

*République Algérienne Démocratique et Populaire.*

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique.

Université Saâd DAHLAB Blida.

Faculté des sciences Agro-Vétérinaires et Biologiques.

Département de Biologie.



Mémoire de fin d'études

En vue d'obtention d'un diplôme de Master Sciences de la Nature et de la Vie

Option : Génétique - Physiologie

***Mise en évidence de la mutation c.525delT  
affectant le gène SGCG chez des patients  
Algériens***

Réalisé par : **LARAB Zineb**

Devant le jury composé de :

<b>ANANE. A</b>	<b>MAA</b>	<b>USDB</b>	<b>Présidente</b>
<b>CHERRALLAH. A</b>	<b>MAA</b>	<b>USDB</b>	<b>Promotrice</b>
<b>HAMADOUCHE. T</b>	<b>MC</b>	<b>UMBB</b>	<b>Examineur</b>
<b>AISSANI. R</b>	<b>MAA</b>	<b>USDB</b>	<b>Examinatrice</b>

Année universitaire : **2012 / 2013**

## *Remerciements*

Merci « ALLAH » le tout puissant

Je tiens à adresser mes sincères et profonds remerciements à ma promotrice **CHERRALLAH Amira** qui a été toujours à mes cotés, de m'avoir encadré et d'être à mon écoute. A travers ces lignes j'exprime ma profonde gratitude envers son encouragement et son soutien, sa générosité et sa précieuse aide.

Je remercie tout particulièrement le **Dr. T. Benhassine** du Laboratoire de Génétique, Faculté des Sciences Biologiques de l'USTHB de m'avoir donné les moyens de travailler au sein de son équipe. Je la remercie également pour la qualité de ses enseignements ainsi que pour sa modestie.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance envers **Mme ANANE A.** Maitre Assistante à l'USDB d'avoir accepté de **Présider le Jury de ma soutenance.**

Mes vifs remerciements s'adressent à **Mr HAMADOUCHE T.** Maitre de conférences à l'Université de Boumerdes pour avoir donné de son temps et d'avoir honoré mon travail en **l'examinant.**

Mes vifs et chaleureux remerciements s'adressent également à **Mme AISSANI Radia** Maitre assistante à l'USDB de m'avoir fait l'honneur d'**examiner** ce travail mais aussi et surtout pour son soutien tout au long de mon cursus de Master.

Un grand merci à toute l'équipe de l'unité de recherche du **Laboratoire de Génétique,**  
USTHB

Enfin,

J'adresse mes remerciements à toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Merci tout le monde

## **Dédicace**

*Je dédie ce travail tout d'abord,*

*A **ma mère** qui a été la lumière éclairant mon chemin, pour sa patience, compréhension et encouragement*

*A **mon père** pour l'aide, les conseils et le soutien*

*Merci **mes parents** pour votre présence en toutes circonstances et votre sacrifice pour nous, je vous aime très fort*

*A mes adorables et chères sœurs, **Fettouma** et **Rabia** pour la gentillesse, pour l'aide, pour l'encouragement, pour être l'oreille entente, pour être les deux fleurs de ma vie, et à qui je souhaite tout le bonheur et la réussite*

*Sans oublié le sourire et la joie de ma vie la petite **Mya***

*Pour mes très chers frères*

***Baghdad** l'exemple de sagesse et de volonté, pour ses conseils pour ses encouragements*

***Tareq** à qui je souhaite beaucoup de réussite*

***Mahrez** à qui j'exprime ma gratitude pour sa compagnie les matins pour arriver à mes cours*

*Merci **mes frères** d'être à mes cotés et d'être là pour moi*

*Merci ma famille, je vous souhaite tous le bonheur et la réussite, et que dieu nous garde toujours ensemble*

*A ma grand-mère **Yamna** et toute ma grande famille, mes tentes mes oncles, mes cousines et cousins surtout la dynamique **Djoudja***

*A **Rafiq** mon grand frère, mes sœurs **Karima** et **Salima**, sans oublié **Tata Radia***

*A mes copines **Sarah Belgrad** et **Fella Andjichairi**, l'exemple d'amitié*

*A mes collègues et sœurs **Ghania Aouali (NANO)** et **Souad Hammouche (SOUSOU)** pour les moments plaisantes passées entre nous*

*A **Dr Ouahrani** et **Dr Kiboua** qui ont été présents comme remède face de tout problème*

*A toute mes copines et amies sans exception, et toute personne j'ai oublié de citer son nom et à qui je suis chère*

*Je vous aime*

**Zineb**

## ***Résumé***

La dystrophie musculaire des ceintures de type 2C (LGMD2C) est une myopathie sévère, d'apparition précoce et qui se transmet selon le mode autosomique récessif. Elle est prévalente en Afrique du Nord, notamment en Algérie, où elle est due à une mutation fondatrice affectant le gène *SGCG* qui code pour une glycoprotéine : la gamma-sarcoglycane.

L'objectif de ce travail était d'explorer 10 patients Algériens afin de confirmer ou d'infirmer le diagnostic clinique de LGMD2C sur un plan génétique et ce en mettant en évidence la présence de la mutation à effet fondateur, la c.525delT à l'état homozygote dans l'exon 6 du gène *SGCG*.

Après amplification et séquençage direct de l'exon 6 du gène *SGCG*, la mutation c.525delT a été mise en évidence à l'état homozygote pour 5 des 10 patients étudiés permettant ainsi l'établissement d'un diagnostic génétique précis pour ces patients là.

**Mots clés** : LGMD2C, gène *SGCG*, mutation fondatrice c.525delT, diagnostic génétique

## *Abstract*

The Limb Girdle Muscular dystrophy type 2C (LGMD2C) is a severe myopathy that occurs at early stages of life. Its mode of inheritance is autosomal recessive. This pathology is prevalent in North Africa, including Algeria and is due to a founder mutation affecting the *SGCG* gene that encodes for a glycoprotein: gamma-sarcoglycan.

In this work, we explored 10 Algerian patients to confirm or refute the clinical diagnosis of LGMD2C genetically, highlighting the presence of a homozygous founder mutation, c.525delT at the sixth exon of the *SGCG* gene.

After amplifying and sequencing of the sixth exon of the *SGCG* gene, the c.525delT mutation was identified in 5 of the 10 patients analyzed permitting to establish a clear LGMD2C genetic diagnosis for these patients.

**Keywords:** LGMD2C, *SGCG* gene, c.525delT founder mutation, genetic diagnosis.

## خلاصة

يعد مرض الضمور العضلي الحزامي نوع 2 س (LGMD2C) من الأمراض العضلية الأكثر حدة، ذات ظهور مبكر والتي تورث بطريقة متنحية عن طريق الكروموزومات الجسمية. هذا المرض السائد في شمال أفريقيا، بما في ذلك الجزائر، راجع إلى طفرة وراثية تصيب الجين *SGCG* المسؤول عن إنتاج بروتين: الغاماساركوغليكان.

كان الهدف من خلال هذا العمل اختبار 10 مرضى جزائريين، من أجل تأكيد أو نفي التشخيص السريري لـ LGMD2C على المستوى الوراثي، وذلك لإثبات وجود طفرة وراثية ذات تأثير أساسي وهي c.525delT في الحالة متماثلة اللواقح في الأكسون 6 للجين *SGCG*.

بعد المضاعفة والتحليل التسلسلي المباشر للأكسونات 6 للجين *SGCG*، تم الكشف عن الطفرة الوراثية c.525delT، في الحالة متماثلة اللواقح عند 5 من أصل الـ 10 مرضى الذين تمت دراسة حالتهم، الأمر الذي سمح لنا بوضع تشخيص وراثي واضح لهؤلاء المرضى.

**كلمات البحث:** LGMD2C، الجين *SGCG*، الطفرة الوراثية ذات التأثير الأساسي c.525delT،

تشخيص وراثي

***Liste des abréviations***

**AAV** : Adenoassociated virus

**AD** : Autosomique Dominant

**ADN** : Acide Dysoxyribonucleique

**ADNc** : Acide DysoxyriboNucleique complémentaire

**AR** : Autosomique Récessif

**ARN** : Acide Ribonucléique

**ARNm** : Acide Ribonucléique messenger

**BMD** : Dystrophie musculaire de Becker

**CPK** : Créatine phospho-kinases

**del** : Délétion

**DAG** : Dystrophin-Associated Glycoproteins (Glucoprotéines associées à la Dystrophine)

**DAP** : Dystrophin Associated Proteins (Protéines associées à la dystrophine)

**DG** : Dystroglycanes

**DMC** : Dystrophie Musculaire Congénitale

**DMD** : Dystrophie musculaire de Duchenne

**DMP** : Dystrophies musculaires Progressives

**EDTA** : Acide Ethylène Diamine Tétra-acétique

**dNTPs (dTTP, dATP, dGTP, dCTP)** : Nucléotides

**EGF** : Facteur de croissance

**EMG** : Electromyographie

**LC** : Localisation Cytogénique

**LGMD** : Limb Girdle Muscular Dystrophies (Dystrophie musculaire des ceintures)

**Mb** : Méga bases

**pb** : Paires de bases

**PCR** : Polymerase Chain Reaction

**PK** : Protéinase K

**PM** : Poids Moléculaire

**SCARMD** : Severe Childhood Autosomal Recessive Muscular Dystrophy (Dystrophies musculaires sévères d'enfance autosomiques récessives)

**SDS** : Dodécyl Sulfate Sodium

**SG** : Sarcoglycanes

**SLB** : Solution de Lyse des Globules Blancs

**SLR** : Solution de Lyse des Globules Rouges

**SSCP** : Single Strand Conformation Polymorphism

**TBE** : Tris-Borate EDTA

**XR** : Récessif lié à X

## *Sommaire*

<b>Introduction</b> .....	1
<b>I- Définition des dystrophies musculaires progressives</b> .....	2
<b>II- Classification des dystrophies musculaires progressive</b> .....	2
<b>III- complexe Dystrophine-Glycoprotéines associées</b> .....	4
<b>IV- Dystrophies musculaires des ceintures</b> .....	7
<b>V- Sarcoglycanopathies</b> .....	8
<b>IV-1- Gamma-sarcoglycanopathie LGMD2C</b> .....	8
<b>IV-2- Alpha-sarcoglycanopathie LGMD2D</b> .....	8
<b>IV-3- Beta-sarcoglycanopathie LGMD2E</b> .....	9
<b>IV-4- Delta-sarcoglycanopathie LGMD2F</b> .....	10
<b>VI- Dystrophies musculaires des ceintures à transmission autosomique récessive de type 2C (<math>\gamma</math>-sarcoglycanopathie)</b> .....	10
<b>VI-1- Aspect clinique de la <math>\gamma</math>-sarcoglycanopathie</b> .....	10
<b>VI-2- Structure et organisation du gène SGCG</b> .....	11
<b>VI-3- La protéine gamma-sarcoglycane</b> .....	12
<b>VI-4- Les mutations affectant le gène SGCG</b> .....	13
<b>VI-5- Diagnostic de l'LGMD2C</b> .....	14
<b>VI-5-1- Etude para-clinique</b> .....	14
<b>VI-5-2- Etude de la biopsie musculaire</b> .....	15
<b>VI-5-3- Analyse génétique</b> .....	18
<b>VI-6- Perspectives thérapeutiques des sarcoglycanopathies</b> .....	18

<b>Matériels et méthodes</b> .....	21
<b>I- Données cliniques</b> .....	21
<b>II- Méthodes</b> .....	22
1. Extraction d'ADN génomique total à partir du sang périphérique par la méthode de « salting-out » .....	22
2. Estimation et quantification d'ADN .....	23
3. Amplification de l'exon 6 du gène <i>SGCG</i> par PCR .....	24
4. Contrôle des produits d'amplification .....	26
5. Séquençage et analyse des séquences .....	27
<b>Résultats et discussion</b> .....	28
<b>I- Analyse clinique et généalogique</b> .....	28
<b>II- Estimation qualitative et semi- quantitative de l'ADN extrait</b> .....	28
<b>III- Amplification par PCR de l'exon 6 du gène <i>SGCG</i> siège de la mutation c.525delT</b> .....	30
<b>IV- Mise en évidence par séquençage de la mutation c.525delT touchant le gène <i>SGCG</i></b> .....	31
<b>Conclusion</b> .....	36
<b>Références bibliographiques</b> .....	37

## **Introduction**

Les dystrophies musculaires progressives sont un exemple saisissant de l'hétérogénéité génétique et phénotypique des pathologies monogéniques.

Elles se caractérisent par une dégénérescence progressive du tissu musculaire aboutissant à une atrophie musculaire, avec une formule histologique de nécrose-régénération caractéristique associée à une hyperplasie du tissu conjonctif et adipeux.

La gamma-Sarcoglycanopathie (LGMD2C), également appelée dystrophie musculaire sévère de l'enfance à transmission autosomique récessive est une dystrophie musculaire des ceintures due à des mutations dans le gène *SGCG* qui code pour la gamma-sarcoglycane. Une glycoprotéine située dans la membrane des cellules musculaires qui concourt avec les autres sarcoglycanes à la stabilité et à la résistance mécanique de la membrane de la cellule lors des contractions musculaires.

