35]. Une étude épidémiologique suédoise nationale a montré que l'âge de décès moyen est de 29,9 ans sans rapport avec l'âge de la perte de la marche. La première cause de décès reste un problème

cardio-respiratoire avec une proportion de 41,9% dont 38% sont décédés à cause d'insuffisance respiratoire. Cependant, 20% sont décédées à un âge moyen plus précoce d'une autre cause : embolie pulmonaire, complications gastro-intestinales, accident vasculaire cérébral, mort accidentelle [47].

4.5. La dystrophie musculaire de Becker

La dystrophie musculaire de Becker (DMB) est une forme plus atténuée que la dystrophie musculaire de Duchenne. La DMB a un tableau clinique moins sévère, un âge de début plus tardif avec une progression plus lente. Notons que les symptômes peuvent apparaître après l'âge de 12 ans et la dépendance au fauteuil après 16 ans. Certains patients DMB entament leur maladie après l'âge de 30 ans et peuvent rester ambulant jusqu'à l'âge de 60 ans [48]. Certains patients peuvent rester pauci-symptomatiques tout au long de leur vie [49].

5. Génétique de la maladie de DMD

5.1. Le gène de la dystrophine

Le gène *DMD* codant la dystrophine est situé sur le bras court du chromosome X (locus Xp21.2) (Figure 7). Il s'agit du plus long gène de l'organisme avec 2,4 millions de paires de bases. Il occupe 0,1% du génome humain et 1,5% de la séquence du chromosome X. Il est formé de 79 exons (ou même 86 exons si l'on inclut les sept promoteurs liés aux premiers exons) qui ne constituent que 0,6% de la séquence globale du gène. Ce gène a 91 transcrits dont le plus long comprend 3685 aa [50-52].

Les mutations au niveau de ce gène causent les deux Dystrophies musculaires : de Duchenne et de Becker.

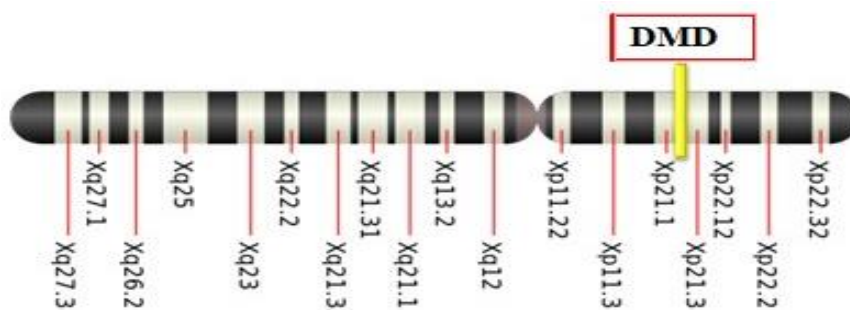


Figure 7: Localisation du gène *DMD* sur le bras court du chromosome X.

5.2. La dystrophine

La dystrophine est essentiellement présente dans le tissu musculaire, le cerveau (cellules gliales et de Purkinje), la rétine et en quantité réduite dans les lymphocytes. Elle est située sur la surface interne du sarcolemme, où elle forme un réseau cytosquelettique dans le muscle normal. Elle constitue 2% du sarcolemme et 50% du cytosquelette sarcolemmale [53].

5.2.1. Structure de la dystrophine

La structure de la dystrophine est particulièrement bien préservée entre les espèces humaines, les rongeurs et le poulet [54]. Elle a un poids moléculaire de 427 KDa [55] et est allongée et articulée, constituée de 3685 aa dont 31 % sont chargés [56].

La dystrophine est composée de 4 domaines fonctionnels et de 4 régions charnières riches en proline qui la rendent plus flexible (Figure 8) [6] :

- **Le domaine N-terminal** est constitué de plus de 240 aa et se lie à l'actine. Ce domaine possède 3 régions distinctes ABS1, 2 et 3 [57, 58] et permettront toutes une interaction avec la γ -actine cytosquelettique qui joue à son tour un rôle dans l'ancrage de la dystrophine à la région sub-sarcolemmale [59].
- **Le domaine central** est le plus grand fragment, suit celui de la liaison à l'actine, est formé de 2840 aa, répartis en 24 séquences répétées similaires aux éléments hélicoïdaux de la spectrine, possède 4 régions charnières, riches en résidus proline donnant à la dystrophine sa flexibilité [60]. La quatrième région charnière contient également un domaine nommé WW, impliqué dans les interactions entre protéines, en particulier entre la dystrophine et le β -dystroglycane [61], une protéine transmembranaire appartenant au complexe protéique associé à la dystrophine [56].
- **Le domaine riche en cystéine**, composé de plus de 280 aa, possède deux sites potentiels de liaison au calcium, EF1 et EF2 [6], sites également impliqués dans l'interaction avec la β -dystroglycane [61], et un site potentiel de liaison au zinc, le domaine ZZ [62].
- **Le domaine C-terminal** est composé de 320 aa et contient le site de liaison de la dystrobrevine et des syntrophines, des protéines cytoplasmiques sub-sarcolemmales [63]. Cette partie de la molécule interagit avec la membrane plasmique par l'intermédiaire de l'une des glycoprotéines associées à la

dystrophine, le β - dystroglycane [64]. Elle contient également un site CC de liaison à l'actine [65].

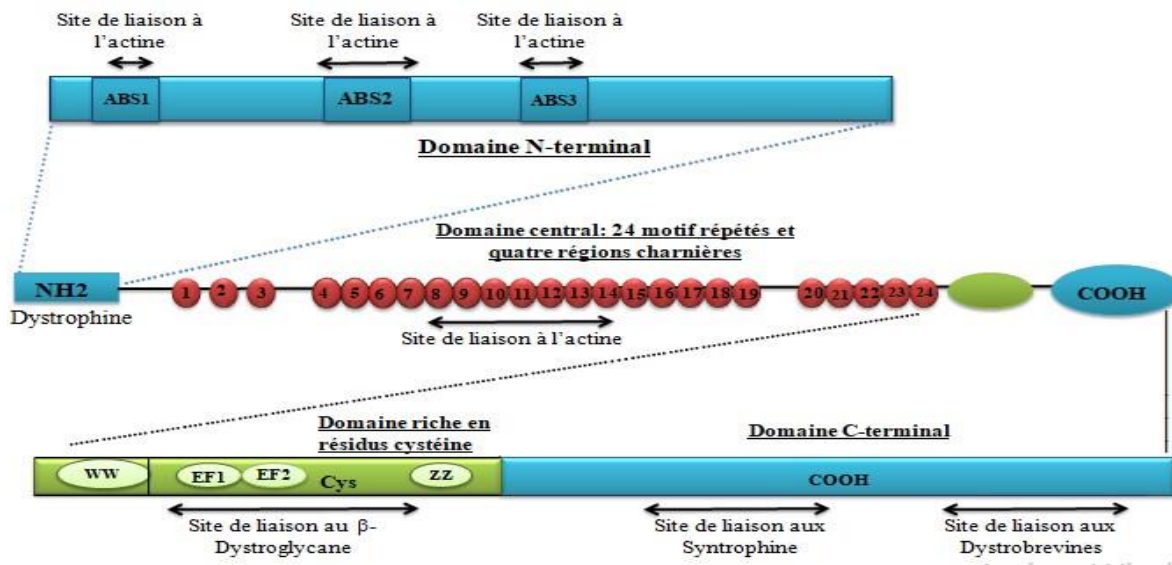


Figure 8 : Représentation schématique de la structure de la dystrophine.

5.2.2. Isoformes de la dystrophine

5.2.2.1. Isoformes longues de 427 kDa

Le gène *DMD* possède à l'extrémité 5' quatre promoteurs génèrent un ARN messager complet (14kb) donnant naissance à quatre isoformes de 427kDa, dont la dystrophine musculaire (Tableau II) :

- **Isoforme cérébrale** ou C- dystrophine ou B- dystrophine (Dp427-B) ; dérivée du promoteur PB (B pour cerveau), active au niveau de cortex et l'hippocampe [66].
- **Isoforme de la dystrophine musculaire** ou M- (Dp427-M) ; dérivé du promoteur PM (M pour muscle), qui est actif principalement dans les muscles et faiblement dans les cellules gliales [67].
- **Isoforme de la cellule de Purkije cérébelleuse** ou P- dystrophine (Dp427-P) ; dérivée du promoteur PP (P pour cellule de Purkije) [64].
- **Isoforme lymphocytaire** ou L-dystrophine (Dp427-L) [67].

5.2.2.2. Isoformes courtes

Des isoformes de faible poids moléculaire de la dystrophine et des ARN messagers incomplets sont issus d'autres quatre autres promoteurs, également spécifiques des tissus. On distingue : Dp71, Dp116, Dp140 et Dp260 (Tableau II). Elles sont dépourvues du domaine de

liaison à l'actine, cependant elles conservent les domaines nécessaires pour réagir avec la dystroglycane, la dystrobrevine et la syntrophine.

Elles sont exprimées dans plusieurs autres tissus, tel que la rétine où le Dp260 est exprimée à des concentrations élevées, en association avec la Dp140, qui est aussi exprimé au niveau de cerveau et le rein. La Dp116 est exprimée uniquement dans les nerfs périphériques. La Dp71 est exprimée dans presque tous les tissus, à l'exception du tissu musculaire squelettique [12].

Ces isoformes pourraient jouer un rôle dans les comorbidités observées dans les maladies de Duchenne et de Becker malgré leur non-expression dans le muscle strié. Dp71 et Dp140, sont incriminées dans la majorité de ces comorbidités à cause de leur forte expression dans le système nerveux central et le muscle lisse [12, 68].

Tableau II: les différents isoformes longues et courtes de la dystrophine [69, 70].

Nom de l'isoforme	Poids moléculaire en (Kda)	Taille du transcrit (Kb)	Exons du gène <i>DMD</i>	Promoteur	Distribution tissulaire chez l'adulte
Isoformes longues					
M-dystrophine	427	14	1--79	P _M (M : Muscle)	Muscle (Lisse, Squelettique, Cardiaque)
B-dystrophine	427	14	1--79	P _B (B : Brain)	Encéphale
P-dystrophine	427	14	1--79	P _P (P : Purkinje cell)	Cervelet
L-dystrophine	427	14	1--79	—	Lymphocytes
Isoformes courtes					
Dp260	260	—	30--79	—	Rétine
Dp140	140	7,5	51--79	—	Encéphale et rein
Dp116	116	5,2	56--79	Entre les exons 55 et	Ubiquitaire
Dp71	71	4,5	63--79	Entre les exons 62 et 63	Lymphocytes

5.2.3. Rôle de la dystrophine

La dystrophine est un élément essentiel du complexe de glycoprotéines liées à la dystrophine (DAG) qui est constitué de plusieurs protéines différentes et agit comme un lien entre le cytosquelette intercellulaire et la matrice extracellulaire [71].

Le complexe Dystrophine-Glycoprotéine (DAPC) est localisé au niveau de la cellule musculaire striée [72]. C'est l'un des éléments du costamère, une structure cellulaire dont le but est de servir d'ancrage du sarcomère musculaire au sarcolemme et à la membrane basale musculaire [73-75]. Il joue un rôle dans la structure du myocyte strié, la transduction de la contraction musculaire et la transduction des signaux intracellulaires [72].

Les protéines constituant le DGC se divisent en 3 groupes selon leur localisation : extracellulaires (α -Dystroglycane), transmembranaires (β -Dystroglycane, Sarcoglycane (α , β , γ et ϵ), et Sarcospane) et intracellulaires (Dystrophine, Dystrobrevine, Syntrophine, oxyde nitrique synthase neuronale (nNOS)) (Figure 9).

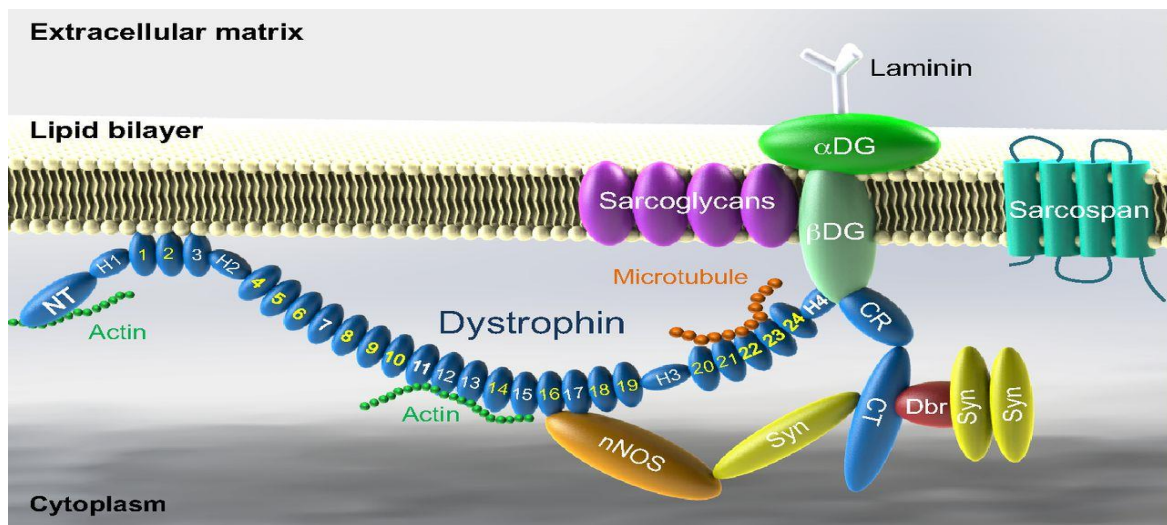


Figure 9: Représentation schématique de la dystrophine et du complexe de glycoprotéines associé à la dystrophine (DGC) [75].

L'ensemble des protéines DGC jouent différents rôles :

- **Dystroglycane** : codée par le gène *DAG1* [76, 77]. Après la transcription, le produit est alors clivé en deux protéines : α -Dystroglycane et β -Dystroglycane [77]. α -Dystroglycane se lie à certains composants de la matrice extracellulaire musculaire

comme les laminines pour fixer le cytosquelette des myocytes à la matrice extracellulaire. Elle aussi fixée à la β -Dystroglycane et à travers elle, au reste du DGC [72, 78].

- **Sarcoglycanes** sont une famille de protéines transmembranaires musculaires. Elles regroupent les protéines α , β , γ , δ et ϵ -Sarcoglycanes. Ces Sarcoglycanes forment un sous-complexe du DGC, permettant son attachement au sarcomère. Leur fonction exacte reste inconnue, mais les recherches montrent qu'elles joueraient un rôle stabilisateur mécanique de la membrane des cellules musculaires [79, 80].
- **Sarcospane** : protéine transmembranaire qui fait partie du DAPC. Elle joue un rôle important dans l'adhésion, la régénération et la résistance des cellules musculaires aux forces mécaniques [79]. Elle joue aussi un rôle dans le complexe utrophin-glycoprotéine (UGC), comme structure importante à la jonction neuro-musculaire [72].
- **Dystrobrevine** : protéine du DGC associée à la Dystrophine. Elle joue un rôle dans la structure du DGC et donc la stabilité du sarcolemme et un rôle dans la signalisation intracellulaire [81]. Elle interagit directement avec le Dystrophine [72].
- **Syntrophines** : groupe de protéines composées de 5 protéines : α , $\beta 1$, $\beta 2$, $\forall 1$ et $\forall 2$. Les protéines α , $\beta 1$, $\beta 2$ et $\forall 1$ sont exprimées au niveau du muscle strié et associées directement à la Dystrophine. Tandis que les protéines $\forall 1$ et $\forall 2$ s'expriment au niveau du système nerveux central [82, 83].

Les syntrophines musculaires constituent un complexe lié à l'oxyde nitrique synthase neuronale (nNOS). Le stress mécanique sur le DGC lié à la contraction musculaire active la nNOS, qui synthétise l'oxyde nitrique qui diffuse à travers le sarcolemme et entraîne la relaxation des capillaires entourant le tissu musculaire. Le complexe Syntrophine-nNOS joue alors un rôle essentiel dans l'augmentation de l'apport sanguin au muscle pendant l'activité physique [84, 85].

5.2.4. Dysfonctionnement de la dystrophine et le complexe protéique associé

La DMD est lié soit à l'absence de production de dystrophine, soit à la production de dystrophine anormale. Cette insuffisance entraîne une instabilité de la membrane plasmique (sarcolemme) et une élévation de la perméabilité sarcolemmale qui se traduit par une libération de créatine phosphokinase dans le sérum et par l'entrée massive et incontrôlée de calcium dans les myofibrilles déficientes en dystrophine. Ce dernier est un phénomène conduisant à la nécrose cellulaire par différents mécanismes, dont l'activation de protéases,

l'hypercontraction de certains sarcomères, ou l'entrée de calcium dans les mitochondries causant une déplétion en ATP (Figure 10) [86].

Les protéines liées à la dystrophine sont produites, mais en l'absence de dystrophine, elles ne sont pas directement associées au sarcolemme et sont dégradées, ce qui explique leur diminution, en particulier celle de l' α -sarcoglycane [87]. L'étude de l' α et du β -dystroglycane par Western blot dans le modèle animal de la souris dystrophique a révélé une diminution de 85% de ces protéines, alors que l'ARNm de ces deux protéines est normal [88].

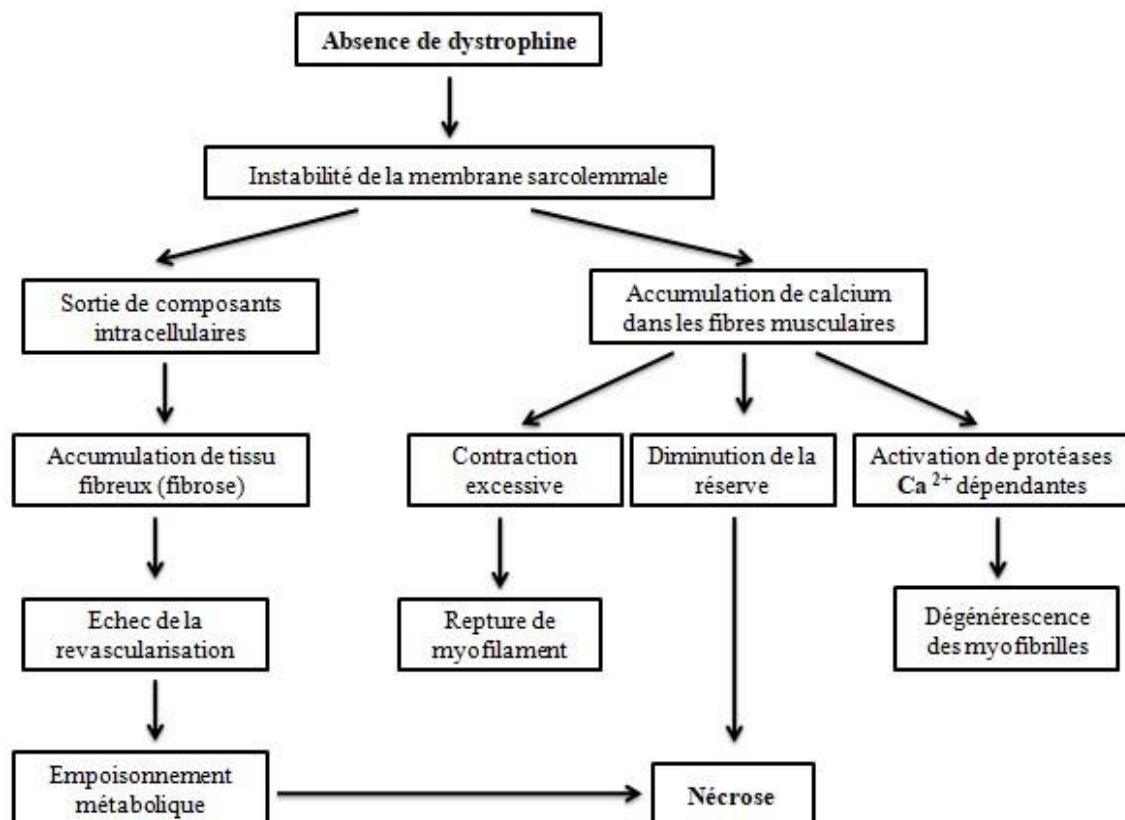


Figure 10 : Enchaînement des dommages causés aux fibres musculaires chez un patient atteint de la DMD.

5.3. Les principaux types de mutations du gène *DMD*

Les dystrophinopathies sont des pathologies de transmission récessive liée à l'X. Dans 70% des cas, la mutation est transmise par la mère porteuse saine. Dans 30% des cas, il s'agit d'une mutation *de novo* [89].

5.3.1. Grandes délétions et duplications

Les délétions et les duplications sont les mutations les plus souvent trouvées dans le gène *DMD*. Les délétions sont en majorité et se rencontrent dans 60 à 68% des cas de DMD, et 85% des cas de DMB. Les duplications, en revanche, sont bien moins fréquentes et ne touchent que 5 à 15 % des cas [11-13].

