الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة سعد دحلب البليدة

Université SAAD DAHLEB de Blida

Faculté des Sciences Agro-vétérinaires et Biologiques



Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master 2 en biologie

Option : Biosignalisation Cellulaire et Moléculaire et Immunologie (BCMI)

Thème

Etude morphologique, histoenzymologique et immunohistochimique des dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker diagnostiquées au Centre de Pierre et Marie Curie (CPMC), Alger

Trial Version
www.nuance.com

Soutenu par Mlle :

KHALFI Naima

Devant le Jury :

Mme RAHIM I.	*Maitre assistante A*	*U.S.D. Blida*	*Présidente*
Mme AMOKRANE A.	*Maitre assistante A*	*U.S.D. Blida*	*Examinatrice*
Mme BENAZOUZ F.	*Maitre assistante A*	*U.S.D. Blida*	*Examinatrice*
Mme DJAZOULI-ALIM F.Z.	*Maitre de conférences B*	*U.S.D. Blida*	*Promotrice*
Dr BENAHMED M.	*Maitre assistante*	*C.P.M.C. Alger*	*Co- promotrice*

Le 13 /12 /2012

Résumé

L'absence totale ou partielle de la dystrophine dans les muscles squelettiques est à l'origine d'altérations anatomo-pathologiques très graves qui mènent à la perte progressive de l'activité contractile normale de la fibre musculaire. L'importance de cette protéine est due à son rôle primordial dans le maintien de l'architecture de la fibre musculaire par l'ancrage de l'unité contractile à la membrane plasmique et par conséquent à la matrice extra cellulaire, en liaison avec d'autres protéines formant le complexe protéique associé à la dystrophine. Cette protéine est impliquée aussi dans le regroupement des récepteurs de l'acétyle choline dans la jonction neuromusculaire. Par des approches histologiques, histoenzymologiques et immunohistochimiques en utilisant des anticorps dirigés contre : le domaine central (Dys1) , le domaine N-terminal (Dys3) et le domaine C-terminal (Dys2) de la dystrophine, les sous unités du complexe des sarcoglycanes (α-sarc, β-sarc, γ-sarc et δ-sarc), la β-dystroglycane (β-DG) et les myosines (MHC-s et MHC-f), nous avons démontrés les anomalies anatomo-histologiques et cytopathologiques provoquées par la dystrophie musculaire de Duchenne et de Becker ainsi que la répartition de la dystrophine avec certaines protéines de son complexe au niveau des fibres musculaires. Ces signes tissulaires et cellulaires comprennent la présence d'une hétérogénéité dans la forme et la taille des fibres musculaires avec parfois la présence de segmentation, de nécrose et de régénération. Enfin l'infiltration cellulaire inflammatoire ainsi que la fibrose importante sont des signes fréquemment retrouvées dans le tissu dystrophique de façon générale et dans le type DMD et DMB de façon particulière. Ces paramètres ont été aussi confrontés à une analyse statistique corrélative.

Mots clés : muscle squelettique, dystrophine, complexe des sarcoglycanes, β-dystroglycane, dystrophie musculaire, immunohistochimie.

Trial Version
www.nuance.com

Abstract

The total or partial absence of dystrophin in skeletal muscle is the cause of pathological alterations that lead to serious progressive loss of normal contractile activity of the muscle fiber. The importance of this protein is due to its vital role in maintaining the architecture of this cell by anchoring the contractile unit to the plasma membrane and therefore to the extracellular matrix with other proteins forming the dystrophin associated protein complex. This last also involved in the clustering of acetyl choline receptors in the neuromuscular junction. Using approaches as histological and histoenzymologiques and immunohistochemistry with antibodies directed against: the central domain (Dys1), the N-termini domain (Dys3) and the C-termini domain (Dys2) of the dystrophin and against the subunits of sarcoglycan complex (α-sarc, β-sarc, γ-sarc and δ-sarc) and against the β-dystroglycan (β-DG) and myosin (MHC-s and MHC-f). We demonstrated anatomo-pathological and cyto-pathological abnormalitis caused by Duchenne and and Beker muscular dystrophy and we analysed parallaly the distribution of the dystrophin and few of its binding protein muscle fibers. These signs included muscle cell heterogeneity in the in shape and size, presenting sometimes segmentation and necrosis and regeneration. Finally, inflammatory cell infiltration and fibrosis are important signs commonly found in dystrophic tissue and especially in the types DMD and BMD. The correlation of these parameters was also statistically analyzed.

Keywords: skeletal muscle, dystrophin, sarcoglycan complex, β-dystroglycan, muscular dystrophy, immunohistochemistry.

Trial Version
www.nuance.com

ملخص

النّقص الكّلي أو الجزئي للديستروفين في العضلات الهيكلية ، يسبّب تغيرات مرضية خطيرة تؤدي إلى الفقدان التدريجي لوظيفة الألياف العضلية. تكمن أهمّية هذا البروتين في دوره في الحفاظ على هندسة هذه الأخيرة عن طريق ربط وحدة التقلّص العضلي مع الغشاء البلازمي و المادة الخلوية الخارجية الأساسية بالإرتباط مع بروتينات أخرى لتكوين المركب البروتيني المرتبط بالديستروفين . هذا المركب يلعب أيضا دورا في تجمع مستقبلات الأستيل كولين عند وحدة الإتصال العضلي العصبي. بواسطة دراسة نسيجية ومناعية توسيمية للنّسيج العضلي باستخدام أجسام مضادة يمكنها التعرّف على الجزء الأول، الأوسط و الأخير للديستروفين و وحدات مركب الصاغكوغليكان و الديستروغليكان و الميوزين. النتائج المتحصل عليها أثبت وجود تشوهات نسيجية و خلوية ناجمة عن ضمور العضلات في الشلل العضلي لدوشان و بيكر مع توزع غير متجانس لديستروفين و بروتينات مركبه. تشمل هذه العلامات النسيجية و الخلوية عدم التجانس في شكل و حجم الألياف العضلية المتواجدة أحيانا مع تجزؤ وتسلل خلايا إلتهابية وظاهرة التجديد لبعض الألياف العضلية. تم دراسة العلاقة بين هذه النتائج تمّ صياغتها بواسطة تحليل إحصاءي.

الكلمات الدّالة:العضلة الهيكلية ،ديستروفين ،مركّب الصاغكوغليكان، β-ديستروغليكان، الشّلل العضلي، تقنية التوسيم النسيجي.

Remerciements

J'adresse mes vifs remerciements à Mme RAHIM d'avoir accepté de présider mon jury de soutenance de mémoire, ainsi qu'au Mme BENAZOUZ et Mme AMOKRANE pour avoir accepté d'être les examinatrices de notre travail.

Je tiens à remercier vivement Docteur BENAHMED qui est à l'origine de ce sujet de mémoire, pour m'avoir accueillie dans laboratoire d'anatomie pathologique du CPMC, pour la confiance qu'elle m'a accordée, pour la liberté dont j'ai bénéficié dans mon stage et l'expérience dont elle m'a fait profiter, pour m'avoir transmis de précieuses connaissances et pour m'avoir conseillée et guidée avec patience et disponibilité .

Je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères à Madame Dr. DJAZOULI-ALIM F.Z. pour avoir acceptée de diriger mon travail et s'être laissé convaincre du bien-fondé de ce mémoire, pour l'attention qu'elle m'a portée. J'ai beaucoup appris sous sa direction. Je la remercie également pour m'avoir conseillée, encouragée et soutenue tout au long du mémoire avec bienveillance.

Je tiens à remercier infiniment Monsieur Dr. DJAZOULI Zahr-Eddine pour son aide précieuse dans l'analyse statistique des résultats.

J'adresse un grand merci à toute ma famille, pour m'avoir toujours encouragée et s'être inquiétés du bon déroulement de mes études. Je remercie spécialement mes deux frères Ahmed et Abdelrezek pour leur soutien moral que financier.

A la fin je voudrais ajouter mes remerciements à tous les membres de la promotion BCM surtout Sihem et Aicha pour leurs soutien .Une attention toute particulière à ma camarade de laboratoire Amina avec qui j'ai partagée des bon moments au paillasse.

Trial Version
www.nuance.com

SOMMAIRE

Page

INTRODUCTION…… 1

CHAPITRE I: DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES

I. 1. Données générales sur le muscle squelettique…….. 1

I.1.1. Structure du muscle squelettique …….. 1

I.1.2. Hétérogénéité des fibres musculaires chez l'homme…… 4

I.1.3. Croissance et régénérescence musculaire…….. 5

I.2. Classification des maladies neuromusculaires…… 6

I.3. Dystrophinopathies de type Duchenne et de type Becker……..…… 7

I.3.1. Historique……. 7

I.3.2. Données phénotypiques et épidémiologique…….. 7

I.3.2.1. Dystrophie musculaire de Duchenne……. 8

I.3.2.2. Dystrophie musculaire de Becker…….. 8

I.3.3. Données générales sur la dystrophine musculaire …… 9

I.3.3.1. Structure de la dystrophine musculaire …… 9

I.3.3.2. Gène *DMD* et les isoformes de la dystrophine……... 10

I.3.3.3. Complexe protéique associe à la dystrophine…….. 11

I.3.3.4. Protéines homologues de la dystrophine……... 12

I.3.3.5. Altérations moléculaires à l'origine de DMD et de DMB……...… 13

I.3.3.6. Physiopathologie des DMD et DMB.…… 14

I.4. Diagnostic des dystrophinopathies …….. 15

I.5. Intérêt des modèles animaux …… 16

I.5.1. Modèle murin…… 16

I.5.2. Modèle canin……. 16

I.5.3. Modèle félin…… 16

I.6. STRATEGIES THERAPEUTIQUES…….. 16

I.6.1. Le traitement actuel disponible…..…… 16

I.6.2. Les approches pharmacologiques ……. 17

I.6.3. Les approches géniques ……. 17

I.6.4. Les approches cellulaires …… 17

Trial Version www.nuance.com

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II.1. Matériel biologique……. 18

II.2. Prélèvement des échantillons…….. 18

II.3. Identification des échantillons…… 18

II.4. Fixation et cryoconservation des prélèvements…… 19

II.5. Confections des coupes au cryostat…… 19

II.6. Méthodes d'étude Morphologique…… 19

II.6.1. Coloration à l'Hématoxyline-Éosine ……. 19

II.6.2. Coloration au Trichrome de Gomori……. 20

II.7. Méthode d'étude Biochimique…….. 20

II.7.1. Coloration de lasucinate déshydrogénase (SDH) …… 20

II.7.2. Coloration du nicotinamide adénine dinucléotide tétrazolium réductase (NADH-TR)……... 20

II.8. Méthode d'étude Immuno-Histochimique…… 21

II.9. Technique d'immunoperoxydase indirecte sur coupes congelées……. 21

II.10. Montage des coupes entre lames et lamelles…… 23

II.11. Observations et acquisition d'images numérique…….. 23

II.12. Traitement des données et analyse statistiques des résultats…… 23

CHAPITRE III. RESULTATS

III.1. Processus dystrophique au niveau tissulaire et cellulaire ……. 24

III.1.1. Altérations accompagnant le processus dystrophique…… 24

III.1.2. Modifications subcellulaires……. 30

III.2. Etude de la distribution de la dystrophine et certaines de ses protéines associées dans les dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker……. 32

III.3. Etude de la répartition des fibres de type I et II……. 37

III.4. Répartition des patients selon les résultats obtenus par l'immunomarquage de la dystrophine et certaines protéines de son complexe……... 39

III.5. Relation des anomalies histo-pathologiques…… 40

CHAPITRE IV. DISCUSSION …….. 44

CONCLUSION …… 50

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES……... 51

ANNEXES……. 56

Trial Version
www.nuance.com

LISTE DES ABREVIATIONS

AChR	Acetylcholin Receptor
AD	Autosomique Dominante
AR	Autosomique Recessive
ADN	Adenosine Désoxyribonucléique
ARNm	Adenosine Ribo- Nucleotide messager
ATPase	Adenosine tri phosphatase
CMT	Charcot Marie Tooth
CD	Cluster Différenciation
CPK	Créatine Phospho-Kinase
Cys	Cysteine
DAB	Di-Aminobezidine
DAPC	Dystrophin-Associated Protein Complex
DM	Distal Myopathy
DMB	Dystrophie Musculaire de Becker
DMD	Dystrophie Musculaire de Duchenne
DMFSH	Dystrophie Musculaire Facio-Scapulo-Humérale
DMOP	Dystrophie Musculaire Oculopharyngée
DMP	Dystrophie Musculaire Progressive
Dp	Dystrophin protein
DRP	Dystrophin Related Protein
Dys	Dystrophine
EDMD	Emery Dreifuss Muscular Dystrophy
FKRP	Fukutin Related Protein
GABA	Gama Amina Butilic Acid
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
GRMD	Golden Retriever Muscular Dystrophy
HE	Hematoxyline Eosine
HFMD	Hypertrophic feline muscular dystrophy
HLA	Human Leukocyte Antigen
IGF	Insulin-like growth factor
IL-6	Interleukine-6
IRM	imagerie par résonance magnétique
JNM	Jonction NeuroMusculaire

Trial Version
www.nuance.com

kDa	kilo Daltons
Kb	Kilo base
LDH	Lacticodéshydrogénases
LGMD	Limb-Girdle Muscular Dystrophy
LZ	lié au Zink
MAST	Microtubule Associated Serine/Threonine
MC	Myopathie congénitale
MD	Myopathie Distale
mdx	Muscular Dystrophy X-linked
MEC	Matrice Extra-Cellulaire
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification assay
MRF	Myogenic Regulatory Factor
MEF	Myocyte Enhancer Factor
Myf-5	Myogenic factor 5
MyoD	Myogenic differentiation
NADH-TR	Nicotinic Acid Dehydrogenase-Tetrazolium reductase
NaN3	Sodium Azide
NCL-GAMP	Novocastra Lyophilized -Goat Anti-Mouse Peroxidase
NF κB	Neucléar Factor kappa B
NO	Nitric Oxyde
NOs	Monoxyde d'azote synthase
OCT	Optimum Compound Tissue
Pax	Paired box gene
Pb	Paire de bases
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	potentiel Hydrogène
Pm	Promoteur
PROMM	Proximal Myotonic Myopathy
RX	Récessive liée à X
S	Sporadique
TM	Transmission maternelle
TNFα	Tumor Necrosis Factors
TRIM32	Tripartite motif-containing 32

Trial Version
www.nuance.com

LISTE DES FIGURES

Page

Figure 1 : Muscle strié squelettique…….... **2**

Figure 2 : Les différentiations spécialisées du sarcolemme au niveau des jonctions neuromusculaires et les tubules T …… **3**

Figure 3 : Organisation protéique sarcomèrique……. **3**

Figure 4 : Différenciation asymétrique d'une cellule satellite…….. **5**

Figure 5 : Classification des maladies neuromusculaires selon l'atteinte de l'unité motrice…….. **6**

Figure 6 : Structure de la dystrophine, corrélé au gène *DMD*……. **9**

Figure 7 : Les produits du géne DMD…… **10**

Figure 8 : Le complexe protéique associé à la dystrophine et les interrelations cellulaires **12**

Figure 9 : Structure des protéines homologues de la dystrophine …… **13**

Figure 10 : Stratégie diagnostic……..... **15**

Figure 11 : Les anomalies tissulaires qui accompagnent le processus dystrophique……... **25**

Figure 12 : Phénomènes de fibrose et de nécrose dans un tissu musculaire dystrophique. **27**

Figure 13: Phénomènes de régénération et de segmentation des fibres musculaires observés lors d'une dystrophie musculaire……. **29**

Figure 14 : Les anomalies subcellulaires …….. **31**

Figure 15 : Immunomarquage de la dystrophine dans un tissu musculaire normal……. **34**

Figure 16 : La dystrophine et certaines de ses protéines associées chez les dystrophinopathes ……... **35**

Figure 17 : La dystrophine et certaines de ses protéines associées chez les dystrophinopathes (suite)……..... **36**

Trial Version www.nuance.com

Figure 18 : La β-dystroglycane chez les dystrophinopathes…….. **36**

Figure 19 : Ciblage des fibres lents et rapides par immunomarquage des myosines spécifiques au niveau des muscles striés des dystrophinopathes……. **38**

Figure 20 : Répartition des patients selon les résultats obtenus par l'immunomarquage de la dystrophine et certaines protéines de son complexe……. **39**

Figure 21: Diagramme récapitulatif des liaisons entre les différentes lésions histo-pathologiques…….. **42**

Figure 22 : Diagramme récapitulatif des liaisons entre la dystrophine et les sarcoglycanes…….. **43**

Trial Version
www.nuance.com

GLOSSAIRE

Jonction neuromusculaire ou plaque motrice : structure anatomique et fonctionnelle, correspondant à la portion présynaptique formée de la terminaison axonale du motoneurone, par la fente synaptique, dans laquelle l'acétylcholine est libérée et par la portion postsynaptique formée par des replis du sarcolemme de la fibre musculaire, contiennent les récepteur de l'acétylcholine (Seratrice, 2008).

Myasthénie : la myasthénie grave (MG) est une maladie de la transmission neuromusculaire due au blocage des récepteurs nicotinergiques à l'acétylcholine (AChRs) de la membrane post-synaptique par des autoanticorps, qui résulte une faiblesse et épuisement de la musculature striée (Buettner, 2003).

Myoglobine : La myoglobine est une protéine spécifique au muscle, proche de l'hémoglobine. La myoglobine fixe dans les muscles, l'oxygène nécessaire au travail musculaire (AFM, 2008).

Tubules T : les tubules transverses sont des invaginations du sarcolemme qui vont prend contact avec le réticulum sarcoplasmique formant une triade autour des stries Z (Seratrice, 2008).