Grâce aux avancées de la recherche génétique, le diagnostic de la plus part des maladies neuromusculaires s'appuie aujourd'hui sur des techniques de biologie moléculaire visant à mettre en évidence soit un déficit ou une absence de la protéine responsable de l'affection ou l'identification de l'altération génétique en cause au niveau de l'ADN ou de l'ARN.

L'objectif de ce travail était d'explorer un ensemble de patients dont les prélèvements sanguins nous ont été adressés afin de confirmer le diagnostic clinique de LGMD2C sur un plan génétique. En effet, cette forme de LGMD à forte prévalence dans le bassin méditerranéen en raison de la présence d'une mutation à effet fondateur (c.525delT) serait responsable de tous les cas de gamma-sarcoglycanopathie dans notre population.

## **I- Définition des dystrophies musculaires progressives**

Les dystrophies musculaires progressives forment un groupe de maladies dont la nature héréditaire est connue depuis longtemps. C'est sans doute le critère anatomique et évolutif qui constitue le dénominateur commun de ce groupe d'affections, par ailleurs très disparates au point de vue clinique, génétique et moléculaire.

Il s'agit de maladies caractérisées par une dégénérescence progressive des fibres musculaires avec une formule histologique de nécrose-régénération caractéristique, comportant une part importante mais variable d'hyperplasie du tissu conjonctif (Kaplan *et al.*, 1996). L'atteinte est essentiellement squelettique, cependant, elle peut toucher, mais pas constamment, le tissu myocardique, voire le système musculaire lisse (Kaplan *et al.*, 1996).

## **II- Classification des dystrophies musculaires progressives**

Les différentes formes de dystrophies musculaires progressives peuvent s'individualiser selon plusieurs critères : localisation de l'atrophie, âge d'apparition, évolutivité et mode de transmission. Une première classification fut proposée, dès 1884, par Erb qui a notamment regroupé les observations réalisées par Duchenne, Landouzy et Déjerine ainsi que les siennes sous le terme de dystrophie musculaire.

En effet, depuis leur description, la classification de ces affections a évolué selon les connaissances de l'époque. Plusieurs classifications se sont ainsi succédées en se basant sur les données cliniques puis histologiques et, ultérieurement, avec les progrès de la génétique, sur le mode de transmission de ces maladies (Gherardi *et al.*, 1989).

Au cours de ces dernières années, les classifications des dystrophies musculaires proposées se basent principalement sur une approche moléculaire et combinent les données cliniques, immuno-histochimiques et génétiques (**Tableau I**) (Bushby *et al.*, 2009).

Le tableau I représente une classification plus ou moins complète de l'ensemble des dystrophies musculaires identifiées à ce jour.

**Tableau I :** Classification des dystrophies musculaires progressives en fonction des données moléculaires, des aspects génétiques et de la présentation clinique : **LGMD**, dystrophie musculaire des ceintures; **DMC**, Dystrophie Musculaire Congénitale; **XR**, Récessif lié à X ; **AD**, Autosomique Dominant ; **AR**, Autosomique Récessif ; **MT**, Mode de Transmission; **LC**, Localisation Cytogénique (Bushby *et al.*, 2009).

Dystrophie musculaire	MT	LC	Locus	Produits du gène
<b>Duchenne /Becker</b>	XR	Xp21.2	<i>DMD</i>	Dystrophine
<b>Emery-Dreyfus type 1</b>	XR	Xq28	<i>EMD</i>	Emerine
<b>Emery-Dreyfus type 2</b>	XR	Xq26.3		
<b>Emery-Dreyfus/LGMD1B</b>	AD/AR	1q21.2	<i>LMNA</i>	Lamines A/C
<b>Facio-scapulo-humérale</b>	AD	4q35		
<b>LGMD1A</b>	AD	5q31	<i>MYOT</i>	Myotiline
<b>LGMD1C</b>	AD	3p25	<i>CAV3</i>	Cavéoline-3
<b>LGMD1D</b>	AD	7q	<i>LGMD1D</i>	-
<b>LGMD1E</b>	AD	6q23	<i>LGMD1E</i>	-
<b>LGMD1F</b>	AD	7q32	<i>LGMD1F</i>	-
<b>LGMD1G</b>	AD	4q21	<i>LGMD1G</i>	-
<b>LGMD2A</b>	AR	15q15	<i>CAPN3</i>	Calpaïne-3
<b>LGMD2B</b>	AR	2p13	<i>DYSF</i>	Dysferline
<b>LGMD2C</b>	<b>AR</b>	<b>13q12</b>	<b><i>SGCG</i></b>	<b><math>\gamma</math>-sarcoglycane</b>
<b>LGMD2D</b>	AR	17q21	<i>SGCA</i>	$\alpha$ -sarcoglycane
<b>LGMD2E</b>	AR	4q12	<i>SGCB</i>	$\beta$ -sarcoglycane
<b>LGMD2F</b>	AR	5q23	<i>SGCD</i>	$\delta$ -sarcoglycane
<b>LGMD2G</b>	AR	17q12	<i>TCAP</i>	Téléthonine
<b>LGMD2H</b>	AR	9q33.3	<i>TRIM32</i>	Tripartite-motif protein 32
<b>LGMD2I/DMCIC</b>	AR	19q13.3	<i>FKRP</i>	Fukutin-related protéine
<b>LGMD2J</b>	AR	2q31	<i>TTN</i>	Titine
<b>LGMD2K</b>	AR	9q34.1	<i>POMT1</i>	Protein O-mannosyltransferase-1
<b>LGMD2L</b>	AR	11p14	<i>ANO5</i>	Anoctamine-5
<b>LGM2M/DMC/Fukuyama</b>	AR	9q31	<i>FKTN</i>	Fukutine
<b>LGMD2N</b>	AR	14q24	<i>POMT2</i>	Protein O-mannosyltransferase-2
<b>LGMD2O</b>	AR	1p34.1	<i>POMGnT1</i>	Protein-O-mannose- $\beta$ 1,2-N-acetylglucosaminyltransferase-1

### III- Complexe Dystrophine-Glycoprotéines associées

La cellule musculaire striée est constituée de plusieurs faisceaux de fibres. Chaque faisceau est composé de plusieurs fibres musculaires. La fibre musculaire est une cellule multinucléée de forme cylindrique entourée d'une membrane appelée : sarcolemme. Elle contient dans son sarcoplasme des éléments hautement différenciés appelés myofibrilles qui constituent le support de la contraction musculaire (*Figure 1A*).

La dystrophine est une protéine du sarcoplasme des cellules musculaires constituée de 3585 acides aminés d'un poids moléculaire total de 427 kDa (*Figure 1B*) (Muntoni *et al.*, 2003 ; Fernandez et Artero, 2010). Elle forme un pont entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire à travers sa liaison au complexe de glycoprotéines membranaires d'une part et à l'actine du cytosquelette d'autre part et ce, afin de protéger les fibres musculaires contre les altérations entraînées par la contraction musculaire. De plus, elle jouerait un rôle clé dans les communications entre la matrice extracellulaire et le milieu interne de la fibre musculaire (Rando, 2001 ; Aartsma-Rus *et al.*, 2006).

La dystrophine est ainsi associée à des protéines qui interagissent entre elles pour former un complexe protéique nommé : « DAG » (Dystrophin-Associated Glycoproteins) (*Figure 1B*). L'absence du complexe ou d'un de ses composants déstabilise et fragilise la membrane de la fibre musculaire qui ne résisterait plus aux contraintes imposées lors de la contraction musculaire.

Ce complexe peut être divisé en trois groupes :

- ❖ **Le groupe des dystroglycanes (DG)** est constitué de l' $\alpha$ -dystroglycane et du  $\beta$ -dystroglycane de poids moléculaires de 156 kDa et de 43 kDa respectivement. La première est extracellulaire et la deuxième transmembranaire responsable de la liaison aux domaines WW et EF de la dystrophine par son domaine cytoplasmique riche en proline.
- ❖ **Le groupe des sarcoglycanes/sarcospan (SG)** est constitué des quatre glycoprotéines  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -sarcoglycane et d'une autre protéine de la famille des tétraspan, le sarcospan.

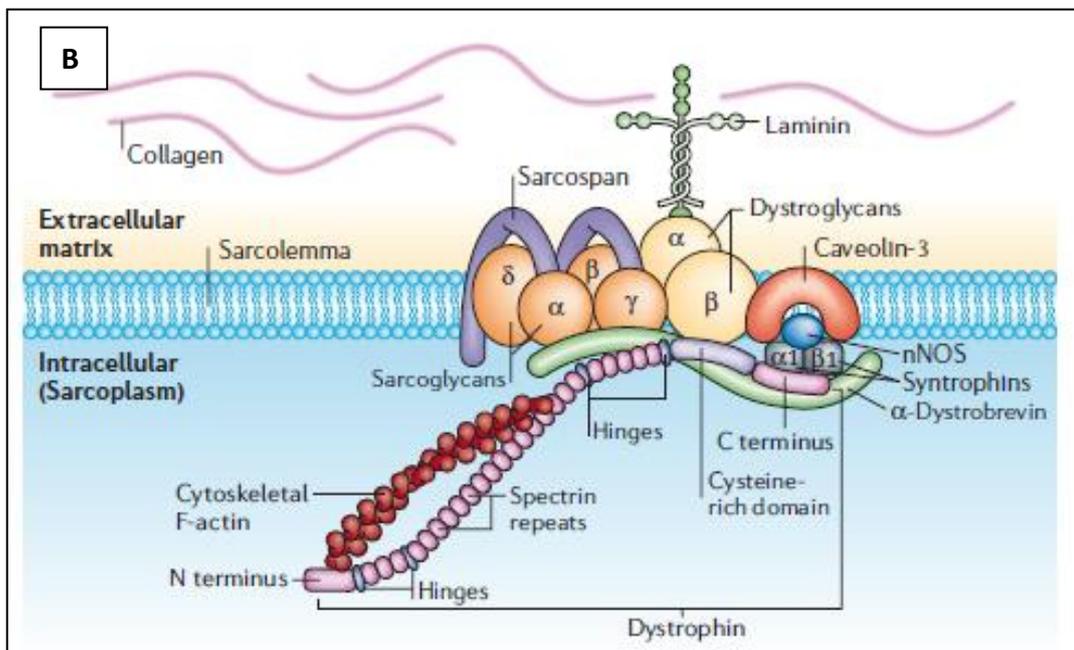
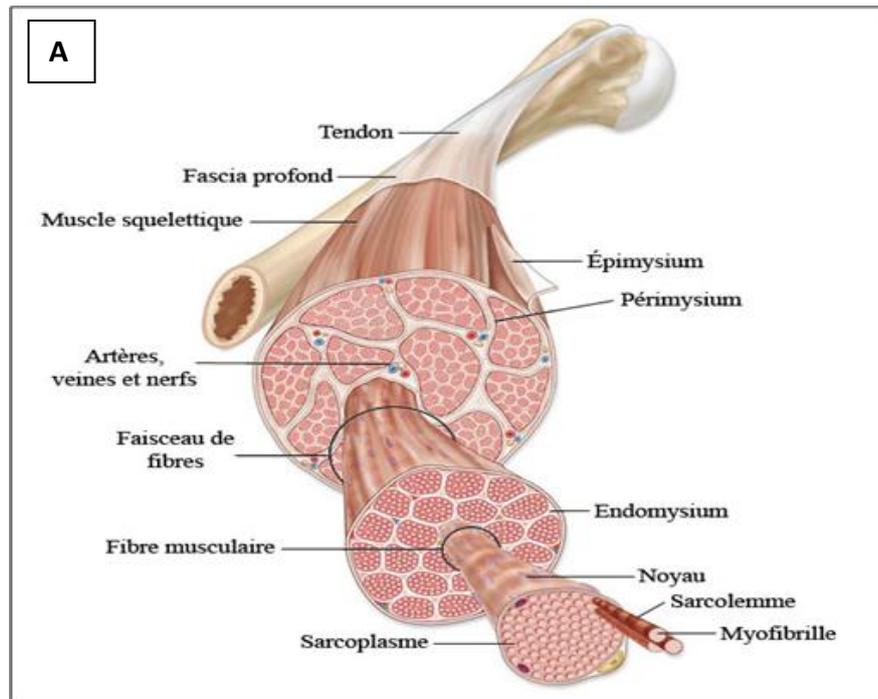
Les sarcoglycanes forment un complexe de glycoprotéines transmembranaires spécifiques du muscle squelettique et cardiaque situés dans la membrane des cellules musculaires qui

concourt à la stabilité et à la résistance mécanique de la membrane de la cellule lors des contractions musculaires. Ces glycoprotéines appelées alpha, beta, gamma, delta, epsilon et zeta-sarcoglycane ont des poids moléculaires respectifs de 50kDa, 43kDa, 35kDa, 35 kDa, 47 kDa et 37 kDa. Elles présentent de fortes similarités entre elles, mais n'ont aucune homologie avec d'autres protéines connues.