En théorie, ces délétions pourraient se trouver à n'importe quel endroit du gène. En réalité, il existe deux zones critiques où l'on trouve 98 % des délétions : une région proche de l'extrémité 5' du gène, de l'exon 2 à l'exon 19 et une région centrale, de l'exon 45 à 55. Celle-ci est le point chaud où l'on retrouve la plupart des délétions [90, 91].

5.3.2. Mutations ponctuelles

Les petites mutations ponctuelles représentent 20 à 35% des mutations identifiées dans le gène *DMD*. Il s'agit de petites délétions, duplications, insertions ou substitutions portant sur 1 à 10 nucléotides [11-13]. Ces mutations sont principalement dénuées de sens, rarement répétées et situées dans l'ensemble du gène, sans point chaud de mutation [52]. En raison de la taille du gène, l'identification de ces mutations est particulièrement difficile.

5.3.3. Les autres types mutationnels

Une insertion intra-génique de 220 kb a été rapportée par Bettecken et Muller (1989). Il ne semble pas s'agir d'une duplication exonique car l'intensité des bandes acquises en Southern blot après hybridation avec des sondes d'ADNc est normale. Un remaniement intronique qui perturbe un site d'épissage ou une inversion d'un fragment exonique pourrait être la cause du phénotype DMD [92].

5.4. Corrélation génotype – phénotype

La première contrainte pour proposer une correspondance génotype-phénotype précise est la détermination des phénotypes. Une classification par consensus des patients en groupes phénotypiques en rapport avec l'âge de la perte de la marche est utilisée. Si le patient perd la marche avant 12 ans, il a un phénotype DMD, après 16 ans il a un phénotype DMB et entre 12 et 16 ans il est de phénotype intermédiaire (DMI) [14]. Ce consensus ne classe les patients que selon les grands groupes phénotypiques.

Néanmoins, une règle dite "de Monaco" est avancée depuis 1988 et permet d'établir un lien entre les phénotypes observés et la conservation du cadre de lecture de la dystrophine [93].

En effet, d'une part, les mutations décalant le cadre de lecture de la protéine, appelées mutations hors cadre, entraînent l'apparition d'un codon Stop prématuré et aboutissent à une absence de dystrophine dans les cellules et à la DMD. En revanche, les mutations qui conservent le cadre de lecture de la protéine, appelées mutations in-frame, entraînent la production d'une dystrophine tronquée en plus petite quantité que dans les cellules saines et sont constatées dans la myopathie de Becker [93].

Cette hypothèse a par la suite été confirmée par plusieurs recherches, dont celle de Hassan et al. en 2008, qui a affirmé que cette règle s'applique chez 77,9% de sa cohorte, ou celle d'Elhawary en 2004, qui a attesté cette règle chez plus de 90% des patients [94, 95].

Cependant, cette règle ne concernerait que les grands groupes phénotypiques (BMD, DMD) et n'expliquerait pas l'hétérogénéité des symptômes observés au sein de ces groupes. De plus, cette règle a des exceptions évaluées entre 8 et 9% des mutations rapportées dans la Leiden Muscular Dystrophies Database mais peut monter jusqu'à 30% selon les études [96, 97].

Une partie de ces exceptions peut être expliquée par une évolution des techniques de diagnostic génétique. Les premiers diagnostics génétiques utilisaient la MPCR pour rechercher la présence de certains exons sur l'ADNc, mais cette technique non exhaustive laisse subsister un doute sur l'étendue réelle des mutations des patients [98]. Une délétion repérée comme étant en phase peut, en fait, impliquer plus d'exons que ceux détectés initialement et décale le cadre de lecture conduisant à une absence de dystrophine caractéristiques d'un phénotype DMD et vice versa [99, 100]. Ces dernières années, les progrès des techniques de biologie moléculaire ont permis d'identifier de manière fiable les mutations présentes chez les patients par MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification), RT-PCR de tous les exons et séquençage de l'ADN [52, 97, 101].

L'autre partie est expliquée par des phénomènes épigénétiques. En outre, il a été observé chez des patients porteurs d'une mutation par décalage de cadre de lecture, un saut d'exon "naturel" dans une partie des cellules. Le saut d'exon est un événement au cours duquel l'exon muté ou les exons entourant l'exon supprimé ne sont pas transcrits, ce qui crée une délétion plus importante mais restaure le cadre de lecture. Dans ces cellules, le cadre de lecture de la protéine est réaligné et il permet la production d'une petite quantité de dystrophine tronquée conduisant à un phénotype de DMB [102]. Ces phénomènes sont rares, situés dans des certaines de cellules et difficilement prévisibles.

Finalement, certaines mutations de type frame shift sont observées chez les patients qui souffrent de DMD sévères. Ces mutations sont localisées dans les régions riches en cystéine et le domaine C-terminal (exons 64-70), qui est indispensables pour la fixation de la dystrophine au DAG ou bien dans le domaine N-terminal (exons 2-10 et 32-45) (Figure 11) [51, 87].

En outre, il existe une petite proportion de patients atteints de DMB présentant des mutations hors cadre à l'extrémité 5' du gène (exon 3-7, 5-7, 3-6) ou plus en aval (exon 51, exon 49-50, 47- 52, 44 ou 45) (Figure 11) [103]. La règle de Monaco n'est par conséquent pas suffisante pour établir une corrélation précise entre le génotype et le phénotype.

De récentes études ont été réalisées sur l'hétérogénéité clinique des patients atteints de DMD. Ces études ont montré une hétérogénéité du phénotype DMD en termes d'atteinte musculaire, mentale, respiratoire et cardiaque. Ainsi, différents sous-groupes phénotypiques pourraient être déterminés en combinant soit, une atteinte musculaire et respiratoire, soit une atteinte musculaire et mentale [104, 105].

Par ailleurs, une correspondance partielle entre ces sous-groupes phénotypiques et la localisation de la mutation a pu être établie concernant l'atteinte mentale. Les mutations présentes après l'exon 30 et touchant les isoformes les plus courtes sont en effet observées chez les patients présentant des troubles cognitifs. En outre, aucune relation n'a pu être établie entre la position de la mutation et l'atteinte musculaire et cardiaque.

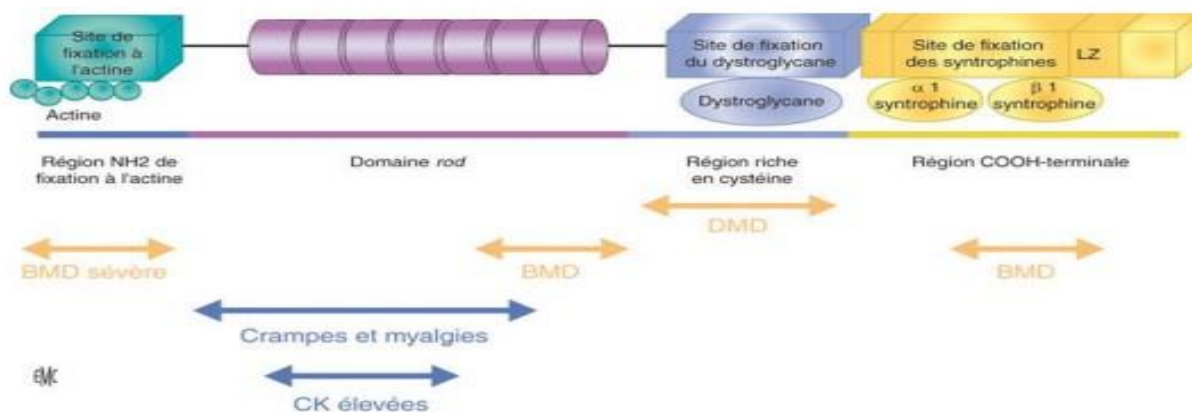


Figure 11 : Corrélation théorique génotype-phénotype. (Source : AFM Téléthon)

6. Diagnostic

6.1. Diagnostic clinique

Bien que le diagnostic moléculaire soit le diagnostic de certitude, plusieurs tests paracliniques permettent d'orienter le diagnostic ou rechercher d'autres étiologies expliquant la symptomatologie clinique d'une dystrophie musculaire.

Dans la grande majorité des cas, ce diagnostic est mentionné à l'occasion de difficultés à marcher ou de faiblesses musculaires progressives qui s'installent en général chez le jeune garçon. La manœuvre de Gowers peut aussi être un signe évocateur.

6.1.1. Biochimiques

6.1.1.1. Dosages des créatinines phosphokinases

La CPK est une enzyme intracellulaire localisée principalement dans les cellules musculaires squelettiques, les cellules myocardiques et le cerveau. La destruction de la membrane cellulaire dans ces tissus entraîne un largage de cette enzyme dans la circulation. Ainsi, sa concentration dans le sang est considérée comme un marqueur sensible, mais non spécifique [26].

En cas de DMD, son augmentation atteint dès la naissance 20 à 50 fois le taux normale (CPK= 0 - 195 UI /L pour un homme et entre 0 - 170 UI /L pour une femme), ce qui permet un dépistage néonatal de cette affection [50]. L'activité enzymatique croît ensuite considérablement durant la première année de la vie pour atteindre entre 1 ans et 5 ans 100 à 300 fois la normale du même âge. Ce taux diminuera par la suite progressivement. Seules deux autres anomalies musculaires peuvent aboutir à une élévation aussi importante de la CPK : la forme mineure de la DMB et la forme autosomale récessive de la dystrophie musculaire des ceintures.

En fait, nombreux paramètres (température, hémolyse, dilution...) bouleversent considérablement les résultats du dosage sérique de la CPK, ce qui exige une standardisation des méthodes de mesure. Généralement trois mesures sont préconisées en cas d'activité élevée ou dans les limites supérieures à la normale au cours de la première mesure [106].

6.1.1.2. Les transaminases

Les transaminases (ASAT et ALAT) peuvent être élevées chez les enfants atteints de DMD, parce que ces enzymes sont également synthétisées par les myocytes et seront relâchées dans le sang lorsque les fibres musculaires sont détruites chez ces patients [107-109].

6.1.2. L'électromyogramme (EMG)

C'est un appareil permettant de recueillir et d'analyser des signaux électriques musculaires ainsi de déterminer si les troubles moteurs ont pour origine une atteinte neurogène ou sont dus à une atteinte des tissu musculaire (atteinte myogène) [110].

Dans les DMD et DMB, l'EMG donne un tracé de type myogène, c'est-à-dire une absence d'activité musculaire au repos et une diminution de la durée des potentiels d'action d'unité motrice et des potentiels polyphasiques. Ces signes restent généralisables à toute pathologie touchant le tissu musculaire, ce qui fait de cet examen un test non discriminatif non indiqué qu'en cas de suspicion d'une atteinte nerveuse ou devant un tableau atypique [111].

6.1.3. Technique d'imagerie médicale

Pour améliorer le dépistage certains auteurs proposent de réaliser autres examens tel que l'échographie quantitative, le scanner et imagerie par résonance magnétique (IRM). Ces technologies sont essentiellement utilisées au cours de l'appréciation de l'extension des lésions et peu employées dans un but diagnostique [112].

6.1.4. La biopsie musculaire

La biopsie musculaire reste l'élément principal de la démarche diagnostique de la pathologie musculaire en général et des dystrophinopathie en particulier. Elle consiste à prélever un petit échantillon dans une zone où le muscle n'est pas trop altéré. Le prélèvement est réalisé habituellement au niveau du muscle deltoïde (épaule) ou du quadriceps (cuisse), sous anesthésie locale [50]. Deux types d'études diagnostiques sont réalisés :

6.1.4.1. Microscopie optique

L'étude histologique classique est une méthode importante, utilisée en routine pour le diagnostic des maladies musculaires [113]. Dans la maladie de Duchenne, la préparation microscopique se fait par coloration du tissu musculaire fixée par Hématine - éosine ou Trichrome de Gomori. Cet examen permet ainsi de visualiser des anomalies orientant vers la maladie en sujet : Nécrose myophagocytaire des fibres musculaires (Figure 12) [113].

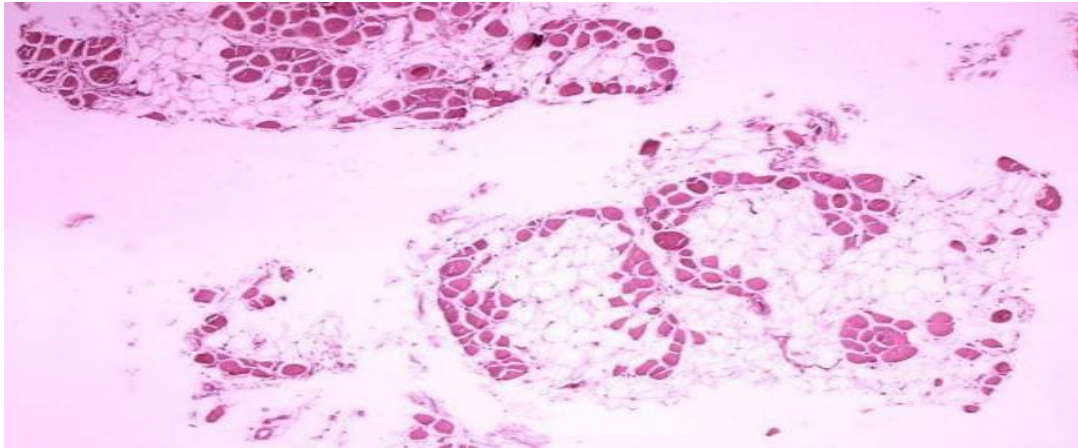


Figure 12: Image de l'aspect en microscopie optique du tissu musculaire d'un patient atteint de la DMD, prélevé par biopsie :l'image illustre les changements caractéristiques de l'atteinte musculaire [114].

6.1.4.2. Immunohistochimie (IHC)

C'est une technique qui permet de visualiser et de localiser des protéines spécifiques sur une coupe d'un tissu donné. Elle comporte l'utilisation de 2 anticorps. Un anticorps dit primaire, qui possède une grande spécificité pour la protéine à détecter, et un anticorps dit secondaire, spécifique à l'anticorps primaire.

L'anticorps primaire se fixe sur la protéine cible (dite épitope), avant d'être lui-même fixé par l'anticorps secondaire. Ainsi le couple anticorps-antigène est formé, provoquant une réaction chimique causant la précipitation d'un colorant (ou de lumière dans le cas d'un fluorochrome) (Figure 13) [37].

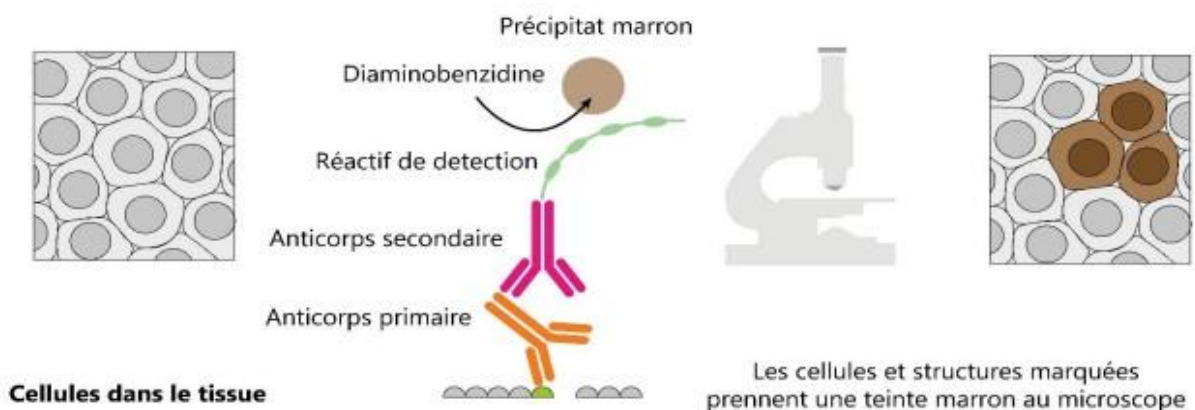


Figure 13: Principes de base de l'immunohistochimie [115].

En 1988, Bonilla et al ont déterminé la localisation de la dystrophine au niveau des myocytes en utilisant l'immunohistochimie. Cette étude a été fait sur des coupes de muscles congelé, grâce à différent anticorps monoclonaux ou polyclonaux orientés contre les différents fragments de la protéine (Cterminus, Rod domain et N-terminus). Cette technique permet d'établir la présence, la localisation et dans certaines mesures, l'abondance de la dystrophine (Figure 14) [116, 117].

Sur un muscle témoin normal, la forme de la dystrophine est un liseré fluorescent contigu à la membrane plasmique. Chez le patient DMD, on observe une absence totale ou quasi totale de la dystrophine et il se peut que la fluorescence soit faible et parfois des images de discontinuité membranaire de l'expression de la dystrophine [118].

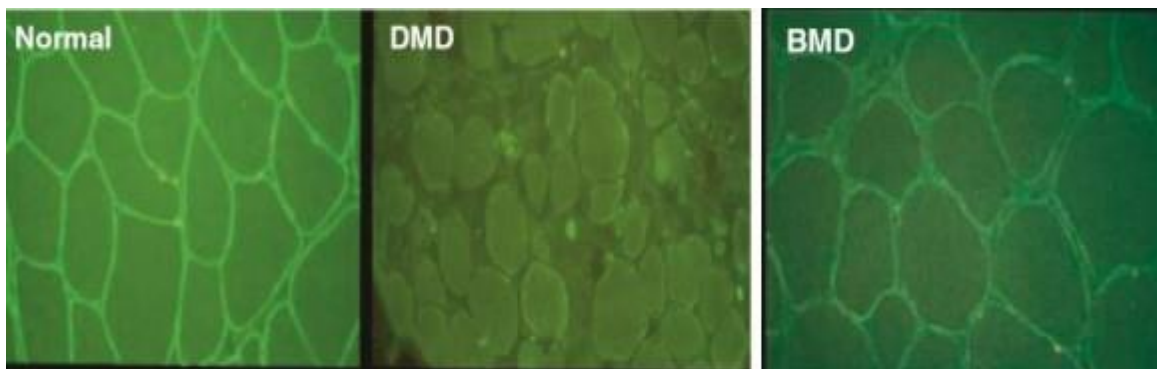


Figure 14: Étude de dystrophine à partir de la biopsie musculaire par immunofluorescence : marquage avec un anticorps monoclonal (NCL DYS1, Novocastra) [51].

6.1.5. Diagnostic moléculaire

Le diagnostic moléculaire reste obligatoire même si la biopsie musculaire est positive. Le test moléculaire permet, d'établir des corrélations phénotype/génotype, le conseil génétique et le diagnostic prénatal. Il permet par ailleurs de classer les patients pour les essais cliniques de thérapies spécifiques à la mutation [11, 12].

6.1.5.1. Recherche des grands remaniements

6.1.5.1.1. PCR multiplex (MPCR)

Il existe 2 régions hotspots le long du gène *DMD*, qui comprend 98% des délétions. Une région, dite proximale, près de l'extrémité 5' du gène, débute de l'exon 2 jusqu' à l'exon 19, et une région centrale, de l'exon 45 jusqu' à l'exon 55. Pour cela, la technique de diagnostic de première ligne reste la PCR multiplex. Elle a été décrite pour la première fois par

Chamberlain et al., en 1988, et elle a évolué à travers les années en sa forme actuelle, permettant cette couverture [90, 91].

6.1.5.1.2. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)

La MLPA est une technique à haute résolution, semi quantitative qui permet le diagnostic des délétions et duplications. L'avantage de cette technique par rapport à la PCR multiplex est sa capacité à analyser les 79 exons du gène *DMD*. Un autre avantage qui s'ajoute est sa possibilité d'être utilisé pour diagnostiquer les femmes conductrices [119, 120].

Crashant et al., ont observé que la MLPA a permis de détecter de mutations dans 5.6% de cas supplémentaires que la PCR multiplex a été incapable d'identifier. Dans la même étude, la MLPA a identifié deux mères conductrices dans les formes familiales de DMD et six conductrices sur huit mères de patients sporadiques.

6.1.5.2. Recherche des mutations ponctuelles

La recherche de ces mutations est en deuxième intention chez les patients suspects de DMD et DMB uniquement si la PCR multiplex et/ou la MLPA sont négatifs en fonction des moyens et de protocoles des laboratoires. Les 2 principales techniques pratiqués sont le séquençage Sanger, qui reste très laborieux en raison de la grande taille du gène *DMD* (79 exons) et de l'absence de points chauds de mutations ponctuelles récurrentes, et le Séquençage de Nouvelle Génération (NGS) [13, 121].