Unité motrice : est formé par une terminaison axonale d'un motoneurone innervant plusieurs fibres musculaires de même type histologique (Seratrice, 2008).

Trial Version
www.nuance.com

Données bibliographiques

TrialVersion
www.nuance.com

INTRODUCTION

Près de 640 muscles sont présents dans le corps humain, impliqués dans de nombreuses fonctions : la locomotion, la respiration, la digestion et la régulation de la pression sanguine **(**Chérin, 1999). D'un point de vue histo-fonctionnel, on distingue le muscle lisse et le muscle strié cardiaque dont les contractions sont involontaires et le muscle strié squelettique qui est sous contrôle volontaire.

Ce dernier type musculaire seul représente environ 40 à 45 % de notre masse corporelle (Mekrami et Brignol, 2003). De nombreux gènes codent pour les protéines qui assurent leur intégrité et leur contractilité ou interviennent dans leurs activités métaboliques. Les mutations de certains de ces gènes engendrent des pathologies musculaires modérées à redoutables chez les sujets atteints. Parmi ces pathologies, on retrouve les dystrophies musculaires progressives de type Duchenne (DMD) et de type Becker (DMB), deux variantes alléliques d'une même atteinte musculaire causée par des mutations dans le gène *DMD*.

La description de la maladie de Duchenne remonte à 1868 mais ce n'est qu'en 1986 et 1987 qu'ont été identifiés le gène *DMD* et en 1987 la protéine qu'il code: dystrophine. Depuis, les études se poursuivent pour mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques afin de développer les thérapeutiques (Association française contre les myopathies AFM, 2012).

Dans le cadre de notre mémoire, nous nous sommes intéressées à l'aspect histologique et histoenzymologique du processus dystrophique musculaire d'une cohorte de patients pour lesquels le diagnostic clinique DMD/DMB a été évoqué. Nous avons ciblé, par immunohistochimie, la dystrophine et certaines protéines de son complexe associé, avec l'intérêt évident de comprendre la physiopathologie, d'orienter les études de la biologie moléculaire, de trouver les meilleurs moyens de prise en charge avec les conseils génétiques adéquats et l'avancement des stratégies thérapeutiques.

I.1. Données générales sur le muscle squelettique

I.1.1. Structure du muscle squelettique

Le muscle squelettique est constitué par des cellules musculaires striées groupées en faisceaux et assemblées à différents niveaux par un tissu conjonctif richement vascularisé en formant l'endomysium qui entoure chaque fibre musculaire, le périmysium autour de chaque faisceau et l'épimysium qui enveloppe entièrement le muscle **(Fig.1)**(Seratrice, 2008).

Trial Version www.nuance.com

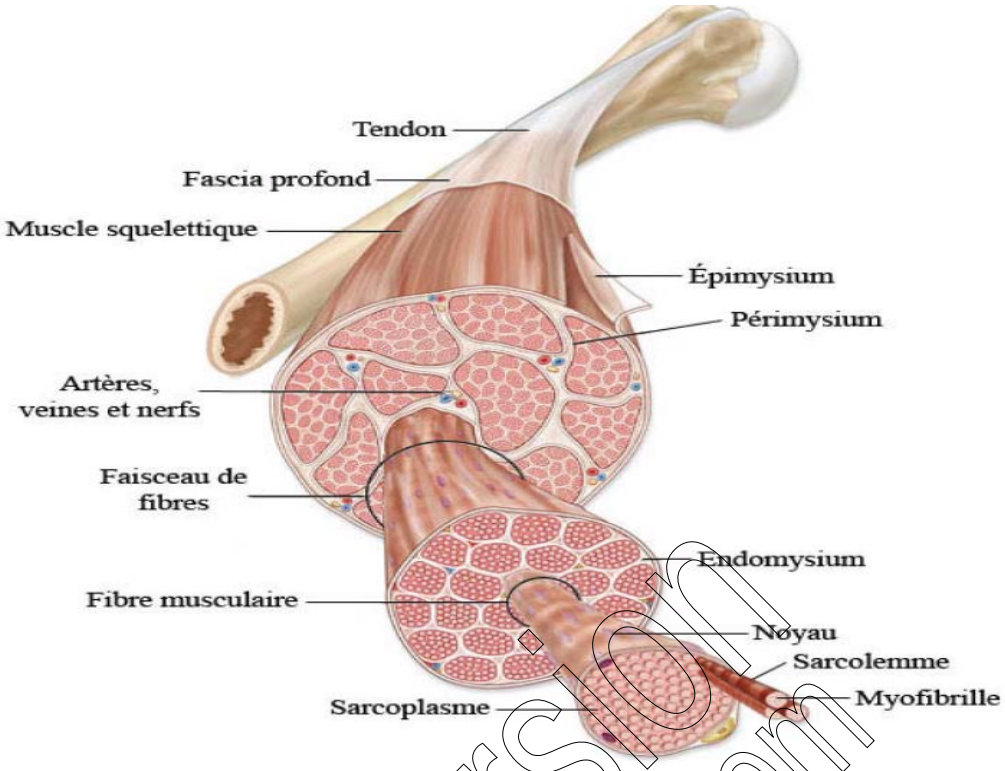


Figure 1 : Muscle strié squelettique. A : Anatomie du muscle squelettique, elle est attaché à l'os par un tendon est entouré par deux membranes : le fascia profond et l'épimysium (Dominique, 2009).

Les fibres musculaires striées (ou cellules musculaires striées ou rhabdomyocytes) sont de forme cylindrique, allongées parallèlement. Elles mesurent 10 à 100 µm de diamètre et peuvent atteindre 30 cm de longueur. La fibre musculaire mature est plurinucléé, elle résulte de la fusion de plusieurs cellules non différenciés appelées myoblastes caractérisé par des noyaux uniques à position centrale, ces noyaux vont se déplacer à la périphérie lors de la myogenèse (Mekrami et Brignol, 2003 ; Bougeon, 2008).

La membrane des fibres musculaires ou sarcolemme est constituée par l'association du plasmalemme avec la lame basale, comporte plusieurs différenciations spécialisées en particulier au niveau des insertions myotendineuses et les synapses neuromusculaires. Elle présente des fines invaginations tubulaires appelé tubules T réparties régulièrement le long de la fibre, s'enfoncent en profondeur et cheminent parfois entre les citernes du réticulum sarcoplasmique pour constituer une triade jouant un rôle dans le transfert et le stockage du calcium intracellulaire **(Fig.2)**. Le cytoplasme ou sarcoplasme contient les organites responsables du fonctionnement de la fibre musculaire (le réticulum sarcoplasmique, les mitochondries), les substances métaboliques (les goulettes lipidiques, les grains de glycogène, les protéines enzymatiques, les sels minéraux, l'eau, la créatine phosphate et la myoglobine) et le cytosquelette myofibrillaire (Mekrami et Brignol, 2003).

Trial Version
www.nuance.com

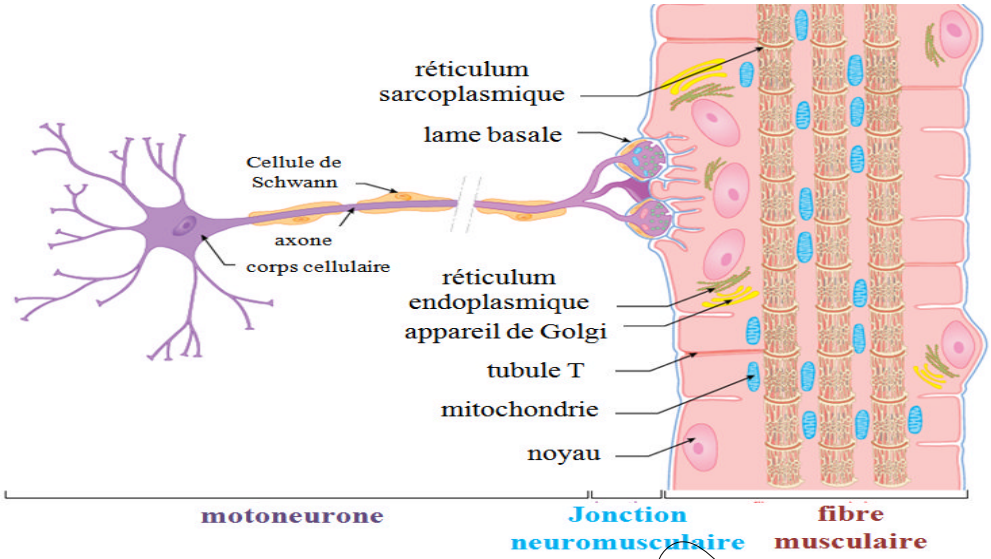


Figure 2 : Les différentiations spécialisées du sarcolemme au niveau des jonctions neuromusculaires et les tubules T (Brignol, 2009).

Chaque myofibrille est composée d'une chaine d'unités contractiles répétitives appelées sarcomères qui se situe entre deux stries Z. Son aspect strié est dû à la succession de disques sombres ou bandes A et de disques clairs ou bandes I. Au niveau moléculaire, les stries des myofibrilles sont formées par une disposition ordonnée des myofilaments épais et fins. Les premiers composés de myosine s'étendent sur toute la longueur de la bande A. Les myofilaments fins sont constitués d'actine G (globulaire) qui polymérisée, constitue l'actine F (filamenteux). L'enroulement de deux chaines d'actine F est la base de la formation des filaments fins. Toutefois deux autres protéines régulatrices, la tropomyosine et la troponine participent à l'organisation de ces filaments fins **(Fig.3)** (Chérin, 1999).

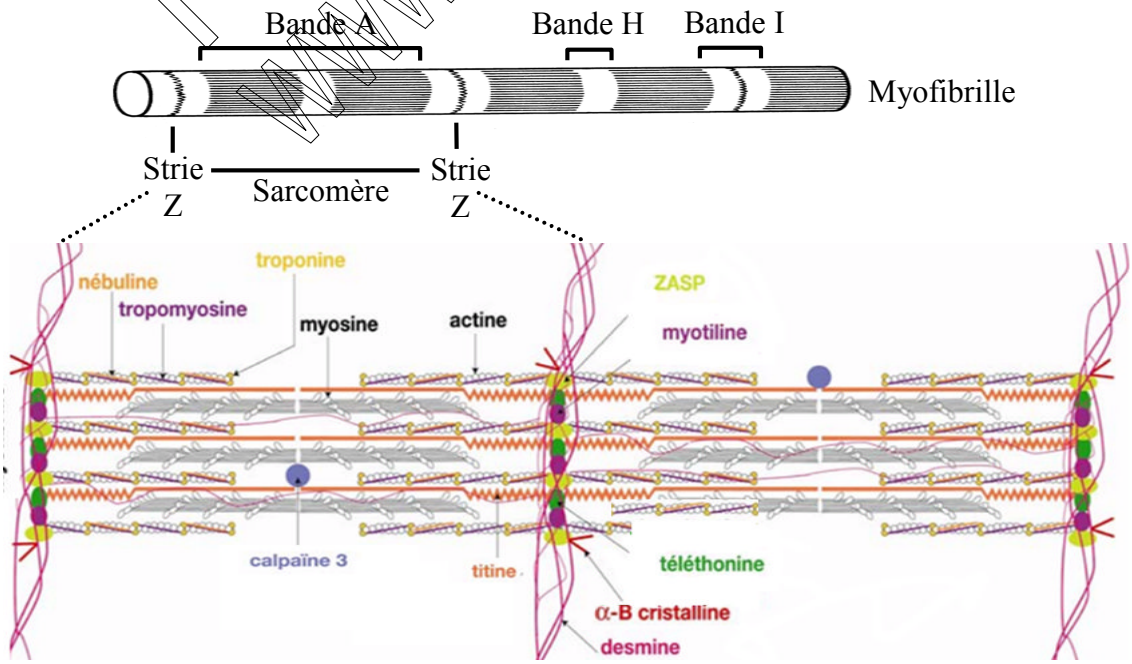


Figure 3 : **Organisation protéique sarcomèrique** (AFM, 2011).

Trial Version www.nuance.com

I.1.2. Hétérogénéité des fibres musculaires chez l'Homme.

Une unité motrice est formée de fibres musculaires de même type, innervées par un même motoneurone et reparties sur plusieurs fascicules voisins, entremêlées avec des fibres de type différent. C'est l'aspect en mosaïque du muscle (Bacou et Vigneron, 1988 ; Mekrami et Brignol, 2003).

Les fibres se distinguent en fonction de leurs propriétés contractiles et métaboliques qui déterminent leur vitesse de contraction et leur fatigabilité **(Tableau I)**. Les fibres de Type I (slow) sont des fibres impliquées dans les activités posturales. Les fibres de Type IIB (fast) sont sollicitées dans les exercices brefs et intenses. Les fibres de Type IIA sont dites FR (fast resistant) à activité intermédiaire : leur tension est modérée mais leur durée de contraction est relativement brève (Bioulac et *al*. 2004 ; Seratrice, 2008). Le rapport fibres lentes/rapides peut se modifier : Les fibres IIA évoluent vers le type I lors d'exercices prolongés ; les fibres IIA en IIB lors d'exercices brefs et intenses (Mekrami et Brignol, 2003).

Tableau I : Critères de différentes fibres musculaires**.**

Critères	**Fibres I (S)**	**Fibres II**	
		Fibres IIA (FR)	**Fibres IIB (F)**
Critère morphologique :			
Diamètre	petit	grand	grand
Couleur	rouge	rouge	blanche
Mitochondries	+++	++	+
Glycogène	+	+++	+++
Lipides	+++	++	+
Epaisseur de la strie Z	++	+++	+
Densité capillaire	+++	+++	+
Réactions enzymatiques:			
SDH	+++	++	+
NADH-TR	+++	++	+
Phosphorylase	+	+++	+++
ATPase 9.4	+	+++	+++
ATPase 4.6	+++	-	+
ATPase 4.3	+++	-	-
Source d'énergie	phosphorylation oxydative	phosphorylation oxydative et glycolyse	Glycolyse
Critères physiologiques :			
Vitesse de contraction	lente	rapide	rapide
Résistance à la fatigue	élevée	élevée	faible

+++ : activité élevée, ++ : activité moyenne, + : activité faible, - : pas d'activité. (Bioulac et *al*., 2004 ; Seratrice, 2008).

Trial Version www.nuance.com

I.1.3. Croissance et régénérescence musculaire

D'un point de vue cellulaire, Le muscle possède une caractéristique de plasticité importante grâce à ses capacités de croissance et de régénération. A l'origine de cette particularité se trouve une réserve de cellules souches ou cellules satellites localisées entre le sarcolemme et la lame basale, capables à chaque instant de s'engager dans le processus myogénique. Ces cellules souches sont présentes dans toutes les masses musculaires squelettiques, où elles résident dans un état quiescent jusqu'au moment où des signaux viennent les solliciter lors de la croissance musculaire postnatale, lors d'exercices ou plus généralement lors d'endommagement des fibres musculaires (Lagha et *al*. 2005; Mayeuf et Relaix, 2011). L'engagement de ces cellules progénitrices dans le programme de prolifération et de différenciation musculaire est induit par l'activation des facteurs de régulation myogéniques formant les MRF (Myf5, MyoD, Myogénine et MRF4) et le facteur de transcription Pax **(Fig.4)** (Seratrice, 2008). Les cellules satellites se divisent alors, de façon asymétrique donnant une cellule Pax7+ MyoD+ Myf5+ qui contribuera à la réparation du muscle et une cellule exprimant seulement le Pax7qui retournera en quiescence afin de maintenir la réserve des cellules satellites (Pichavant, 2010).

Trial Version
www.nuance.com

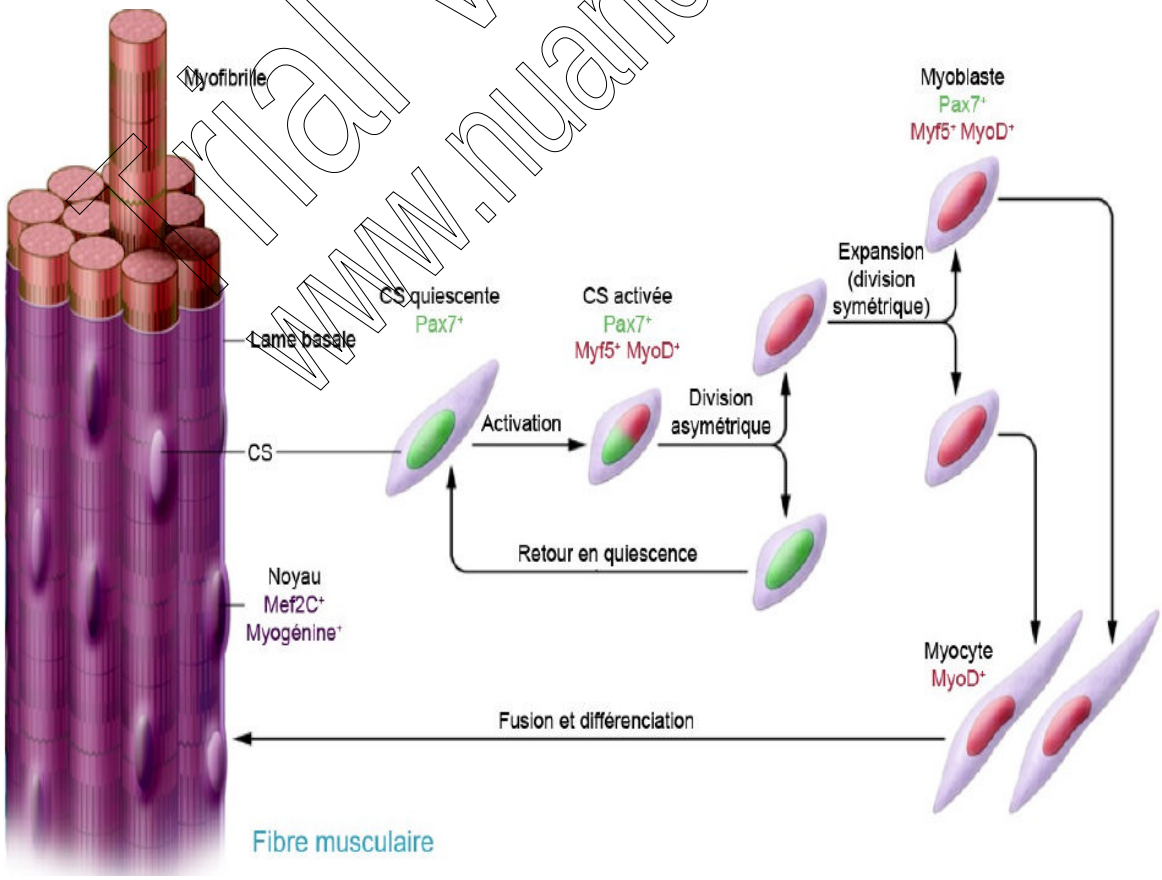


Figure 4 : Différenciation asymétrique d'une cellule satellite. (Pichavant, 2010).