Bien que ces glycoprotéines jouent un rôle dans la signalisation intracellulaire, leur rôle physiopathologique n'est pas encore clairement élucidé.

Un déficit dans une seule des sarcoglycanes entraîne souvent la disparition du complexe entier. La fragilisation de la membrane de la fibre musculaire qui en résulte serait un des mécanismes de dégénérescence de la fibre musculaire (De Recondo et De Recondo, 2001 ; Sandona et Betto, 2009).

- ❖ **Le groupe des protéines cytoplasmiques** constitué des syntrophines ( $\alpha$ -,  $\beta$ 1-,  $\beta$ 2-), de la dystrobrevine et de la Nitric Oxyde synthase (Nos) (Blake *et al.*, 2002).



**Figure 1 : A :** Organisation du muscle squelettique

**B :** Complexe de protéines associées à la dystrophine (Davies et Nowak, 2006)

#### IV- Dystrophies musculaires des ceintures

Les dystrophies musculaires des ceintures ou LGMD pour « Limb Girdle Muscular Dystrophies » forment un groupe de pathologies génétiquement et cliniquement hétérogènes (Beckman *et al.*, 1991).

L'atteinte porte initialement sur les muscles des ceintures (pelvienne et scapulaire) et particulièrement sur les muscles proximaux aux stades précoces. Le schéma évolutif de la maladie varie considérablement, allant des formes les plus sévères avec un début précoce et une évolution rapide, à des formes modérées avec un début plus tardif et une progression plus lente (Kaplan *et al.*, 1996).

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

- Les dystrophies musculaires des ceintures de type 1, LGMD1, qui sont à transmission autosomique dominante et représentent environ 10% des LGMDs. (Bushby, 1999). Elles sont caractérisées par un début des signes à la fin de l'enfance, à l'adolescence ou à l'âge adulte ainsi que par une atteinte des muscles pelviens progressant jusqu'aux muscles de la ceinture scapulaire (Kaplan *et al.*, 1996). Il en existe sept formes selon le locus identifié (LGMD1A, LGMD1B, LGMD1C, LGMD1D, LGMD1E, LGMD1F, LGMD1G). Le gène responsable des quatre dernières formes n'a toujours pas été identifié à ce jour (**Tableau I**) (Bushby *et al.*, 2009).
- Les dystrophies musculaires des ceintures de type 2, LGMD2, qui sont à transmission autosomique récessive peuvent apparaître au début de l'enfance et parfois même à l'âge adulte. Selon le locus identifié, on peut aujourd'hui compter 15 types de LGMD2 (de la LGMD2A jusqu'à la LGMD2O) (Zatz *et al.*, 2003).

## V- Sarcoglycanopathies

Les sarcoglycanopathies sont causées, comme leur nom l'indique, par un défaut d'expression dans les gènes codants pour l'une des protéines sarcoglycanes ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - et  $\delta$ -sarcoglycanes respectivement) (Kaplan *et al.*, 1996).

La première description de dystrophies musculaires liées à une atteinte du complexe des sarcoglycanes apparut au début des années 90, au cours de l'étude d'une dystrophie musculaire de l'enfance fréquente en Afrique du Nord.

Cette dystrophie maghrébine, proche de la maladie de Duchenne, affecte autant les garçons que les filles ce qui traduisait une transmission autosomique. Les patients présentaient un déficit en un composant de 50 KDa du complexe DAP, appelé « adhaline » du mot arabe désignant le muscle. Par analyse de liaison génétique, le gène responsable de la maladie fut localisé en 13q12 et l'on considéra, à tort, qu'il s'agit du gène qui code pour l'adhaline.

Le gène responsable de la dystrophie maghrébine fut par la suite identifié comme étant celui qui code pour la  $\gamma$ -sarcoglycane et localisé en 13q12, la déficience, observée dans ce cas, en composé 50KDa ( $\alpha$ -sarcoglycane) n'étant alors que secondaire. Enfin, le gène qui code pour l'  $\alpha$ -sarcoglycane fut caractérisé et impliqué dans une autre forme de dystrophie musculaire des ceintures (De Recondo et De Recondo, 2001).

Quatre formes peuvent ainsi être individualisées en fonction du gène touché et par conséquence du déficit en sarcoglycane protéine impliqué : la LGMD2C, 2D, 2E et 2F.

### V-1- Gamma-sarcoglycanopathie (LGMD2C)

Cette forme qui apparait chez les patients présentant une altération moléculaire dans le gène *SGCG* se traduisant par un déficit protéique dans la  $\gamma$ -sarcoglycane sera détaillée plus loin.

### V-2- Alpha-sarcoglycanopathie (LGMD2D)

L'  $\alpha$ -sarcoglycanopathie (MIM 608099) est due à des mutations dans le gène *SGCA* qui a été localisé en 17q21.33. Il couvre 17kb d'ADN génomique et contient 10 exons codants pour

une protéine de 387 acides aminés, associée à la dystrophine et appartenant au complexe des sarcoglycanes.

Cette protéine de 50 kDa fut décrite en premier par Ervasti et ses collaborateurs en 1990. Elle semble avoir un rôle critique dans l'organisation et la stabilisation du complexe des sarcoglycanes.

Un nombre élevé de mutations a été identifié dans ce gène et plus particulièrement, des mutations faux-sens. De plus, un nombre important de mutations pathogènes a été retrouvé dans l'exon 3 du gène *SGCA* ; ce dernier pourrait en effet correspondre à un point chaud de mutations.

La mutation la plus fréquemment rapportée dans ce gène est une substitution (C → T) en position 229 de l'exon 3 avec remplacement d'une arginine par une cystéine en position 77 (R77C) touchant le domaine cadhérine-like de la protéine, qui joue un rôle dans l'ancrage de la dystrophine à la région sous-sarcolemmale.

Cette mutation non-sens représente un tiers des mutations dans la population européenne (Roberts *et al.*, 1994 ; Carrié *et al.*, 1997).

### **V-3- Bêta-sarcoglycanopathie (LGMD2E)**

La LGMD2E (MIM 604286) est causée par des mutations dans le gène *SGCB*, composé de 8 exons et localisé sur le chromosome 4, en 4q12. La β-sarcoglycane est une protéine de 43 kDa constituée de 318 acides aminés, avec un domaine intracellulaire (N-terminal) de 63 acides aminés, une région transmembranaire unique (acides aminés Leu64-Ile90) et un domaine carboxy-terminal extracellulaire de 228 acides aminés contenant cinq résidus Cys conservés (Cys97, 288, 290, 307 et 314) (Bonnemann *et al.*, 1996).

La Bêta-sarcoglycane est au centre du lien transmembranaire entre la dystrophine et l'α-dystroglycane. Elle se trouve le plus souvent sous forme d'un doublet A3a et A3b, constitué de protéines apparemment distinctes (Kaplan *et al.*, 1996).

Les mutations identifiées jusqu'à présent affectent le domaine extra-membranaire de la protéine. De plus, une mutation avec effet fondateur, la T151R a été mise en évidence dans une population Amish du Sud des Etats-Unis (Lim *et al.*, 1995).

#### **V-4- Delta-sarcoglycanopathie (LGMD2F)**

La LGMD2F (MIM 601287) est causée par des mutations dans le gène *SGCD* composé de 9 exons et localisé sur le chromosome 5, en position 5q33.3. La  $\delta$ -sarcoglycane est une protéine de 35 kDa et de 290 acides aminés qui est abondamment exprimée au niveau des muscles squelettiques et cardiaques, son extrémité N-terminale contient un domaine de 36 acides aminés hydrophobe cytoplasmique, suivie d'une région transmembranaire de 21 acides aminés (Phe37-Leu57) (Nigro *et al.*, 1996).

Quelques rares mutations sont présentes dans ce gène avec une mutation fondatrice chez les personnes d'ascendance africaine (Moreira *et al.*, 1998).

#### **VI- Dystrophie musculaire des ceintures à transmission autosomique récessive de type 2C ( $\gamma$ -sarcoglycanopathie)**

Des mutations dans le gène *SGCG* sont à l'origine de la gamma-sarcoglycanopathie (LGMD2C, MIM : 253700)

La LGMD2C (MIM 253700) a été initialement décrite par Ben Hamida et ses collaborateurs dans la population Tunisienne en 1977 - 1980. Cette forme de myopathie est due à des mutations dans le gène *SGCG* et semble aussi fréquente que les dystrophinopathies dans le Maghreb (Ben Othmane *et al.*, 1992).

##### **VI-1- Aspect clinique de la $\gamma$ -sarcoglycanopathie**

La gamma-sarcoglycanopathie également appelée **SCARM** pour « Severe Childhood Autosomal Recessive Muscular Dystrophy » ou Duchenne-like, présente des signes cliniques semblables à ceux des dystrophinopathies. Le début des troubles se situe entre l'âge de 3 à 12 ans et semble marqué par des chutes fréquentes, des difficultés à marcher et à monter les escaliers. L'examen clinique révèle une atteinte des muscles de la ceinture pelvienne et scapulaire, une hypertrophie des mollets, une hyperlordose et une macroglossie (Ben Hamida *et al.*, 1996 ; Kefi *et al.*, 2003).

Le processus dystrophique touche les muscles de la ceinture pelvienne dans les stades les plus précoces puis évolue progressivement jusqu'aux muscles distaux dans les stades les plus évolués de la maladie (Kaplan *et al.*, 1996).

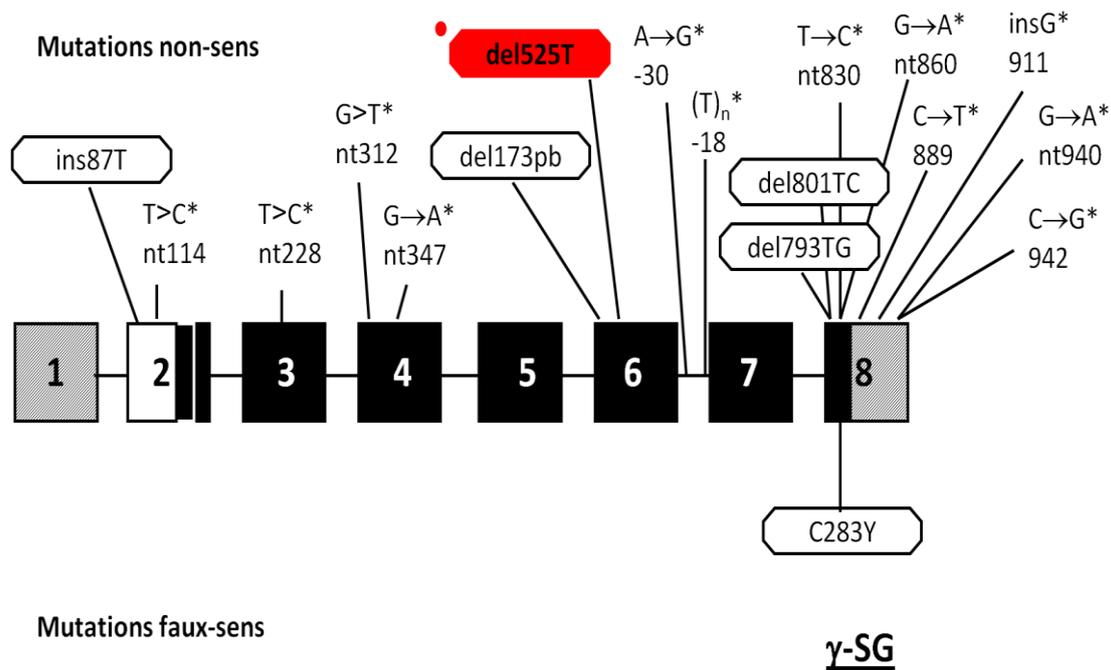
Par ailleurs, les muscles de la face et les muscles extra-oculaires ne sont jamais atteints et le cœur l'est exceptionnellement (Kefi *et al.*, 2003).

Après la perte de la marche, des complications telles qu'une scoliose ainsi que des rétractions tendineuses commencent à apparaître. Des troubles respiratoires sont souvent notés aux stades les plus avancés ce qui est à l'origine de la mort prématurée des patients atteints.

## **VI-2- Structure et organisation du gène *SGCG***

Le gène *SGCG* a été localisé sur le bras long du chromosome 13 en 13q12 dès 1992 par liaison génétique dans des familles tunisiennes par Ben Othmane et ses collaborateurs (**Figure 2**). Il est constitué de huit exons et sept introns qui occupent une longueur d'environ 144 kb (Bushby *et al.*, 2009).

Le transcrit en ARNm a une taille de 1,7 kb et ne s'exprime que dans les muscles squelettiques et cardiaques (Noguchi *et al.*, 1995). Il code pour la  $\gamma$ -sarcoglycane, une glycoprotéine sarcolemmale de 35 kDa constituée de 291 acides aminés (Bushby *et al.*, 2009).