6.1.5.3. Etude des transcrits

Même par NGS, certaines variations sont indétectables, comme les mutations introniques profondes. Pour cette raison l'analyse des transcrits (ARNm) sera essentielle chez tous les patients négatifs après analyse NGS. L'ARNm est transcrit en ADNc par RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction), puis sera séquençé par la méthode Sanger. Cette technique permet de visualiser les mutations ponctuelles qui ont une conséquence sur l'épissage, aussi bien dans les régions de consensus d'épissage que dans les zones profondes introniques [122].

6.1.6. Diagnostic différentiel

6.1.6.1. Dystrophies musculaires des ceintures

Les dystrophies musculaires des ceintures sont un groupe de maladies musculaires cliniquement et génétiquement hétérogènes, qui se caractérisent par une atteinte des ceintures musculaires. Ce groupe comprend un large nombre de maladies génétiques dues à des

mutations de différentes protéines qui interagissent avec la dystrophine à transmission autosomique récessif ou dominant atteignant ainsi les deux sexes à proportions égales. Pour cela, leur symptomatologie et phénotype, peuvent être extrêmement similaires aux DBMD, ce qui rend ainsi le diagnostic moléculaire la seule manière de les différencier [31, 123].

6.1.6.2. Dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss

C'est une maladie génétique musculaire progressive qui se caractérise par la triade suivante :

- 1) Contractures articulaires, qui apparaît dès l'enfance ;
- 2) Faiblesse musculaire avec progression lent et affectant en premier les muscles distaux, puis proximaux ;
- 3) Une atteinte cardiaque, dont les manifestations sont diverses, caractérisée par une variabilité importante de l'âge d'apparition, de l'évolution et de la sévérité.

Les modes de transmission sont liés au sexe (gène *EMD* codant pour l'émerine et plus rarement gène *FHL1*) et autosomique dominant ou récessif (gène *LMNA*). L'association de troubles cardiaques, l'atteinte musculaire progressive et la possibilité d'une transmission récessive liée à l'X rend cette maladie un diagnostic différentiel important à évoquer devant une suspicion de la maladie de Duchenne ou de Becker [124].

6.1.6.3. Amyotrophies spinales

A l'inverse des dystrophies musculaires, c'est un groupe de maladies neurologiques héréditaires, qui se caractérisent par une destruction des neurones de la corne antérieure de la moelle épinière. L'entité est composée d'un groupe de pathologies de sévérité variable, caractérisées cliniquement par une faiblesse et une atrophie musculaire progressive, qui affectent les muscles distaux, puis proximaux. Ces pathologies sont secondaires à une mutation qui paralyse la fonction du gène *SMNI* [124, 125].

Pour différencier l'amyotrophie spinale des dystrophies musculaires, on recherche des signes d'atteinte neurologique non retrouvées chez les patients atteints de Duchenne et Becker. Il s'agit de l'atrophie musculaire, la baisse, voir la perte des reflex tendineux, un EMG neurogène, mais aussi l'absence de signes auxquels on s'attend dans les atteintes musculaires comme un taux élevé de CPK sériques [125].

6.1.6.4. Les myopathies acquises

L'origine des myopathies acquises peut être: inflammatoire (lors d'une **dermatomyosites** ou bien d'une **polymyosites**), métaboliques, toxiques, iatrogènes (des troubles musculaires dus à un traitement médical comme l'utilisation de la cortisone et ses dérivés à haute dose et sur une longue durée) et neurologiques comme **la maladie de Charcot, la poliomyélite** ou bien lors d'une lésion nerveuse. Le caractère acquis de ces affections est établi d'emblée par l'interrogatoire et les investigations complémentaires [126].

6.1.7. Dépistage de la famille

Une fois la mutation de l'enfant connue, la mère de celui-ci peut faire une analyse génétique pour savoir si elle est transmettrice de la maladie [127]. Les mutations *de novo* concernent environ un tiers des cas de myopathie de Duchenne [128]. Si la mutation est présente chez la mère, la même analyse est effectuée chez les autres membres femmes de la famille (sœur, filles etc.). Cette analyse génétique permet à la femme transmettrice de prendre une décision éclairée au sujet des grossesses futures et le risque de transmettre la pathologie.

En effet, une femme conductrice de la DMD a 50% de risque de transmettre la maladie si c'est un garçon et 50% que l'enfant soit porteur si c'est une fille [129, 130].

Les parents peuvent être suivis en consultations génétiques et avoir recours à un diagnostic prénatal. Ce diagnostic permettait de savoir si l'enfant à naître est porteur de la maladie [129].

Par ailleurs, les femmes transmettrices peuvent ensuite être suivies sur les plans musculaire et cardiaque et savoir le taux de risques de développement des symptômes [127].

7. Traitement

7.1. La Thérapie actuelle

Actuellement on ne peut pas parler d'un traitement curatif de cette maladie. Cependant, la médecine d'aujourd'hui peut retarder certains symptômes.

7.1.1. Corticothérapie

Le traitement des patients DMD par corticoïdes date de 1974. Aujourd'hui, les corticoïdes sont un traitement de référence qui figure parmi les lignes directrices de soins standards pour la DMD[131]. Elles peuvent être administrées de manière chronique ou discontinue, selon

leur tolérance. Le déflazacort et la prednisolone/prednisonesont les molécules les plus utilisées actuellement [132, 133].

En effet, les glucocorticoïdes possèdent un effet anabolisant dans le muscle et par conséquent une action positive sur la prolifération et la différenciation des myoblastes. Ils peuvent aussi inhiber la protéolyse musculaire, diminuer la concentration en calcium cytosolique et amplifier l'expression d'utrophine qui est une protéine possédant 80% d'homologie avec la dystrophine [134-136], Elles permettent aussi de réduire l'inflammation et la nécrose musculaire ce qui augmente la force musculaire, réduit le développement de scoliose, fait retarder l'âge de perte de la marche et l'apparition de l'insuffisance respiratoire [137, 138].

Comme tout autre traitement, la corticothérapie possède des effets secondaires qui sont plus importants si l'administration est journalière [138]. Ainsi, plus de 30 % des patients sous corticothérapie quotidienne présentaient un syndrome de Cushing (contre environ 15 % lorsque la corticothérapie était discontinuée). Les fractures vertébrales et l'ostéoporose étaient aussi très fréquentes [133, 138] et la prise de poids est elle aussi courante. Pour toutes ces raisons, 42 % des patients touchés par la myopathie de Duchenne sont traités de manière discontinue et plus rarement ne le sont pas [139].

7.1.2. Traitements contre l'insuffisance cardiaque

La dégénérescence du muscle cardiaque est considérée comme cause majeure de morbidité et de mortalité dans la DMD.

La prise en charge de l'insuffisance cardiaque consécutive à une cardiomyopathie dilatée [140] est assurée par les inhibiteurs de l'enzyme de conversion associés ou non à des bêta-bloquants. La mise en place d'une telle thérapie est tellement efficace lorsque les sujets sont encore asymptomatiques. Ainsi, une augmentation significative de la survie à long terme a été obtenue comparativement chez un groupe traité en phase symptomatique [141]. Des diurétiques peuvent aussi être utilisés quand la dysfonction ventriculaire est importante et entraînant des œdèmes. On mentionne aussi qu'une surveillance cardiaque renforcée est conseillée pour les femmes transmettrices, avec la mise en place d'une médication cardioprotectrice.

7.1.3. Autres traitements

En plus des traitements déjà cités, d'autres interventions peuvent être administrées tel que [12-15] :

- La ventilation non invasive (VNI) qui lorsqu'elle est associée à la corticothérapie, a permis d'obtenir un gain remarquable dans la période d'autonomie des patients ;
- Trachéotomie qui peut être réalisée lorsque la VNI n'est pas ou n'est plus efficace ;
- La kinésithérapie qui fait partie des soins dispensés aux patients DMD, elle a pour but de diminuer les contractures et la survenue de scoliose, par le maintien le plus longtemps possible une activité physique ;
- L'intervention chirurgicale est aussi pratiquée par ténotomie de plusieurs muscles dans le but de réduire les contractures musculotendineuses et corriger les déformations orthopédiques. La chirurgie est aussi utilisée pour compenser la scoliose qui s'installe généralement dès lors que les patients sont non-déambulants. Elle a donné de nets effets bénéfiques sur l'équilibre en position assise, sur la commodité en fauteuil roulant et de manière plus générale sur la qualité de vie des patients.

7.2. Possibilité thérapeutique

7.2.1. La Thérapie cellulaire

La thérapie cellulaire vise à pousser la régénération de tissu musculaire par l'adjonction de cellules souches myogéniques. Diverses approches de ce type existent, dont la transplantation de cellules souches musculaires de manière autologue ou allogénique. Cependant, cette méthode se heurte à la durée de vie réduite des cellules injectées (mort de la plupart de celles-ci en 3 jours) et à une réponse immunitaire, notamment par immunité à médiation cellulaire [142].

Une alternative consisterait à utiliser des cellules mésenchymateuses ou des cellules souches de moelle osseuse, qui sont capables de sécréter des cytokines anti-inflammatoires et anti-apoptotiques de même que sous certaines conditions avoir un potentiel myogénique. Ce qui pourrait avoir une action sur la régénération tissulaire. Des études ont été menées sur un nombre réduit de patients traités par injection par voies intrathécale et intramusculaire ont montré une amélioration au niveau fonctionnel et au niveau de la force musculaire (près de 90 %) [143], sans qu'il ne soit rapportés d'effets secondaires notables [142].

7.2.2. Thérapie génique

Cette thérapeutique a pour but de faire exprimer la dystrophine à l'intérieur des fibres musculaires. Cette thérapie se heurte à plusieurs obstacles à citer [144] :

- La taille du tissu cible, avec les muscles constituant 40% de la masse corporelle totale.
- La circulation du vecteur viral, rendue difficile par le système immunitaire de l'hôte et la barrière hémato-tissulaire.
- La grande taille du gène *DMD*, qui rend son intégration dans le vecteur viral difficile.

Les stratégies thérapeutiques en thérapie génique peuvent être d'apporter une mini ou micro dystrophine, un anti-myostatine, de réaliser une translecture du codon stop ou encore de faire un saut de l'exon porteur de ce codon stop [145]. Cette stratégie consiste à compenser l'anomalie génétique pour obtenir une protéine fonctionnelle [146] (Tableau III).

Tableau III: Mode d'action des principaux traitements par thérapie génique en cours d'essai.

Thérapie génique et mini ou micro dystrophine	Translecture du codon STOP	Saut d'exon	Apporter un anti myostatine par thérapie génique
Supplantation du gène manquant par un mini ou micro gène thérapeutique à l'aide d'un (Virus vecteur viral).	Les molécules développées passent outre les codons stop prématurés (La production de protéine continue malgré le codon STOP).	Suppression du ou des exons porteurs d'une anomalie lors de l'épissage alternatif par des oligonucéotides antisens.	La myostatine est un inhibiteur de croissance musculaire présent dans l'organisme. En diminuant son action, les effets recherchés sont de favoriser la croissance musculaire.

PATIENTS ET METHODES

1. Description de l'étude

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche collaboratif entre l'Unité de Génétique de la Faculté de Médecine et de Pharmacie d'Oujda (FMPO) et le service de pédiatrie, intitulé « Etude des maladies monogéniques ».

Le projet est approuvé par le comité d'éthique pour la recherche biomédicale de la faculté de médecine de Casablanca (CERBC) et par la commission nationale du contrôle de la protection des données à caractère personnel (CNDP).

Ce travail, est une étude rétrospective/prospective réalisée durant la période du stage du mois avril au mois de juillet 2022 à partir des dossiers médicaux de patients atteints de dystrophinopathies recrutés au sein de la biobanque de la Région de l'Oriental « BRO Biobank » du service de pédiatrie du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Mohammed VI et par analyse moléculaire de l'ADN des patients extrait du sang périphérique prélevée sur tube EDTA après consentement éclairé des patients et/ou de leurs parents(**Annexe1**).

Cette étude s'étale sur une période de cinq ans, allant de février 2017 à juillet 2022. Elle concerne tout patients présentant des signes cliniques et/ou biologique évocateurs de dystrophinopathie, avec ou sans notion de cas familial, ayant consenti verbalement et en écrit. Elle exclue tout patient non consentant et ou présentant un autre type de pathologie neurologique héréditaire ou de myopathie.

L'objectif de l'étude :

- Préciser les caractéristiques cliniques, paracliniques et surtout génétiques des patients atteints de dystrophinopathie de la région de l'oriental.
- Rechercher et étudier les macrodélétions au sein du gène *DMD* par PCR multiplex ;
- Etablissement des corrélations possibles entre l'anomalie moléculaire et le phénotype clinique.

2. Patients

Cette étude a été réalisée à partir de trente-cinq (35) patients de sexe masculin et féminin, issus de trente-quatre familles, d'origine marocaine de la région de l'oriental, âgés de 4 à 24 ans. Ces patients présentaient tous un tableau clinique évocateur d'une dystrophie musculaire de type DMD ou DMB.

Une fiche d'exploitation a été remplie pour chacun des patients avant l'analyse moléculaire à partir des dossiers médicaux. Elle fournit des renseignements sur l'âge du premier signe clinique, la provenance, l'arbre généalogique de la famille en notant la consanguinité et des cas familiaux similaires, les manifestations cliniques, ainsi que le dosage de CPK, le résultat de l'EMG et de la biopsie musculaire (**Annexe2**).

3. Méthodes

3.1. Analyse génétique

Afin de mettre en évidence les mutations du gène *DMD* chez ces patients, nous avons exploré dans un 1er temps les délétions d'exons au niveau des points chauds connus dans le gène *DMD* par PCR multiplex chez les patients recrutés durant la période du PFE du Master.

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

3.1.1. Prélèvement Sanguin

Les prélèvements de sang total pour l'analyse moléculaire du gène *DMD* ont été réalisés dans deux tubes EDTA (Ethylen Diamin tetra acetic Acid) de (4 ml), comme anticoagulant qui de plus est un inhibiteur de l'action des enzymes DNase ou nucléase.

3.1.2. 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 technique d'extraction d'ADN utilisée dans cette étude est la technique phénol-chloroforme. Car elle est la mieux adaptée aux cellules eucaryotes et permet l'obtention d'ADN de quantité suffisante et de bon qualité, conservable pour une longue durée à -20°C.

Le principe de l'extraction par phénol-chloroforme repose sur la solubilité différentielle des molécules dans une émulsion à deux phases, une phase aqueuse et une phase organique, non miscible (méthode de séparation liquide-liquide). Elle permet d'éliminer les protéines et d'isoler les acides nucléiques [147]. L'ADN se trouvant dans la phase aqueuse supérieure va être précipité avec de l'éthanol absolu, puis resuspendu dans un tampon de resuspension(**Annexe3**).

3.1.3. Contrôle quantitatif et qualitatif de l'ADN extrait

3.1.3.1. Contrôle quantitatif de l'ADN extrait

La quantification de l'ADN est effectuée en déposant 1-2µl de l'ADN extrait au Nanodrop (NanoDrop spectrophotometry) qui mesure la concentration de l'ADN et détermine sa pureté.

Cet appareil repose sur le principe de la spectrométrie. Il utilise l'absorbance de la lumière ultra-violette à travers un liquide (tampon TE 10 :1 mM) pour déterminer la concentration d'une substance particulière (ADN) dans ce liquide. Les molécules absorbent différentes longueurs d'onde de la lumière à des degrés divers et la plupart ont une longueur d'onde spécifique qu'elles absorbent au maximum. En mesurant l'absorbance d'un liquide, on peut estimer avec précision la concentration d'une substance dans ce liquide.

L'absorbance maximale des acides nucléiques (ADN et ARN) est à 260 nm, les rapports 260/280 (acide nucléique/protéine) et 260/230 (acide nucléique / impuretés) sont généralement utilisés comme indicateurs de la pureté des échantillons d'ADN[148].

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

Si le rapport DO260/DO280 > 2 => l'ADN est contaminé par les ARN.

Si le rapport DO260/DO280 < 1,6 => l'ADN est contaminé par les protéines.

Si le rapport DO260/DO230 < 1,8 => l'ADN est contaminé par des composés organiques ou des agents chaotropiques.

3.1.3.2. Contrôle qualitatif de l'ADN extrait

L'intégrité de l'ADN est appréciée par une électrophorèse sur un gel d'agarose. Cette technique permet la séparation des fragments d'ADN par taille dans un support solide, tel qu'un gel d'agarose en appliquant un courant électrique qui provoque la migration de l'ADN chargé négativement vers l'extrémité positive. La vitesse de migration est proportionnelle à la taille : les petits fragments se déplacent plus rapidement et se retrouvent au fond du gel.

Le gel d'agarose à **0,8 %** est préparé par un mélange de 0.2 g d'agarose avec 25 ml de TAE [X1], 1µl de le bromure d'éthidium (BET) est ajouté au mélange fondu par chauffage, ensuite le gel fondu est versé dans le support du gel dans lequel les peignes appropriés sont placés.

Après la polymérisation du gel à température ambiante, les échantillons contenant 5 µl de tampon de charge mélangé avec 1µl d'échantillon d'ADN extrait sont déposés dans les puits.

L'ensemble est soumis à un champ électrique (100 volts pendant 15 min) permettant la migration d'ADN de la cathode vers l'anode, les résultats sont ensuite visualisés sous UV et traités par un logiciel photoLab. La quantité d'ADN est estimée en fonction de l'intensité de la bande, plus la quantité est grande plus le BET intercale à l'intérieur de la séquence et plus l'intensité est grande. La présence d'une trainée de petites bandes (smear) reflète une mauvaise qualité de l'ADN.

Les échantillons d'ADN purs sont conservés après contrôle à -20°C jusqu'à leur utilisation.

3.1.4. Amplification génique

3.1.4.1. Principe

L'amplification génique a été réalisée par la technique appelée Réaction de polymérisation en Chaîne ou Polymerase Chain Reaction (PCR). La PCR est une technique basée sur la réplication enzymatique de l'ADN dont une enzyme thermostable (Taq polymérase) assure l'amplification du fragment d'intérêt par l'élongation de l'amorce complémentaire à ce fragment. Cette méthode peut générer des dizaines de milliards de copies du fragment d'ADN d'intérêt.

3.1.4.2. PCR simplex Vs multiplex

La PCR multiplex fait référence à l'amplification simultanée de plusieurs régions d'un gène ou plusieurs gènes, à partir de plusieurs paires d'amorces spécifiques, introduites dans un même mixte. C'est l'option préférable, en raison du gain de temps et de rentabilité.

Cependant, elle présente un risque de générer des amplicons inexacts par interaction amorce-amorce ou par hybridation incorrecte entre amorce-matrice.

La PCR simplex permet l'amplification d'une seule région d'un gène à partir d'une seule paire d'amorce, en l'occurrence elle donne le même résultat de la PCR multiplex pour un seul exon. De ce fait, elle est utilisée pour confirmer les résultats obtenus par la PCR multiplexe. En outre, elle ne présente pas de risque de compétition des amorces, mais elle est moins économiste que la PCR multiplex.

3.1.4.3. Protocole

Pour ce faire, un mélange réactionnel, adapter au kit PCR multiplex (QIAGEN® Multiplex PCR Kit), a été utilisé selon les 3 mélanges d'amorces suivants (**Annexe 4**) (Tableau IV) :

Tableau IV : Représentation des amorces DMD utilisées dans les réactions PCR (Chamberlain, Beggs et Kunkel).

Set 1	Set 2	Set 3
DM45 (F/R)	DM1 (F/R)	DM49 (F/R)
DM48 (F/R)	DM3 (F/R)	DM16 (F/R)
DM19 (F/R)	DM43 (F/R)	DM41 (F/R)
DM17 (F/R)	DM50 (F/R)	DM32 (F/R)
DM51 (F/R)	DM13 (F/R)	DM42 (F/R)
DM8 (F/R)	DM6 (F/R)	DM34 (F/R)
DM12 (F/R)	DM47 (F/R)	
DM44 (F/R)	DM60 (F/R)	
DM4 (F/R)	DM52 (F/R)	
DM46 (F/R)		

Le mélange réactionnel contient 5 µl d'ADN [20 ng/µ], 12,5 µl du Master Mix (mélange du tampon de la PCR, des d'NTP, MgCl₂ et de Taq DNA polymérase) [X1], 5 µl (0,25 µl de chaque amorce) du Mix d'amorces [20Mm] pour le set1, 4,5µl pour le set 2 et 3µl pour le set 3, RNase-Free Water pour compléter le volume final à 25 µl.

Les tubes PCR sont mis dans le thermocycleur selon les programmes suivant (Tableau V et VI) :

Tableau V: Conditions d'amplification du gène *DMD* pour le Set 1 et 2.

Étape	Température (°C)	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	95°	10min	1Cycle
Dénaturation	95°	30s	35 Cycles
Hybridation	55°	45s	
Élongation	72°	1min	
Élongation finale	72°	15min	1Cycle

Tableau VI: Conditions d'amplification du gène *DMD* pour le Set 3.