I.2. CLASSIFICATION DES MALADIES NEUROMUSCULAIRES

Les maladies neuromusculaires **(annexe 1)** sont classées selon l'atteinte de l'unité motrice en quatre groupes **(Fig. 5)**.

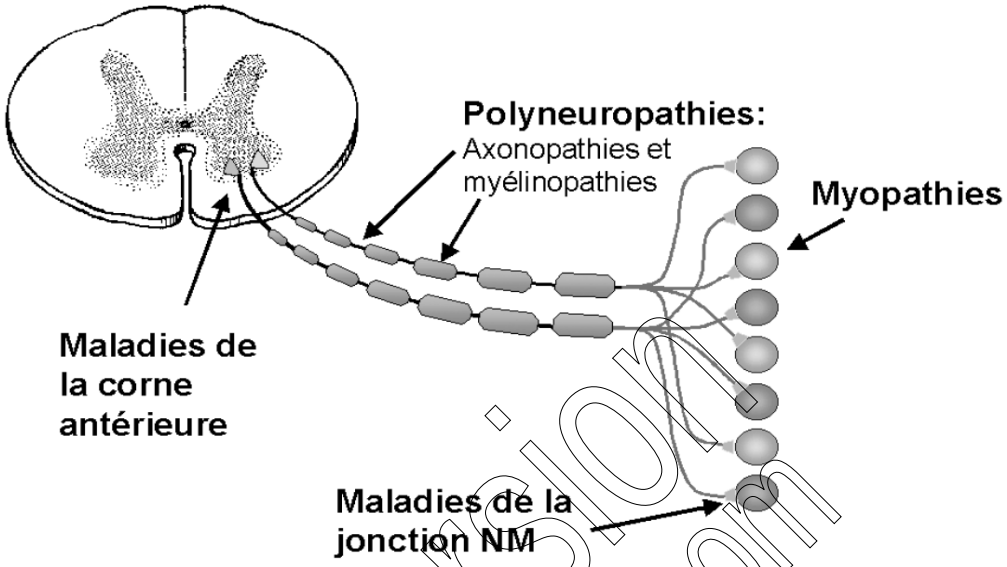


Figure 5: Classification des maladies neuromusculaires selon l'atteinte de l'unité motrice. Moelle épinière (à l'extrême gauche), les nerfs périphériques et la plaque motrice, l'ensemble des fibres musculaires formant le muscle (à l'extrême droite) (Kuntzer, 2001).

Les myopathies touchent les muscles squelettiques et s'expriment par une faiblesse musculaire variable, allant d'une simple asymétrie de petits muscles de la face sans conséquence fonctionnelle au développement d'une déficience complète des fonctions motrices. L'atteinte peut être progressive persiste dans le temps à l'origine d'une incapacité ou d'un handicap, stable pendant de nombreuses années ou régressive selon les possibilités de traitements, selon le type de myopathie l'atteinte du muscle cardiaque, respiratoire ou la déformation ostéo-articulaire sont aussi observées (Kuntzer, 2001 ; Héron, 2008). Elles peuvent être de forme génétique et comprend les dystrophies musculaires progressives (DMP), les myopathies congénitales (MC) et les myopathies métaboliques ou bien de forme acquise survienne sur un muscle antérieurement sain et englobe les myopathies endocriniennes, toxiques, médicamenteuses et inflammatoires (Emery, 2002).

Les DMP sont un groupe hétérogène d'affections héréditaires caractérisées par la perte progressive de la force et de l'intégrité musculaires, dont les différentes formes se différencient par l'âge d'apparition du déficit et la répartition de la faiblesse musculaire **(annexe 2) (**Bougeon, 2008; Urtizberea, 2009).

Trial Version
www.iuare.com

I.3. DYSTROPHINOPATHIES DE TYPE DUCHENNE ET DE TYPE BECKER

I.3.1. Historique

Plusieurs descriptions succinctes de pathologies ressemblant à la DMD furent probablement faites dès 1830 mais pas suffisamment détaillées sur le plan pathologique. Il va falloir attendre 1851, en Angleterre, pour avoir une description précise par le Dr E. Meyron. En 1858, un français du nom Guillaume Duchenne de Boulogne voit son premier cas clinique de dystrophie musculaire et y fait une brève description trois ans plus tard. En 1865, il est le premier à obtenir une biopsie musculaire faite sur un patient vivant. En 1868, il présente ses observations histologiques détaillées et évoquait la désorganisation du tissu musculaire par la présence de tissu fibreux-adipeux et des fibres à différentes tailles et caractérisait plus la maladie comme pseudo-hypertrophique et non hypertrophique. Une dizaine d'années plus tard, d'autres observations ont été rapportées par l'anglais Gowers, sur la manière et les différentes positions que prend un enfant dystrophique qui veut se mettre debout à partir d'une position allongée. Malgré le fait que Meyron fut la première personne à mentionner les cas d'enfants dystrophiques, l'histoire a retenu le nom de Duchenne pour identifier la maladie (Pichavant, 2010). La prochaine progression des connaissances été réalisées par les études de Becker entre 1940 et 1950. En plus de la dystrophie qui porte aujourd'hui son nom, Becker a décri d'autres dystrophies et nota que la DMD est une maladie récessive liée au chromosome X. L'avancée la plus importante des connaissances est redevable aux travaux de Kunkel qui ont permis d'identifier le gène responsable de la DMD en 1986 et parviennent à relier la cause à une anomalie d'une protéine qui fut nommée dystrophine en 1987 (Lafrenière, 2007).

I.3.2. Données phénotypiques et épidémiologiques

Les dystrophinopathies se transmettent selon un mode récessif lié au chromosome X. Dans ce mode de transmission : les sujets masculins porteurs d'une anomalie du gène expriment la maladie, tandis que les sujets féminins ont une mutation hétérozygote dans ce gène sont asymptomatiques (Urtizberea, 2009). L'apparition d'une néo-mutation est estimée pour un tiers des cas sporadiques de DMD, les femmes étant conductrices dans les deux tiers restants (Kuntzer, 2001) avec une atteinte musculaire possible par une sévérité variable et un début moyenne se déclaré dans la trentaine (Seemann et *al*., 2011). Exceptionnellement, des filles peuvent être atteintes d'une authentique myopathie de Duchenne dont l'évolution de la maladie est le même que chez les garçons, ce cas de figure ne concerne que quelque dizaines de filles à travers le monde (Urtizberea, 2009; Tselikas et *al*., 2011).

Trial Version www.nuance.com

I.3.2.1. La dystrophie musculaire de Duchenne

C'est une maladie rare d'évolution progressive, affectant l'ensemble des muscles de l'organisme (squelettique, cardiaque et lisse). Elle est à ce jour la DMP la plus fréquente chez l'enfant avec une incidence d'environ 1/3500 naissances males en France.

La maladie débute de manière précoce voire anténatale avec un taux très élevé des CPK sérique, cependant c'est seulement vers 2 à 5 ans que les troubles de la marche attirent l'attention : difficulté à courir, sauter, monter les escaliers et des chutes fréquentes. Entre 5 et 6 ans, le déficit des muscles de la ceinture pelvienne donne une position debout typique à l'enfant : bassin basculé en arrière entraînant une lordose lombaire et un abdomen proéminent. La rétraction des tendons d'Achille accentue le déplacement sur la pointe des pieds et la marche devient dandinante avec hypertrophie des mollets. Parallèlement, une cardiomyopathie se développe et le déficit musculaire s'étend aux membres supérieurs (Urtizberea, 2009).Les troubles de la marche s'aggravent considérablement et s'accentue jusqu'à la perte totale de marche entre 10 et 12 ans dont l'utilisation du fauteuil roulant devient nécessaire. Ces enfants ont éprouver aussi des difficultés d'apprentissage possiblement dû au fait que la dystrophine présente une signification fonctionnelle dans le cerveau (Fernandez et *al*., 2010) et une perte de la densité minérale osseuse apparaît en parallèle de l'avancement de la maladie, à comme conséquence le développent d'une ostéoporose et un os très susceptibles aux fractures (Nakagaki, 2012). Vers la vingtaine les muscles squelettiques sont tous complètement paralysés avec une atteinte des muscles lisses conduise à des problèmes respiratoires, digestifs et urinaires. Le décès survient avant 25 ans suite à une décompensation cardiaque chez 10 % des cas ou le plus souvent par insuffisance respiratoire (Fernandez et *al*. 2010).

Trial Version www.nuance.com

I.3.2.2. La dystrophie musculaire de Becker

C'est une maladie similaire à celle de Duchenne, son incidence est estimée par 5,42/100000 naissances males en France. Elle est caractérisée par un tableau clinique hétérogène et moins sévère, L'âge du début de la maladie se situe le plus souvent dans l'adolescence parfois beaucoup plus tard. L'hypertrophie des mollets et la présence des crampes sont les très fréquentes. L'âge de la perte de la marche est variable mais se situe généralement au début de l'âge adulte, et l'âge moyen du décès est de 47,3 ans (Utizberea, 2009 ; Fernandez et *al*., 2010 ; Tselikas et *al*., 2011).

I.3.3. Données générales sur la dystrophine musculaire

I.3.3.1. Structure de la dystrophine musculaire

La dystrophine est une protéine du cytosquelette qui appartient à la famille des β-spectrine/α-actinine (Fayssoil et *al*., 2007), en forme de bâtonnet mesurant 150 nm de long et comptant 3685 acides aminés pour un poids moléculaire total de 427 kDa. Structurellement, elle est divisée en quatre domaines **(Fig.6)**. Le domaine N-terminal (240 aa) possède une homologie avec l'α-actinine. Le domaine central « *rod domain* » (résidus 241- 3080) répartis en 24 unités répétées (d'environ 109 aa pour chacune), similaires aux éléments répétés α-hélicoïdaux de la β-spectrine « *spectrine-like* ». Il contient quatre zones charnières « *hinge* » non répétées, riches en résidus proline et lui conférant de la flexibilité. Ce domaine lie également la F-actine par des interactions électrostatiques. Le domaine riche en cystéine (280 aa) possède trois sites de fixation deux de calcium et un de zinc (domaine ZZ), il est capable de se lier au β-dystroglycane sarcolemmale. Le domaine C-terminal (325 aa), contient le site de liaison aux dystrobrévines et syntrophines. (Fernandez *et al*., 2010 ; Nakagaki, 2012).

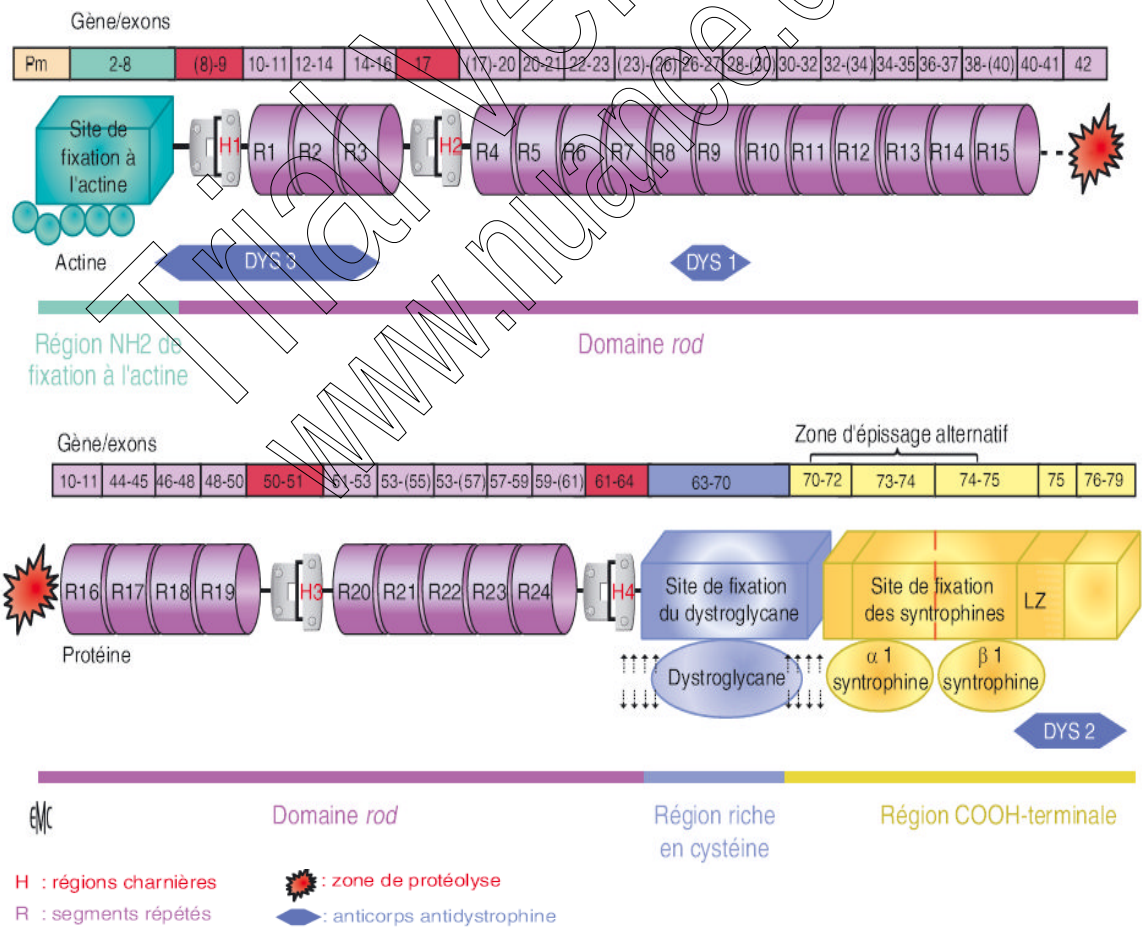


Figure 6: Structure de la dystrophine, corrélé au gène DMD (Fernandez et *al*., 2010).

Trial Version
www.nuance.com

I.3.3.2. Gène *DMD* et isoformes de la dystrophine

Le gène *DMD* est le plus grand gène humain ; il s'étend sur 2,5 millions de paires de bases et représente 0.1% du génome et environ 1.5% du Chromosome X, les introns comptent pour 99% avec 79 exons (Muntoni *et al*., 2003). Il comporte trois promoteurs différents code pour des isoformes pleines longueurs « full length isoform » : le promoteur M (muscle) est actif dans le muscle squelettique et cardiaque, le promoteur B (brain) est actif dans l'hippocampe et le cortex cérébral et le promoteur P (*Purkinje*) est actif dans les cellules de Purkinje. Ces trois isoformes sont probablement fonctionnellement équivalentes car elles ne diffèrent que par les premiers acides aminés. Il existe également une expression très faible d'une dystrophine longue dans les lymphocytes. Le gène possède aussi quatre promoteurs internes codent à des isoformes courtes «short isoform », dépourvues de l'extrémité N-ter mais possède l'extrémité COOH-ter **(Fig.7)**. Le promoteur de l'exon 30 code pour l'isoforme de 260 kDa qui est exprimé dans la rétine, le promoteur de l'exon 45 produit l'isoforme de 140 kDa qui s'exprime dans le cerveau, la rétine et le rein. Le promoteur de l'exon 56 produit l'isoforme de 116 kDa des nerfs périphériques et le promoteur de l'exon 63 produit l'isoforme de 71kDa, s'exprime dans le cerveau, la rétine, le foie, le rein, le poumon et le cœur (Desguerre, 2009 ; Fernandez et *al*., 2010 ; Nakagaki, 2012).