**Figure 2 :** Spectre de mutations dans le gène *SGCG* codant pour la gamma-sarcoglycane.

Les rectangles représentent les exons, où sont individualisées les séquences correspondant au domaine transmembranaire (en noir), intracellulaire de la protéine (en blanc), et les séquences 5' et 3' non traduites (en hachuré) ; \* : Polymorphismes (Kaplan *et al.* 1996).

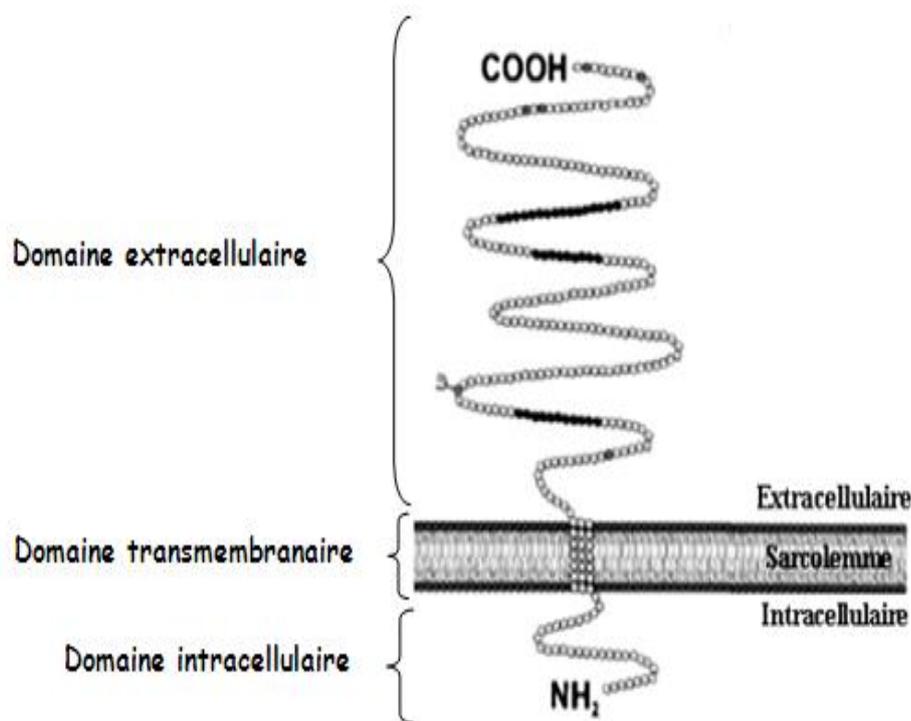
### VI-3- La protéine gamma-sarcoglycane :

La gamma-sarcoglycane appartient au complexe des sarcoglycanes, groupe de glycoprotéines appartenant au complexe sarcolemmale de protéines associées à la dystrophine (**Figure 2**). C'est une protéine qui présente environ 70 % d'homologie avec la delta-Sarcoglycane. Elle est constituée de 291 acides aminés et possède un poids moléculaire total de 35 KDa (Bushby *et al.*, 2009).

Elle est constituée d'un domaine N-terminal composé de 37 acides aminés, d'un domaine transmembranaire composé de 21 acides aminés (Ileu-38 à Val-58) et d'un domaine carboxy-terminal extracellulaire composé de 233 acides aminés. Cette protéine ne contient pas de séquence signal dans son domaine N-terminal et possède des résidus d'acides aminés chargés dans les positions 32 à 34 (RKR). Le domaine cytoplasmique contient un site de glycosylation potentiel lié à l'asparagine (Asn110) ; quant au domaine C-terminal, il est caractérisé par la

présence de quatre résidus Cys conservés (Cys265, Cys267, Cys283 et Cys290) (Noguchi *et al.*, 1995 ; Bushby *et al.*, 2009).

Elle contient un domaine cytosolique indispensable pour les interactions avec l' $\alpha$ - ou la  $\beta$ -sarcoglycane ainsi qu'un domaine EGF-like (Sandona et Betto, 2009).



**Figure 3 :** Structure et localisation de la gamma-sarcoglycane (Lim *et al.*, 1998).

#### VI-4- Les mutations affectant le gène *SGCG*

De nombreuses mutations touchant le gène *SGCG* ont été décrites (**Figure 2**). Certaines sont de type faux sens et génèrent une protéine complète avec une substitution dans un seul résidu d'acide aminé alors que d'autres provoquent un décalage du cadre de lecture et donnent naissance à une protéine tronquée (Sandona et Betto, 2009).

Parmi ces altérations, deux mutations avec effet fondateur au sein de populations à forte endogamie ont été décrites et semblent être à l'origine de la plupart des cas de gamma-sarcoglycanopathie chez celles-ci :

- La mutation c.525delT (p.Phe175LeufsX20) est la délétion d'une thymine dans l'exon 6 du gène *SGCG*. Elle conduit à une perturbation du cadre de lecture au 175<sup>ème</sup> codon et entraîne l'apparition d'un codon Stop au codon 193. Cette mutation est à forte prévalence en Afrique du Nord et conduit à la production d'une protéine tronquée dépourvue du domaine EGF-like impliqué dans les interactions avec les autres sarcoglycanes (Ben Othmane *et al.*, 1992 ; Mc Nally *et al.*, 1996 ; Crosbie *et al.*, 2000).
- La mutation c.848G>A (p.C283Y) est une mutation faux-sens au niveau de l'exon 8 retrouvée à l'état homozygote chez la population Tsigane de d'Europe occidentale et serait une mutation exclusive de ce groupe ethnique (Mc Nally *et al.*, 1996). C'est la substitution de la guanine en position 848 par une Adénine conduisant à la substitution du résidu cystéine en position 283 du domaine riche en cystéine par une tyrosine, un acide aminé situé dans le domaine EGF-like et qui semblerait crucial sur le plan fonctionnel (Piccolo *et al.*, 1996).

#### **VI-5- Diagnostic des LGMD2C**

D'une manière générale, et au cours d'un examen clinique, le médecin se fait une opinion sur le diagnostic en observant certains signes évocateurs tel que l'hypertrophie des mollets, la fréquente macroglossie et l'atteinte musculaire proximale peu sélective, qui sont des traits partagés sur le plan clinique avec les dystrophinopathies (Kaplan *et al.*, 1996).

Afin de confirmer le diagnostic de la myopathie suspectée, le médecin prescrit des examens complémentaires standards qui sont: le dosage biochimique des enzymes sériques et l'électromyogramme ce qui va permettre une meilleure orientation du diagnostic, lequel sera définitivement confirmé par des explorations plus spécifiques tel que l'étude de la biopsie musculaire et l'analyse génétique.

##### **VI-5-1- Etude para-clinique**

Face à un tableau clinique et/ou à des données généalogiques en faveur d'une dystrophie musculaire des ceintures, deux examens para-cliniques clés peuvent conforter le diagnostic de dystrophie musculaire sans pour autant permettre l'individualisation du type de myopathie :

- **Dosage de la créatine-phosphokinase (CPK) :** Un taux élevé en CPK dans le sang est le signe d'une lésion musculaire, dont l'origine peut être une maladie musculaire, un traumatisme musculaire, ou même une activité physique intense. En effet, les CPK ne sont pas, de par leurs fluctuations physiologiques et leurs manques de spécificité, un critère fiable à 100 %. Lors du dosage de cette enzyme, chez les patients atteints d'une sarcoglycanopathie, il semblerait que son taux soit supérieur à la normale.
- **Electromyographie (EMG):** Elle permet d'étudier la qualité de la contraction musculaire et de recueillir et d'analyser des signaux électriques par l'intermédiaire de fines aiguilles-électrodes implantées dans le muscle étudié. L'EMG permet de constater l'existence d'anomalies musculaires, cet examen n'est cependant pas spécifique à une forme particulière de dystrophie musculaire progressive (Ghozlane., 2001).

#### **VI-5-2- Etude de la biopsie musculaire**

Bien que certaines techniques nécessitent de disposer d'une biopsie musculaire, acte médical invasif parfois traumatisant, l'analyse histologique et immunohistochimique peuvent être nécessaire pour établir un diagnostic rapide et précis (Abbs *et al.*, 2010).

##### **❖ Analyse histologique**

L'étude histologique met en évidence les lésions tissulaires présentes au niveau du tissu musculaire. Un petit échantillon est prélevé et examiné par microscopie. En présence d'une dystrophie, il montre des fibres musculaires de dimensions anormalement grandes.

A mesure que la maladie progresse, le tissu musculaire nécrosé se trouve également remplacé par du tissu gras ou d'autres types de tissus. (De Recondo J. et De Recondo A-M., 2001 ; Abbs *et al.*, 2010 ; Soltanzadeh *et al.*, 2010)

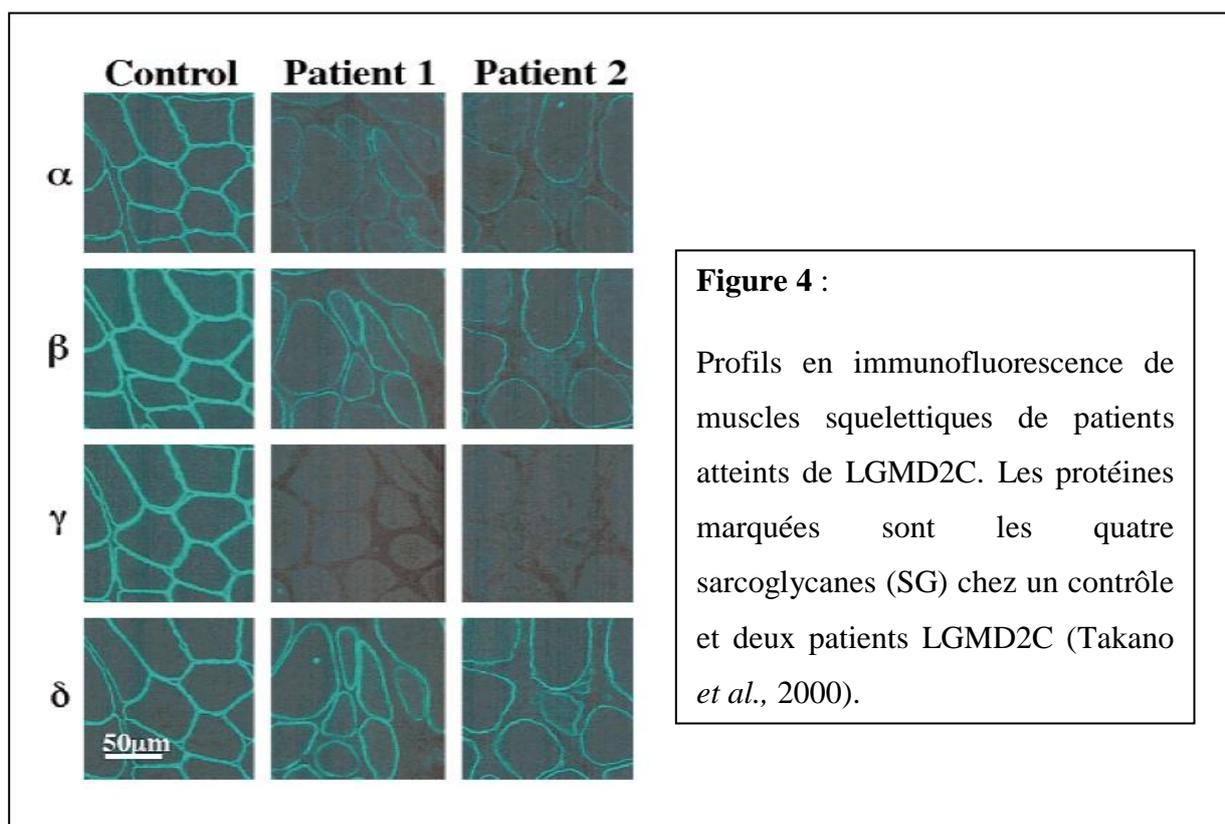
La pratique des techniques d'immunohistochimies et de Western blot à partir de cette même biopsie permettra d'identifier la protéine déficiente.

### ❖ Analyse immunohistochimique

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

En utilisant des anticorps spécifiquement dirigés contre les sarcoglycanes, une aide considérable peut être apportée au diagnostic des sarcoglycanopathies. Dans le cas de la gamma-sarcoglycanopathie, cette approche vise à rechercher l'absence d'expression de la  $\gamma$ -sarcoglycane dans le sarcolemme.