Étape	Température (°C)	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	95°	10min	1Cycle
Dénaturation	95°	30s	35 Cycles
Hybridation	63°	30s	
Élongation	72°	1min	
Élongation finale	72°	15min	1Cycle

Après amplification, les produits PCR ont été contrôlés sur gel d'agarose à 3%.

3.2. Analyses bioinformatiques

À partir de la séquence génomique du gène *DMD* présente dans la banque de données NCBI, sous l'identifiant NM_004006.2. Nous avons estimé le profil pathogène phénotypique des patients présentant des éventuelles délétions, à l'aide du vérificateur du cadre de lecture du gène *DMD* disponible dans la base de données <http://www.dmd.nl/> et <http://www.lovd.Nl/3.0/home>.

RESULTATS

1. Résultats cliniques et épidémiologiques

1.1. Provenance

Les patients inclus dans cette étude sont originaires de la région de l'Orientale, principalement d'Oujda (31,4%) et de Berkane (14.3%) (Figure 15).

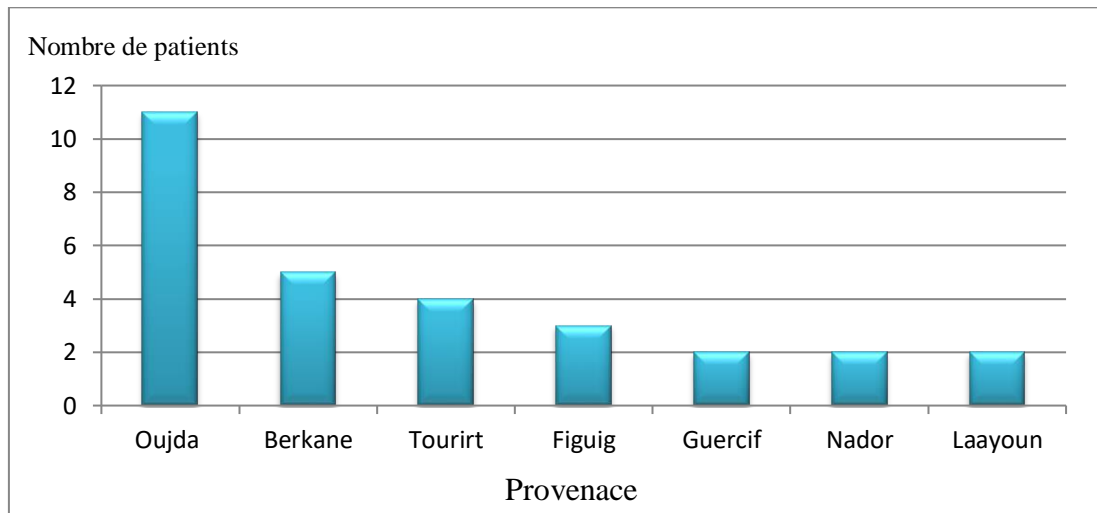


Figure 15 : Répartition des familles selon leur provenance.

1.2. Sexe

Concernant le sexe, les hommes sont plus touchés par cette maladie que les femmes avec un sex-ratio H/F de 16 ,5 (Figure 16).

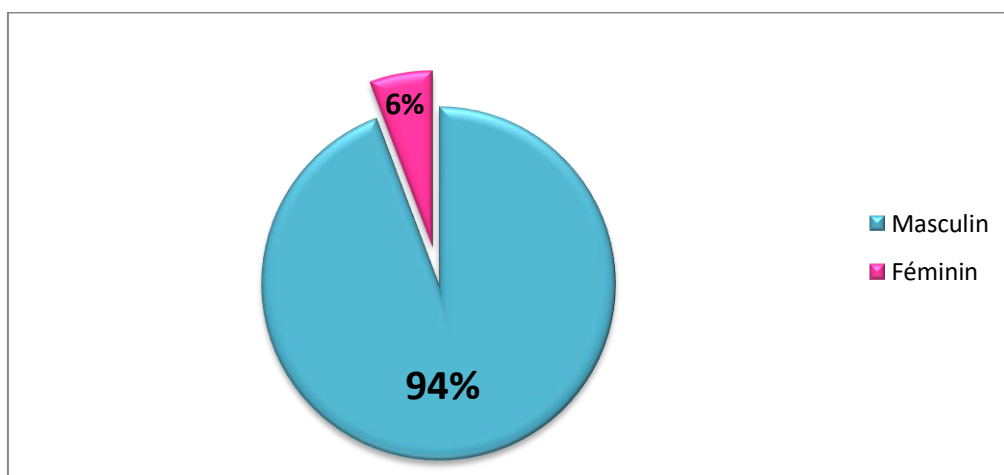


Figure 16: Répartitions des patients selon leur sexe.

1.3. Consanguinité

En ce qui concerne la consanguinité, l'information était indisponible pour 5 patients alors que 13 patients sur 30 étaient issus d'un mariage consanguin, soit 43%. Parmi les patients porteurs d'une délétion du gène *DMD*, 3/11 étaient issus d'un mariage consanguin, soit 27,27% (Figure 17).

Des cas similaires familiaux sont retrouvés chez 7 patients sur 29, soit 24% des cas. Ce nombre diminue à 2/11, soit 18,18% chez les patients qui ont une délétion du gène *DMD* (Figure 18).

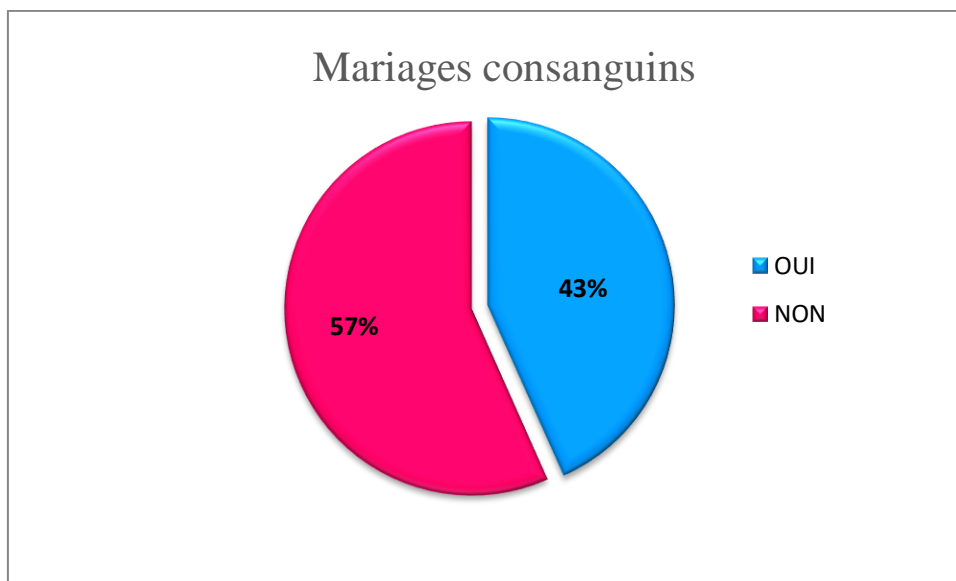


Figure 17 : Taux de patients issus de mariages consanguins.

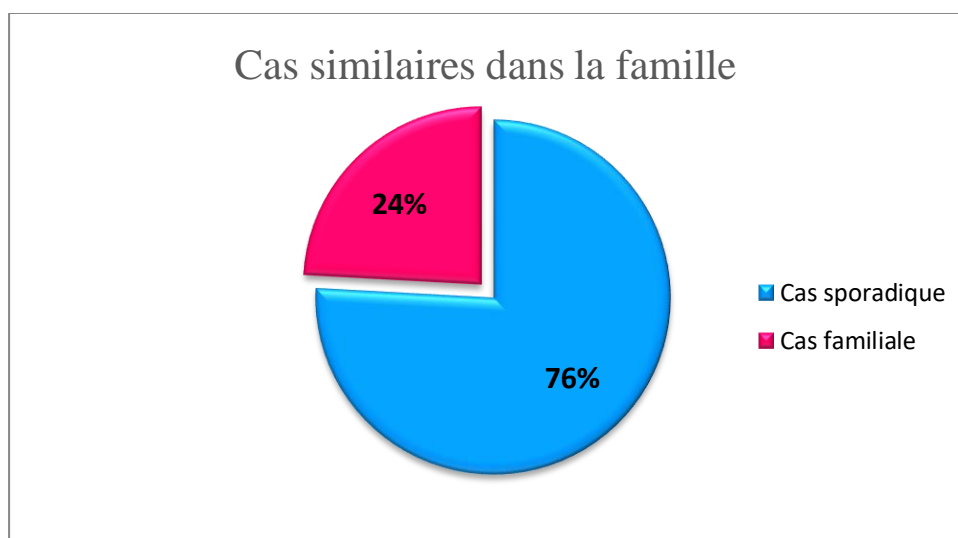


Figure 18: Répartition des familles selon le caractère familial ou sporadique.

1.4. Age du premier signe clinique et du diagnostic

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 cohorte les premiers signes cliniques sont apparus à l'âge moyen de 4 ans et 2 mois (Figure 19 et 20).

Quant à l'âge du diagnostic, il était compris entre 2 et 20 ans, avec un âge moyen de 8 ans et 8 mois. L'âge au diagnostic est inconnu pour 2.8% des patients, soit 1/35 (Figure 19 et 21).

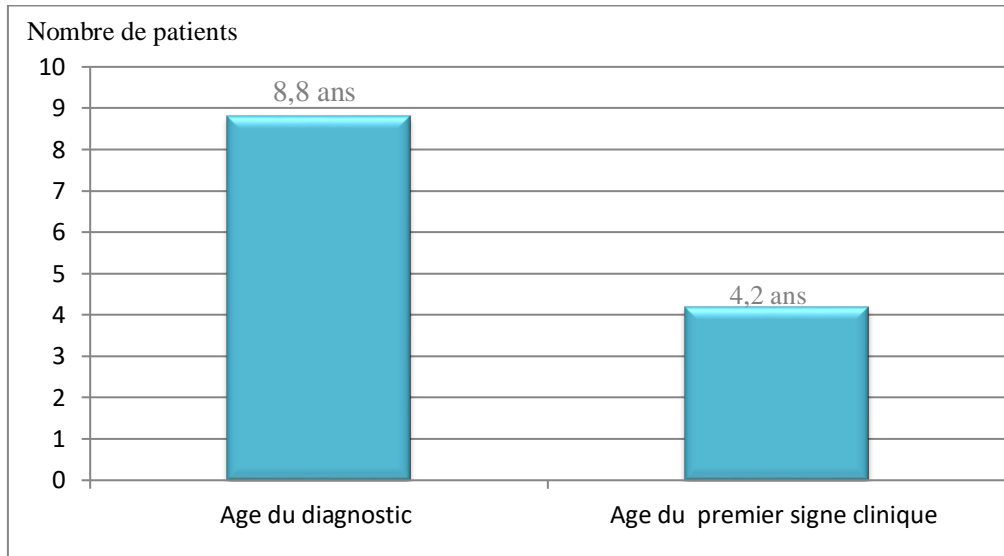


Figure 19: Age moyen des patients au moment d'apparition des symptômes et au moment du diagnostic.

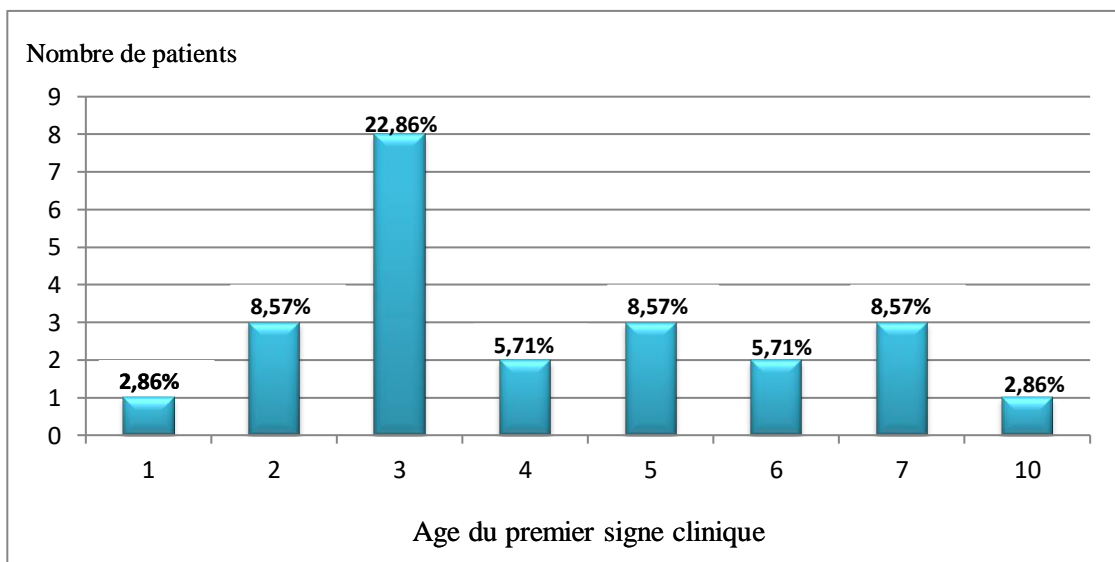


Figure 20 : Répartition des patients selon l'âge d'apparition des symptômes.

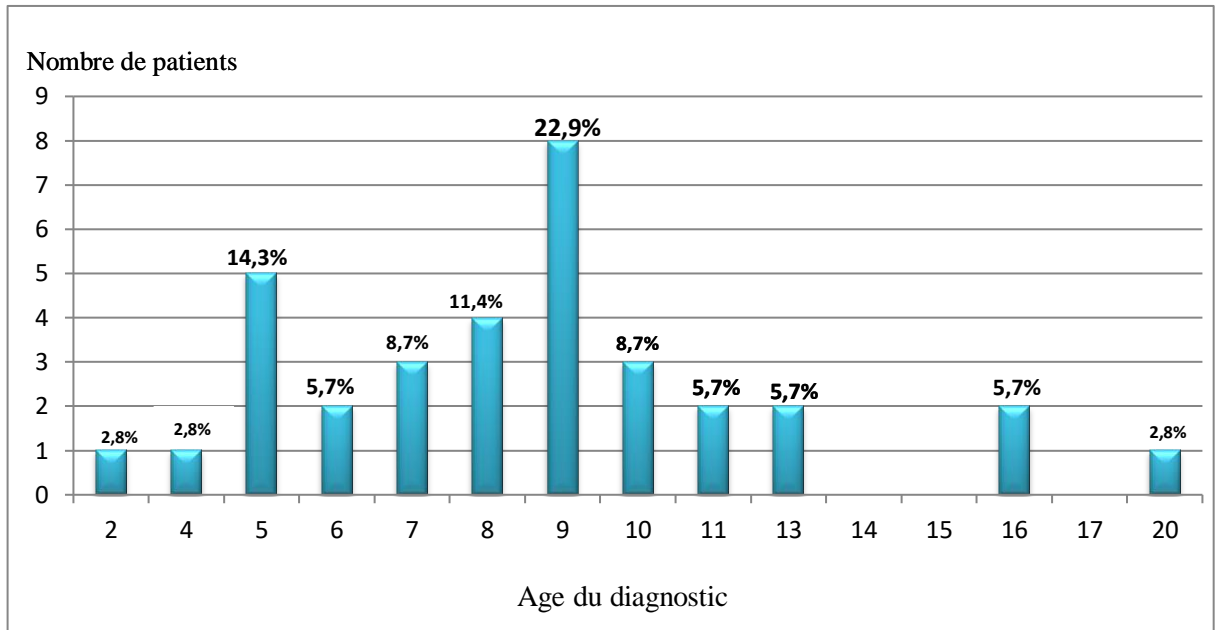


Figure 21 : Répartition des patients selon l'âge du diagnostic.

1.5. Manifestations cliniques

La majorité des patients sont caractérisés par une faiblesse musculaire, 14 d'entre eux sont reconnues avec une hypertrophie des mollets, 9 avec des difficultés de marcher/ monté des escaliers et 4 ont une scoliose (Figure 22).

En plus, il existe un retard d'acquisition de la marche (après l'âge de 18 mois) chez 9 (25,7%) de patients et un retard d'acquisition du langage signalé chez un seul (2,9%) des enfants (Figure 23).

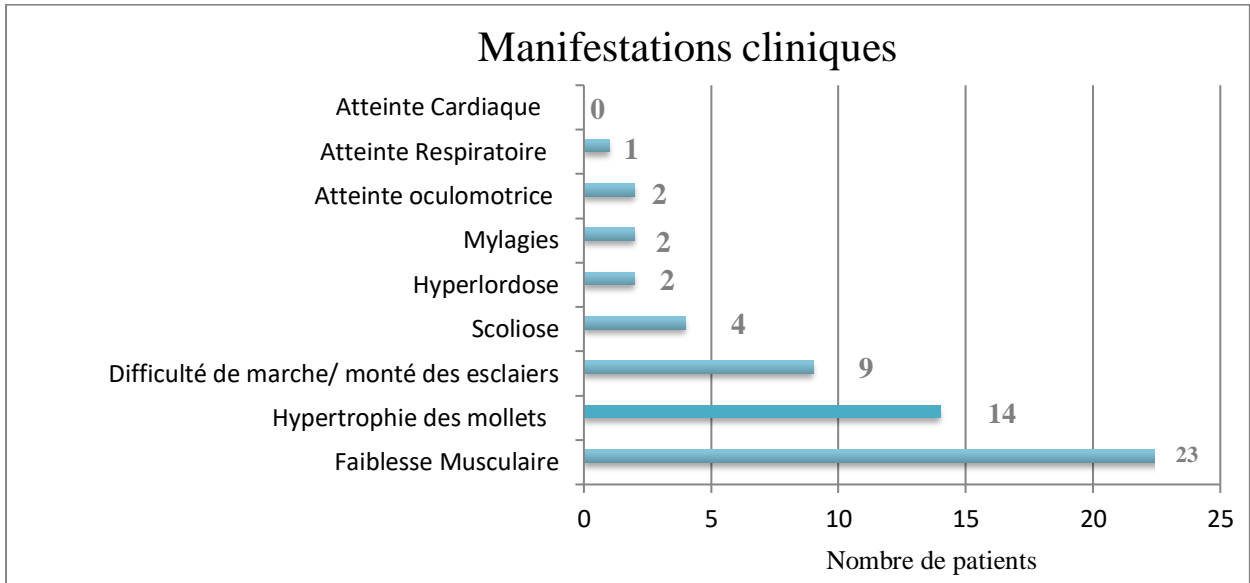


Figure 22 : Répartition des patients selon les manifestations cliniques.

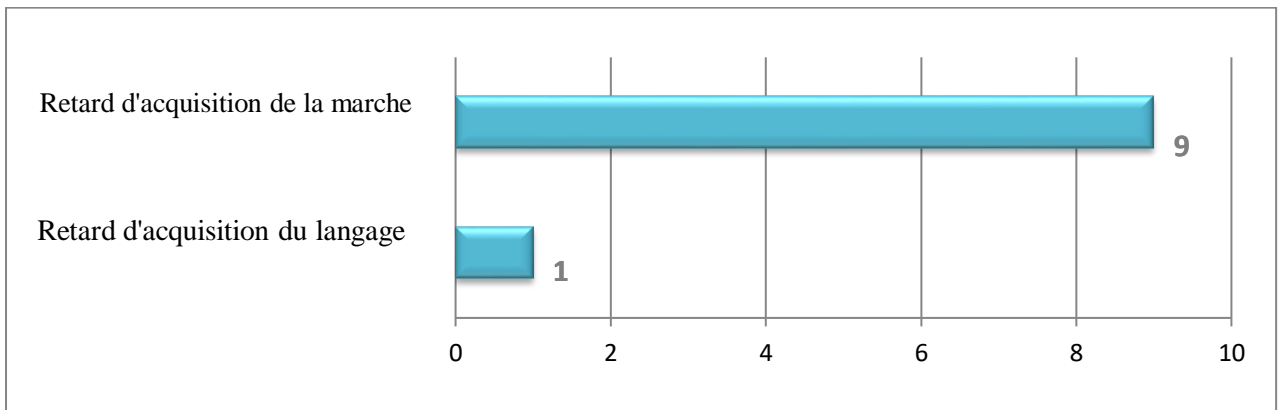


Figure 23 : Répartition des patients selon le développement psychomoteur.

2. Résultats des examens complémentaires

Les taux de CPK ont été mesurés chez 18 sur les 35 patients dans notre cohorte, soit 51,4%. Parmi eux, 17/18 avaient un taux de CPK élevé, soit 94%, et 1/18 avaient un taux de CPK normal (6%) (Figure 24).



Figure 24 : Taux de CPK sériques.