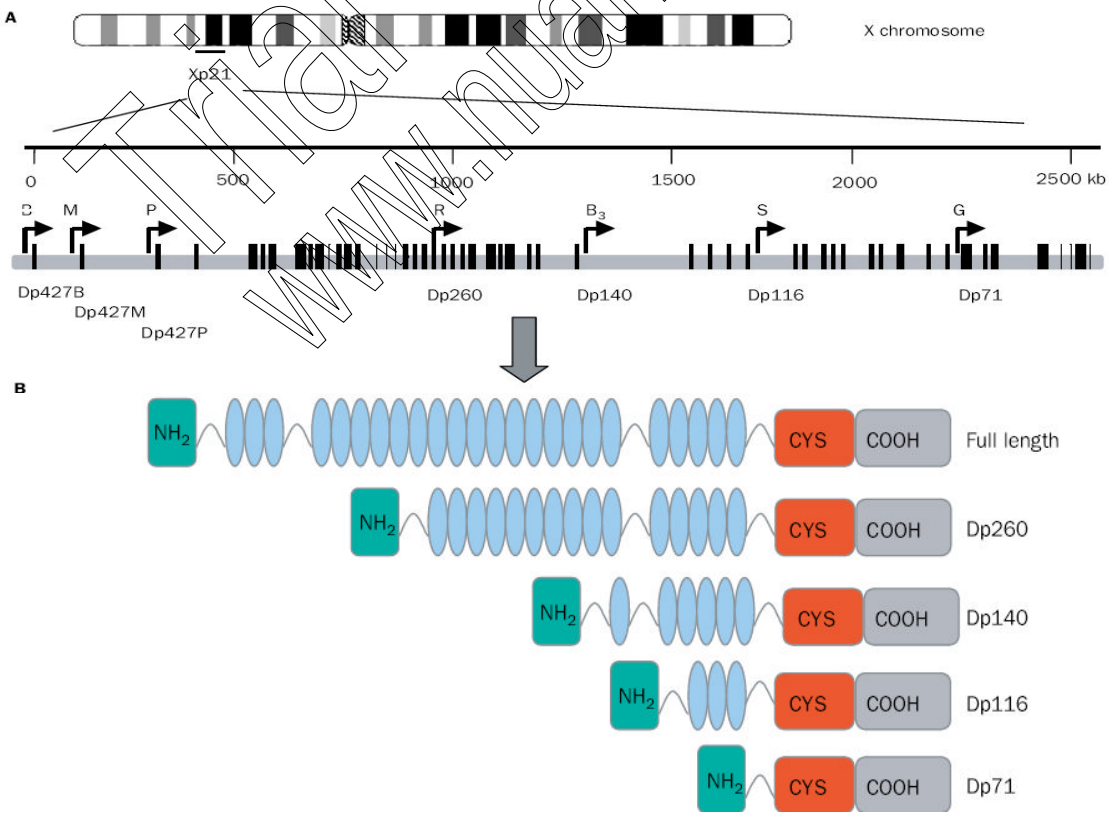


Figure 7: Les produits du géne *DMD*. A: localisation des differents promoteurs du géne *DMD*. **B** : les isoforme pleine longueur et courtes de la dystrophine (Muntoni et *al*., 2003).

Trial Version www.nuance.com

I.3.3.3.Le complexe protéique associe à la dystrophine

Par la technique d'immunohistochimie, Campbell et *al* (1989) montrèrent la localisation submembranaire de la dystrophine dans les fibres musculaires. Cette protéine interagisse avec d'autres protéines pour former un complexe reliant l'actine F du cytosquelette à la MEC. À ce jour, le complexe protéique lié à la dystrophine **(Fig.8)** ou DAPC comporte :

La laminine-α2 ou mérosine (80kDa) se situe entre le sarcolemme et la MEC. Elle est reliée à la dystrophine via le complexe des dystroglycanes.

Le complexe des dystroglycanes comprend deux protéines liées structuralement, une de 156 kDa (α-dystroglycane) se situant à la face externe et l'autre de 43 kDa (β-dystroglycane) transmembranaire qui s'attache au dystrophine dans la face interne du sarcolemme.

Le complexe des **sarcoglycanes/sarcospane** est composé des sous-unités α (50 kDa), β (43 kDa), δ (35 kDa), γ (35 kDa) et ε (50 kDa) sarcoglycane, il se relie aux dystroglycanes, mais les sites de liaisons exacts restent à élucider. Le sarcospane (25 kDa) traverse quatre fois le sarcolemme et contient une large partie extracellulaire.

La syncoiline intéragit avec l'α-dystrobrevine et la desmine, elle est fortement exprimée au sarcolemme, aux stries Z et aux jonctions neuromusculaires.

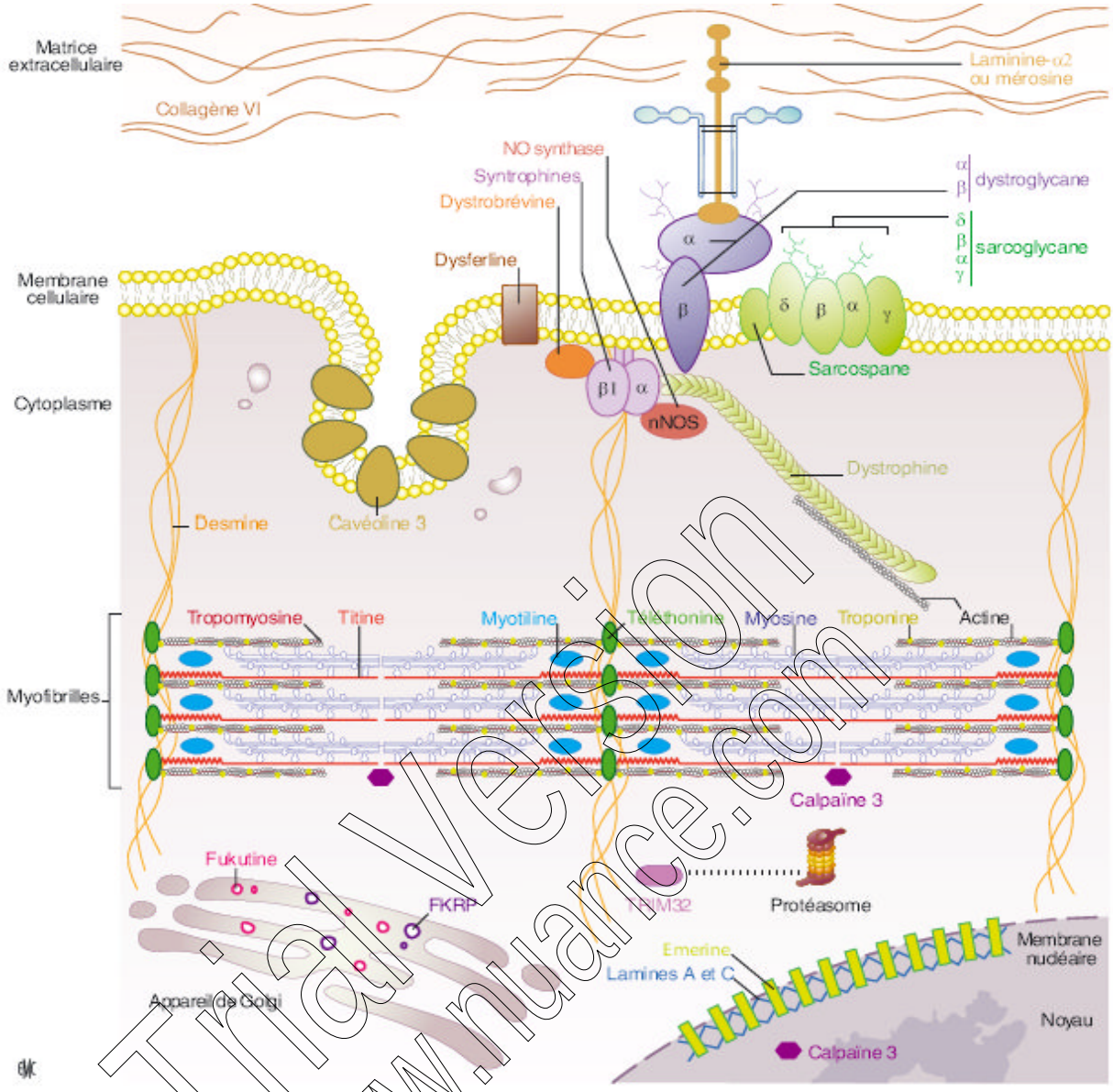
La calvéoline-3 (18kDa) interagit avec la partie C-terminale de la β-dystroglycane comme elle co-précipite avec la dystrophine et l'α-sarcoglycane.

La Grb2 possède des domaines SH2 et SH3 (Src homology domains), interagissant avec des protéines importantes dans la transduction des signaux intracellulaires et lie les domaines riches en proline de la β-dystroglycane par ses domaines SH3.

Au niveau du cytoplasme, on retrouve **les syntrophines** (α, β1 et β2) possèdent toutes un poids moléculaire de 58 kDa, l'α-dystrobrevine et la MAST (205 kDa) qui est récemment associée au complexe, elle se lie avec la dystrophine et les syntrophines et l'enzyme **monoxyde d'azote synthétase** de type neuronal (nNOS) se colocalise avec α-syntrophine.

De plus, des modifications dans les gènes de certaines protéines du DAPC se traduisent en myopathie (Lapidos *et al*., 2004 ; Fayssoil *et al*., 2007 ; Urtizberea, 2009 ; Nakagaki, 2012).

Trial Version www.nuance.com



Trial Version
www.nuance.com

Figure 8: Le complexe protéique associé à la dystrophine et les interrelations cellulaires (Fernendez et *al* ., 2010).

I.3.3.4. Protéines homologues de la dystrophine

La dystrophine possède des homologues structurels **(Fig.9)** codés par des gènes différents. Les dystrobrévines (α1, α2 et β) sont des protéines membres du complexe DAPC, présentent 30% d'homologie avec la dystrophine (Jin *et al*., 2007). Les deux isoformes α1et α2 sont également exprimées dans les tissus musculaires tandis que l'isoforme β, codée par le chromosome 18 est exprimé dans des tissus non-musculaires. La Dystrophin related protein 2 ou DRP2 est un autre membre de la famille des homologues de la dystrophine, codé par le chromosome X mais n'est pas exprimé dans le muscle squelettique ou cardiaque (Thomas et *al*., 2004). Le DRP1 ou l'utrophine présente une grande homologie structurelle avec la dystrophine, codé par le chromosome 6, elle est retrouvée dans le cytoplasme des fibres

musculaires au cours de développement fœtal et préférentiellement concentrée après la naissance au niveau des jonctions neuromusculaires des muscle sains et des patients DMD (Jasmin *et al*., 2002 ; Nakagaki, 2012), il est suggéré qu'elle exerce le même rôle que la dystrophine dans le muscle adulte et joue un rôle très important surtout dans le groupement des récepteurs de l'acétyle choline (AChR) postsynaptique (Prochniewicz *et al*., 2009).

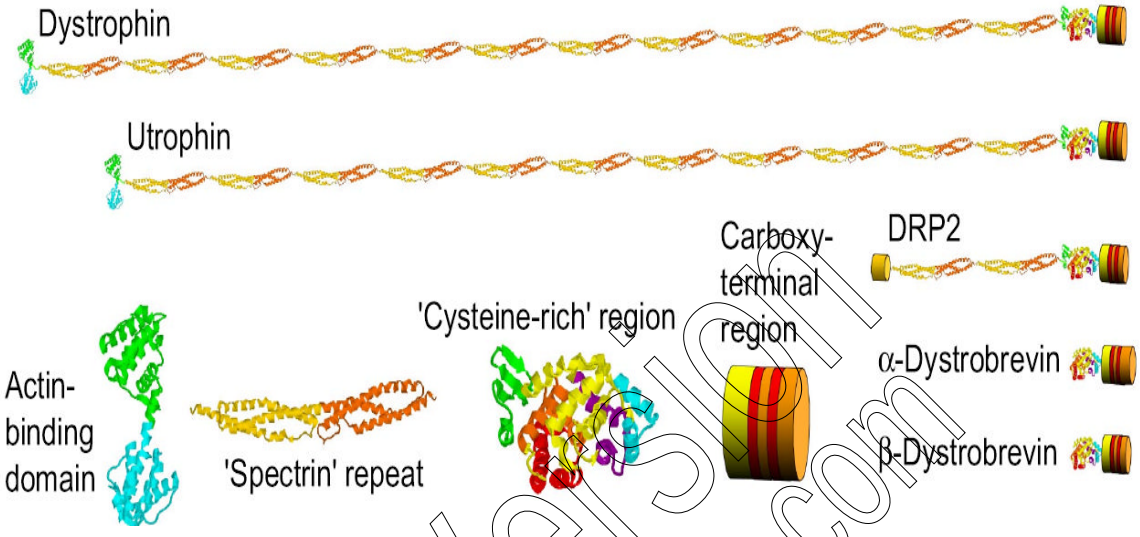


Figure 9 : **Structure des protéines homologues de la dystrophine** (Robert, 2001).

I.3.3.5. Altérations moléculaires à l'origine de DMD/DMB

Les altérations géniques les plus fréquentes sont les grandes délétions et duplications du gène *DMD* qui présentent 70% à 80%, tandis que les petits réarrangements et les mutations ponctuelles ne concernent que 20% à 30%. Il existe dans le gène *DMD* deux points chauds dit *hot spot* pour les délétions, l'une localisée au niveau de la partie centrale du géne qui est la plus fréquemment mutée (exons 45 à 55) et l'autre au niveau de l'extrémité 5' (exons 2-19). Les petits réarrangements sont dus le plus souvent à des mutations non sens, des petites délétions décalant le cadre de lecture, des insertions et des duplications touchant quelques nucléotides, ou des mutations d'un site d'épissage mais très rarement des mutations faux-sens. Il est admis que les mutations maintenant le cadre de lecture (in frame) permettant la synthèse d'une dystrophine anormale mais partiellement fonctionnelle et sont associe à un phénotype BMD. En revanche les mutations décalant le cadre de lecture (out of frame*)* entrainant une absence totale de la dystrophine et aboutissant au phénotype DMD (Fayssoil *et al*., 2007 ; Fernandez *et al.*, 2010 ; Tselikas *et al*., 2011). Il est important de souligner qu'il existe des porteurs de larges délétions mais ne présentent pas de signes cliniques particuliers si ce n'est qu'un taux de CPK un peu plus élevé de la normal (Benchaouir et *al*., 2008).

Trial Version
www.nuance.com

I.3.3.6. Physiopathologie des DMD/DMB

La dystrophine joue un rôle important dans le maintien de l'architecture cellulaire et la stabilisation du sarcolemme pendant les cycles répétés de contractions et de relâchements. Elle crée un lien mécanique via son complexe et permet la transduction du signal entre le cytosquelette contractile et la MEC, elle se concentre dans la surface post-synaptique des jonctions neuromusculaires (JNM) et des synapses gamma-amino acide butyrique (GABAergique) (Banks et *al*., 2009).

L'absence de cette protéine est associée à une diminution de l'immunomarquage de toutes les glycoprotéines du DAPC, ce qui conduit à une faiblesse et une vulnérabilité accrue du sarcolemme durant les tensions de la contraction musculaire induisant leur dégénérescence avec libération des CPK dans le sang des patients, des changements conformationnels des canaux calcique conduisant à l'afflux exacerbé d'ions Ca++ (Emery., 2002) ayant pour résultat l'activation des protéases endogènes calcium-dépendantes, l'inhibition de l'activité mitochondriale et l'hypercontraction des fibres musculaires, une diminution de la quantité et diffusion anormale du nNOS dans le cytosol, de même que sa production d'oxyde nitrique (NO) est réduite. Dans le muscle squelettique normal, le NO réduit la vasoconstriction au cours de la contraction pour adapter le flux sanguin aux besoins physiologiques, cette activité protectrice est déficiente dans le muscle dystrophique ce qui déclenche la survenue d'ischémie, et participe aussi dans la libération du Ca++ du réticulum sarcolémmique, la glycolyse et l'activation des cellules satellites (Nakagaki, 2012).

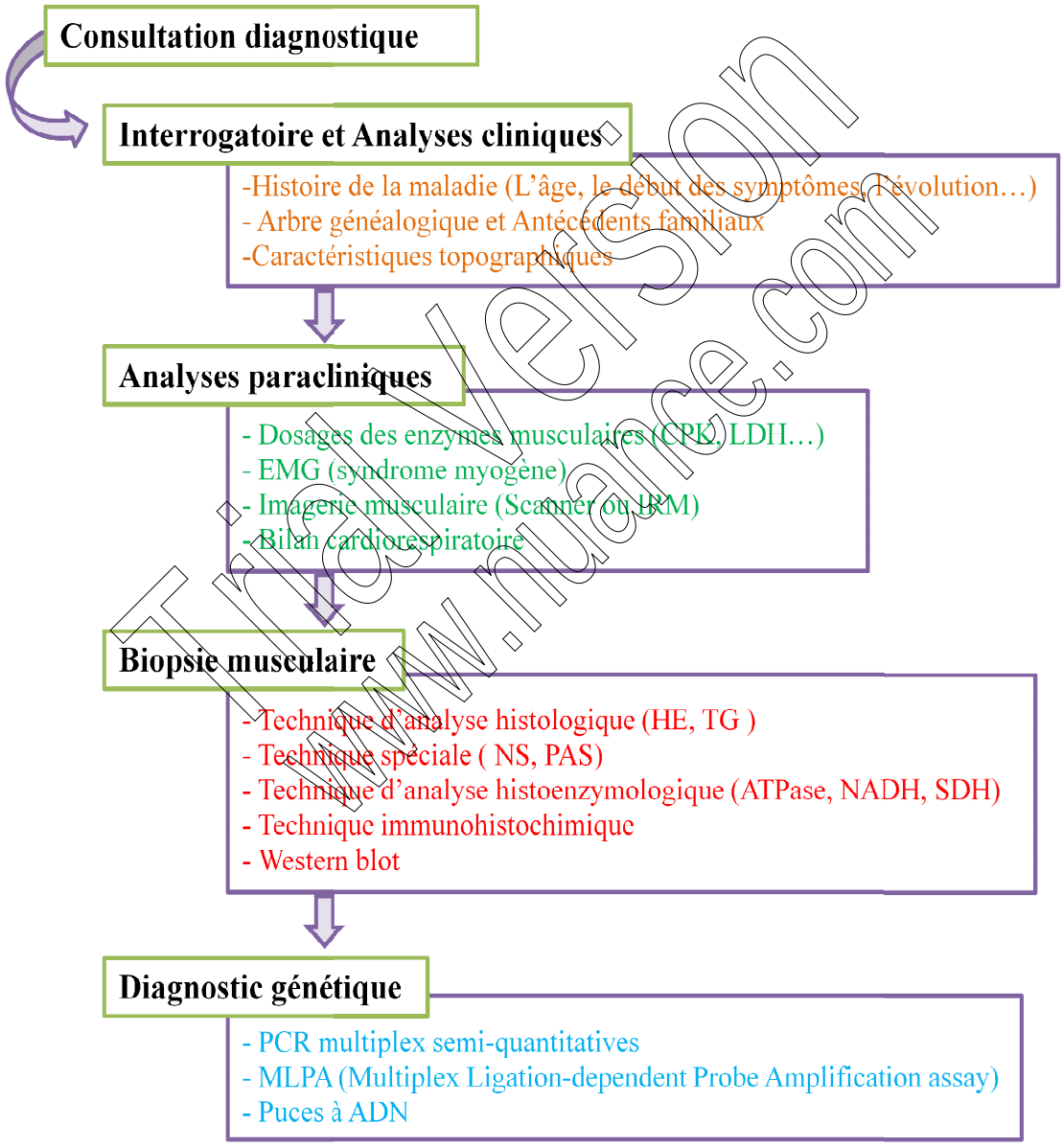
Toutes ces perturbations aboutissant à une éventuelle nécrose qui provoque une réponse inflammatoire endogène accompagnée par des mécanismes d'activation des monocytes phagocytaire qui joue un rôle dans le nettoyage des débris nécrotiques et favorise le processus régénératif. De plus, ils jouent un rôle amplificateur de la réponse inflammatoire par la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires telles que l'Il-6 et le TNFα contribuant au recrutement des macrophages. Ces dernières produisent des facteurs de croissance qui facilite la réparation du tissu en activant les cellules satellites et l'angiogenése (Fayssoil et *al*., 2007 ; Messina et *al*., 2011). La chronicité des cycles nécrose-régénération aboutit à une diminution graduelle de la force musculaire, par conséquence, les fibres musculaires seront remplacées par du tissu conjonctif (fibrose) et du tissu adipeux (adipose) (Urtizberea, 2009).