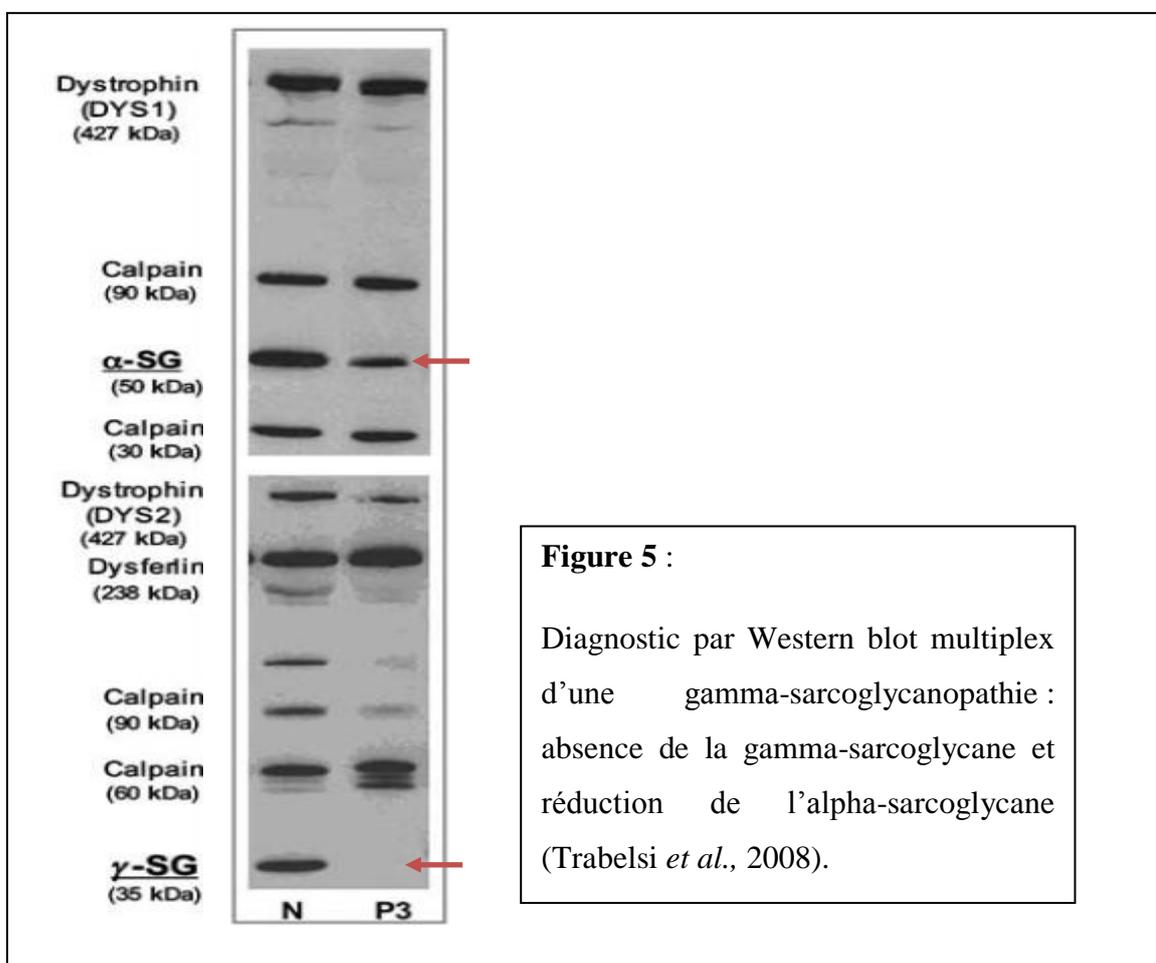
L'absence de marquage pour cette protéine peut également être accompagnée par l'absence ou la réduction d'expression des autres sarcoglycanes, en particulier, l' $\alpha$ -sarcoglycane (*figure 4*) (Petiot et Urtizbera, 2004).



### ❖ Diagnostic par Western Blot

Le western blot est une technique d'immuno-marquage permettant d'affiner le résultat diagnostique apporté par l'immuno-histochimie et de mettre en évidence un déficit protéique non révélé par celle-ci. C'est une méthode qui permet l'évaluation semi quantitative et qualitative du déficit musculaire à partir d'extraits protéiques issus de biopsies musculaires.

Le système de Western Blot multiplex dans lequel la plupart des protéines musculaires couramment affectées dans les DMP peuvent être analysées simultanément est très efficace pour déterminer l'atteinte protéique primaire dans les sarcoglycanopathies. En effet, une absence d'expression de la gamma-sarcoglycane, associée à une anomalie dans l'expression des autres sarcoglycanes et plus particulièrement l' $\alpha$ -sarcoglycane, est en faveur d'un diagnostic de  $\gamma$ -sarcoglycanopathie (*figure 5*) (Pelissier et Urtizbera, 1996).



### **VI-5-3- Analyse génétique**

Les progrès réalisés au cours de ces dernières années en biologie moléculaire ont permis une meilleure détection des altérations génétiques chez les patients atteints de maladies génétiques et les formes apparentées.

Pour un patient atteint d'une sarcoglycanopathie par exemple, cette exploration se fait généralement par séquençage direct du gène. Cependant, cette recherche n'est malheureusement pas toujours possible et disponible (mutations trop nombreuses).

Dans ce type de situation, un contexte clinique particulier peut permettre d'orienter la recherche diagnostique. Par exemple, devant un cas d'origine maghrébine présentant une dystrophie musculaire des ceintures à transmission autosomique récessive avec un phénotype clinique Duchenne-like ou Becker-like, la recherche de l'altération génétique en cause sera orientée d'emblée vers le gène *SGCG* et la mise en évidence de la mutation avec effet fondateur, la c.525delT (Mc Nally *et al.*, 1996). Cette mutation peut être facilement détectée par la technique SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) ou par séquençage direct de l'exon 6 du gène *SGCG* la renfermant (Kaplan *et al.*, 1996).

### **VI-6- Perspectives thérapeutiques des sarcoglycanopathies**

Au cours de ces dernières années, plusieurs approches thérapeutiques ont été développées afin de corriger le défaut génétique, restaurer une expression fonctionnelle de la protéine, ralentir la progression de la pathologie et améliorer la qualité de vie des patients atteints de sarcoglycanopathies. Cependant, aucun traitement curatif pour ces pathologies n'existe aujourd'hui (Van Deutekom et Van Ommen, 2003 ; Chakkalakal *et al.*, 2005 ; Nowak et Davies, 2004).

#### **➤ Approche génétique ou thérapie génique**

La thérapie génique consiste en l'introduction d'une copie du gène *SGCG* dans la fibre musculaire afin de restaurer la fonction musculaire. L'efficacité d'une telle stratégie dépend de l'expression durable du transgène qui doit diffuser aussi largement que possible, de la

nécessité de traiter les différents muscles atteints et de limiter au maximum les réactions immunitaires (Pichavant *et al.*, 2011).

La taille réduite de l'ADNc des gènes codants pour les sarcoglycanes facilite l'insertion de celui-ci dans un vecteur d'expression approprié. Cette approche a été testée sur tous les modèles animaux de sarcoglycanopathies et les meilleurs résultats ont été observés pour le vecteur non pathogène « AAV » (adenoassociated virus) surtout lorsqu'il a été injecté avant le développement et l'apparition de la pathologie (Sandona et Betto, 2009).

### ➤ Approche cellulaire

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

Les tentatives d'implantations de cellules pluripotentes pour le traitement de la  $\delta$ -sarcoglycan se sont soldés par un échec (Lapidos *et al.*, 2004) alors que l'implantation des cellules satellites musculaires ont été plus efficaces (Wallace *et al.*, 2008).

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

### ➤ Approche pharmacologique

Les approches pharmacologiques visant à traiter les sarcoglycanopathies sont devenues une alternative à la thérapie génique. En effet, ces stratégies incluent les traitements anti-inflammatoires, ceux qui compensent la perte musculaire et font face aux mécanismes

physiopathologiques ou encore ceux qui suppriment les codons Stop (Van Deutekom et Van Ommen, 2003 ; Chakkalakal *et al.*, 2005 ; Nowak et Davies, 2004 ; Khurana et Davies, 2003).

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

A titre d'exemple, la thérapie chaperonne représente une approche thérapeutique et stratégique innovante visant à stabiliser la protéine mutée. Elle se base sur l'utilisation de petites molécules, comme le glycérol, le diméthylsulfoxyde, le 4-phénylbutyrate ou le triméthylamine qui sont des chaperones chimiques créant un environnement plus favorable à la stabilité du repliement et de l'assemblage des protéines mutées. Cependant, l'efficacité de ces molécules implique leur utilisation à des concentrations très élevées, une condition qui permet rarement leur emploi dans les essais cliniques (Loo et Clarke, 2007). Cependant, les chaperones pharmacologiques semblent plus utiles que les chaperones chimiques parce qu'elles agissent d'une manière plus spécifique, sont moins toxiques et peuvent être employées à des doses élevées (Loo et Clarke, 2007). Une chaperonne pharmacologique idéale est une molécule qui interagit avec le site fonctionnel de la protéine mutée et la stabilise jusqu'à son adressage à la membrane cellulaire.

## I- Données cliniques

Le travail que nous avons réalisé consistait à analyser un panel de 10 patients Algériens qui nous ont été adressés par les hôpitaux d'Alger pour une étude génétique visant à poser un diagnostic précis sur la nature moléculaire de l'atteinte suspectée cliniquement.

Ce panel était constitué de 6 garçons et de 4 filles présentant des signes cliniques en faveur d'une dystrophie musculaire des ceintures (**Tableau II**). Notre travail a consisté à rechercher la mutation c.525delT dans le gène *SGCG* par une approche PCR-Séquençage.

Il est à noter également que pour les garçons analysés, la dystrophinopathie a été exclue par PCR multiplex.

**Tableau II** : Données cliniques disponibles pour les patients explorés.

(M, sexe masculin ; F, sexe féminin ; LGMD2C, Dystrophie musculaire des ceintures de type 2C)

Patients	Sexe	Age (ans)	Phénotype clinique
P-1	M	12	Duchenne-like
P-2	M	25	Becker-like
P-3	M	5	LGMD2C
P-4	F	13	LGMD2C
P-5	F	12	LGMD2C
P-6	F	14	LGMD2C
P-7	M	14	Duchenne-like
P-8	F	15	Duchenne-like
P-9	M	15	Duchenne-like
P-10	M	27	Becker-like

## II- Méthodes

### 1. Extraction d'ADN génomique total à partir du sang périphérique par la méthode de « salting-out »

Afin d'arriver au diagnostic génétique direct de  $\gamma$ -sarcoglycanopathie suspectés chez nos patients il nous fallait d'abord, extraire l'ADN génomique total de chaque patient à partir du sang périphérique. Pour cela, nous avons fait appel à la méthode d'extraction par relavage salin « salting out », une technique qui nécessite l'utilisation des solutions suivantes :

- Solution SLR, une Solution de Lyse des Globules Rouges (10 mM Tris, à PH 7.6 ; 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaCl).
- Solution SLB, une Solution de Lyse des Globules Blancs (10 mM Tris, à PH 7.6 ; 10 mM EDTA, à PH = 8 ; 10 mM NaCl).
- Le SDS à 10 %.
- Une PK (Protéinase K) à 20mg/ml.
- L'éthanol à 100 %.
- L'éthanol à 70 %.
- Le NaCl 6 M.
- Tampon TE (10 mM Tris, à PH = 7.6 ; 1 mM EDTA, à PH = 8) ou bien l'eau distillée.

Pour nos extractions, nous avons procédé selon la démarche qui suit :

- On a prélevé 5 à 10 ml de sang, pour chaque patient, dans un tube contenant préalablement un anticoagulant ;
- On a transféré le sang dans un tube de 50 ml ;
- On a rempli le tube jusqu'à 45 ml, en complétant avec la solution SLR glacée, on mélange puis on met les tubes dans de la glace pendant 20 min ;
- On centrifuge à 5000 TPM pendant 15 mn à 4°C, ensuite on élimine les globules rouges lysés en éliminant le surnageant ;
- On répète le lavage à la solution SLR et la centrifugation jusqu'à éclaircissement du culot (composé de globules Blancs et de débris cellulaires) ;

- On re-suspend ce dernier dans 2 ml de solution SLB, puis on ajoute 300 µl de SDS à 10 % et 10 µl de PK à 20 mg/ml ;
- On incube pendant toute une nuit à 37°C sous agitation ;
- Après incubation, on ajoute 1 ml de NaCl à 6 M puis on agite vigoureusement pendant 15 à 20 secondes ;
- Une centrifugation à 5000 TPM pendant 15 mn à 4°C, est nécessaire pour récupérer le surnageant, qui devra être transféré dans un tube de 50 ml ; auquel on ajoute 2 volumes d'éthanol absolu 100 % glacé et qui sera mélangé doucement par retournement, jusqu'à apparition de la méduse d'ADN ;
- On récupère la méduse d'ADN avec une pipette pasteur et on la transfère dans un tube de 1.5 ml ;
- On réalise deux ou trois lavages de la méduse, avec 1ml d'éthanol 70 % ; puis on élimine l'éthanol et on laisse l'ADN sécher à une température ambiante ;
- Enfin, on rajoute de l'eau distillée ou du Tampon TE et on laisse notre méduse se re-suspendre à 4°C.

## **2. Estimation de la quantité et de la qualité de l'ADN**

Après l'extraction de l'ADN, la quantification et l'estimation de la qualité de celui-ci est une étape très importante et déterminante pour la suite de notre travail. Pour se faire, une électrophorèse sur gel d'agarose en présence d'une gamme de concentrations a été effectuée.