L'électromyogramme a été réalisé chez 18 sur les 35 patients dans notre cohorte, soit 51,4 %. Parmi eux, 17/18 (94%), avaient un électromyogramme myogène et 1/18, (6%), avaient un électromyogramme normal (Figure 25).

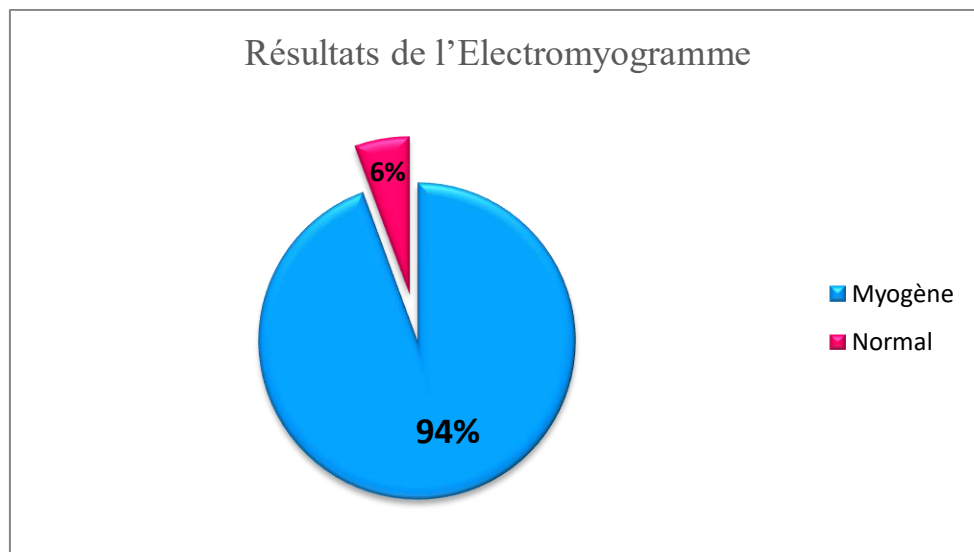


Figure 25 : Résultats de l'Electromyogramme.

La biopsie musculaire a été réalisée seulement chez 2 patients dont un a eu une biopsie normale et l'autre présente une myopathie (Figure 26).

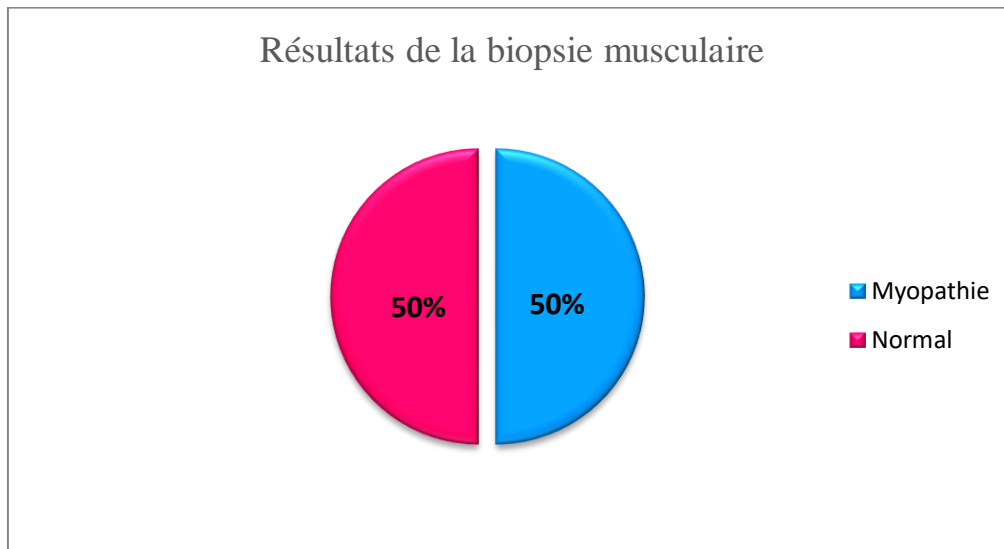


Figure 26 : Résultats de la biopsie musculaire.

3. Résultats de l'analyse moléculaire

Les résultats de PCR multiplex ont été interprétés à partir des photos de gel d'agarose sous UV affichant les exons amplifiés sous forme de bandes alignées verticalement (Figure 27 et 28). Dans le cas où une délétion se présente, cela est traduit par une absence de bande. A noter que toutes éventuelles délétions doivent être impérativement confirmées par PCR simple, visant l'amplification d'un seul exon (Figure 29).

Parmi les 35 patients testés par PCR multiplex, 11 étaient porteurs d'une délétion au sein du gène *DMD* soit 31% et 24 patients n'ont pas de délétion au niveau de ce gène, soit 69% (Figure 30).

Les résultats de PCR multiplex par le Set 3 montrent que seulement les patients ayant des délétions avec les Set 1 et 2 présentent des délétions avec le Set 3 (Figure 31).

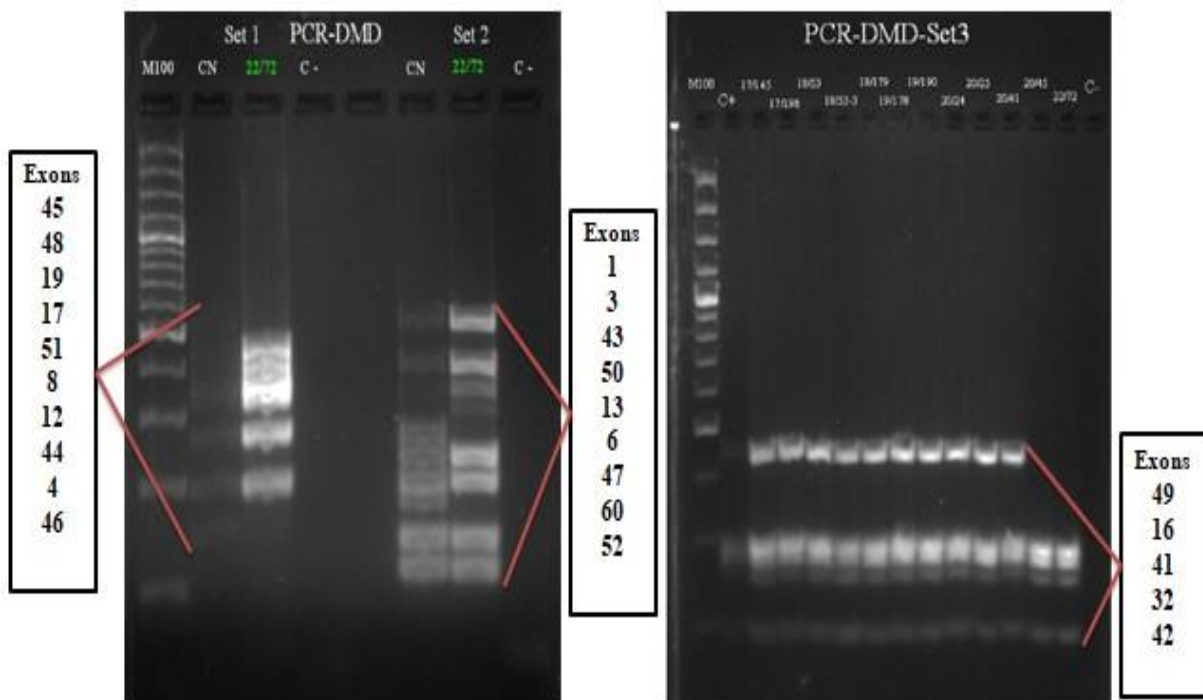


Figure 27: Exemples de résultat des PCR multiplexes pour le Set 1,2 et 3 par électrophorèse sur gel d'agarose (3%).

M100 : marqueur de taille, **CN** : Contrôle Normal, **C-** : Contrôle Négatif,
 Les chiffres sous forme **n/n** représentent les patients.

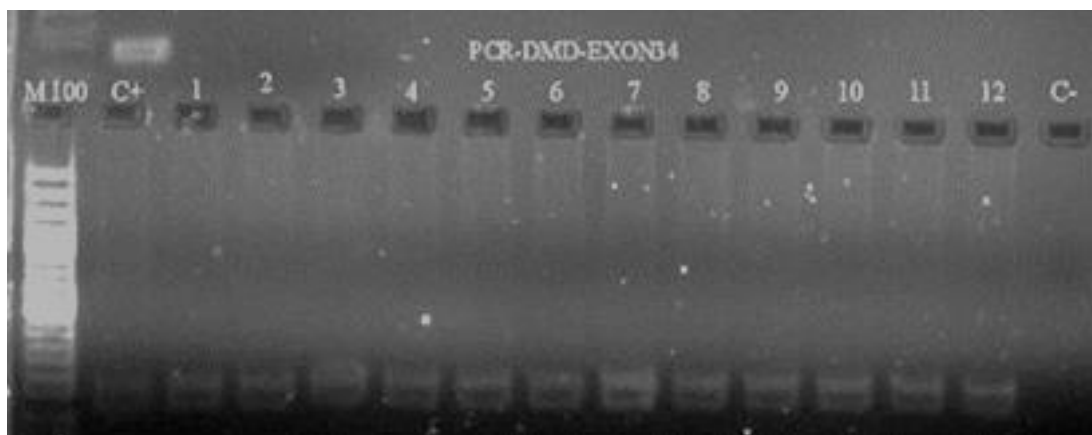


Figure 28 : Exemple de résultat de PCR simplexe pour l'exon 34 par électrophorèse sur gel d'agarose (2%).

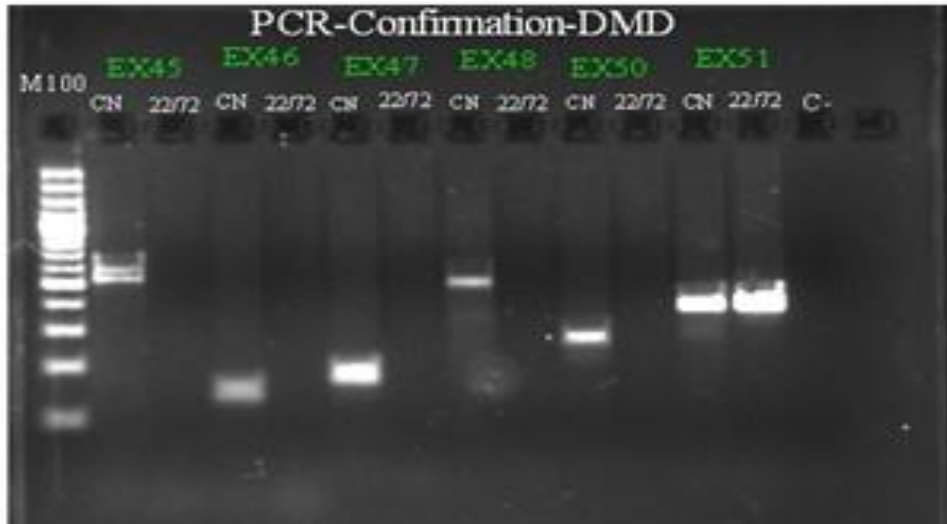


Figure 29: Exemple de résultat de PCR simplexe pour les exons 45,46, 47, 48, 50 et 51 par électrophorèse sur gel d'agarose (2%).

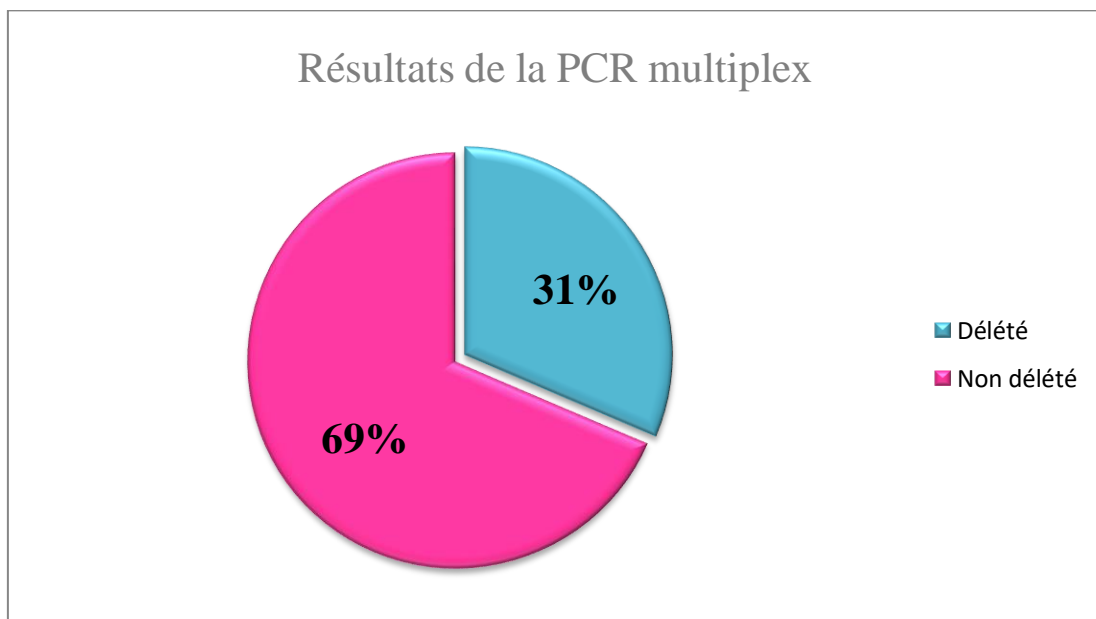


Figure 30: Résultats de la PCR multiplex.

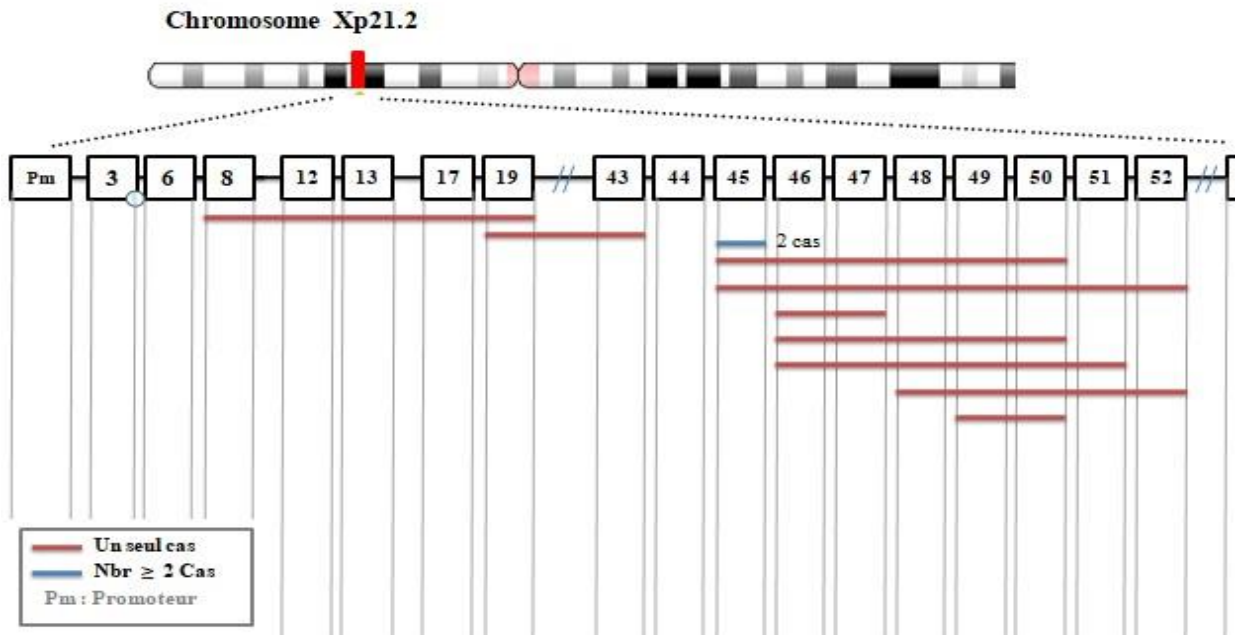


Figure 31: Différentes combinaisons de délétions du gène *DMD* retrouvées à la PCR multiplex: Modèles de délétions d'exons dans le gène *DMD* détectés par PCR multiplex. Les barres représentent l'emplacement des exons supprimés. L'axe horizontal montre le nombre d'exons. Le nombre à la fin de chaque barre représente le nombre de cas avec une suppression identique.

3.1. Analyse de la fréquence des exons délétés identifié dans le gène *DMD* :

Nous avons réalisé une analyse plus détaillée en déterminant la fréquence des exons délétés de façon individuelle. Nous avons obtenu une délétion majoritaire des exons 49 et 50 représentant une fréquence de 12,5% suivi des exons 46,47 et 48 avec une fréquence de 10,42%, puis l'exon 45 avec une fréquence de 8,3%, l'exon 51 avec une fréquence de 6,25% et les exons 52 et 19 avec une fréquence de 4,2%. Pour les autres (Exon 8,12, 13, 16, 17, 32, 34, 41, 42 et 43) sont de fréquence de 2,8% (Figure 32).

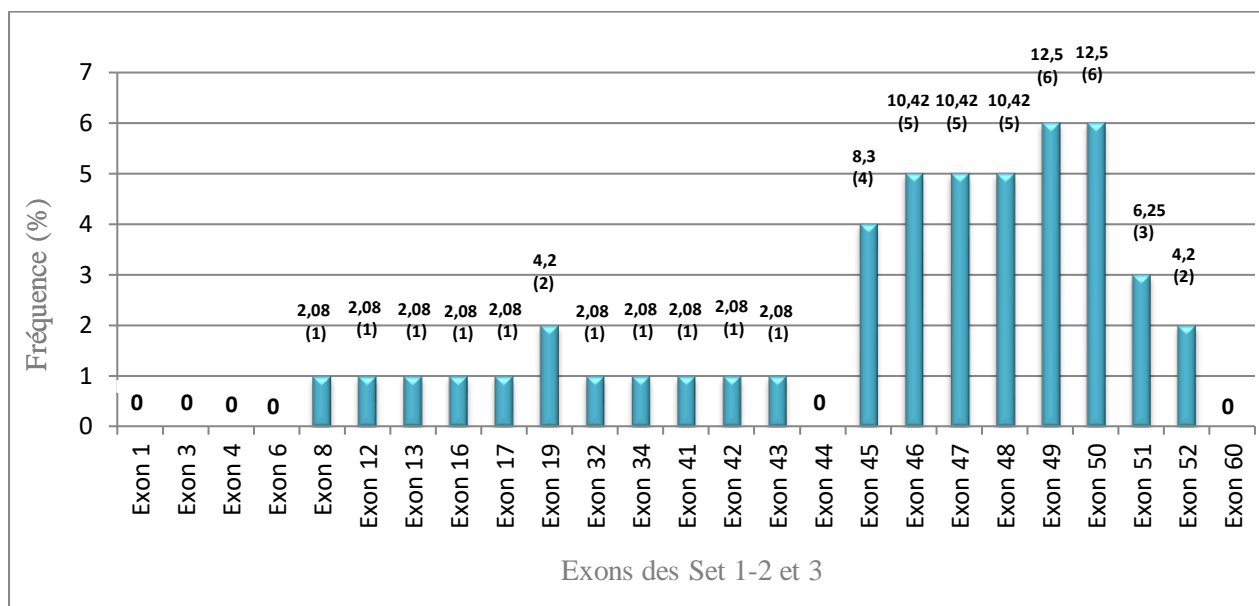


Figure 32: Fréquence des exons délétés chez les patients DMD.

3.2. Analyse moléculaire de l'étendu des délétions du gène *DMD* :

Nous avons déterminé la taille des délétions du gène *DMD* obtenu par les Sets 1-2 et 3 tout en calculant leurs fréquences et en liant les résultats avec les phénotypes DMD/DMB (Tableau VII). Entre temps, nous avons identifié la région la plus fréquemment délétée en présentant les séquences sous forme de deux régions hotspots, à savoir la région 5' (Exons 2-20) et 3' (Exons 45-55) (Tableau VIII).

Comme résultats, l'étendu des délétions du gène *DMD* est très variable entre les patients, allant de l'absence de 1 à 24 exons. Concernant la localisation des délétions, la plupart des délétions se présentent dans la région 3' (85,72%), plus fréquemment dans la séquence 49-50 (42,86%) suivie de 48-51 (21,43 %), puis 48-52 (14,29 %). Fait intéressant, un seul patient présente une délétion étendue entre les deux régions hotspots, au niveau de la séquence 19-43 (Tableau VIII)

Tableau VII: Etendue des délétions caractérisées dans notre panel.