Trial Version www.nuance.com

I.4. Diagnostic des dystrophinopathies DMD/BMD

La démarche diagnostique nécessite l'association de l'analyse clinique et paraclinique avec différentes examens complémentaires nécessitent un prélèvement sanguin ou une biopsie musculaire. Cette dernière est un acte médical traumatisant mais un élément essentiel pour aboutir à un diagnostic positif et étiologique d'une myopathie.

Par l'étude immunohistochimique, la mise en évidence du déficit protéique oriente l'analyse génétique (Petiot et Urtizberea, 2004).



Traduction www.nuance.com

Figure 10: Stratégie diagnostic. (Petiot et Urtizberea, 2004 ; Bunyan, 2007 ; Sewry, 2010 ; Fernandez et *al*., 2010).

I.5. INTERET DES MODELES ANIMAUX

Les modèles animaux sont indispensables pour des études physiopathologiques d'une part et pour effectuer des essais thérapeutiques précliniques d'autre part. Il existe trois modèles animaux spontanés caractérisés par une absence d'expression de dystrophine musculaires :

I.5.1. Modèle murin : La souris mdx est connue depuis 1984, est le modèle animal le plus utilisé dans la DMD. Il possède une transversion d'un nucléotide C en un T à la position 3185, dans l'exon 23 du gène de la dystrophine. Elle résulte d'une absence marquée du complexe protéique associé à la dystrophine, elle est plus sujettes à la fatigue dans le cadre d'exercice quotidien mais ne présentent que peu de phénotypes associés à la maladie. La souris *mdx* possède la capacité de la reproduction en comparaison aux humains.
Il existe d'autres souches de souris *mdx* double mutantes ont été confectionnées, elles présentent des phénotypes beaucoup plus sévères que les souris *mdx* (Souris *mdx* / *utrophine*, Souris *mdx* / *MyoD*, Souris *mdx* / *α7-intégrine*…) (Chamberlain et *al*., 2002 ; Willmann et *al*., 2009).

I.5.2. Modèle canin: Il existe différentes sortes de chiens dystrophiques pour étudier la DMD mais celui qui est le plus intéressant est le chien Golden Retrovier Muscular Dystrophy (GRMD). L'absence de la dystrophine chez les chiens cause une myopathie et une cardiomyopathie similaire aux patients DMD. Ce modèle, présente des taux de CPK élevés au cours de l'exercice, une démarche chambranlante, une difficulté à ouvrir la mâchoire et à se nourrir. Du point de vue histologique, les fibres nécrosées sont graduellement remplacées par du tissu fibreux causant une atrophie et seule la partie N-terminale de la dystrophine qui peut être détectée par les anticorps.

De manière générale, leur phénotype est bien plus sévère que la souris mdx (Willmann et *al*., 2009 ; Zucconi et *al*., 2009).

I.5.3. Modèle félin : des chats Hypertrophic feline muscular dystrophy (HFMD) ne possédant pas de dystrophine, ont été aussi décrits dans la littérature. Ce modèle possède moins de signes phénotypiques caractéristiques de la DMD que les autres modèles animaux. De plus, leurs muscles sont hypertrophiques, causant à long terme des détériorations respiratoires et cardiaques évoluant parfois vers la mort (Brignol, 2006).

Trial Version www.nuance.com

I.6. STRATEGIES THERAPEUTIQUES

I.6.1. Les traitement actuel disponible : consistent à améliorer le quotidien et l'espérance de vie des patients. Principalement une kinésithérapie régulière pour optimiser de la fonction musculaire et améliorer la fonction respiratoire, des appareillages et chirurgie orthopédiques pour corriger les déformations vertébrales, la vitamine D et le calcium pour lutter contre l'ostéoporose. Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion afin d'améliorer la fonction cardiaque et un traitement aux corticoïdes, des anti-inflammatoires (prédnisone, déflazacort…) est aussi utilisé pour retarder la perte de la marche (AFM, 2008 ; Urtizberea, 2009).

I.6.2. Les approches pharmacologiques : les chercheur essaient de favoriser la croissance musculaire en bloquant l'action de la myostatine, un inhibiteur endogène de la croissance musculaire et d'inhiber les protéases pour stabiliser les cellules musculaires. La ciclosporine, molécule inhibitrice de la voie calcium/calmoduline et la sur-expression du facteur de croissance IGF-I semblent diminuer la sévérité de la maladie (Brignol., 2007; Pichavant et *al*., 2010). L'administration de l'utrophine par voie orale, pourrait partiellement remplacer le manque de la dystrophine et avoir un rôle protecteur dans le muscle (Fernandez et *al*., 2010).

I.6.3. Les approches géniques : la thérapie génique dans le cadre de la DMD consiste à introduire via des vecteurs viraux ou non viraux, une copie saine du gène *DMD* codant pour une dystrophine fonctionnelle. Une des autres manipulations géniques prometteuses est la thérapie par "saut d'exon", qui intervienne au moment de l'épissage des ARNm t vise à supprimer la partie comportant la mutation pour rétablir le cadre de lecture et permettre à la cellule de produire une dystrophine plus courte mais fonctionnelle (Pichavant et *al*., 2010; AFM, 2012).

I.6.4. Les approches cellulaires : consistent à la transplantation de cellules souches/progénitrices (hématopoïétiques, mésangioblastes ou myoblastes). Ces cellules souches peuvent être prélevées chez un individu donneur sain (thérapie hétérologue) ou prélevées directement (thérapie autologue) et réimplanter chez l'individu malade après la correction du déficit génétique par la thérapie génique ex vivo.

Par rapport à la thérapie génique isolée, la combinaison avec la thérapie cellulaire permet de bénéficier des propriétés de régénération et probablement de corriger le déficit dans des régions tissulaires plus étendues et de réduire une partie des problèmes immunologiques dus au vecteur viraux (Lee Sohn et Gussoni, 2004; Krahn et *al*, 2008 ; AFM, 2012).

Trial Version www.nuance.com

Matériel et méthodes

Trial Version
www.nuance.com

II.1. Matériel biologiques

Notre étude prospective a porté sur une banque des biopsies musculaires cryoconservées à partir de l'année 2007 à une température de -80°C, elles sont issues de patients présentant des signes cliniques de dystrophie musculaire. L'examen clinique s'est déroulé au niveau du service de neurologie du centre Hospitalo-Universitaires (C.H.U) MUSTAPHA BACHA et des autres C.H.U : de BENI MESSOUSS, de KOUBA, d'AIT IDIR et de BAB EL OUED.

II.2. Prélèvement des échantillons

Les biopsies sont prélevées de patients après une intervention chirurgicale simple, nécessitant une anesthésie locale chez les adultes et parfois totale chez les petits enfants et les bébés. Les muscles de choix comprennent le deltoïde du membre supérieur ou le quadriceps du membre inférieur.

L'incision doit être faite dans le sens de l'arrangement longitudinal des fibres et doit comporter suffisamment de tissu musculaire qui est séparé en plusieurs fragments. Les échantillons sont par la suite rapidement placés dans un récipient sous froid (glaçon) et menu d'une fermeture hermétique pour être transporter au laboratoire d'anatomie pathologique du Centre de Pierre et Marie Curie (CPMC) pour une analyse tissulaire approfondie.

II.3. Identification des échantillons

Une fois dans le laboratoire anatomo-pathologique, chaque échantillon reçoit un numéro d'identification qui sera reporté sur son bloc de paraffine et le récipient de la cryoconservation.

Une fiche de renseignements obligatoire accompagne chaque échantillon et comporte les renseignements suivants:

- L'identité du patient : nom, prénom, âge et sexe.
- Le siège, la date et le nom du médecin préleveur.
- L'âge du début et le mode d'évolution de la maladie.
- Les symptômes cliniques.
- Les données paracliniques : dosages enzymatiques, imagerie musculaire, électro-myogramme.
- Les hypothèses diagnostiques.

TrialVersion www.nuance.com

II.4. Fixation et cryoconservation des prélèvements

Les échantillons reçus sont des tissus frais, ils doivent être congelés dans les plus brefs délais. Le fragment est orienté dans le sens longitudinal des fibres musculaires dont les extrémités pincées sont éliminées ; sur un support de liège, il est enrobé par l'OCT (Optimum Compound Tissue) puis rapidement immergé dans l'isopentane de -80°C qui est refroidi dans l'azote liquide de -160°C. Une fois congelé, le fragment est stocké à -80°C. Il est à noter que la chaîne du froid ne doit pas être rompue jusqu'à l'utilisation finale de l'échantillon. Un autre fragment est fixé dans le formol à 10% pour la confection des blocs en paraffine.

II.5. Confections des coupes au cryostat

Les fragments de tissu portés sur le support de liège sont fixés sur un support de métal et enrobé par l'OCT. L'ensemble est placée dans le cryostat réglé à -20°C pour que le tout devient un seul block dur. Des coupes de 5 à 7 µm d'épaisseur sont confectionnés, puis ils sont étalées sur des lamelles ou des lames silanisées (annexe 3) et mises à sécher à l'aire libre. Une coloration rapide au Bleu de toluidine est réalisée pour déterminer le sens de l'arrangement des fibres musculaires.

Dans le cas ou la coloration est prévue les heures qui suivent la coupe, les lames sont conservées à +4°C, dans le cas ou elle est programmées ultérieurement, les lames et lamelles sont emballées dans un papier aluminium et conservées à -80°C.

NB : Nous avons fait au moins 12 lamelles et 13 lames avec une seule biopsie.

II.6. Méthodes d'étude morphologique

Les méthodes des études morphologiques est basées sur différentes colorations topographiques accentuent les contrastes pour mieux reconnaître les différents éléments de la préparation et pour identifier les foyers des lésions musculaires.

II.6.1. Coloration à l'Hématoxyline-Éosine

C'est la technique la plus utilisé en histologie animale et en anatomie pathologique de routine. Cette coloration nous renseigne sur l'état des myocytes et sur l'état du tissu conjonctif endo et périmésial dont l'Hématoxyline colore les structures acides qui se concentrent dans le noyau sous forme d'ADN nucléaire en bleu violet tandis que l'Eosine colore les composants cytoplasmiques en rose qui sont de nature basique sauf s'ils contiennent une grande quantité d'ARN, prenant alors, dans ce cas, une coloration violette.

Trial Version www.nuance.com

Par conséquent les lames sont incubées dans l'Hématoxyline pendant 10 minutes puis dans l'Eosine pendant 5 minutes **(annexe 5)**.

II.6.2. Coloration au Trichrome de Gomori

La coloration de trichrome permet de visualiser le contingent mitochondrial, et la recherche des inclusions anormales dans le cytoplasme des fibres musculaires et l'état du tissu conjonctif péri et endomysial.

Après l'immersion dans l'Hématoxyline, les lames sont incubées dans le Trichrome de Gomori qui sera suivie d'un lavage avec de l'eau acidifiée suivi d'une étape de déshydratation **(annexe 5).**

II.7. Méthode d'étude Biochimique

Les techniques enzymatiques oxydatives sont le lien entre la morphologie et la biochimie du tissu musculaires. Notre étude inclue deux activités enzymatiques qui permettent de préciser la répartition des mitochondries, de réticulum endoplasmique et de système T.

II.7.1. Coloration de la Succinate Déshydrogénase (SDH)

Sur des coupes de tissu on fait agir une solution de Succinate de Sodium (substrat) et le nitrobleu de tetrazolium de couleur jaune pour mettre en évidence l'activité métabolique oxydative mitochondriale de la succinate déshydrogénase. Lors de l'incubation des coupes à 37°C dans la solution SDH le Succinate de Sodium est transformé par l'enzyme en fumarate avec libération d'hydrogène. Les atomes d'hydrogène se combinent au nitrobleu de tétrazolium qui vire du jaune au bleu dans les zones de tissu qui contiennent l'enzyme tandis que les zones tissulaires dépourvues de l'enzyme restent de couleur jaune **(annexe 5).**

II.7.2. Coloration du nicotinamide adénine dinucléotide tétrazolium réductase (NADH-TR)

Le NADH-TR enzyme oxydative présente dans les mitochondries, le réticulum sarcoplasmique et les tubules T. Au cours de l'incubation des coupes dans la solution NADH-TR à 37°C, l'activité enzymatique de ce dernier libère l'hydrogène du substrat dont l'hydrogène libéré est transféré au tetrazolium. Avec l'addition de l'hydrogène, le tetrazolium est converti en colorant formazan bleu mis en évidence la répartition de l'activité enzymatique dans le réseau intermyofibrillaire **(annexe 5).**

Trial Version www.iuane.com

II.8. Méthode d'étude Immuno-Histochimique

L'immunohistochimie en microscope optique à trois principales indications en pathologie musculaire : l'étude des protéines membranaires et submembranaires associés à la dystrophine, la recherche d'une expression anormale des éléments inflammatoires et la recherche d'une accumulation anormale des protéines myofibrillaires via l'utilisation des anticorps anti myosine en ciblant les chaines lourdes.

L'utilisation d'un panel d'anticorps primaires monoclonaux (tableau N°II) de souris dirigés contre les trois domaines de la dystrophine et d'autres protéines musculaires est nécessaire pour identifier les réactions faussement négatives, pour la différentiation des dystrophies musculaires et aussi pour orienter l'analyse des mutations géniques.

Les anticorps sont originaires du laboratoire Novocastra (Leica Biosystems). Ils sont commercialisés sous forme lyophilisée. La liquéfaction est faite par un volume de 1 ml d'eau distillée stérile juste avant l'utilisation pour la première fois, le produit doit se conserver à +4°C.

II.9. Technique d'immunoperoxydase indirecte sur coupes congelées

Toutes les incubations des coupes sont réalisées dans une chambre humide et à la température ambiante, avec des lavages 2 fois 5 minutes avec le tampon PBS entre chaque étape. Les coupes séparément, sont incubées avec les différents anticorps primaires (Tableau N°II) pendant 1heure ; par la suite avec l'anticorps secondaire monoclonal de chèvre anti-immunoglobuline de souris conjugué avec la peroxydase (NCL-GAMP, 1 :50) pendant une heure.

La mise en évidence de l'activité peroxydase est réalisée par incubation des lames avec un substrat chromogène: 3-3' diaminobenzidine tetrachloride (DAB), après la révélation les lames sont rincées dans l'eau distillée pendant 10 minutes. Une contre coloration est réalisée à l'Hématoxyline afin de mettre en évidence les noyaux **(annexe 5).**

Trial Version www.nuance.com

Tableau II : Liste des anticorps utilisés.

Antigène	Anticorps	Nomenclature	Clone	Dilution
La dystrophine est une protéine sub-sarcolemmale de 427 kDa joue un rôle primordial dans le maintien de l'architecture cellulaire.	Anti-dystrophine (domaine central)	NCL-DYS1	Dy4/6D3	Pur
	Anti-dystrophine (C-ter)	NCL-DYS2	Dy8/6C5	1 :10
	Anti-dystrophine (N-ter)	NCL-DYS3	Dy10/12B2	1 :10
La α, β, γ et δ sarcoglycanes sont des protéines transmembranaires de 50, 43, 43, 35 kDa se lient entre elles et fonctionnent comme une protéine unique et se lient à la β-dystroglycane de 35 kDa formant un lien entre la dystrophine et MEC.	Anti-α-sarcoglycane	NCL-a-SARC	Ad1/20A6	1 :10
	Anti-β-sarcoglycane	NCL-b-SARC	βSarc/5B1	1 :50
	Anti-γ-sarcoglycane	NCL-g-SARC	35DAG/21B5	1 :50
	Anti-δ-sarcoglycane	NCL-d-SARC	δSarc3/12C1	1 :50
	Anti-β -dystroglycane	NCL-b-DG	43DAG1/8D5	1 :50
La chaine lourde des myosines de 200 kDa dans laquelle se trouve l'activité ATPasique de la molécule, qui fournit l'énergie nécessaire à la contraction.	Anti-chaine lourde de la myosine rapide	NCL-MHCf	WB-MHCf	1 :80
	Anti-chaine lourde de la myosine lente	NCL-MHCs	WB-MHCs	1 :20

Trial Version www.nuance.com

II.10. Montage des coupes entre lames et lamelles

Le montage des coupes se fait entre lames et lamelles avec un milieu de montage permanent aqueux ou non aqueux, constituant un revêtement solide qui facilite la manipulation et la conservation. Le milieu de montage aqueux (Faramount Aqueous Monting Medium) renferme l'azide de sodium (NaN3) est utilisé pour les lames qui ne subissent pas un processus de déshydratation tandis que le milieu de montage non aqueux ou l'Eukitt poly (butylméthacrylamide-co-methylméthacrylamide) est utilisé si les lames sont déshydratées par le passage des coupes colorées dans plusieurs bains d'alcool à titre croissant puis dans le xylène. Les lames se conservent à l'obscurité et à température ambiante.