### **a) Principe :**

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une méthode qui permet la révélation des différents acides nucléiques. Son principe consiste à faire migrer l'ADN sur un support : le gel d'agarose, préparé préalablement, et immergé dans une solution tampon.

L'ADN comme étant un poly-anion, déposé à une extrémité (cathode), migre sous l'effet d'un champ électrique, vers l'autre extrémité (l'anode). La vitesse de migration dépend, entre autre, de la taille des molécules d'ADN.

Le Bromure d'Éthidium, un agent intercalant (s'intercale entre les bases nucléiques), permet de visualiser les bandes d'ADN fluorescentes, sous la lumière UV.

Afin de réaliser notre électrophorèse, nous avons utilisé les solutions suivantes :

- Tampon TBE 0.5x (89 mM Tris, 89 mM Acide borique, 2 mM EDTA, pH 8.0).
- Bromure d'éthidium (10 mg/ml).
- Bleu de dépôt (0.05% Bleu de bromophénol, 60 % Glycérol).
- ADN phage  $\lambda$  (50 ng/ $\mu$ l) (utilisé pour réaliser une gamme permettant d'évaluer la concentration de l'ADN extrait).

**b) Mode opératoire :**

- 1) Préparer un gel d'agarose à 1% (0.7g d'agarose dans 70 ml de tampon TBE) contenant 0.5  $\mu$ g/ml de Bromure d'éthidium.
- 2) Préparer les échantillons de cette façon :

1  $\mu$ l d'ADN génomique

+ 2  $\mu$ l de Bleu de dépôt

+ 10  $\mu$ l d'H<sub>2</sub>O

- 3) Préparer une gamme de concentration d'un ADN  $\lambda$  (50 ng/ $\mu$ l, 100 ng/ $\mu$ l, 200ng/ $\mu$ l, 400 ng/ $\mu$ l).
- 4) Déposer les échantillons et la gamme de concentration dans les puits et laisser migrer à 100 V pendant 45 min.
- 5) Révéler l'ADN par exposition du gel sous rayons UV dans un transilluminateur.

**3. Amplification de l'exon 6 du gène SGCG par PCR :**

**a) Principe :**

La réaction de polymérisation en chaîne, ou ce qu'on appelle PCR (Polymerase Chain Reaction), est une technique qui permet d'amplifier une séquence d'ADN in-vitro par

répétition d'un cycle de 3 réactions conduisant à la production de milliers voire, des millions de copies d'ADN. Il s'agit de réaliser une succession de réactions à partir d'une matrice double brin ADN, chaque réaction met en œuvre deux amorces, forward et reverse choisies de façon à encadrer la séquence d'ADN et capables de s'hybrider de façon spécifique sur les deux brins d'ADN à amplifier. La phase d'élongation du brin complémentaire est elle, assurée par la *Taq polymérase*, une polymérase thermostable isolée à partir d'une eubactérie thermophile vivant dans les sources chaudes (Mullis *et al.*, 1994).

La réaction PCR se déroule en une suite répétée de cycles composés chacun de trois étapes:

- L'étape de **dénaturation**, est réalisée à environ 95°C pour une dissociation complète des deux brins d'ADN après rupture des liaisons hydrogènes (matrices simple brin).
- L'étape **d'hybridation** se fait à une température qui sera définie selon la nature des amorces (cette température varie de 50 à 60°C pendant 15 à 60 sec). Les amorces en larges excès, s'hybrident dès lors qu'elles rencontrent les séquences complémentaires.
- L'étape de **polymérisation ou élongation** est réalisée pendant 15 sec à 2 min à une température de 72°C, température à laquelle la taq-polymérase est active. Au cours de cette étape, les brins complémentaires d'ADN sont synthétisés à partir des extrémités 3'OH libre des amorces hybridées.

Dans notre travail, nous avons utilisé les solutions suivantes afin d'amplifier l'exon 6 du gène *SGCG*, siège de la mutation c.525delT :

- Tampon de la *Taq* polymerase 10x.
- dNTPs (Mélange de : dTTP, dATP, dGTP, dCTP, à 10 mM chacun).
- Amorces *ex6\_SGCG\_forward* et *ex6\_SGCG\_reverse* (permettant d'amplifier l'exon 6 du gène *SGCG*) (Mc Nailly *et al.* 1996).
- *Taq* polymerase Roche® (5 U/μl).
- H<sub>2</sub>O ultra pure.

- ADN génomique des patients.

**b) Mode opératoire :**

Dans notre travail, les réactions d'amplification par PCR, ont été réalisées dans un volume final de 25 µl chacun, contenant :

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

Les réactions PCR ont été effectuées à l'aide d'un « thermocycler » programmé en respectant les données suivantes :

- 94°C, 5 min.
- [94°C, 30 sec - 57°C, 30 sec - 72°C, 30 sec] x 35
- 72°C, 10 min
- 4°C, ∞

**4. Contrôle des produits d'amplification :**

Le contrôle des produits d'amplification se fait par électrophorèse sur gel d'agarose afin de s'assurer que la technique s'est déroulée correctement et ceci dans le but de vérifier que le produit d'amplification est bien présent et qu'il est à la taille attendue soit 198 pb, tout en s'assurant qu'il n'y ai aucune contamination dans notre produit final.

**a) Solutions utilisées**

- Tampon TBE 1x (89 mM Tris, 89 mM Acide Borique, 2 mM EDTA, à PH = 8).
- Le Bromure d'éthidium (10 mg/ml, Promega®).

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

**b) Mode opératoire :**

On prépare un gel d'agarose à 1.5 % dans un Tampon TBE 1 x, et on ajoute le Bromure d'Ethidium.

On prépare les échantillons en mettant 10 µl de produits d'amplification, puis on ajoute 3 µl de Bleu de dépôt.

On prépare un marqueur de différents poids moléculaires puis on dépose les échantillons chacun dans un puits du gel, et on laisse migrer pendant 40 min sous tension de 100 V.

Enfin, la visualisation de notre produit PCR se fait en exposant le gel sous rayons UV, et là on peut apprécier notre amplification.

**5. Séquençage et analyse des séquences**

Après amplification de l'exon 6 du gène *SGCG*, un séquençage direct de cet exon a été réalisé sur un séquenceur de type ABI 3130XL au niveau de l'hôpital Pitié-Salpêtrière à Paris.

Les chromatogrammes obtenus ont été analysés en utilisant la version 2.1 du logiciel Chroma Lite et les profils obtenus ont été comparés à la séquence de référence du gène *SGCG* humain (NM\_000231.2) afin de déterminer la présence ou non de la mutation c.525delT.

## **I- Analyse clinique et généalogique**

Dans le cadre de notre travail, nous avons eu à analyser l'ADN de dix patients, quatre ayant été diagnostiqués atteints d'une dystrophie musculaire des ceintures à transmission autosomique récessive de type 2C sur un plan clinique. Ces patients n'avaient aucun lien de parenté et provenaient de différents hôpitaux d'Alger centre. Nous avons pour objectif de confirmer ou d'infirmer leur diagnostic sur un plan génétique.

Les patients ont été sélectionnés pour les critères suivant :

- 1- La maladie affectait aussi bien les garçons que les filles et ceci est en accord avec le mode de transmission autosomique de la pathologie.
- 2- Le début des symptômes se situait au cours de la première décennie et se caractérisait par l'existence d'une atteinte des muscles de la ceinture pelvienne et scapulaire plus importante au niveau des muscles proximaux, se traduisant par des chutes fréquentes et des difficultés à marcher.
- 3- L'histoire familiale a révélé que sept d'entre eux (P-4, P-5, P-6, P-7, P-8, P-9, et P-10) étaient issus de mariages consanguins.
- 4- L'exclusion d'une éventuelle dystrophinopathie (phénotypiquement proche voir semblable à une LGMD2C) chez tous les garçons du panel par la recherche des délétions intra-géniques les plus fréquemment retrouvées dans le gène *DMD* par PCR multiplex et ce, qu'ils soient issus de mariages consanguins ou non.

L'ensemble de ces critères, en plus de la forte prévalence en Algérie de cette forme de dystrophie nous ont incité à rechercher la présence ou non de la mutation avec effet fondateur, la c.525delT dans le gène *SGCG*.

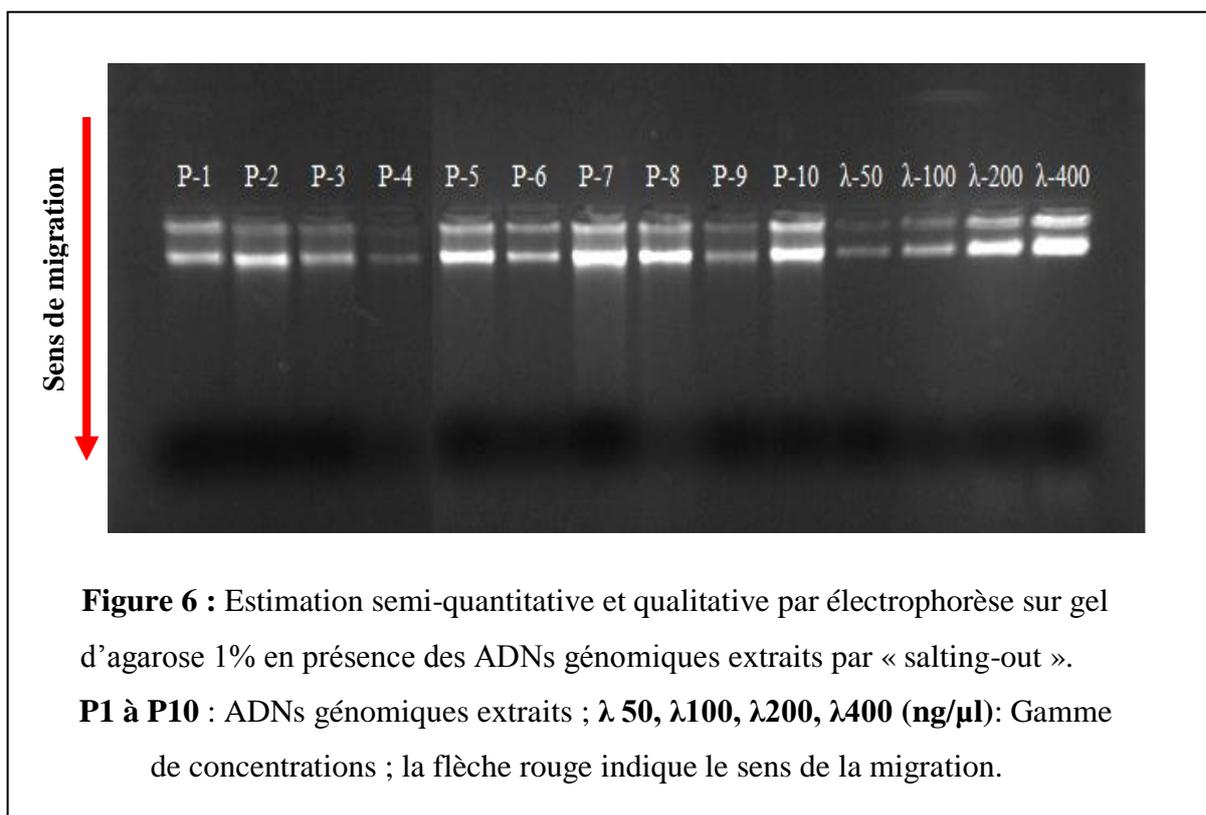
## **II- Estimation qualitative et semi-quantitative de l'ADN extrait**

L'obtention de l'ADN des patients qui ont fait l'objet de ce mémoire représentait une étape clé puisque ce dernier est le matériel génétique à partir duquel les anomalies moléculaires aboutissant à l'apparition d'une maladie génétique peuvent être identifiées.

La première étape pour la réalisation de ce travail consistait donc en l'extraction de l'ADN des patients, puis à s'assurer qu'il est de bonne qualité et en quantité suffisante pour poursuivre nos manipulations.

A partir d'un prélèvement sanguin, réalisé sur des tubes contenant un anticoagulant de type EDTA, une extraction de l'ADN des 10 patients a été effectuée par relargage salin « Salting-Out ». Notre choix s'est orienté vers cette technique du fait de sa simplicité, sa rapidité, son coût réduit, sa non toxicité mais aussi parce qu'elle permettait d'obtenir une concentration en ADN suffisante pour la suite des explorations et pour mener à terme cette approche diagnostique.