Taille de la délétion (nombre d'exons absents)	Nombre de Patients	Fréquence %	Phénotype	
1	2	18,18	x	DMB
2	2	18,18	DMB	DMD
3	0	0	-	-
4	2	18,18	DMD	DMD
5	2	18,18	DMD	DMD
6	0	0	-	-
7	1	9,09	x	-
8	0	0	-	-
9	0	0	-	-
10	0	0	-	-
11	1	9,09	DMD	-
24	1	9,09	X	-
Total	11	100%	-	-

X : phénotype non défini

Tableau VIII : Schéma de délétions identifiées sur deux régions hotspots.

Région hotspot 5'			Région hotspot 3'		
Délétions	Nombre de patient selon la récurrence	Fréquence %	Délétions	Nombre de patient selon la récurrence	Fréquence %
Pm	0	0	Del 45-52	1	7,14
Del 2-3	0	0	Del 48-51	3	21,43
Del 8-19	1	7,14	Del 48-52	2	14,29
Del 19-43	1	7,14	Del 49-50	6	42,86

3.3. Analyse de l'effet des délétions du gène *DMD*

Pour estimer le type de dystrophinopathie qu'atteignent les patients ayant des délétions du gène *DMD*, nous avons concouru à une analyse bioinformatique, permettant la détermination du phénotype selon l'effet des délétions sur le cadre de lecture. De plus, nous avons déterminé la composition des séquences protéiques suite aux délétions (Tableau IX). En résultat, nous avons obtenu un phénotype DMD chez 90,9% des cas par décalage du cadre de lecture. En revanche, un seul patient présente un phénotype DMB par respect du cadre de lecture (Tableau IX).

Concernant l'effet des délétions sur les séquences protéiques, tous les patients présentent une absence du domaine centrale emportant des répétitions spectrales et zone charnières variables.

Pour plus de détails sur le phénotype DMD/DMB, nous avons mis en relation la taille des délétions avec le phénotype observer (Tableau IX), en conséquence, nous avons remarqué que la corrélation est absente, car les deux phénotypes peuvent être concernés par le même étendu. Par ailleurs, la confrontation des données cliniques aux résultats moléculaires/bioinformatiques est délicate par manque des données cliniques chez la plupart de patients.

Tableau X : Présentation des différents effets des délétions sur le gène *DMD*.

Résultats PCR multiplex Set 1-2 et 3	Effet sur le cadre de lecture	Effet sur la protéine	Promoteurs d'Isoformes courts délétés	Phénotype
Del 8-19	RCL	ABD : Homologie de la calponine 2 (CH2) DC : charnière 1, Rep 1, Rep2, Rep3, charnière 2, Rep4	Aucun	BMD
Del 19-43	DCL	DC: Rep 4-10, Rep11-16(Liaison de l'actine - ABD2) = Interruption ABD2 et nNOS	DP260	DMD
Del 45	DCL	Dc : Rep 17 (Liaison de l'actine - ABD2)	Aucun	DMD
Del 45-50	DCL	Dc: Rep17 (Liaison de l'actine - ABD2), Rep18, Rep19, Charnière 3	Aucun	DMD
Del 45-52	DCL	Dc : Rep 17(Liaison de l'actine - ABD2), Rep 18, Rep 19, Charnière 3, Rep20	Aucun	DMD
Del 46-47	DCL	Dc : Rep 17(Liaison de l'actine - ABD2), Rep 18	Aucun	DMD
Del 46-50	DCL	Dc : Rep 17(Liaison de l'actine - ABD2), Rep 18, Rep 19, Charnière 3	Aucun	DMD
Del 46-51	DCL	DC : Rep17 (Liaison de l'actine - ABD2), Rep 18, Rep19, Charnière 3, Rp20	Aucun	DMD
Del 48-52	DCL	Dc : Rep18, REP19, Charnière 3, Rep20	Aucun	DMD
Del 49-50	DCL	Dc : Rep19, Charnière 3	Aucun	DMD

Légende :

DCL : décalage du cadre de lecture **RCL** : respect du cadre de lecture **DC** : domaine central

ZF : zone de flexibilité

Rep : répétition spectrale

DISCUSSION

Les patients faisant sujet de cette étude, sont tous des habitants de la région de l'Orientale, réparties en plusieurs secteurs (Oujda, Berkane, Taourirt, etc.). Ils sont majoritairement du sexe masculin (94%), cela est expliqué par le mode de transmission de *DMD* récessif lié à l'*X*.

Dans cette étude, 37 % des patients sont issus d'un mariage consanguin, ce qui montre que la consanguinité augmente le risque du développement des maladies génétique y compris les dystrophinopathies.

L'âge moyen du premier signe clinique est de 4 ans et 2 mois, l'éventail d'âge est étroit entre nos patients et les autres patients marocains (un âge moyen de 4 ans et de 4 mois) [90]. Dans une étude faisant le suivi de 275 patients atteints de myopathie de Duchenne de 1998 à 2014 en Inde, Singh RJ a rapporté que l'âge moyen d'apparition des symptômes était de 3.7 ± 1.9 ans, dont 41% avec un âge de début inférieur à 3 ans [34]. Il est possible d'expliquer ce retard par 2 points : soit par la nature hétérogène de notre série, constituée d'un mélange de patients atteints de Duchenne et de Becker soit par le manque d'informations chez les parents, qui remarquent tardivement les symptômes.

L'âge moyen du diagnostic est de 8 ans et 8 mois. Plus le diagnostic est précoce, plus sa chance de développer des formes sévères diminue et plus l'espérance de vie augmente. Les patients étudiés présentent une variabilité dans les symptômes, mais la majorité d'entre eux ont une faiblesse musculaire associée à une hypertrophie des mollets et à des difficultés de marcher/monter des escaliers avec un retard d'acquisition de la marche et la cadence des symptômes sont formels pour la suspicion d'une dystrophinopathie, plus précisément un phénotype *DMD/DMB*. Cependant, un complément des informations cliniques est nécessaire ainsi qu'un suivi pour l'exploration d'un phénotype de *DMB*.

La plupart des patients présentent un taux de CPK élevé avec un électromyogramme tracé myogène, ce qui nous confirme une présence de myopathie. Cependant, ces examens cliniques ne sont pas suffisants pour préciser plus spécifiquement le type de myopathie, d'où l'importance du diagnostic moléculaire.

Parmi les 35 patients analysés par PCR multiplex, 31% avaient une délétion d'un ou plusieurs exons du gène *DMD* parmi les 25 exons amplifiés. Ce taux de délétions est non comparable à celui d'autres cohortes analysées par MPCR dans différentes populations (Tableau X). Le taux faible de délétions dans notre série peut s'expliquer par de nombreux arguments, telle

que la méthode d'analyse génétique qui n'explore que les 25 exons considérés comme hotspots ou bien la différence dans les fréquences pourraient également être secondaire à la région géographique, à la race et à la taille de l'échantillon [149, 150].

En ce qui concerne la relation entre l'étendu des délétions du gène *DMD* et le phénotype DMD/DMB. Nous avons remarqué que la corrélation est absente, car les deux phénotypes peuvent être concernés par le même étendu, par exemple la délétion des deux exons (la délétion de l'exon 46 et 47 avec le phénotype DMB et de l'exon 49 et 50 avec le phénotype DMB).

Les régions hotspots 3' (exons 45-55) et 5' (exons 2-20) du gène *DMD* ont été historiquement identifiées par Koenig et ses collègues [151]. Dans notre étude, les délétions étaient plus fréquentes dans la région hotspot 3' (85,72%) que 5' (14,28%). Ce résultat est en accord avec une large gamme d'études de plusieurs pays appartenant à différents continents (Tableau X). En fait, les délétions sont plus fréquentes au niveau de la région 3', présentant des proportions variantes entre 44 à 85% (Tableau X). Par ailleurs, il est possible d'observer des délétions qui s'étalent entre les deux régions hotspots, comme c'est le cas de notre patient, présentant une délétion de l'exon 19 au 43. Également, les résultats obtenus montrent que les patients sont plus touchés par les petites délétions, cela est conforme avec les résultats obtenus chez autres populations (Tableau X). Cependant, certaines études présentent des cas des délétions emportant les deux régions à la fois, par exemple la Turquie (exon 5 à 44)[152], l'Inde (exon 3 à 43) [153] et le Maroc (exon 12 à 48) [121].

Dans cette étude, les délétions d'un seul exon représentaient 18,8% 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 [154-156]. Chez les patients de cette étude, l'exon 45 est l'exon le plus fréquemment délété, tandis que les exons 49, 50, 46, 47 et 48 étaient globalement les plus fréquemment affectés par les délétions. Le dépistage d'un panel égyptien a rapporté les mêmes résultats, identifiant la délétion de l'exon 45 comme la plus récurrente [95]. Dans une étude récente réalisée par Youssef EL Kadiri et al au Maroc, il a été montré que la délétion de l'exon 50 est la plus fréquente, suivie par la délétion de l'exon 48 [121].

Tableau XI : Panel d'étude présentant les délétions les plus fréquentes. [110, 146-153].

	Taux de délétion	Régions hotspots	Séquence les plus délétées
Inde (2021) (Manisha Goyal et al)	78,50%	3'	47-50
Cameroun (2020) (Edmond Wonkam-Tingang et al)	45,50%	3'	45-50
Maroc (2020) (Youssef EL Kadiri et al)	45,22%	3'	43 - 52.
Algérie (2020) (Hamadouche et al)	85.5%	3'	44-53
Indonésie (2019) (Kristy Iskandar et al)	44,10%	3'	43-52
Chine (2019) (Xiangdong Kong et al)	70,41 %	3'	44-52
Koweït (2018) (Fawziah Mohammed et al)	66,20%	3'	44-55
Arabie saoudite (2018) (Nasser A Elhawary et al)	46,3 %	3'	44-56
Espagne (2017) (I. Vieitez et al)	46,1 %	3'	44-55
Notre étude	31%	3'	46-50

Le gène de la dystrophine peut être soumis à une grande variété de mutations, mais les délétions sont généralement les plus fréquentes. Cependant, plusieurs études incitent qu'en cas d'absence des délétions dans le contexte des régions hotspots, il est inutile d'explorer d'autres régions délétées, mais plutôt de chercher la présence des autres types de mutations comme les duplications dont la fréquence est de 5-15% et les mutations ponctuelles avec une fréquence de 20-35% [11-13]. De plus, dans le cas où les analyses biologiques

(Immunohistochimie et western blot) confirment une altération de la dystrophine, il est pertinent de continuer l'étude moléculaire sur le gène *DMD*.

La théorie du cadre de lecture commence à bannir totalement l'idée que le phénotype clinique DMD/DMB est en corrélation avec la taille de la délétion/ duplication, elle suggère de manière argumentée que le phénotype clinique est plutôt lié aux effets de l'ajout/ perte de matériel génétique sur l'enchaînement ordonné de 3 bases nucléotidiques dans le contexte d'un cadre de lecture ouvert. Lorsque le cadre de lecture n'est pas respecté, la protéine est tronquée, aboutissant à un phénotype DMD. En revanche, si le cadre de lecture est respecté, la protéine est raccourcie et semi fonctionnelle, associée à un phénotype DMB. Par ailleurs, les mutations de types faux sens et non-sens n'obéissent pas à la loi du cadre de lecture dans le sens propre du terme, car elles provoquent des substitutions d'un ou plusieurs nucléotides susceptibles de provoquer la formation d'une protéine tronquée, selon la région où elles se déclarent [6, 14, 94-96].

Certaines régions du gène *DMD* sont rassemblées comme un puzzle. Le cadre de lecture dépend des séquences nucléotidiques qui se réunissent après une délétion. Pour plus d'explication, prenons comme exemple les délétions de nos patients : la délétion des exons 8 à 19 réunit les exons 7 et 20 qui sont compatibles pour respecter le cadre de lecture, aboutissant à un phénotype DMB. En revanche, la délétion de l'exon 45 à 52 aboutit à l'assemblage des exons 44 et 53 provoquant une perturbation du puzzle par incompatibilité, par conséquent un phénotype DMD.

Faisons des hypothèses sur les mécanismes physiopathologiques derrière les phénotypes pathogènes de nos patients, en élucidant l'effet des délétions sur le domaine NT, le domaine central et les isoformes courts de la dystrophine.

La perte du domaine ABD-1 est très souvent associée au phénotype sévère et un début précoce des symptômes par diminution du niveau de synthèse de la dystrophine et l'interruption du lien avec l'appareil contractile [12, 72, 165]. ABD-1 possède trois séquences de liaison à l'actine (ABS-1, ABS-2 et ABS-3). De la même manière que le domaine ABD-2 central, elles assurent toutes, une liaison avec les filaments d'actine pour protéger la cellule contre les lésions induites par les contractions. Une perte complète des domaines ABD interrompt potentiellement le lien entre appareil contractile et le sarcomère, ce qui rend la cellule plus vulnérable aux lésions. En revanche, la conservation d'un seul domaine ABD peut supporter le phénotype pathogène, cela peut expliquer en une partie, le phénotype DMB chez

notre patient qui porte la délétion des exons 8-19, conservant le domaine ABD2. Pour argumenter ce fait, une étude a généré une dystrophine tronquée en ABS2-3, ZF1 et les répétitions 1-18 en conséquence, la protéine était semi-fonctionnelle supportant le phénotype pathogène [165] (Figure 33).

Les délétions du gène *DMD* peuvent provoquer à la fois, une perte des domaines d'interaction protéique et l'expression des autres isoformes de la dystrophine, comme nous le remarquons chez le patient, portant la mutation 19-43, ayant perdu l'expression de la DP260 par la perte des exons 29 et 30 et ceci revient à la délétion du promoteur de cette dernière (DP260). Ces isoformes sont couramment appelés forme rétinienne par sa forte expression dans la couche plexiforme externe de l'œil, sa présence semble être nécessaire pour la fonction synaptique rétinienne. De ce fait, son altération peut être associée au strabisme qu'atteint le patient. Des études mettent en cause la perte d'expression de la DP260 aux rétinoigrammes anormaux chez des cas DMD [58, 166].

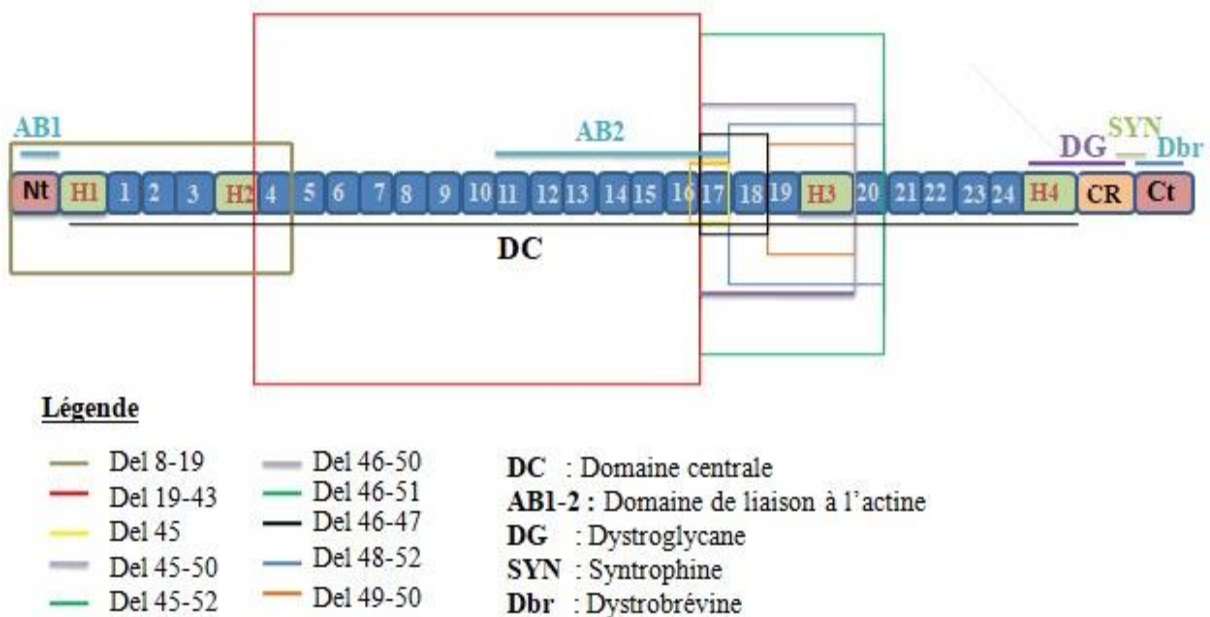


Figure 33: Représentation schématique des délétions des domaines de la dystrophine chez nos patients.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'exploration moléculaire des délétions du gène de la dystrophine via la PCR multiplex possède une grande importance dans la confirmation du *DMD*, la mise en place d'une prise en charge adaptée et en plus, il permet, dans l'immédiat une meilleure offre de conseil génétique pour les parents d'enfants malades.

Dans le cas des dystrophinopathie, nous confirmons la délétion d'un exon en réalisant impérativement une PCR simplex, en revanche, l'absence de délétions ne demande pas une réalisation de PCR simplex, mais reste relatif, car il faut toujours prendre en considération que les délétions peuvent concerner des exons non testés ou bien le gène est soumis à un autre type de mutations, notamment les duplications et les substitutions de nucléotides. Par ailleurs, les patients à profil non délété sont menés à suivre une analyse biologique par western blot ou immunohistochimie pour confirmer une altération de la dystrophine, afin d'explorer paisiblement les autres types de mutations du gène *DMD*. Dans le cas contraire, ces patients peuvent être concernés par d'autres types de dystrophie musculaire notamment la **LGMD2C**.

Par la suite de ce travail, nous envisagerons un certain nombre de perspectives :

- Elargir l'échantillonnage par le recrutement d'autres patients,
- La recherche d'autres mutations chez les patients négatifs pour les délétions.
- La mise en place des techniques génétiques dans le diagnostic des dystrophinopathies à savoir la MLPA et le NGS, surtout que la région de l'Orientale fait partie des provinces ayant des taux de consanguinité élevés et donc un risque élevé de maladies héréditaires récessives.

BIBLIOGRAPHIE

1. Monaco, A.P., et al., *Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene*. Nature, 1986. **323**(6089): p. 646-650.
2. Y.T. Le Guen, T.L.G., V. Laurent, F. d'Arbonneau, S. Braun and T. Montier, *Dystrophie musculaire de Duchenne : état actuel et perspectives thérapeutiques* *Dystrophie musculaire de Duchenne : état actuel et perspectives thérapeutiques*. 2021. **205**(15): p. 509-518.
3. Annexstad, E.J., et al., *Molecular and clinical characteristics of a national cohort of paediatric Duchenne muscular dystrophy patients in Norway*. Journal of Neuromuscular Diseases, 2019. **6**(3): p. 349-359.
4. Malhotra, S., et al., *Frame-shift deletions in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy*. Science, 1988. **242**(4879): p. 755-759.
5. Y, S., . *Les dystrophies musculaires progressives*. 2017: p. 31-71.
6. Koenig, M., A. Monaco, and L. Kunkel, *The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein*. Cell, 1988. **53**(2): p. 219-228.
7. Koenig, M., et al., *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): p. 509-517.
8. Gumerson, J.D. and D.E. Michele, *The dystrophin-glycoprotein complex in the prevention of muscle damage*. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2011. **2011**.
9. Gumerson, J.D., & Michele, D. E., *The dystrophin-glycoprotein complex in the prevention of muscle damage*. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2011.
10. Abdelhady, A., S. Abdelhady, and H. Rashed, *Patterns of Dystrophin Gene Deletion/Duplication in a Sample of Saudi Patients with Duchenne Muscular Dystrophy*. Biomedical Journals, 2019. **8**: p. 252.
11. Laing, N.G., et al., *Molecular diagnosis of duchenne muscular dystrophy: past, present and future in relation to implementing therapies*. The Clinical Biochemist Reviews, 2011. **32**(3): p. 129.
12. Muntoni, F., S. Torelli, and A. Ferlini, *Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes*. The Lancet Neurology, 2003. **2**(12): p. 731-740.
13. Aartsma-Rus, A., I.B. Ginjaar, and K. Bushby, *The importance of genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy*. Journal of medical genetics, 2016. **53**(3): p. 145-151.