II.11. Observations et acquisition d'images numérique

Les coupes sont analysées sous microscopie optique Zaiss (Axioscop 40) et sont photographiées avec un appareil photo numérique adapté (Leika lazes).

II.12. Traitement des données et analyse statistique des résultats

Les données d'étude histologique et immunohistochimique des patients (N= 21) ont été représenté sous forme de tableaux et figures puis analysées qualitativement et corrélées par le logiciel statistique PAST (vers.1.37) en utilisant le coefficient de corrélation de Pearson (r) qui est sollicité pour comparer deux variables numériques. Pour un but d'apprécier les éventuelles relations entre les paramètres anatomo-pathologiques et immunohistochimique.

$r = \mathrm{Cov}(x,y)/S_x S_y$

$\mathrm{Cov}(x,y)$: entre les variables x et y.

S_x: écart type de x et S_y : écart type de y.

La corrélation est positive lorsque les chiffres se rapprochent de +1et elle est négative lorsque les chiffres se rapprochent de -1. La corrélation est absente lorsque les chiffres égale à 0 et se rapprochent de 0 dont l'intervalle est de [-0.5, +0.5].

La corrélation a été confrontée à une probabilité *P*. Cette probabilité est significative lorsque les chiffres sont <0.05 et elle n'est pas significative lorsque les chiffres sont >0.05.

Trial Version www.nuance.com

Résultats

Trial Version
www.nuance.com

Notre étude porte sur des biopsies musculaires de 21 malades suspects de dystrophinopathie, diagnostiqués au niveau du CPMC d'Alger.

Les résultats sont présentés par une démonstration microscopique des manifestations anatomo-pathologiques accompagnées avec ce type de pathologie ainsi que l'immuno-marquage de certaines protéines impliquées dans l'intégrité et le fonctionnement de la fibre musculaire.

III.1. Processus dystrophique au niveau tissulaire et cellulaire

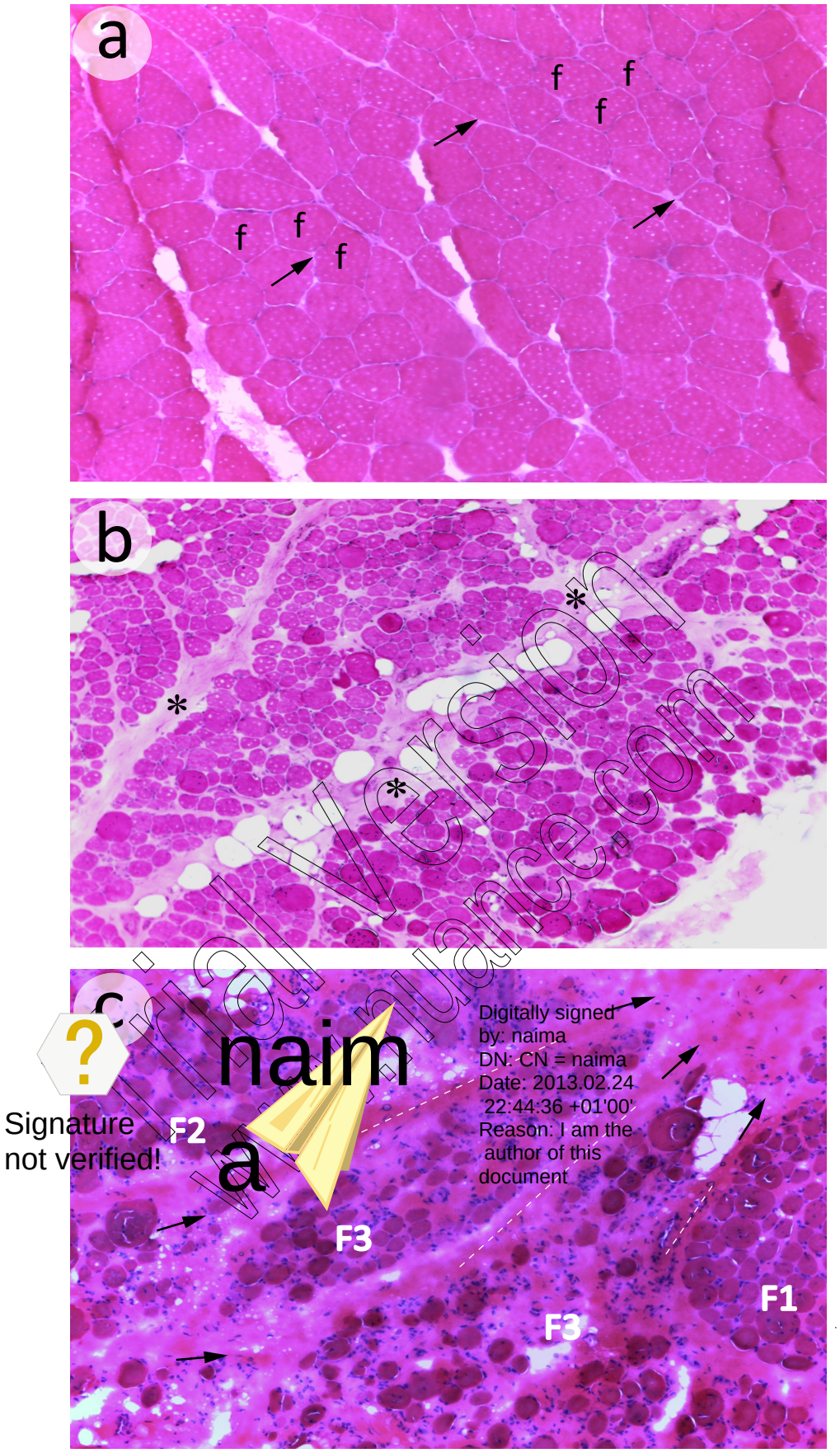
III.1.1. Altérations accompagnant le processus dystrophique

Dans le muscle normal **(Fig.11a)** les fibres musculaires sont de forme polyédrique, de taille homogène avec la présence de plusieurs noyaux périphériques, ils sont juxtaposés et assemblés en faisceaux. La couche de tissu conjonctif qui sépare les fibres musculaires (l'endomysium) et les faisceaux musculaires (périmysium) est très fine **(Fig.11a).**

Par contre dans le muscle dystrophique, des modifications dans l'organisation du tissu musculaire sont observées ; ceci se reflète par la présence d'une hétérogénéité anormale dans la taille des fibres musculaires. Cette dernière se caractérise par l'existence de fibres arrondies de petite taille atrophiques dispersés et de fibres de grande taille hypertrophiques **(Fig. 11b).**

Un autre aspect observé est l'augmentation importante du tissu conjonctif inter-fasciculaire diffus dans la région interstitielle. De plus, la présence d'infiltrations des cellules inflammatoires est remarquable avec la ratification des fibres au sein des faisceaux **(fig. 11c).**

Trial Version
www.nuance.com



Trial Version
Nuance.com

Figure 11. Les anomalies tissulaires qui accompagnent le processus dystrophique

a. Aspect tissulaire d'un muscle normale. A noter la forme polyédrique et homogéne des fibres musculaires (f) séparées par une couche de tissu conjonctif peri et endomysiale (flèches).

b. Aspect d'une atteinte modérée d'un muscle dystrophique. La forme des fibres est arrondie et hétérogéne. A noter l'instalation de la fibrose (astérisque).

c. Aspect d'une ateinte musculaire sévére. Noter l'abondance du tissu fibreux (lignes discontinues), L'hétéro-geinité entre les faisseaux (F) des stades graduels de rarèfication des fibres.

a, b, c Hématoxyline & Eosine. Gx100

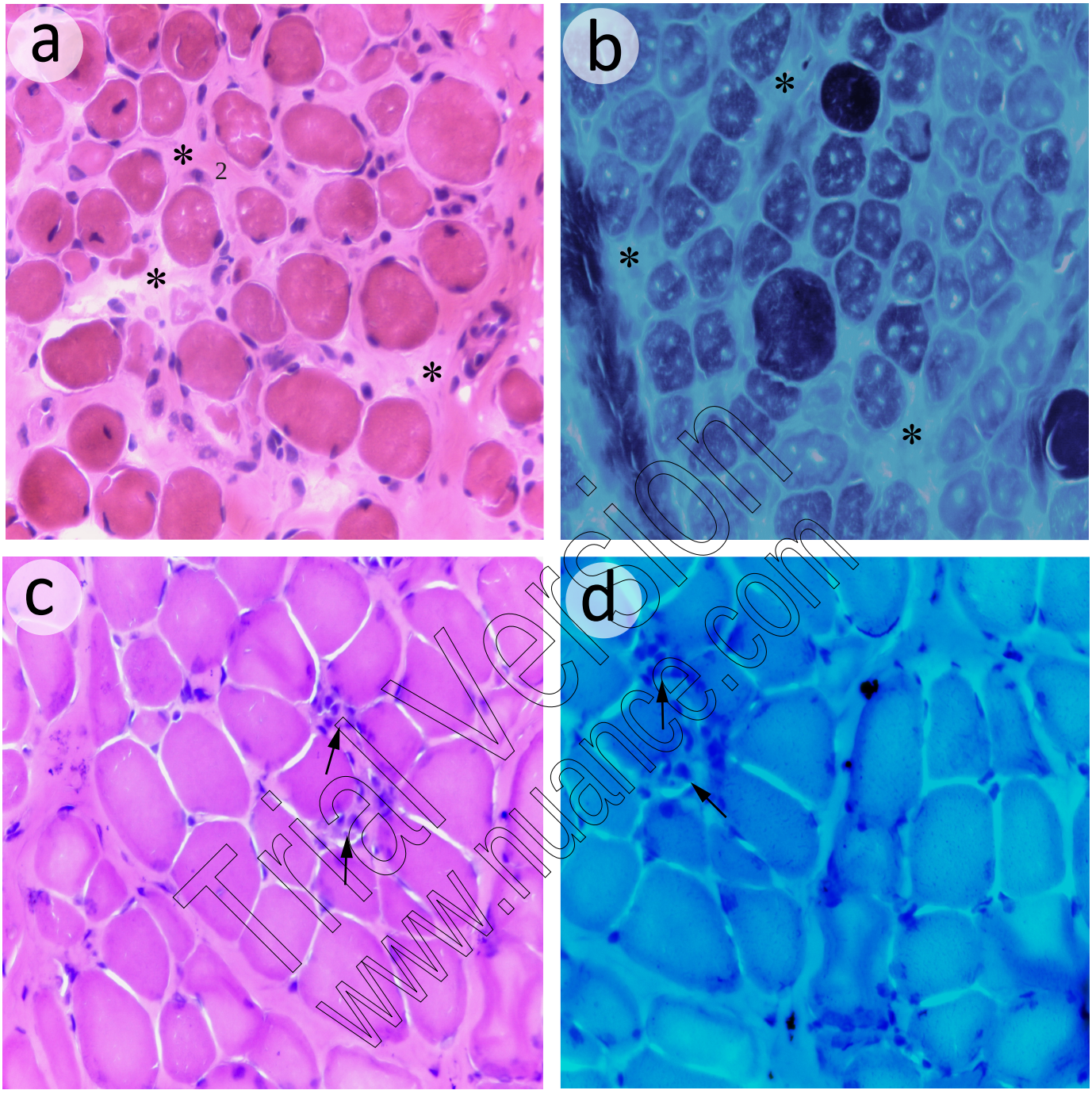
III.1.1.1.La fibrose

Les Figures **12a** et **b**, démontre de façon claire l'ampleur de la fibrose entre les fibres musculaires lors du processus dystrophique, ces dernières modifient leur taille et diminuent en nombre pour céder la place aux fibres de la matrice extracellulaire.

III.1.1.2.La nécrose

Des foyers contenant des amas de cellules inflammatoires reflétant la présence de fibres dégénératives et nécrosées, envahissent le tissu musculaire dystrophique dans certaines régions **(Fig. 12b et c).**

Trial Version
www.nuance.com



Trial Version
www.nuance.com

Figure 12 . Phénoménes de fibrose et de nécrose dans un tissu musculaire dystrophique

a, b. Noter l'épaisser du tissu conjonctif fibreux (astérisques) entre les fibres (lignes discontinues en a) avec la présence d'une hétérogeinité dans la taille des fibres musculaires.

c, d. Infiltrat inflammatoire (flèches), temoin de la présence de fibres musculaires en nécrose.

a, c. Hématoxyline & Eosine; c, d. Trichrome de Gomori. G X 400.

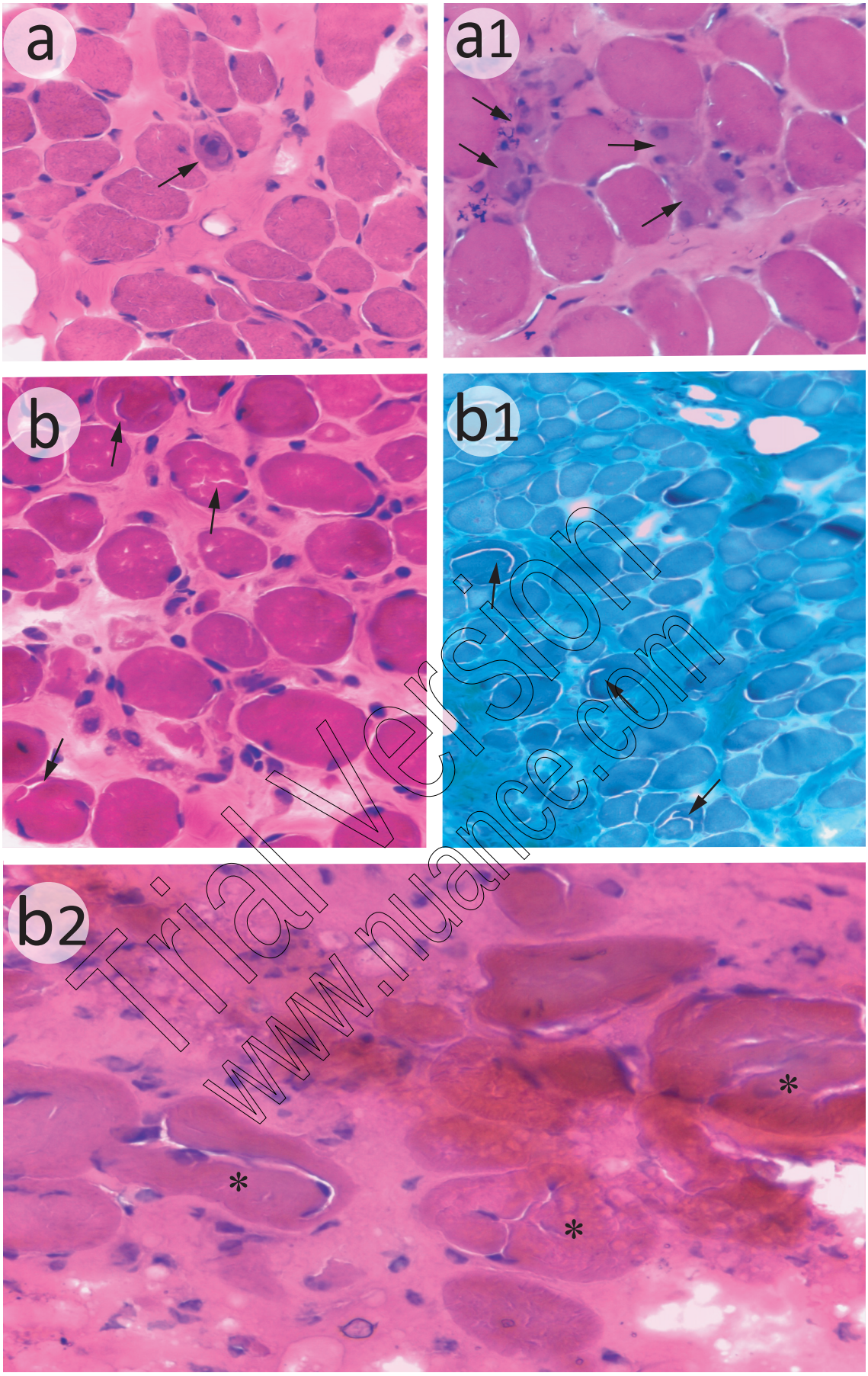
III.1.1.3.La régénération

Un autre processus est retrouvé dans le tissu musculaire dystrophique, est la régénération de fibres musculaires. Elle est indiquée par la présence de fibres à caractère jeune entre les fibres adultes **(Fig. 13a et a1)**. Les fibres en régénération sont souvent regroupées, reconnues par leurs petites tailles, leurs cytoplasmes basophiles et leurs gros noyaux centraux ou périphériques.