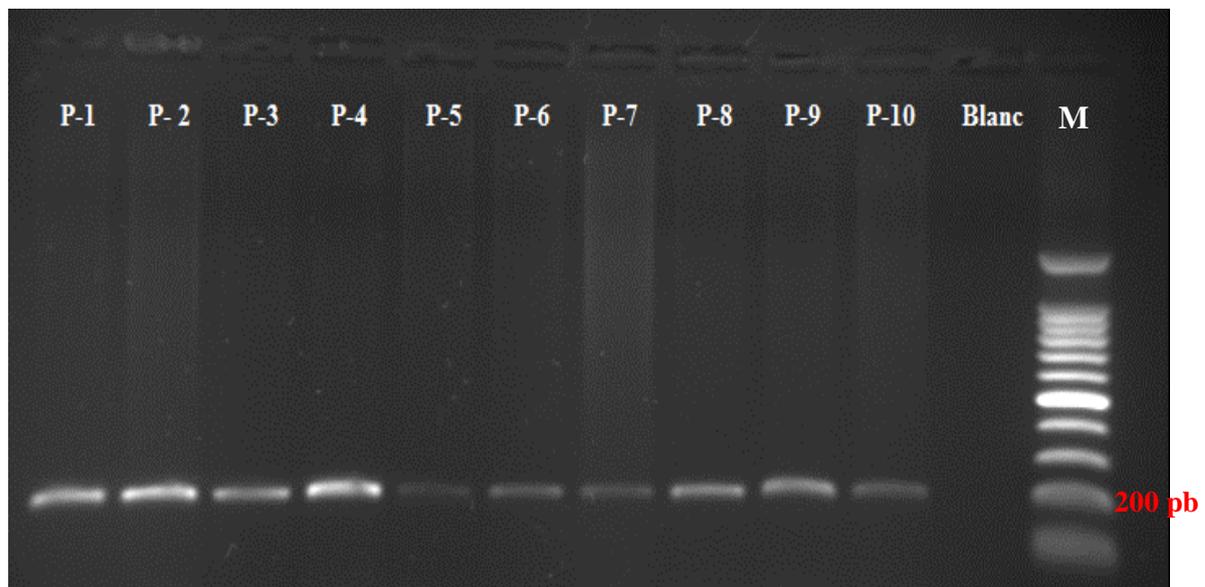
En effet, une électrophorèse sur gel d'agarose à 1% nous a permis de visualiser le résultat de nos extractions (**Figure 6**). La présence d'une bande unique, nette, intense et non dégradée dans ces échantillons, en plus de l'absence de débris dans les puits de dépôt témoigne de la bonne qualité des extraits. De plus, la comparaison de ces bandes d'ADN génomique à une gamme de concentration d'ADN lambda contrôle (50, 100, 200 et 400 ng/μl) indique concentration variable en ADN allant de 50 à plus de 200 ng/μl d'un individu à l'autre, concentrations suffisamment importantes pour poursuivre nos explorations moléculaires.



### III- Amplification par PCR de l'exon 6 du gène *SGCG* siège de la mutation c.525delT

Une fois l'ADN des patients extrait et contrôlé, l'amplification de l'exon 6 du gène *SGCG* a pu être réalisée par PCR en utilisant deux amorces spécifiques : *ex6\_SGCG\_forward* et *ex6\_SGCG\_reverse*, cet exon étant le siège de la mutation récurrente c.525delT, la plus fréquemment rencontrée en Afrique du Nord, et notamment en Algérie.

Afin de s'assurer que l'amplification des séquences cible a bien été réalisée, tous nos produits PCR ont été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose à 1.5 % en présence de bromure d'éthidium. La **figure 7** illustre le résultat de nos amplifications qui semblent correspondre à la taille attendue, soit 198 pb. De plus, aucune bande aspécifique et aucun produit parasite ne sont apparus sur le gel d'agarose.

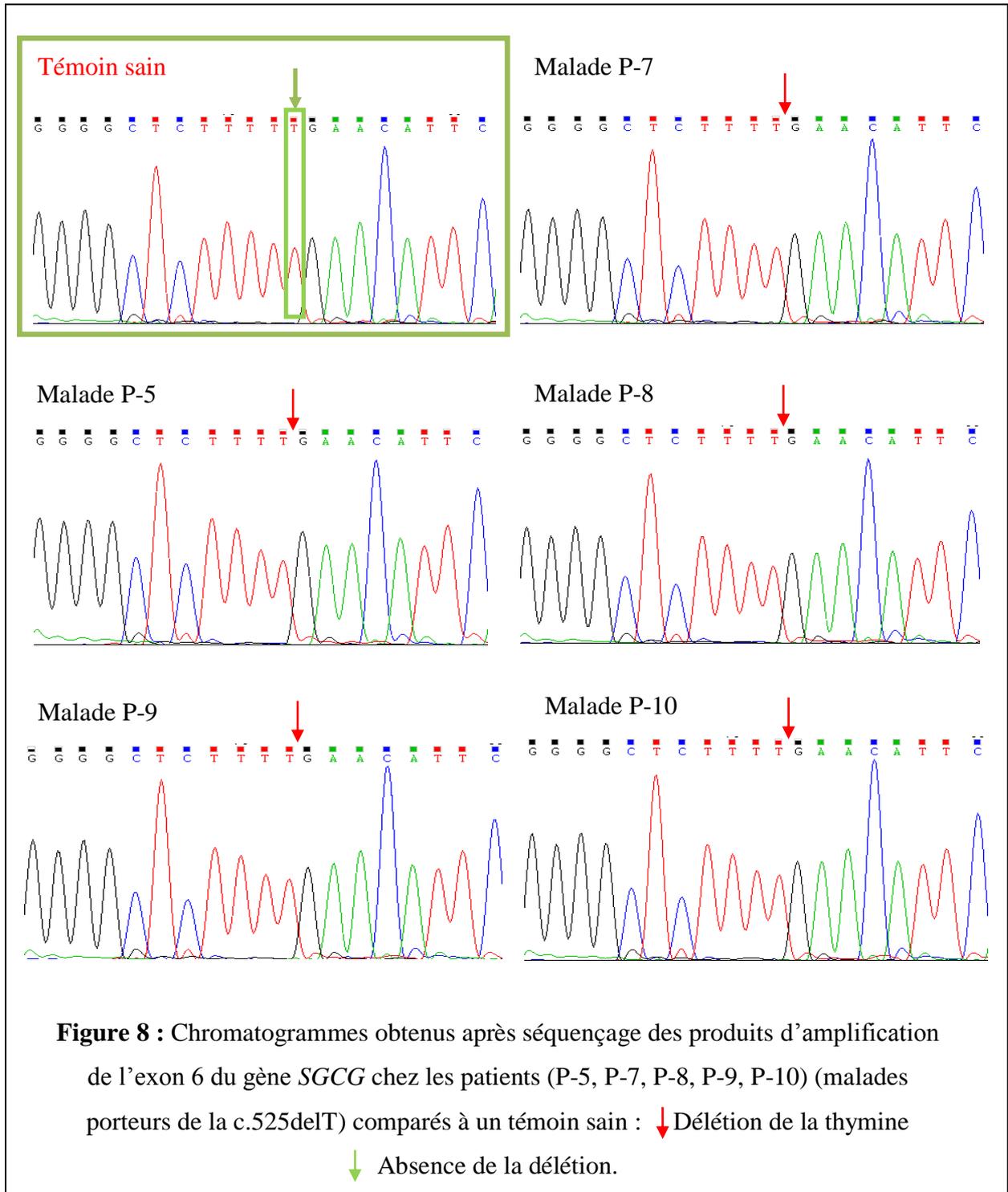


**Figure 7** : Illustration de la migration électrophorétique du produit PCR sur gel d'agarose 1,5 % en présence de bromure d'éthidium, **P-1 à P-10** : patients testés et **M** : Marqueur de taille 100pb lader.

#### **IV- Mise en évidence par séquençage de la mutation c.525delT touchant le gène *SGCG***

Les produits d'amplification de l'exon 6 générés par PCR ont été séquencés sur un séquenceur de type ABI 3130XL au niveau de l'hôpital Pitié-Salpêtrière à Paris. L'analyse des chromatogrammes obtenus a été effectuée en utilisant le logiciel Chroma Lite. Afin de déterminer la présence ou non de la mutation c.525delT, les profils obtenus ont été comparés à la séquence de référence du gène *SGCG* humain (NM\_000231.2).

L'analyse des séquences a mis en évidence la mutation à l'état homozygote, défini par une délétion d'une thymine en position 525 dans l'exon 6 du gène *SGCG*, chez cinq patients, dont 2 filles (P-5 et P-8) et 3 garçons (P-7, P-9 et P-10), ce qui nous permet de poser un diagnostic génétique clair de LGMD2C pour ces individus (**Figure 8**).



Plusieurs cas de sarcoglycanopathies ont été décrit de part le monde et malgré ce caractère de distribution ubiquitaire, la plupart d'entre eux surviennent dans un groupe de population caractérisé par une forte endogamie. C'est le cas de la communauté des Amishs de l'Indiana par exemple chez qui une mutation avec effet fondateur a été identifiée dans le gène *SGCB* (Lim *et al.*, 1995).

La gamma-sarcoglycanopathie quant à elle, concerne plus particulièrement deux groupes ethniques: les populations à forte endogamie du pourtour méditerranéen et les Tziganes vivant en Europe. Dans certaines contrées, comme le Maroc ou l'Algérie, elles peuvent même représenter jusqu'à la moitié des cas de dystrophie musculaire autosomique récessive. C'est pourquoi devant l'origine Algérienne de nos patients l'analyse diagnostique s'est tout naturellement orientée vers la recherche de la délétion c.525delT à l'état homozygote.

L'établissement d'un diagnostic clair et la caractérisation de la maladie au plan moléculaire chez 5 de nos patients sera d'une grande utilité pour une bonne prise en charge du malade mais aussi afin d'apporter un conseil génétique aux familles à risque.

Cependant, sur l'ensemble des patients étudiés 5 étaient tout aussi malades mais négatifs pour la mutation recherchée. Pour ces cas-là (P-1, P-2, P-3, et P-6), plusieurs hypothèses peuvent être posées (**Tableau III**) :

- ✓ Il est possible que d'autres formes de dystrophies musculaires des ceintures soient en cause, comme d'autres sarcoglycanopathies.
- ✓ Il est possible mais peu probable que d'autres mutations touchant le gène *SGCG* puissent être impliquées.
- ✓ Il n'est pas à exclure que d'autres mutations qui n'ont pas été recherchées dans le gène *DMD* soient responsables du phénotype décrit.
- ✓ L'implication d'un nouveau locus/gène, non encore identifié à l'heure actuelle, qu'il serait intéressant de rechercher par analyse de liaison ou approche gène candidat.

Pour ces patients là, nous devons approfondir nos explorations afin d'orienter notre diagnostic et d'aboutir à une caractérisation de la mutation en cause. Une approche intéressante qui nous permettrait de répondre à nos interrogations quant à l'altération

moléculaire recherchée est l'étude de la biopsie musculaire soit par immuno-histochimie ou par Western-Blot multiplex, deux méthodes qui se basent sur l'utilisation d'anticorps dirigés contre les différentes protéines musculaires et qui permettent de mettre en évidence un déficit d'intensité variable semi-quantitatif et/ou qualitatif pour une protéine ou une autre. Cette approche permet d'arriver à des diagnostics inattendus chez des patients présentant des tableaux cliniques parfois atypiques; et peut parfois conduire à la description de sous groupes cliniques présentant des anomalies caractéristiques dans l'expression des protéines avec une altération génétique encore inconnu (Bushby *et al.*, 1999).

Enfin, les grandes similitudes cliniques entre les différentes formes de dystrophies musculaires progressive combiné à l'ambiguïté soulevée par un examen clinique parfois incomplet suggère que nos patients soient réexaminés pour une éventuelle réorientation du diagnostic.

**Tableau III** : Résultats obtenus chez les patients après séquençage des produits d'amplification du gène SGCG

(M, Masculin ; F, Féminin ; LGMDC, Gamma-sarcoglycanopathie ; BMD, Dystrophie musculaire de Becker ; DMP, Dystrophie musculaire progressive)

Patients	Sexe	Age (ans)	diagnostic clinique	Diagnostic moléculaire
P-1	M	12	Duchenne-like	PCR-séquençage : Absence de la mutation c.525delT dans le gène SGCG
P-2	M	25	Becker-like	PCR-séquençage : Absence de la mutation c.525delT dans le gène SGCG
P-3	M	5	LGMD2C	PCR-séquençage : Absence de la mutation c.525delT dans le gène SGCG
P-4	F	13	LGMD2C	PCR-séquençage : Absence de la mutation c.525delT dans le gène SGCG
<b>P-5</b>	F	12	<b>LGMD2C</b>	PCR-séquençage : <b>Présence</b> de la mutation c.525delT dans le gène SGCG
P-6	F	14	LGMD2C	PCR-séquençage : Absence de la mutation c.525delT dans le gène SGCG
<b>P-7</b>	M	14	<b>Duchenne-like</b>	PCR-séquençage : <b>Présence</b> de la mutation c.525delT dans le gène SGCG
<b>P-8</b>	F	15	<b>Duchenne-like</b>	PCR-séquençage : <b>Présence</b> de la mutation c.525delT dans le gène SGCG
<b>P-9</b>	M	15	<b>Duchenne-like</b>	PCR-séquençage : <b>Présence</b> de la mutation c.525delT dans le gène SGCG
<b>P-10</b>	M	27	<b>Becker-like</b>	PCR-séquençage : <b>Présence</b> de la mutation c.525delT dans le gène SGCG

## Conclusion

Le diagnostic des LGMD2C dans la population algérienne reste simple du fait de sa forte prévalence ainsi que de la présence d'une mutation majoritaire, à effet fondateur qui affecte l'exon 6 du gène *SGCG*, la c.525delT qui peut être aisément détectée par une approche moléculaire PCR-séquençage et ceci appuie la nécessité de la cribler en priorité dans notre population.