14. Tuffery-Giraud, S., et al., *Genotype–phenotype analysis in 2,405 patients with a dystrophinopathy using the UMD–DMD database: a model of nationwide knowledgebase*. *Human mutation*, 2009. **30**(6): p. 934-945.
15. Wei, 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*. *European Journal of Human Genetics*, 2014. **22**(1): p. 110-118.
16. Bushby, K., et al., *Ataluren treatment of patients with nonsense mutation dystrophinopathy*. *Muscle & nerve*, 2014. **50**(4): p. 477-487.
17. Nichols, B.M., et al., *Multi-exon skipping using cocktail antisense oligonucleotides in the canine X-linked muscular dystrophy*. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 2016(111): p. e53776.
18. Emery, A.E. and M.L. Emery, *The history of a genetic disease: Duchenne muscular dystrophy or Meryon's disease*. 2011: Oxford University Press.
19. Engel, A., *Duchenne dystrophy in Myology: Basic and Clinical (Engel, AG and Banker, BQ, eds.) pp. 1185-1240*. 1986, McGraw-Hill, New York.
20. Kunkel, L.M., *Analysis of deletions in DNA from patients with Becker and Duchenne muscular dystrophy*. *Nature*, 1986. **322**(6074): p. 73-77.
21. SELOUANI, Y., *VINGT-SEPT ANS DE DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE DES DYSTROPHINOPATHIE PAR PCR MULTIPLEX AU MAROC-A PROPOS D'UNE SÉRIE DE 365 CAS*. 2020.
22. Nader Salari , B.F., Elahe Valipour ,Mohsen Kazeminia ,Reza Fatahian ,Aliakbar Kiaei ,Shamarina Shohaimi and Massoud Mohammadi, *Prévalence mondiale de la dystrophie musculaire de Duchenne et Becker : revue systématique et méta-analyse*. *Journal de chirurgie orthopédique et de recherche*, 2022.
23. Chevalier, E., *État des lieux de la dystrophie Facio-Scapulo-Humérale (FSHD) de l'adulte et de l'enfant*. 2021.
24. Cummings, P.E.e.B., 2016: p. recap-ide.
25. *Cours sur le Role du muscle strié et squelettique dans la conversion de l'Energie. chapitre 2 de programme science de la vie et de la terre*. 2020: p. bestcours.
26. *Myofibrille : définition, explications*. 02/12/2017: p. aquaportail.
27. Perrin, A., *Augmentation de l'expression de la chaine $\alpha 1$ de la laminine III, un potentiel traitement pour la Dystrophie musculaire de Duchenne*. 2016.
28. Deconinck, N. and B. Dan, *Pathophysiology of duchenne muscular dystrophy: current hypotheses*. *Pediatric neurology*, 2007. **36**(1): p. 1-7.

29. Urtizberea, J.A., *La recherche dans la dystrophie musculaire de Duchenne*.2009: p. 39.
30. Sinha, R., et al., *Duchenne muscular dystrophy: Case report and review*. Journal of family medicine and primary care, 2017. **6**(3): p. 654.
31. Darras BT, U.D., Ghosh PS, *Dystrophinopathies*. 2000(GeneReviews®).
32. Birnkrant, D.J., et al., *Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: respiratory, cardiac, bone health, and orthopaedic management*. The Lancet Neurology, 2018. **17**(4): p. 347-361.
33. Wein, N., L. Alfano, and K.M. Flanigan, *Genetics and emerging treatments for Duchenne and Becker muscular dystrophy*. Pediatric Clinics, 2015. **62**(3): p. 723-742.
34. McNally, E.M., *Cardiomyopathy in muscular dystrophy: when to treat?* JAMA cardiology, 2017. **2**(2): p. 199-199.
35. Finsterer, J., et al., *Muscular and cardiac manifestations in a Duchenne-carrier harboring a dystrophin deletion of exons 12-29*. Intractable & rare diseases research, 2018.
36. Latimer, R., et al., *Secondary conditions among males with Duchenne or Becker muscular dystrophy*. Journal of child neurology, 2017. **32**(7): p. 663-670.
37. Rae, M.G. and D. O'Malley, *Cognitive dysfunction in Duchenne muscular dystrophy: a possible role for neuromodulatory immune molecules*.Journal of neurophysiology, 2016. **116**(3): p. 1304-1315.
38. Sylvain BROCHARD, D.J.R., *MARCHE DMD :Prévention de la perte de la marche chez les enfants ayant une dégénérescence progressive de l'ensemble des muscles*. p. INNOVEO.
39. Hsu, D.T., *Cardiac manifestations of neuromuscular disorders in children*. Paediatric Respiratory Reviews, 2010. **11**(1): p. 35-38.
40. Bourke, J.P., T. Bueser, and R. Quinlivan, *Interventions for preventing and treating cardiac complications in Duchenne and Becker muscular dystrophy and X-linked dilated cardiomyopathy*. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2018(10).
41. Khirani, S., et al., *Respiratory muscle decline in Duchenne muscular dystrophy*. Pediatric pulmonology, 2014. **49**(5): p. 473-481.
42. Mayer, O., et al., *Characterization of pulmonary function in Duchenne muscular dystrophy*. Pediatric pulmonology, 2015. **50**(5): p. 487-494.
43. Dubowitz, V., *Mental retardation in Duchenne muscular dystrophy*.Pathogenesis of human muscular dystrophies, 1977: p. 64-82.

44. Desguerre, I., *Atteinte cognitive dans la dystrophie musculaire de Duchenne*. Médecine thérapeutique/Pédiatrie, 2014. **17**(3): p. 156-159.
45. Boulahia, I., et al., *Dépistage des troubles cognitifs et psycho-comportementaux de la dystrophie musculaire de Duchenne et corrélation phénotype/génotype*. Revue Neurologique, 2018. **174**: p. S43.
46. Archer, S.K., et al., *Dysphagia in Duchenne muscular dystrophy assessed by validated questionnaire*. International journal of language & communication disorders, 2013. **48**(2): p. 240-246.
47. Lisa Wahlgren , A.-K.K., Mar Tulinius et Kalliopi Sofou, *Un patient sur cinq atteint de dystrophie musculaire de Duchenne décède d'autres causes que l'insuffisance cardiaque ou respiratoire*. Journal européen d'épidémiologie 21 novembre 2021.
48. Yazaki, M., et al., *Clinical characteristics of aged Becker muscular dystrophy patients with onset after 30 years*. European neurology, 1999. **42**(3): p. 145-149.
49. Magot, A., S. Mercier, and Y. Péréon, *Specific features of Becker Muscular Dystrophy patients and female carriers of Duchenne Muscular Dystrophy*. Archives de Pédiatrie: Organe Officiel de la Société Française de Pédiatrie, 2015. **22**(12 Suppl 1): p. 12S31-6.
50. Benseghier, S., *Diagnostic moléculaire des dystrophinopathies (étude phénotypique et génotypique)*. 2006.
51. Leturcq, F. and S. Tuffery-Giraud, *Aspects génétiques et moléculaires des dystrophinopathies*, in *Archives de pédiatrie*. 2015. p. 12S3-12S11.
52. Flanigan, K.M., et al., *Mutational spectrum of DMD mutations in dystrophinopathy patients: application of modern diagnostic techniques to a large cohort*. Human mutation, 2009. **30**(12): p. 1657-1666.
53. Brown Jr, R.H. and E.P. Hoffman, *Molecular biology of Duchenne muscular dystrophy*. Trends in neurosciences, 1988. **11**(11): p. 480-484.
54. Lemaire, C., R. Heilig, and J. Mandel, *The chicken dystrophin cDNA: striking conservation of the C-terminal coding and 3' untranslated regions between man and chicken*. The EMBO journal, 1988. **7**(13): p. 4157-4162.
55. Marques, M.J., *Structural biology of the dystrophin-deficient muscle fiber*. Journal of Morphological Sciences, 2017. **21**(3): p. 0-0.
56. Sadoulet-Puccio, H.M., M. Rajala, and L.M. Kunkel, *Dystrobrevin and dystrophin: an interaction through coiled-coil motifs*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997. **94**(23): p. 12413-12418.

57. Ahn, A.H. and L.M. Kunkel, *The structural and functional diversity of dystrophin*. Nature genetics, 1993. **3**(4): p. 283-291.
58. Sadoulet-Puccio, H.M. and L.M. Kunkel, *Dystrophin and its isoforms*. Brain Pathology, 1996. **6**(1): p. 25-35.
59. Stromer, M., *The cytoskeleton in skeletal, cardiac and smooth muscle cells*. 1998.
60. Koenig, M. and L. Kunkel, *Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility*. Journal of Biological Chemistry, 1990. **265**(8): p. 4560-4566.
61. Rentschler, S., et al., *The WW domain of dystrophin requires EF-hands region to interact with β -dystroglycan*. 1999.
62. Ponting, C.P., et al., *ZZ and TAZ: new putative zinc fingers in dystrophin and other proteins*. Trends in biochemical sciences, 1996. **21**(1): p. 11-13.
63. Blake, D.J., et al., *β -Dystrobrevin, a member of the dystrophin-related protein family*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998. **95**(1): p. 241-246.
64. Towbin, J.A., *The role of cytoskeletal proteins in cardiomyopathies*. Current opinion in cell biology, 1998. **10**(1): p. 131-139.
65. Hance, J.E., et al., *α -Actinin-2 is a new component of the dystrophin–glycoprotein complex*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1999. **365**(2): p. 216-222.
66. Olivé, M., et al., *Apoptosis is not the mechanism of cell death of muscle fibers in human muscular dystrophies and inflammatory myopathies*. Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine, 1997. **20**(10): p. 1328-1330.
67. Culligan, K.G., et al., *Role of dystrophin isoforms and associated proteins in muscular dystrophy*. International journal of molecular medicine, 1998. **2**(6): p. 639-687.
68. Lionarons, J.M., et al., *Dystrophin is expressed in smooth muscle and afferent nerve fibers in the rat urinary bladder*. Muscle & nerve, 2019. **60**(2): p. 202-210.
69. Amann, K.J., A.W.-X. Guo, and J.M. Ervasti, *Utrophin lacks the rod domain actin binding activity of dystrophin*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(50): p. 35375-35380.
70. Blake, D.J., et al., *Different dystrophin-like complexes are expressed in neurons and glia*. The Journal of cell biology, 1999. **147**(3): p. 645-658.
71. Abdullah, M., et al., *Tyrosine phosphorylation as a regulator of dystrophin and beta-dystroglycan interaction: A molecular insight*. Journal of Molecular Graphics and Modelling, 2020. **99**: p. 107623.

72. Gao, Q. and E.M. McNally, *The Dystrophin Complex: structure, function and implications for therapy*. Comprehensive Physiology, 2015. **5**(3): p. 1223.
73. Le, S., et al., *Dystrophin as a molecular shock absorber*. ACS nano, 2018. **12**(12): p. 12140-12148.
74. Srivastava, D. and S. Yu, *Stretching to meet needs: integrin-linked kinase and the cardiac pump*. Genes & development, 2006. **20**(17): p. 2327-2331.
75. Constantin, B., *Dystrophin complex functions as a scaffold for signalling proteins*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2014. **1838**(2): p. 635-642.
76. Ibraghimov-Beskrovnaya, O., et al., *Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix*. Nature, 1992. **355**(6362): p. 696-702.
77. Spence, H.J., et al., *Dystroglycan, a scaffold for the ERK–MAP kinase cascade*. EMBO reports, 2004. **5**(5): p. 484-489.
78. Ibraghimov-Beskrovnaya, O., et al., *Human dystroglycan: skeletal muscle cDNA, genomic structure, origin of tissue specific isoforms and chromosomal localization*. Human molecular genetics, 1993. **2**(10): p. 1651-1657.
79. Groh, S., et al., *Sarcoglycan complex: implications for metabolic defects in muscular dystrophies*. Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(29): p. 19178-19182.
80. McNally, E.M., *The sarcoglycans*, in *Madame Curie Bioscience Database [Internet]*. 2013, Landes Bioscience.
81. Ceccarini, M., et al., *Association of dystrobrevin and regulatory subunit of protein kinase A: a new role for dystrobrevin as a scaffold for signaling proteins*. Journal of molecular biology, 2007. **371**(5): p. 1174-1187.
82. Lyssand, J.S., et al., *Syntrophin isoforms play specific functional roles in the α 1D-adrenergic receptor/DAPC signalosome*. Biochemical and biophysical research communications, 2011. **412**(4): p. 596-601.
83. Bhat, S.S., R. Ali, and F.A. Khanday, *Syntrophins entangled in cytoskeletal meshwork: Helping to hold it all together*. Cell Proliferation, 2019. **52**(2): p. e12562.
84. Persson, M., et al., *Endogenous nitric oxide as a modulator of rabbit skeletal muscle microcirculation in vivo*. British journal of pharmacology, 1990. **100**(3): p. 463-466.
85. Brenman, J.E., et al., *Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy*. Cell, 1995. **82**(5): p. 743-752.
86. F, N., *La dystrophie musculaire du chien Golden Retriever (GRMD): Etude*

histologique de la forme néonatale fulminante et contribution à l'étude de pathogénie des

lesions. 2001, Ecole Nationale Vétérinaire de

Nantes.

87. de Recondo, J. and A.-M. de Recondo, *Pathologie du muscle strié: de la biologie cellulaire à la thérapie.* 2001: Flammarion Médecine-Sciences.
88. De La Porte, S., S. Morin, and J. Koenig, *Characteristics of skeletal muscle in mdx mutant mice.* International review of cytology, 1999. **191**: p. 99-148.
89. Matsuo, M., *Duchenne/Becker muscular dystrophy: from molecular diagnosis to gene therapy.* Brain and Development, 1996. **18**(3): p. 167-172.
90. Sbiti, A., F. El Kerch, and A. Sefiani, *Analysis of dystrophin gene deletions by multiplex PCR in Moroccan patients.* Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2002. **2**(3): p. 158-160.
91. Chamberlain, J.S., et al., *Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification.* Nucleic acids research, 1988. **16**(23): p. 11141-11156.
92. Gilgenkrantz, H., *Pathologie moléculaire des myopathies de duchenne et de becker: contribution à l'étude des deletions.* 1990, Lyon 1.
93. Monaco, A.P., et al., *An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus.* Genomics, 1988. **2**(1): p. 90-95.
94. Hassan, M.J., et al., *Intragenic deletions in the dystrophin gene in 211 Pakistani Duchenne muscular dystrophy patients.* Pediatrics International, 2008. **50**(2): p. 162-166.
95. Elhawary Nasser, A., R.M. Shawky, and N. Hashem, *Frame shift deletion mechanisms in Egyptian Duchenne and Becker muscular dystrophy families.* Mol Cells, 2004. **18**: p. 141-9.
96. Aartsma-Rus, A., et al., *Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule.* Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine, 2006. **34**(2): p. 135-144.
97. Kesari, A., et al., *Integrated DNA, cDNA, and protein studies in Becker muscular dystrophy show high exception to the reading frame rule.* Human mutation, 2008. **29**(5): p. 728-737.

98. Beggs, A.H., et al., *Exploring the molecular basis for variability among patients with Becker muscular dystrophy: dystrophin gene and protein studies*. American journal of human genetics, 1991. **49**(1): p. 54.
99. Taylor, P.J., et al., *Measurement of the clinical utility of a combined mutation detection protocol in carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy*. Journal of medical genetics, 2007. **44**(6): p. 368-372.
100. Taylor, P.J., *Molecular genetic analysis of a New South Wales muscular dystrophy cohort*. 2008, UNSW Sydney.
101. Deburgrave, N., 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 mutation, 2007. **28**(2): p. 183-195.
102. Gurvich, O.L., et al., *DMD pseudoexon mutations: splicing efficiency, phenotype, and potential therapy*. Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society, 2008. **63**(1): p. 81-89.
103. Fernandez, C., et al., *Dystrophies musculaires liées au gène DMD: myopathie de Duchenne, myopathie de Becker, formes féminine et atypiques*. EMC-Neurologie, 2010: p. 1-15.
104. Desguerre, I., et al., *Clinical heterogeneity of duchenne muscular dystrophy (DMD): definition of sub-phenotypes and predictive criteria by long-term follow-up*. PloS one, 2009. **4**(2): p. e4347.
105. Humbertclaude, V., et al., *Motor and respiratory heterogeneity in Duchenne patients: implication for clinical trials*. European Journal of Paediatric Neurology, 2012. **16**(2): p. 149-160.
106. Plauchu, H., et al., *Detection of carriers for duchenne muscular dystrophy. Quality control of creatine kinase assay*. Human Genetics, 1982. **61**(3): p. 205-209.
107. Buddhe, S., et al., *Cardiac management of the patient with Duchenne muscular dystrophy*. Pediatrics, 2018. **142**(Supplement_2): p. S72-S81.
108. Kurul, S., et al., *Early diagnosis of Duchenne muscular dystrophy with high level of transaminases*. Indian pediatrics, 2002. **39**(2): p. 210-210.
109. Zhu, Y., et al., *Serum enzyme profiles differentiate five types of muscular dystrophy*. Disease Markers, 2015. **2015**.
110. Reaz, M.B.I., M.S. Hussain, and F. Mohd-Yasin, *Techniques of EMG signal analysis: detection, processing, classification and applications*. Biological procedures online, 2006. **8**(1): p. 11-35.

111. Emeryk-Szajewska, B. and J. Kopeć, *Electromyographic pattern in Duchenne and Becker muscular dystrophy. Part I: Electromyographic pattern in subsequent stages of muscle lesion in Duchenne muscular dystrophy*. *Electromyography and clinical neurophysiology*, 2008. **48**(6-7): p. 265-277.
112. Rott, H., F. Breimesser, and W. Rödl, *Imaging technics in muscular dystrophies*. *Journal de génétique humaine*, 1985. **33**(5): p. 397-403.
113. Joyce, N.C., B. Oskarsson, and L.-W. Jin, *Muscle biopsy evaluation in neuromuscular disorders*. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics*, 2012. **23**(3): p. 609-631.
114. Pray, L., *Sex-linked diseases: the case of Duchenne muscular dystrophy (DMD)*. *Nature Education*, 2008. **1**(1): p. 132.
115. Atlas, *immunohistochemistry*. p. Atlas des protéines humaines.
116. Bonilla, E., et al., *Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin at the muscle cell surface*. *Cell*, 1988. **54**(4): p. 447-452.
117. Vogel, H. and J. Zamecnik, *Diagnostic immunohistology of muscle diseases*. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 2005. **64**(3): p. 181-193.
118. Arechavala-Gomez, V., et al., *Immunohistological intensity measurements as a tool to assess sarcolemma-associated protein expression*. *Neuropathology and applied neurobiology*, 2010. **36**(4): p. 265-274.
119. Verma, P.K., et al., *Utility of MLPA in mutation analysis and carrier detection for Duchenne muscular dystrophy*. *Indian Journal of Human Genetics*, 2012. **18**(1): p. 91.
120. Janssen, B., et al., *MLPA analysis for the detection of deletions, duplications and complex rearrangements in the dystrophin gene: potential and pitfalls*. *Neurogenetics*, 2005. **6**(1): p. 29-35.
121. Kadiri, Y.E., et al., *Molecular diagnosis of dystrophinopathies in Morocco and report of six novel mutations*. *Clinica Chimica Acta*, 2020. **506**: p. 28-32.
122. Boulez, F.R., 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**: p. 146-149.
123. Adam MP, A.H., Pagon RA, 1993-2020.
124. Bonne G, L.F., Ben Yaou R. , *Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy*. , *Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy*. 2004 Sep 29
125. Prior, T., M. Leach, and E. Finanger, *Spinal muscular atrophy. 2000*. *GeneReviews (R)*[Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle, 2020.
126. Nicard, Q., *Amyotrophie*. Octobre 2017: p. passeportsante.

127. *Diagnostic et suivi de la dystrophie musculaire de Duchenne : guide à l'usage des familles.*
128. Leturcq, F. and S. Tuffery-Giraud, *Aspects génétiques et moléculaires des dystrophinopathies.* Archives de pédiatrie, 2015. **22**(12): p. 12S3-12S11.
129. *Portail des maladies rares et des médicaments orphelins, dystrophie musculaire de Duchenne.* p. Orpha.net.
130. Lee, S.H., et al., *Clinical and genetic characterization of female dystrophinopathy.* Journal of Clinical Neurology, 2015. **11**(3): p. 248-251.
131. Birnkrant, D.J., et al., *Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and neuromuscular, rehabilitation, endocrine, and gastrointestinal and nutritional management.* The Lancet Neurology, 2018. **17**(3): p. 251-267.
132. Benveniste, O., *La myosite à inclusions.* Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine, 2018. **202**(1-2): p. 91-103.
133. Matthews, E., et al., *Corticosteroids for the treatment of Duchenne muscular dystrophy.* Cochrane Database of Systematic Reviews, 2016(5).
134. Mendell, J.R., et al., *Randomized, double-blind six-month trial of prednisone in Duchenne's muscular dystrophy.* New England Journal of Medicine, 1989. **320**(24): p. 1592-1597.
135. Griggs, R.C., et al., *Prednisone in Duchenne dystrophy: a randomized, controlled trial defining the time course and dose response.* Archives of neurology, 1991. **48**(4): p. 383-388.
136. Brooke, M.H., et al., *Clinical investigation of Duchenne muscular dystrophy: interesting results in a trial of prednisone.* Archives of neurology, 1987. **44**(8): p. 812-817.
137. Simon, H.-U., *CRC desk reference for allergy and asthma.* 2000: CRC press.
138. Ricotti, V., et al., *Long-term benefits and adverse effects of intermittent versus daily glucocorticoids in boys with Duchenne muscular dystrophy.* Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, 2013. **84**(6): p. 698-705.
139. Buyse, G.M., et al., *Efficacy of idebenone on respiratory function in patients with Duchenne muscular dystrophy not using glucocorticoids (DELOS): a double-blind randomised placebo-controlled phase 3 trial.* The Lancet, 2015. **385**(9979): p. 1748-1757.