III.1.1.4.La segmentation

En plus de la modification de la forme et de la taille des fibres musculaires dystrophiques, un autre aspect anormale est observé, il comprend la segmentation de certaines fibres **(Fig. 13b et b1).** Des fissurations s'installent dans les fibres qui a tendance de leurs donner l'aspect polylobé **(Fig. 13b2).**

Trial Version
www.nuance.com



Trial Version
www.nuance.com

Figure 13. Phénomènes de regénération et de segmentation des fibres musculaires observés lors d'une dystrophie musculaire

a, a1. Fibres avec de gros noyaux en regénération (flèches).

b, b1, b2. Fibres en segmentation (flèches) à aspect fragmentaire (astérisques en b2).

Hématoxyline & Eosine (a, a1, b, b2); Trichrome de Gomori (b1). G X 400.

III.1.2. Modifications subcellulaires

Nous avons vu plus haut, que le processus dystrophique est accompagné par d'importantes modifications tissulaires, en parallèle, des modifications au niveau cellulaires sont observées, comprenant :

III.1.2.1.Centralisation nucléaire

Dans le cas normal, la fibre musculaire possède plusieurs noyaux réparties à sa périphérie. Cependant, dans le cas du muscle dystrophique, il existe plusieurs fibres musculaires présentant à la fois des noyaux périphériques et centraux **(Fig. 14a).**

III.1.2.2.Répartition anormale des mitochondries et du réticulum endoplasmique

L'étude des réactions oxydative des enzymes mitochondriaux et du réticulum endoplasmique SDH et NADH a un intérêt dans l'analyse de leur répartition cytoplasmique.

Dans les fibres musculaires normales **(Fig. 14b et c)**, une répartition homogène de ces deux organites cellulaires qui se remarque par la présence de réaction colorante dans toutes les fibres. Cependant, un aspect en mosaïque est retrouvé (forte et faible coloration) qui est expliqué par la présence d'une forte activité des enzymes dans le groupe de fibres de type I à coloration bleu foncé (forte activité oxydative SDH ou NADH) et le groupe de fibres de type II à coloration bleu claire (faible activité oxydative SDH ou NADH).

Dans le muscle dystrophique une réactivité très intense de la NADH reflété par une accumulation de couleur trop foncées dans des régions distinctes du cytoplasme **(Fig. 14b1).**

La réaction de la SDH dans quelques fibres musculaires présente des accumulations anormales sous sarcolemmale **(Fig. 14c).** Des fibres en voie de dégénérescence sont reconnues par une très faible réaction de la SDH **(Fig. 14c1).**

Trial Version
www.nuance.com

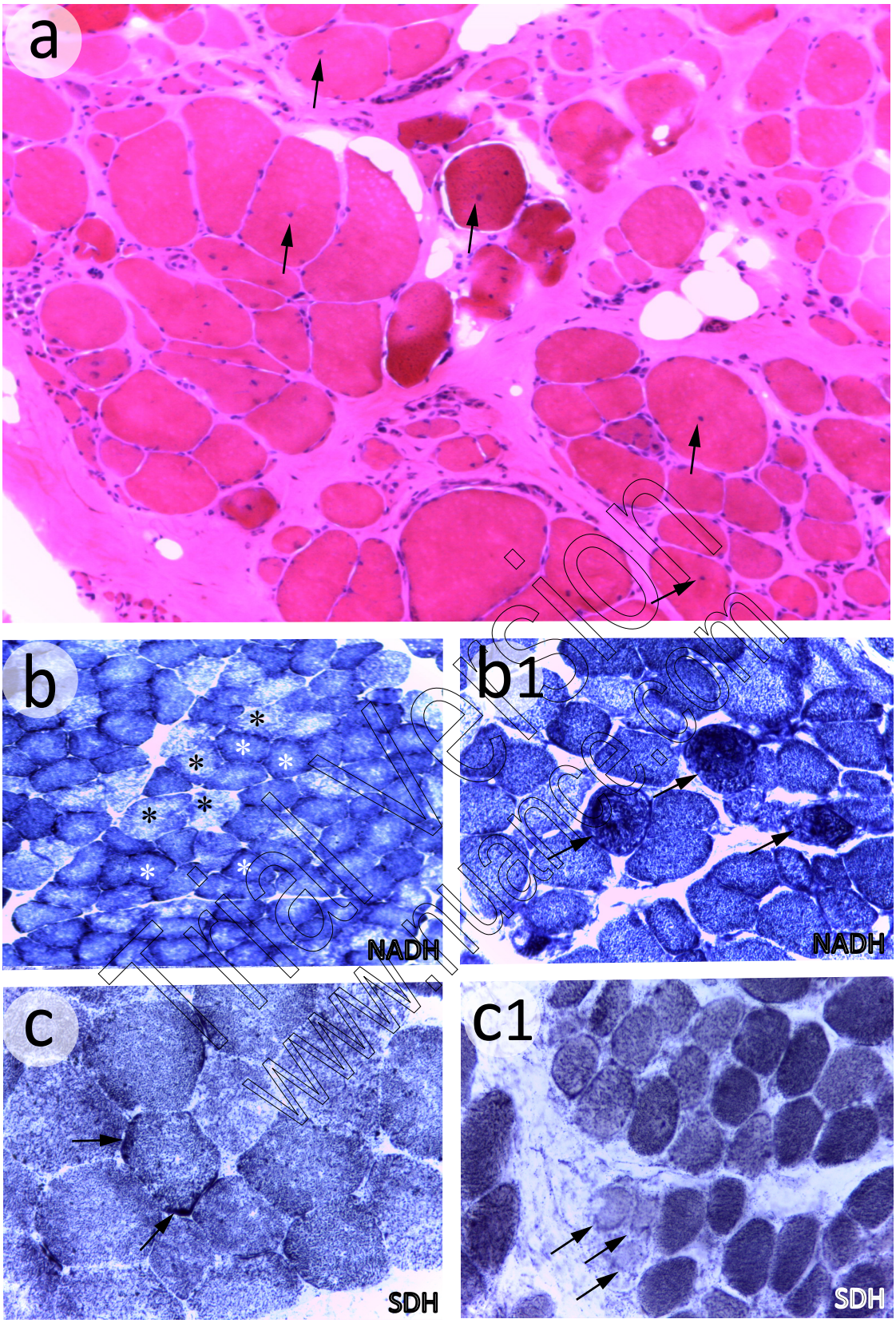


Figure 14. Les anomalies subcellulaires

a. Noter la présence de nombreux fibes musculaires présentant inhabituellements des noyaux centrés (fléches).
b. Réaction intense de la NADH dans les fibres de type I (astériques blancs), et faible dans les fibres de types II (astérisques noirs) dans le muscle normal. Dans le muscle dystrophique (b1) quelques fibres présentent une réaction trés intence et compartimentée (fléche).
c. Réaction importante submembranaire anormale de la SDH dans certaines fibres (fléches). Une réaction trés faible est observée dans certaines fibres du muscle dystrophique (c1).

a. Coloration Hématoxyline & Eosine. b, b1. Réaction histoenzymologique pour la NADH
c, c1 Réaction histoenzymologique pour la SDH. G X 100 (b), X 400 (a, b1, c, c1).

TlaVision www.tlavision.com

III.2. Etude de la distribution de la dystrophine et certaines de ses protéines associées dans les dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker

Les biopsies musculaires des cas pathologiques suspects de dystrophie musculaire de Duchenne et de Becker ont fait l'objet d'une étude approfondie par l'immunomarquage de la dystrophine et de certaines protéines associées. Différents anticorps ont été utilisés :

1/ anti- dystrophine, Dys1, Dys2 et Dys3 dirigées respectivement contre son domaine central, son domaine C-terminal et son domaine N-terminal.

2/ anti- α, -β, -γ et δ sarcoglycanes et 3/anti- β-dystroglycane.

Le marquage de la dystrophine dans le tissu musculaire squelettique normal est présenté dans la **figure (15**) ; le marquage de la dystrophine prend une localisation homogène péri-membranaire.

Trois cas suspects ont fait l'objet de cette étude, le marquage du tissu musculaire du premier patient **(Fig. 16).** De façon générale, une hétérogénéité de taille et de forme ainsi qu'un espacement important fibreux entre les fibres musculaires est remarqué. Il semble que le domaine central de la dystrophine est très faiblement présent (Dys1) et les domaines N-terminal (Dys3) et C-terminal (Dys2) sont complètement absent.

La distribution des sous-unités (α, β, γ et δ) du complexe des sarcoglycanes (protéines associées à la dystrophine) chez ce même patient, présente des variations entre les sous-unités. La distribution de l'α-sarcoglycane (α-sarc) présente une répartition membranaire continue qui semble être normale. Cependant la distribution du marquage des autres sous-unités des sarcoglycanes (β-sarc, γ-sarc et δ-sarc) semble être hétérogène : présentes dans certaines fibres avec parfois des discontinuités de marquage membranaire. Leur marquage aussi est parfois totalement et absent pour d'autres fibres musculaires.

Dans la même **figure (16),** le marquage du tissu musculaire du deuxième patient, le marquage des domaines (Dys1, Dys2, Dys3) de la dystrophine intéresse un amas de fibres du même faisceau, avec l'absence du marquage des trois domaines dans les autres groupes de faisceaux de fibres. Chez ce patient, l'immunomarquage des sous-unités α-sarc, β-sarc, γ-sarc et δ-sarc du complexe des sarcoglycanes est homogène entre les fibres musculaires et prend une localisation membranaire continue.

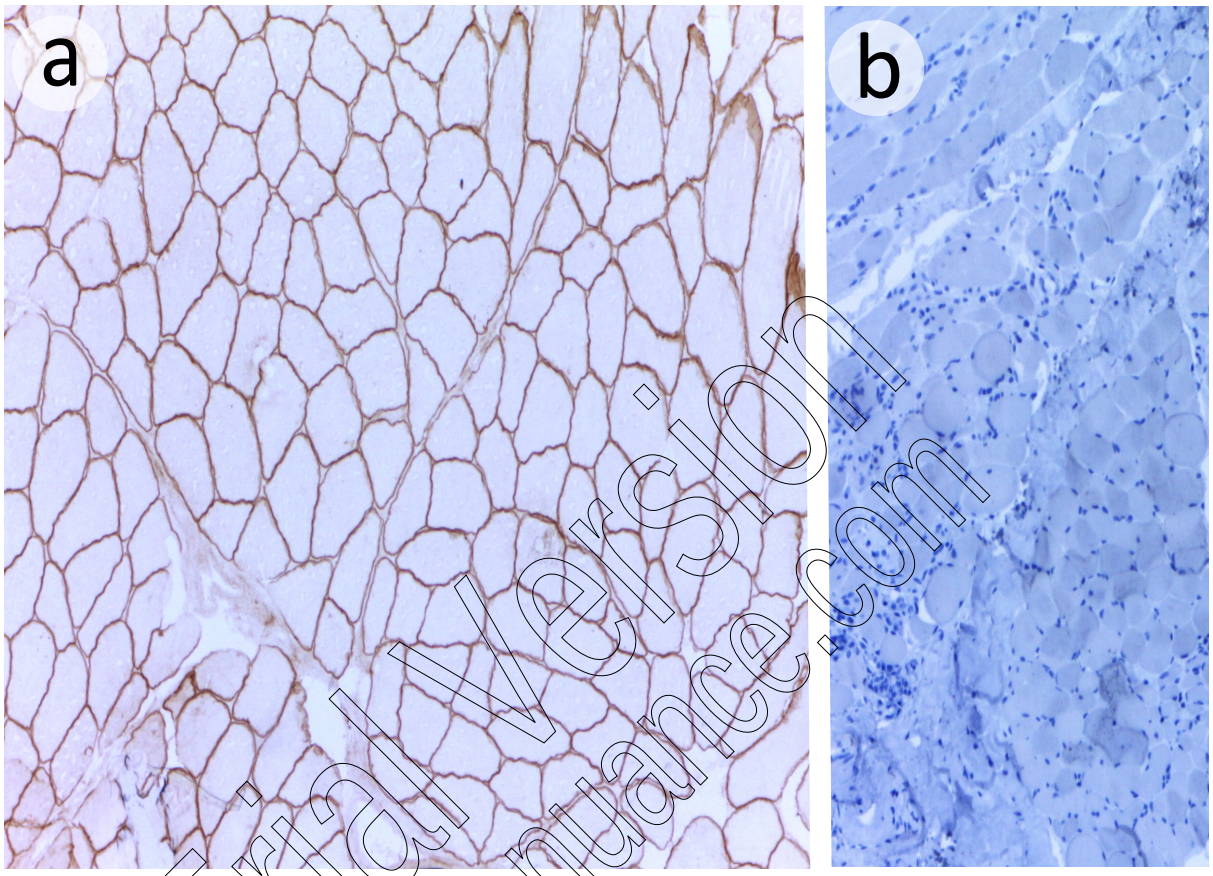
Trial Version www.nuance.com

Le tissu musculaire du troisième patient **(Fig. 17),** présente un marquage faible et hétérogène du domaine centrale de la dystrophine (Dys1) avec une absence total du marquage pour la partie N-terminale (Dys2) et la partie C-terminal (Dys3).

En outre, l'immunoréaction des sous-unités du complexe sarcoglycanes révèle un marquage moyen pour la sous-unité α-sarc, très fort pour les sous unités β-sarc et γ-sarc et très faible pour la sous unité δ-sarc.

L'immunomarquage de la β-dystroglycane (β-DG, **Fig.18**) montre une forte immunoréaction péri membranaire de la protéine qui est homogène dans toutes les fibres musculaires.

Trial Version
www.nuance.com

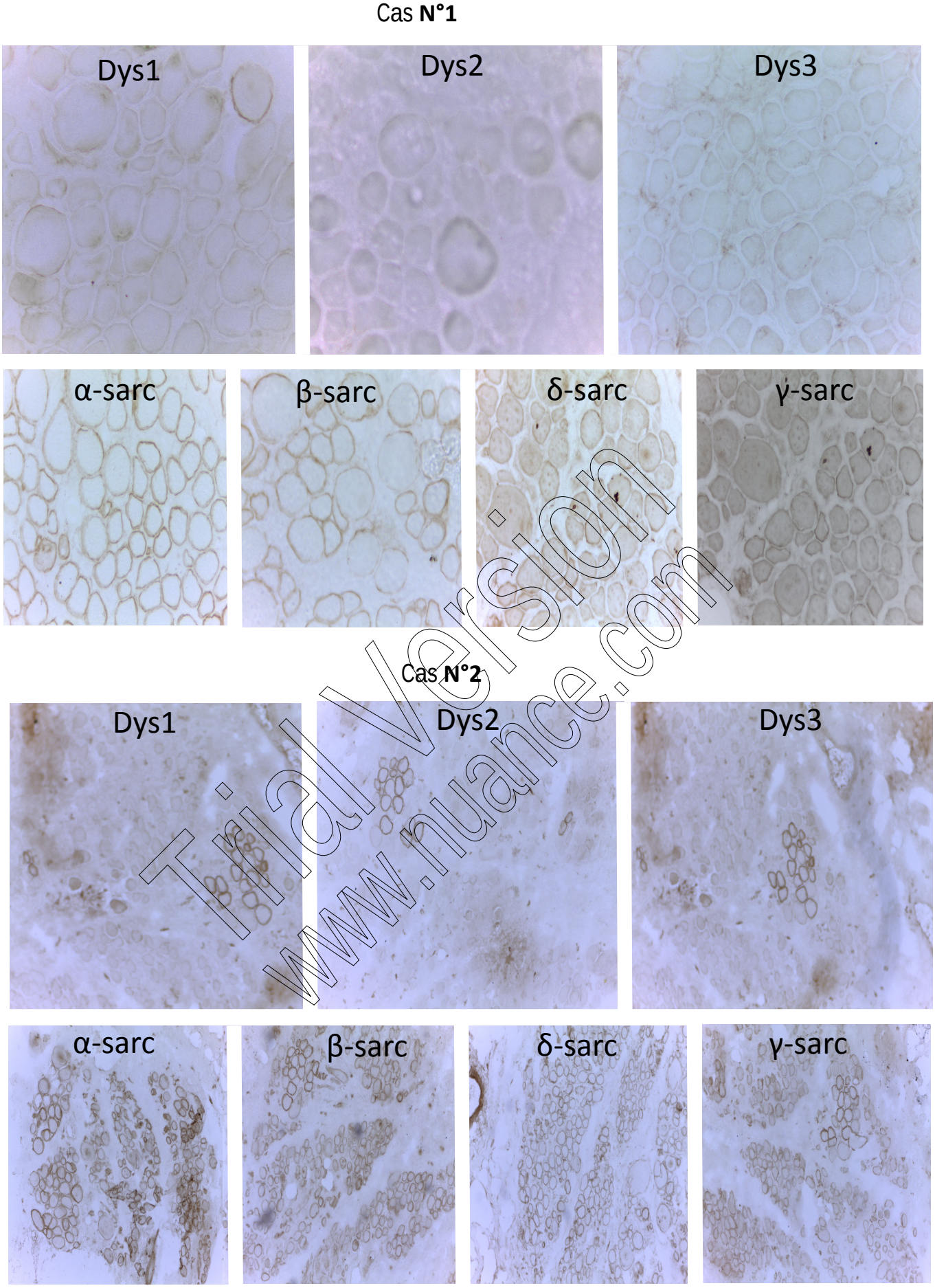


Trial Version
www.nuance.com

Figure 15. Immunomarquage de la dystrophine dans un tissu musculaire normal

a. La dystrophine est régulièrement localisée au niveau du compartiment submembranaire.
b. Témoin négatif.

a, b GX 100



Trial Version
www.nuance.com

Figure 16. La dystrophine et certaines de ses proteines associées chez les dystrophinopathes