Les explorations moléculaires du gène *SGCG* que nous avons eues à réaliser dans le cadre de ce mémoire ont porté sur un ensemble de patients Algériens et nous ont permis de constater que :

- 5/10 patients présentant les symptômes cliniques d'une dystrophie musculaire des ceintures de type 2C présentaient la délétion c.525delT du gène *SGCG* à l'état homozygote.
- Pour les 5 autres patients chez qui aucune mutation n'a été mise en évidence, il conviendrait d'explorer d'autres gènes tout en envisageant de revenir vers les cliniciens pour un autre examen et une meilleure orientation du diagnostic.

## *Références bibliographiques*

- Aartsma-Rus, A., Judith, T.C., Fokkema, F., Van Ommen, B., et Johan, T. (2006). Entries in the leiden duchenne muscular dystrophy mutation database : an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. *Muscle Nerve*. **34** : 135-144.
- Beckmann, J.S., Richard, I., Hillaire, D., Broux, O., Antignac, C., Bois, E., Cann, H., Cottingham, R.W.Jr., Feingold, N., et Feingold, J. (1991) A gene for limb-girdle muscular dystrophy maps to chromosome 15 by linkage. *C R Acad Sci III*. **312**: 141-8.
- Ben Othmane, K., Ben Hamida, M., Pericak-Vance, M. A., Ben Hamida, C., Blel, S., Carter, S. C., Bowcock, A. M., Petruhkin, K., Gilliam, T. C., Roses, A. D., Hentati, F., et Vance, J. M. (1992) Linkage of Tunisian autosomal recessive Duchenne-like muscular dystrophy to the pericentromeric region of chromosome 13q. *Nature Genet*. **2**: 315-317.
- Bonnemann, C., Passos-Bueno, M.R., McNally, E.M., Vainzof, M., Moreira, E.S., Noguchi, S., Ozawa, E., Zatz, M., et Kunkel, L.M. (1996) Genomic screening for beta-sarcoglycan gene mutations: missense mutations may cause severe limb-girdle muscular dystrophy type 2E (LGMD 2E). *Hum. Mol. Genet*. **5**:1953-1961.
- Blake, D.J., Weir, A., Newey, S.E., et Davies, K.E. (2002). Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol, Rev*. **82** :291-329.
- Bushby, K.M. (1999) The limb-girdle muscular dystrophies: multiple genes, multiple mechanisms. *Hum Mol Genet*. **8** :1875–1882.
- Bushby, K.M., Lochmuller, H., Lynn, S., et Straub, V. (2009) Interventions for muscular dystrophy : molecular medicines entering the clinic. *Lancet*. **374**: 1849-1456.
- Carrié, A., Piccolo, F., Leturcq, F., de Toma, C., Azibi, K., Beldjord, C., Vallat, J.M., Merlini, L., Voit, T., Sewry, C., Urtizbera, J.A., Romero, N., Tomé, F.M., Fardeau, M., Sunada, Y., Campbell, K.P., Kaplan, J.C., et Jeanpierre, M. (1997) Mutational diversity and hot spots in the alpha-sarcoglycan gene in autosomal recessive muscular dystrophy (LGMD2D). *J Med Genet*. **34**:470-475.
- Chakkalakal, J.V., Thompson, J., Parks, R.J., et Jasmin, B.J. (2005) Molecular, cellular, and pharmacological therapies for Duchenne/Becker muscular dystrophies. **19**: 880-891.

- Crosbie, R.H., Lim, L.E., Moore, S.A., Hirano, M., Hays, A.P., Maybaum, S.W., Collin, H., Dovico, S.A., Stolle, C.A., Fardeau, M., Tomé, F.M., et Campbell, K.P. (2000) Molecular and genetic characterization of sarcospan: insights into sarcoglycan-sarcospan interactions. *Hum Mol Genet.* **9**:2019-2027.
- De Recondo, J., et De Recondo, A.M. (2001) Pathologie du muscle strié. De la biologie cellulaire à la thérapie. *Medecine Science. Flammarion.* Paris.
- Ervasti, J.M., Ohlendieck, K., Kahl, S.D., Gaver, M.G., et Campbell, K.P. (1990) Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature.* **345**:315-319.
- Fernandez-Costa, J.M., et Artero, R. (2010) A conserved motif control nuclear localization of Drosophila. *Mol Cells.* **30**:65/70.
- Gherardi, R. (1989) Pathologie neuro-musculaire. Manuel de neuropathologie. Paris, Masson. 204-228.
- Ghozlane, S. (2001) Diagnostic des maladies neuromusculaires. *Repère myoline AFM.*
- Kaplan, J., Jean-Pierre, M., Urtizbera, J.A., et Beckmann, J. (1996) Bases Moléculaires des Dystrophies Musculaires Progressives à Transmission Autosomique Récessive. *Annales de l'institut pasteur.* **7**: 157-171.
- Kay E Davies and Kristen J Nowak, Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players; NATURE reviews: MOLECULAR CELL BIOLOGY, **Nature Publishing Group** October 2006.
- Kefi, M., Amouri, R., Driss, C., Ben Hamida, C., Ben Hamida, M., Kunkel, L.M., et Hentati, F. (2003) Phenotype and sarcoglycan expression in tunisian LGMD2C patients sharing the same  $\Delta 521T$  mutation. *neuromuscular disorder.* **13**:779-87.
- Khurana, T.S., et Davies, K.E. (2003) Pharmacological Strategies for Muscular Dystrophy. *Nature Rev Drug Discov.* **2**: 379-390.
- Lapidos, K .A., Chen, Y.E., Earley, J.U., Heydemann, A., Huber, J.M., Chien, M., Ma, A., et McNally, E.M. (2004) Transplanted hematopoietic stem cells demonstrate impaired sarcoglycan expression after engraftment into cardiac and skeletal muscle. *Journal of Clinical Investigation.* **114** : 1577-1585.

- Lim, L., Duclos, F., Broux, O., Bourg, N., Sunada, Y., Allamand, V., Meyer, J., Richard, I., Moomaw, C., et Slaughter, C. (1995) Beta-sarcoglycan: characterization and role in limb-girdle muscular dystrophy linked to 4q12. *Nat Genet.* **11**:257-265.
- Lim, L. E., Campbell, K. P. (1998) The sarcoglycan complex in limb-girdle muscular dystrophy. *Curr. Opin. Neurol.* **11**: 443– 452.
- Loo, T.W., et Clarke, D.N. (2007) Chemical and pharmacological chaperones as new therapeutic agents. *Expert Reviews in Molecular Medicine.* **9**:1-18.
- McNally, E.M., Passos-Bueno, M.R., Bonnemann, C.G., Vainzof, M., de Sa Moreira, E., Lidov, H.G.W., Ben Othmane, K., Denton, P.H., Vance, J.M., Zatz, M., et Kunkel, L.M. (1996) Mild and Severe Muscular Dystrophy Caused by a Single Sarcoglycan Mutation. *Am. J. Hum. Genet.* **59** :1040-1047.
- Moreira, E., Vainzof, M., Marie, SK., Nigro, V., Zatz, M., et Passos-Bueno, M.R. (1998) A first missense mutation in the delta sarcoglycan gene associated with a severe phenotype and frequency of limb-girdle muscular dystrophy type 2F (LGMD2F) in Brazilian sarcoglycanopathies. *J Med Genet.* **35**:951-953.
- Ben Hamida, M., Ben Hamida, C; Zouari, M; Belal, S and Hentati, F. (1996) Limb-Girdle Muscular Dystrophy 2C: Clinical Aspects. *Institut National de Neurologie.* **6**: 493-494.
- Mullis, K.B., Ferre, K.B.F., et Gibbs, R.A. (1994) The Polymerase Chain Reaction. Ed. Birkhauser, Boston-Basel-Berlin.
- Muntoni, F., Torelli, S., et Ferlini, A.S. (2003) Dystrophin and mutations : one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol.* **2** : 731-740.
- Nigro, V., Moreira, E.S., Piluso, G., Vainzof, M., Belsito, A., Politano, L., Puca, A.A., Passos-Bueno, M.R., et Zatz, M. (1996) Autosomal recessive limb girdle muscular dystrophy, LGMD2F, is caused by a mutation in the dsarcoglycan gene. *Nat Genet.* **14**:195–198.
- Noguchi, S., McNally, E.M., Ben Othmane, K., Hagiwara, Y., Mizuno, Y., Yoshida, M., Yamamoto, H., Bonnemann, C.G., Gussoni, E., Denton, P.H., Kyriakides, T., Middleton, L., Hentati, F., Ben Hamida, M., Nonaka, I., Vance, J.M., Kunkel, L.M.,

- et Ozawa, E. (1995). Mutations in the dystrophin-associated protein gamma-sarcoglycan in chromosome 13 muscular dystrophy. *Science*. **270**: 819-822.
- Nowak, K.J., et Davies, K.E. (2004) Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment. *EMBO Rep*. **5**: 872-876.
  - Pélissier, J., et Urtizbera, J.A. (1996) Les maladies neuromusculaires. De la génétique à la réadaptation. Masson. Paris. 19-93.
  - Petiot, P., et Urtizbera, J.A. (2004) Diagnostic des maladies musculaires. *EMC-Neurologie*. **1** : 137–155.
  - Piccolo, F., Jeanpierre, M., Leturcq, F., Dode, C., Azibi, K., Toutain, A., Merlini, L., Jarre, L., Navarro, C., Krishnamoorthy, R., Tome, F. M. S., Urtizbera, J. A., Beckmann, J. S., Campbell, K. P., et Kaplan, J.-C. (1996) A founder mutation in the gamma-sarcoglycan gene of Gypsies possibly predating their migration out of India. *Hum. Molec. Genet*. **5**: 2019-2022.
  - Pichavant, C., Aartsma-Rus, A., Clemens, P.R., Davies, E.K., Dickson, G., Takeda, S., Wilton, S.D., Wolff, J.A., Wooddell, C., Xiao, X., et Tremblay, J.P. (2011) Current Status of Pharmaceutical and Genetic Therapeutic Approaches to Treat DMD. *The American Society of Gene & Cell Therapy*. **19**:830-84.
  - Rando, T.A. (2001). The dystrophin– glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle Nerve*. **24** :1575–1594.
  - Roberds, S.L., Leturcq, F., Allamand, V., Piccolo, F., Jeanpierre, M., Anderson, R.D., Lim, L.E., Lee, J.C., Tomé, F.M., et Romero, N.B. (1994) Missense mutations in the adhalin gene linked to autosomal recessive muscular dystrophy. *Cell*. **78**:625-633.
  - Sampaolesi, M., Torrente, Y., Innocenzi, A., Tonlorenzi, R., D'Antona, G., Pellegrino, M.A., Barresi, R., Bresolin, N., De Angelis, M.G., Campbell, K.P., Bottinelli, R., et Cossu, G.(2003) Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. *Science*. **301**: 487-492.
  - Sandonà, D., et Betto, R. (2009) Sarcoglycanopathies: molecular pathogenesis and therapeutic prospects. *Expert Rev Mol Med*. **11**.

- Soltanzadeh, P., Friez, M. J., Dunn, D., Von Niederhausern, A., Gurvich, O. L., Swoboda, K.J., Sampson, J. B., Pestronk, A., Connolly, A. M., Florence, J. M., Finkel, R. S., Bonnemann, C. G., Medne, L., Mendell, J. R., Mathews, K. D., Wong, B. L., Sussman, M. D., Zonana, J., Kovak, K., Gospe, S. M., Gapmaier, E., Taylor, L. E., Howard, M. T., Weiss, R. B., et Flanigran, K. M. (2010) Clinical and genetic characterization of manifesting carriers of DMD mutations. *Neuromuscul. Disord.* **20**: 499 – 504.
- Van Deutekom, J.C., et Van Ommen, G.J. (2003) Advances in Duchenne muscular dystrophy gene therapy. *Nat Rev Genet.* **4**:774-783.
- Wallace, G.Q., Lapidos, K.A., Kenik, J.S., et McNally, E.M. (2008) Long-term survival of transplanted stem cells in immunocompetent mice with muscular dystrophy. *American Journal of Pathology.* **173** : 792-802.
- Zatz, M., Paula, F.D., Starling, A., et Vainzof, M. (2003) The 10 autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. *Neuromuscular disorders.* **13** : 532-544.

# *Introduction*

# *Recherche bibliographique*

## *Matériels et méthodes*

## *Résultats et discussion*

## *Conclusion*

## *Références bibliographiques*