140. Magot, A., S. Mercier, and Y. Péréon, *Particularités de la dystrophie musculaire de Becker et des femmes conductrices*. Archives de Pédiatrie, 2015. **22**(12): p. 12S31-12S36.
141. Ogata, H., et al., *Beneficial effects of beta-blockers and angiotensin-converting enzyme inhibitors in Duchenne muscular dystrophy*. Journal of cardiology, 2009. **53**(1): p. 72-78.
142. Sienkiewicz, D., et al., *Duchenne muscular dystrophy: current cell therapies*. Therapeutic advances in neurological disorders, 2015. **8**(4): p. 166-177.
143. Sharma, A., et al., *A clinical study shows safety and efficacy of autologous bone marrow mononuclear cell therapy to improve quality of life in muscular dystrophy patients*. Cell transplantation, 2013. **22**(1_suppl): p. 127-138.
144. Konieczny, P., K. Swiderski, and J.S. Chamberlain, *Gene and cell-mediated therapies for muscular dystrophy*. Muscle & nerve, 2013. **47**(5): p. 649-663.
145. *Avancées dans les dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker. Savoir et comprendre*. 2018: p. AFM Téléthon.
146. *DYSTROPHIE MUSCULAIRE DE DUCHENNE : ESSAIS CLINIQUES EN COURS*.2021: p. AFM-telethon.
147. EDUCATION, G., *Phenol Chloroform DNA Extraction: Basics, Preparation Of Chemicals And Protocol..* 2018.
148. *Nucleic Acid Thermo Scientific NanoDrop Spectrophotometers.[Brochure]. USA: Thermo Fisher Scientific Inc.* 2010: p. SCIENTIFIC THERMO FISHER.
149. Li, Y., et al., *Distribution of dystrophin gene deletions in a Chinese population*. Journal of International Medical Research, 2016. **44**(1): p. 99-108.
150. Lee, B.L., et al., *Genetic analysis of dystrophin gene for affected male and female carriers with Duchenne/Becker muscular dystrophy in Korea*. Journal of Korean Medical Science, 2012. **27**(3): p. 274-280.
151. Beggs, A.H., et al., *Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction*. Human genetics, 1990. **86**(1): p. 45-48.
152. Battaloğlu, E., et al., *DNA analysis in Turkish Duchenne/Becker muscular dystrophy families*. Human genetics, 1992. **89**(6): p. 635-639.
153. Dastur, R.S., et al., *Becker muscular dystrophy in Indian patients: Analysis of dystrophin gene deletion patterns*. Neurology India, 2008. **56**(3): p. 374.

154. Zhao, H.-H., et al., *Molecular analysis-based genetic characterization of a cohort of patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy in Eastern China*. Chinese Medical Journal, 2018. **131**(07): p. 770-775.
155. Vengalil, S., et al., *Duchenne muscular dystrophy and Becker muscular dystrophy confirmed by multiplex ligation-dependent probe amplification: genotype-phenotype correlation in a large cohort*. Journal of Clinical Neurology, 2017. **13**(1): p. 91-97.
156. Magri, F., 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**(1): p. 1-12.
157. Vieitez, I., et al., *Mutational spectrum of Duchenne muscular dystrophy in Spain: Study of 284 cases*. Neurología (English Edition), 2017. **32**(6): p. 377-385.
158. Mohammed, F., et al., *Mutation spectrum analysis of Duchenne/Becker muscular dystrophy in 68 families in Kuwait: The era of personalized medicine*. PloS one, 2018. **13**(5): p. e0197205.
159. Goyal, M., et al., *Duchenne muscular dystrophy: Genetic and clinical profile in the population of Rajasthan, India*. Annals of Indian Academy of Neurology, 2021. **24**(6): p. 873.
160. Elhawary, N.A., et al., *Molecular characterization of exonic rearrangements and frame shifts in the dystrophin gene in Duchenne muscular dystrophy patients in a Saudi community*. Human genomics, 2018. **12**(1): p. 1-11.
161. Kong, X., et al., *Genetic analysis of 1051 Chinese families with Duchenne/Becker muscular dystrophy*. BMC medical genetics, 2019. **20**(1): p. 1-6.
162. Hamadouche, N. and Y. Sifi, *Aspects cliniques et génotypiques des dystrophinopathies Duchenne de Boulogne et Becker dans l'Est algérien*. 2020.
163. Wonkam-Tingang, E., et al., *DMD-related muscular dystrophy in Cameroon: Clinical and genetic profiles*. Molecular genetics & genomic medicine, 2020. **8**(8): p. e1362.
164. Iskandar, K., et al., *The analysis of DMD gene deletions by multiplex PCR in Indonesian DMD/BMD patients: The era of personalized medicine*. BMC Research Notes, 2019. **12**(1): p. 1-6.
165. Banks, G.B., et al., *Functional capacity of dystrophins carrying deletions in the N-terminal actin-binding domain*. Human molecular genetics, 2007. **16**(17): p. 2105-2113.
166. Amalfitano, A., *Structure and mutation of the dystrophin gene*. Dystrophin. Cambridge, 1997: p. 1-26.

ANNEXES

Annexe 1

	<p>المملكة المغربية جامعة محمد الأول كلية الطب والصيدلة وجدة Royaume du Maroc Université Mohammed Premier Faculté de Médecine et de Pharmacie Oujda</p>	
---	---	---

إقرار بالموافقة على المشاركة في بحث

عنوان البحث: بنك العينات الحيوية وتخزين البيانات للبحوث الطبية

اسم المشارك:
تاريخ الميلاد (اليوم / الشهر / السنة): الجنس: ذكر أنثى
العنوان:
رقم الهاتف: البريد الإلكتروني:

أنا الموقع أسفله، أؤكد بأنني قد فهمت المعلومات حول بنك العينات الحيوية وتخزين البيانات للبحوث الطبية مع الفوائد والمخاطر المحتملة. و قد قدمت لي شفوياً كافة الشروح المتعلقة بها. كما أنني اقتنعت بالأجوبة التي قدمت لي على كل تساؤلاتي.

و بناء على ذلك أوافق على مشاركتي أو مشاركة طفلي في هذه الدراسة و على استخدام المعلومات الصحية السرية المرتبطة بها. و أعطي الموافقة لاستخدام صورتي (و/أو صورة طفلي)، و تسجيل مرني لي (و/أو لطفلي) من أجل التدريس و/أو في مطبوعات و/أو في شبكة الإنترنت لكلية الطب والصيدلة بوجدة. أدرك بأن اسم طفلي أو أي معلومات أخرى التي من شأنها أن تحددني و/أو تحدد طفلي لن يتم تضمينها في أي صور و/أو تسجيل مرني.

أقر بأنني طوعاً وبحرية أوافق على استعمال المادة الجينية من العينات الخاصة بي (و/أو بطفلي) في دراسات وراثية.

و أعي تماماً أن المشاركة في هذه الدراسة مشاركة طوعية و أن رفضي المشاركة أو اختياري الخروج من الدراسة في أي وقت، حتى بعد توقيع هذا النموذج، لن يترتب عليه أي عقوبة أو فقدان لمزايا تحق لي و أن قرار الخروج في حال اتخاذي له لن يؤثر على الرعاية الطبية التي يمنحها لي الأطباء في المستشفى حالياً أو مستقبلاً و على ذلك فإنني أوقع هذا الأقرار بالموافقة قبل المشاركة في أية أنشطة متعلقة بالبحث.

من خلال هذا النموذج، تقوم وحدة الوراثة بكلية الطب والصيدلة بوجدة بجمع البيانات الشخصية لأغراض البحث العلمي ومتابعة المرضى. و قد تم طلب ترخيص تحت رق A-RS-279/2014 من اللجنة الوطنية لمراقبة حماية المعطيات ذات الطابع الشخصي. لا تحال البيانات الشخصية إلى باحثين آخرين في بلد أجنبي، إلا إذا تم تقديم طلب إلى اللجنة الوطنية لمراقبة حماية المعطيات ذات الطابع الشخصي وتم الحصول على موافقتها.

يمكنك الاتصال بالأستاذ محمد بلاوي للاستفادة من حقوقك، والتصحيح والمعارضة وفقاً لأحكام القانون 08-09

التوقيعات:

التاريخ	توقيع المريض	اسم المريض
التاريخ	توقيع الوالد(ة)/الوصي	اسم الوالد(ة)/الوصي

تصريح الباحث أو مساعده:

أفيد بأنني شرحت بالكامل لـ _____ الأهدف، المخاطر و المزايا المحتملة لهذه
المشارك/الوالد(ة)/ الوصي

الدراسة. كما أنني أجبت وسوف أجيب عن جميع الأسئلة بأفضل ما يمكن. سوف أطلع المشارك على أي تغيير يطرأ على الإجراءات أو المخاطر والفوائد إن وجدت خلال الدراسة أو بعدها.

التاريخ	توقيع الباحث أو مساعده	اسم الباحث أو مساعده
---------	------------------------	----------------------

Annexe 2

FICHE CLINIQUE DYSTROPHIE MUSCULAIRE PROGRESSIVE

Date :

Dossier Hospitalier :

IDENTIFICATION

Nom :
Prénom :
Date de Naissance :
Médecin traitant :
Adresse :
Tél :
Sexe :
Service :

CRITERES CLINIQUE

Age du premier signe clinique :

Age moyen de la marche :

Age arrête de la marche :

Retard de croissance OUI NON

Retard du langage OUI NON

Retard pubertaire OUI NON

Myalgies OUI NON

Hypertrophie des mollets OUI NON

Hyperlordose OUI NON

Scoliose OUI NON

Atteinte Cardiaque OUI NON

Atteinte Respiratoire OUI NON

Atteinte oculomotrice OUI NON

Atteinte vélo-pharyngée OUI NON

Atteinte intellectuelle OUI NON

Macroglossie Troubles de la déglutition

CRITERES PARACLINIQUES

Taux de CPK :

Electromyogramme : Tracé myogène OUI NON

Echocardiographie : cardiomyopathie dilatée OUI NON

CRITERES GENETIQUES

Origine Géographique du Père : de la Mère :

Cas Familiaux : OUI NON

Consanguinité : OUI NON

Arbre généalogique (à joindre)

Annexe 3

Protocole d'extraction de l'ADN à partir de sang Total :

- **Lavage du sang**

Cette première étape consiste à éliminer les globules rouges et toutes les impuretés du milieu extra cellulaire et spécifiquement l'hème qui est un puissant inhibiteur de la Taq polymérase. On ajoute aux prélèvements effectués une solution hypotonique qui fera éclater les globules rouges. Les globules blancs étant beaucoup plus résistants ne seront pas détruits.

- Faire l'annotation des tubes Falcons de 15 ml (vides) et les classer en ordre ;
- Y verser le sang et ajouter 3 volumes de TE (20:5) ;
- Mélanger et Vortexer quelques secondes ;
- Laisser 15min en 4°C puis 15min de centrifugation 3500rpm (le froid aide à la lyse : choc thermique) ;
- Jeter le surnageant (si le culot reste rouge refaire le lavage).

- **Lyse cellulaire**

Pour cette étape, on utilise un détergent combiné avec une enzyme la « Protéinase K » afin de dégrader les protéines de la cellule, déstabiliser la membrane des globules blancs et le noyau de la cellule.

- Ajouter 1ml de TE (20:5) et 500µl de solution de lyse (Tris EDTA, SDS, NaCl) par tube (TE : est un agent chélateur, il neutralise les ions Mg²⁺ et Ca²⁺ nécessaire au fonctionnement des endonucléases. SDS : Détergent dont le rôle est de lyser les membranes des globules blancs. NaCl : solution hypotonique faisant éclater les cellules) et vortexer quelques secondes ;
- Ajouter 20-40µl de protéinase K (PK) selon la taille du culot globulaire ;
- Homogénéiser délicatement et vortexer rapidement ;
- Laisser dans le bain-marie over-night à 56°C;
- **Extraction de l'ADN par la méthode phénol-chloroforme**
 - Ajouter 1 volume de Phénol (Le phénol, équilibré à pH 8,0, saturé en eau, dégazé, avec ou sans agent anti-oxydant (8-hydroxyquinoléine), est un puissant agent déprotéinisant dans lequel les acides nucléiques ne sont pas solubles.) ;

- Vortexer jusqu'à ce que ça devient laiteux et centrifuger à 4500 rpm (selon la vitesse maximale de la centrifugeuse) pendant 15 min ;
- Après centrifugation deux phases se forment ; une aqueuse contenant de l'ADN et l'autre organique et entre les deux on peut retrouver une mince couche de protéine parfois ;
- A l'aide de la micropipette récupérer la phase aqueuse et la déposer dans un nouveau tube « annoté » puis ajouter 1 volume de chloroforme-Alcool isoamyl (pour éliminer toute trace de phénol) ;
- Homogénéiser et centrifuger à 4500 rpm pendant 15 min. De même, à l'aide de la micropipette récupérer la phase aqueuse et la déposer dans un nouveau tube.
- **Précipitation de l'ADN par l'éthanol**
 - Ajouter 2 volumes d'Ethanol Absolu ;
 - Ajouter 1/10 volume de NaCl (5M) ;
 - Centrifuger full speed à 4 °C pendant 15 min, éliminé le surnageant et laisser la méduse au fond ;
 - Ajouter 1 ml d'éthanol 70 % refroidi, mélanger soigneusement pour bien décoller la méduse et Centrifuger à la vitesse maximale de la centrifugeuse, pendant 15 min à 4C°;

Remarque : Si le NaCl n'a pas été utilisé dans l'étape précédente, sauter cette étape.

- Jeter le surnageant d'éthanol et laisser l'ADN sécher une heure à 40°C sur le bloc chauffant ou incliner sous la hotte.

- **Resuspension de l'ADN**

A l'état sec, l'ADN ne peut être utilisé pour des analyses de biologie moléculaire. On doit donc le réhydrater totalement dans une solution et le conserver.

- Ajouter 300 µl de TE (10 :1) à l'ADN ;
- Homogénéiser bien avec la micropipette jusqu'à observation de la méduse ;
- Récupérer le tout et déposer dans un tube Eppendorf ;
- Pour une meilleure hydratation, on chauffe le tube à 65 C° pendant 15 min.

Annexe 4

Séquences des amorces utilisées en PCR multiplex.

Set 1 :

Région/gène	Amorces	Taille	Forward/Reverse primer	Taille PCR (pb)
Exon 45	DM45F	25	AAA CAT GGA ACA TCC TTG TGG GGA C	547
	DM45R	26	CAT TCC TAT TAG ATC TGT CGC CCT AC	
Exon 48	DM48F	28	TTG AAT ACA TTG GTT AAA TCC CAA CAT G	506
	DM48R	26	CCT GAA TAA AGT CTT CCT TAC CAC AC	
Exon 19	DM19F	26	GAT GGC AAA AGT GTT GAG AAA AAG TC	459
	DM19R	25	TTC TAC CAC ATC CCA TTT TCT TCC A	
Exon 17	DM 17F	27	GAC TTT CGA TGT TGA GAT TAC TTT CCC	416
	DM 17R	26	AAG CTT GAG ATG CTC TCA CCT TTT CC	
Exon 51	DM 51F	26	GAA ATT GGC TCT TTA GCT TGT GTT TC	388
	DM 51R	27	GGA GAG TAA AGT GAT TGG TGG AAA ATC	
Exon 8	DM 8F	25	GGC CTC ATT CTC ATG TTC TAA TTA G	360
	DM 8R	26	GTC CTT TAC ACA CTT TAC CTG TTG AG	
Exon 12	DM 12F	26	GAT AGT GGG CTT TAC TTA CAT CCT TC	331
	DM 12R	26	GAA AGC ACG CAA CAT AAG ATA CAC CT	
Exon 44	DM 44F	25	CTT GAT CCA TAT GCT TTT ACC TGC A	268
	DM 44R	25	TCC ATC ACC CTT CAG AAC CTG ATC T	
Exon 4	DM 4F	25	TTG TCG GTC TCT CTG CTG GTC AGT G	196
	DM 4R	25	CAA AGC CCT CAC TCA AAC ATG AAG C	
Exon 46	DM 46F	27	GCT AGA AGA ACA AAA GAA TAT CTT GTC	148
	DM 46R	27	CTT GAC TTG CTC AAG CTT TTC TTT TAG	

Set 2 :

Région/gène	Amorces	Taille	Forward/Reverse primer	Taille PCR (pb)
Exon 1	DM 1F	35	GAA GAT CTA GAC AGT GGA TAC ATA ACA AAT GCA TG	535
	DM 1R	35	TTC TCC GAA GGT AAT TGC CTC CCA GAT CTG AGT CC	
Exon 3	DM 3F	25	TCA TCC GTC ATC TTC GGC AGA TTA A	410
	DM 3R	30	CAG GCG GTA GAG TAT GCC AAA TGA AAA TCA	
Exon 43	DM 43F	29	GAA CAT GTC AAA GTC ACT GGA CTT CAT GG	357
	DM 43R	29	ATA TAT GTG TTA CCT ACC CTT GTC GGT CC	
Exon 50	DM 50F	28	CAC CAA ATG GAT TAA GAT GTT CAT GAA T	271
	DM 50R	28	TCT CTC TCA CCC AGT CAT CAC TTC ATA G	
Exon 13	DM 13F	29	AAT AGG AGT ACC TGA GAT GTA GCA GAA AT	238
	DM 13R	28	CTG ACC TTA AGT TGT TCT TCC AAA GCA G	
Exon 6	DM 6F	27	CCA CAT GTA GGT CAA AAA TGT AAT GAA	202
	DM 6R	31	GTC TCA GTA ATC TTC TTA CCT ATG ACT ATG G	
Exon 47	DM 47F	28	CGT TGT TGC ATT TGT CTG TTT CAG TTA C	181
	DM 47R	27	GTC TAA CCT TTA TCC ACT GGA GAT TTG	
Exon 60	DM 60F	29	AGG AGA AAT TGC GCC TCT GAA AGA GAA CG	139
	DM 60R	28	CTG CAG AAG CTT CCA TCT GGT GTT CAG G	
Exon 52	DM 52F	27	AAT GCA GGA TTT GGA ACA GAG GCG TCC	113
	DM 52R	28	TTC GAT CCG TAA TGA TTG TTC TAG CCT C	

Set 3 :

Région/gène	Amorces	Taille	Forward/Reverse primer	Taille PCR (pb)
Exon 49	DM 49F	27	GTG CCC TTA TGT ACC AGG CAG AAA TTG	439
	DM 49R	28	GCA ATG ACT CGT TAA TAG CCT TAA GAT C	
Exon 16	DM 16F	25	TCT ATG CAA ATG AGC AAA TAC ACG C	290
	DM 16R	25	GGT ATC ACT AAC CTG TGC TGT ACT C	
Exon 41	DM 41F	29	GTT AGC TAA CTG CCC TGG GCC CTG TAT TG	275
	DM 41R	29	TAG AGT AGT AGT TGC AAA CAC ATA CGT GG	
Exon 32	DM 32F	25	GAC CAG TTA TTG TTT GAA AGG CAA A	253
	DM 32R	29	TTG CCA CCA GAA ATA CAT ACC ACA CAA TG	
Exon 42	DM 42F	28	CAC ACT GTC CGT GAA GAA ACG ATG ATG G	195
	DM 42R	29	CTT CAG AGA CTC CTC TTG CTT AAA GAG AT	
Exon 34	DM 34F	29	GTA ACA GAA AGA AAG CAA CAG TTG GAG AA	171
	DM 34R	28	CTT TCC CCA GGC AAC TTC AGA ATC CAA A	

رقم: MM432022

سنة: 2021/2022

رسالة ماجستير

ماجستير «التكنولوجيا الحيوية الطبية»

خيار «:الطب الحيوي»

بعنوان

دراسة جزيئية لمورثة جين الديستروفين لدى المرضى الذين يعانون من ضمور
دوشين العضلي (DMD) و ضمور بيكر العضلي (BMD) بالجهة الشرقية.

من طرف

مسعودي مريم

بتاريخ

11 يوليوز 2022

أعضاء لجنة التحكيم :

رئيسة

بنطبيي كوثر (أستاذة بكلية الطب و الصيدلة ،الرباط و أستاذة بكلية الطب ،لندن)

ممتحن

بولويز رضوان (أستاذ بالمعهد العالي للمهن التمريضية وتقنيات الصحة ، وجدة)

مشرفة

شريف مجيدة (أستاذة بكلية العلوم، وجدة)

ممتحنة

الإدريسي الرحالي مونية (دكتورة بكلية الطب و الصيدلة ، وجدة)