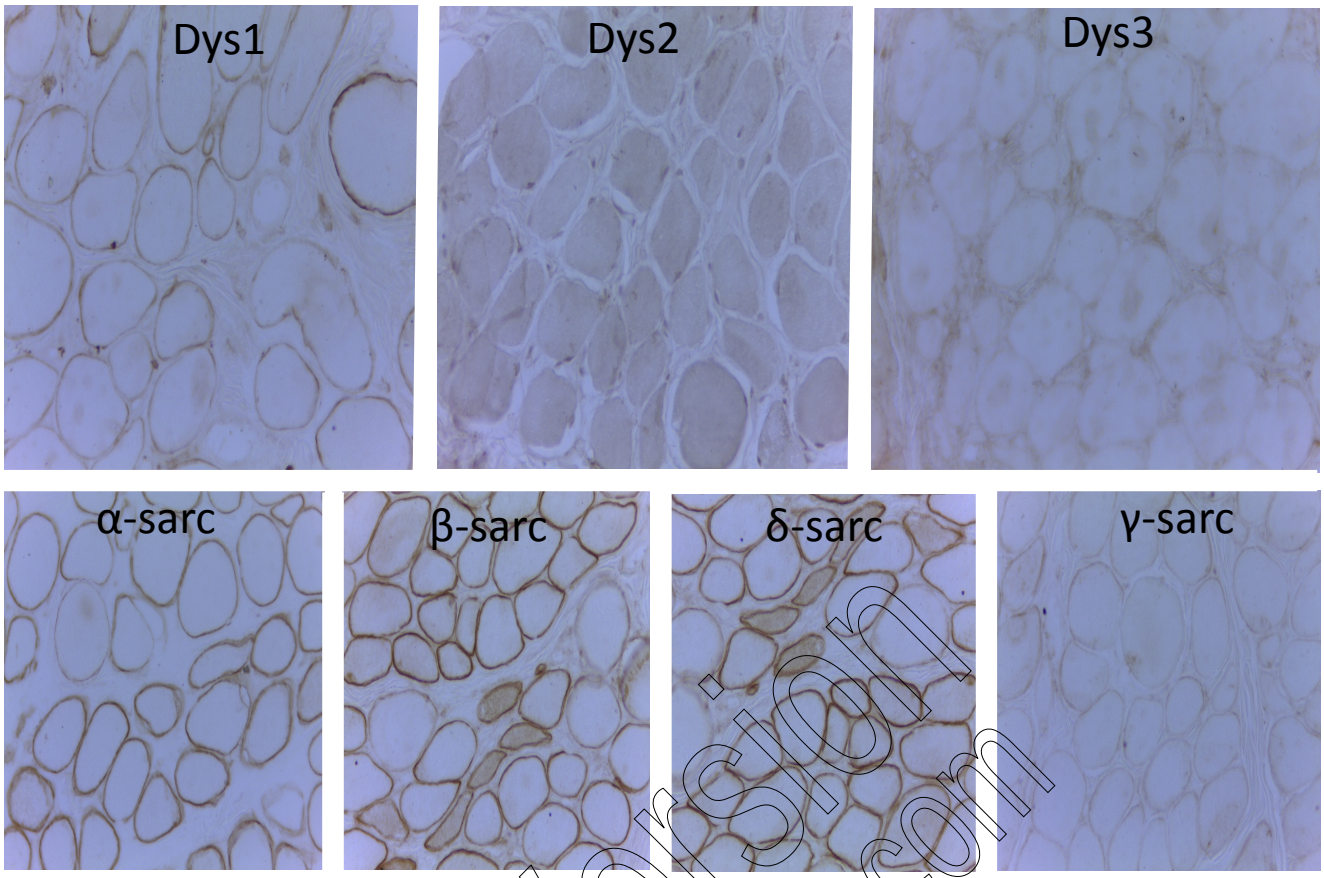


Figure 17. La distrophine et certaines de ses proteines associées chez les dystrophinopathes (suite)

Trial Version
www.nuance.com

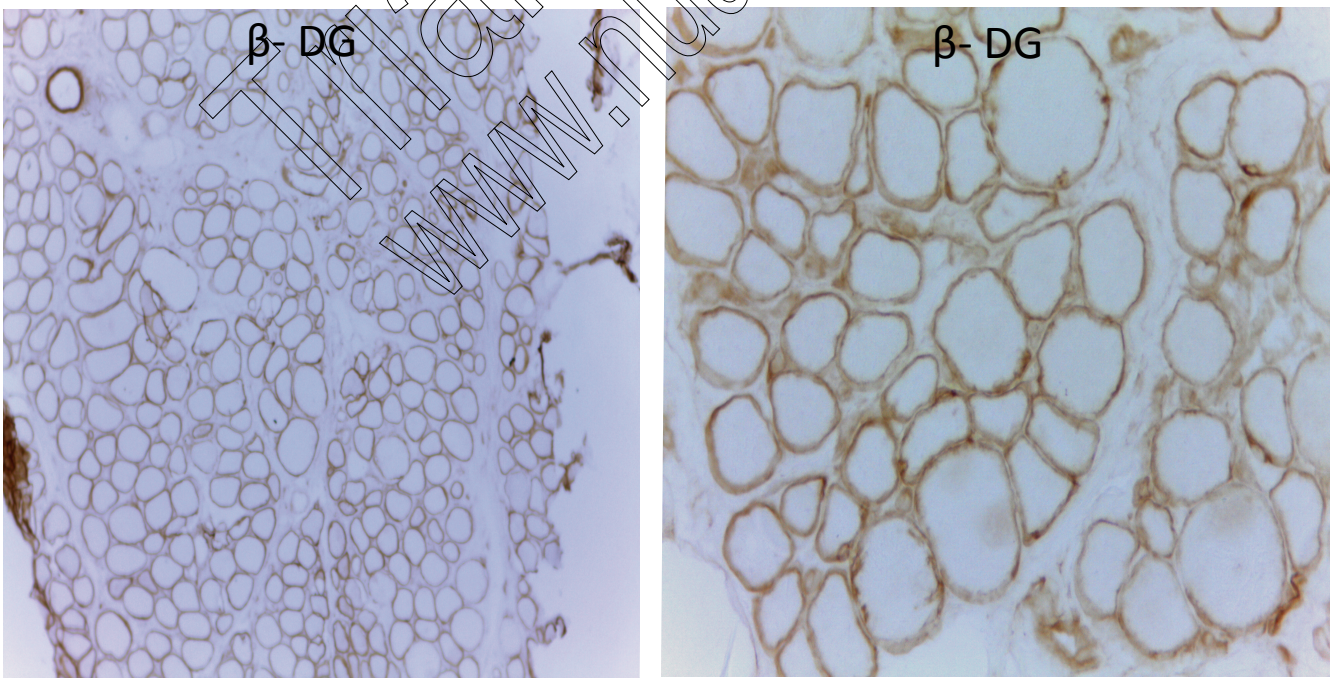


Figure 18. La β-dystoglycane chez les dystrophinopathes

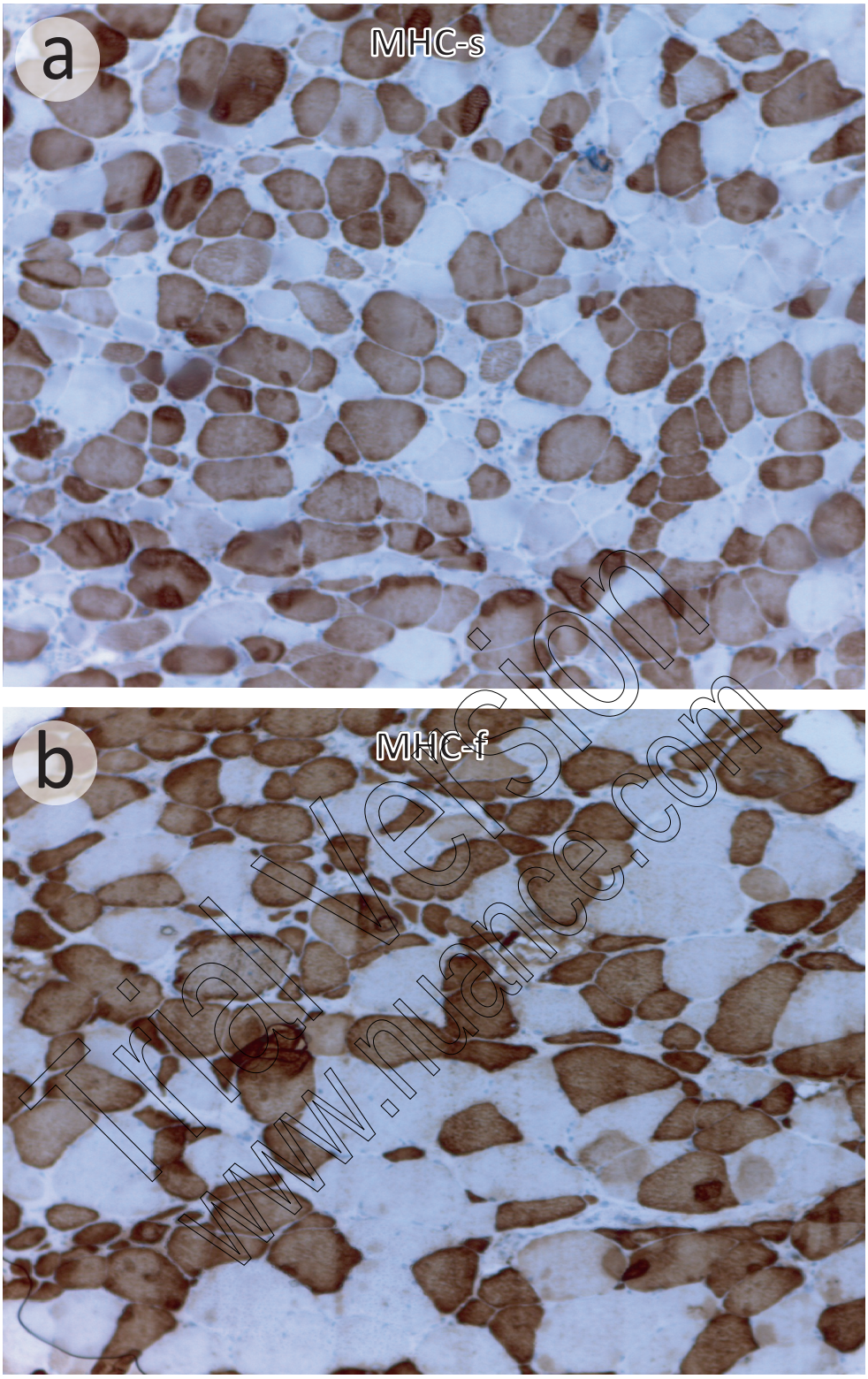
III.3. L'étude de la répartition des fibres de type I et II

Dans cette partie, la répartition des fibres lents de type I et les fibres rapides de type II chez les dystrophinopathes à été étudier par immunomarquage.

Les types des fibres musculaires sont reconnues par le ciblage des chaines lourdes des myosines qui prennent une couleur brune par les anticorps spécifiques anti MHC-s (slow) des fibres de type I **(Fig.19a)** et anti MHC-f (fast) des fibres de type II **(Fig 19b**).

Les résultats de notre étude montrent une distribution hétérogène des deux types de fibres musculaires qui reflète une juxtaposition de ces fibres dans les mêmes faisceaux donnant un aspect en mosaïque.

Trial Version
www.nuance.com



Trial Version
www.nuance.com

Figure 19. Ciblage des fibres lents et rapides par immunomarquage des myosines spécifiques au niveau des muscles striés des dystrophinopathes

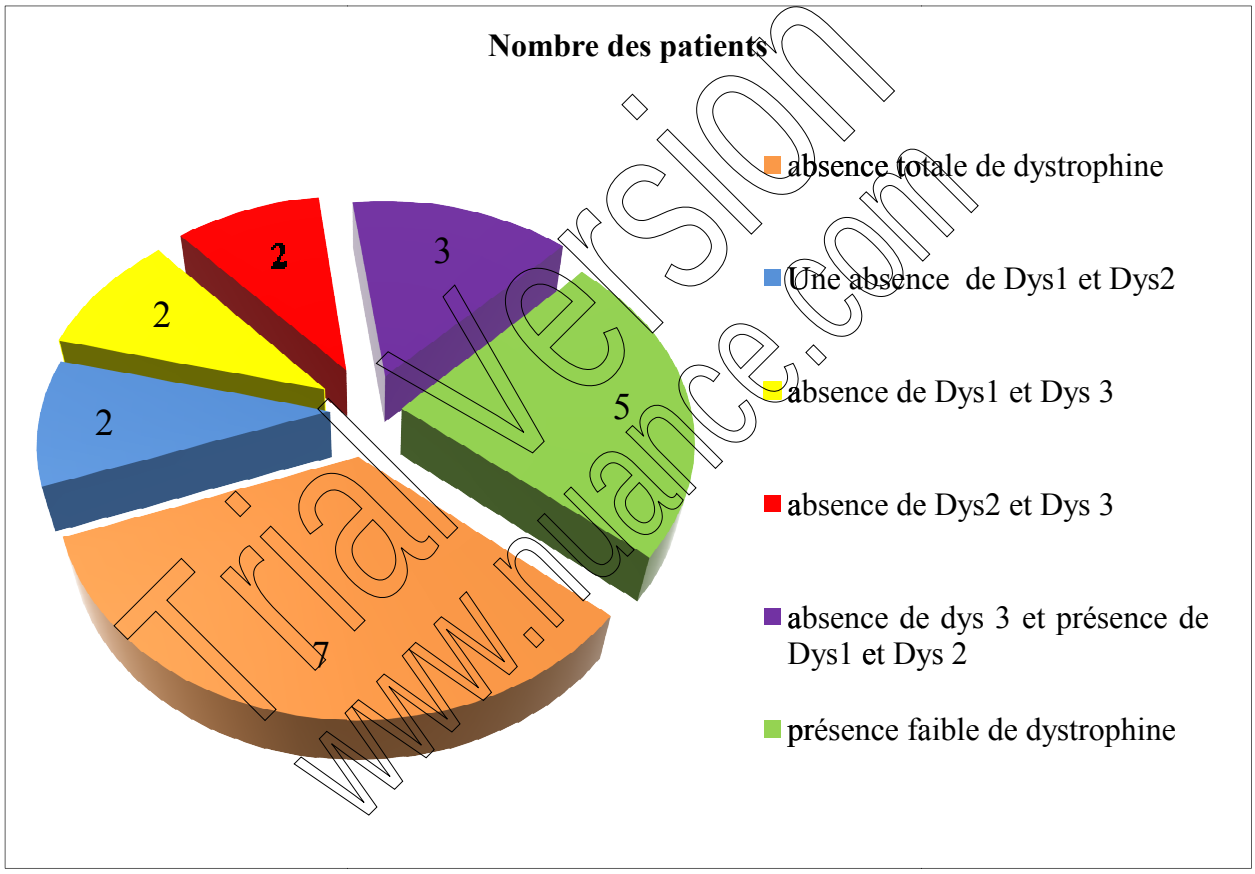
a. Répartition en mosaique des fibres musculaires lents de type I marqués par l'anti-corps spécifique anti-myosine (MHC-s).

b. Répartition en mosaique des fibres musculaires rapides de type II marqués par l'anti-corps spécifique anti-myosine (MHC-f).

a, b GX 400

III.4. Répartition des patients selon les résultats obtenus par l'immunomarquage de la dystrophine et certaines protéines de son complexe

Les résultats obtenus à partir de notre étude sur les biopsies musculaires de 21 dystrophinopathes révèlent soit une absence totale de l'immunomarquage de la dystrophine soit un marquage faible par les trois anticorps utilisés, soit un marquage hétérogène entre les trois anticorps et un marquage faible et hétérogène pour les quatre sous unités des sarcoglycanes avec un marquage membranaire normal pour la β-dystrobrévine.



Trial Version
www.nuance.com

Figure 20. Répartition des patients selon les résultats obtenus par l'immunomarquage de la dystrophine.

III.5. Relation des anomalies histologiques et immuno-histochimiques

Le tableau N°III désigne la présence (1) ou l'absence (0) des anomalies anatomo-pathologiques et des marquages immuno-histochimiques dans le tissu musculaire des dystrophinopathes.

Tableau III : Estimation qualitative des signes anatomo-pathologiques et des marquages immuno-histochimiques

N° des biopsies	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Age de début des signes	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	4	5	5	5	5	6	8	10	11	16	29
Fibrose	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Fibnéc	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0
Fibreg	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0
Inf	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0
Fibseg	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1
Dys 1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Dys 2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dys 3	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
α-sarc	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0
β-sarc	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0
γ-sarc	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0
δ-sarc	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0
β-DG	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

0 : absence, 1 : présence

Fibnéc : fibres nécrotiques, Fibreg : fibre régénératifs, Inf : inflammation, Fibseg : fibres segmentés, Dys : dystrophine, sarc : sarcoglycane, β-DG : β-dystroglycane.

Le tableau des données brutes a été soumis à une analyse de corrélation entre les paramètres histo-pathologiques et immuno-histochimiques et permet d'obtenir le tableau N° IV qui indique les valeurs du Coefficient de corrélation de Pearson (r) ainsi que les probabilités associées (p).

Trial Version www.nuance.com

Tableau IV : Corrélations entre les paramètres histo-pathologiques et immuno-histochimiques

	Fibnéc	Fibreg	inf	Fibseg	Dys1	Dys2	Dys3	α-sarc	β-sarc	γ-sarc	δ-sarc
Fibnéc	-	0,5863	0,6364	0,4824	0,2282	0,1814	0,2712	0,1386	0,2083	0,0323	0,2083
Fibreg	0,0052	-	0,6633	0,4301	0,1168	-0,0155	-0,0231	0,0455	-0,0374	0,0550	0,1589
Inf	0,0019	0,0010	-	0,5892	0,2582	0,2052	0,0383	0,0302	0,0620	-0,0913	0,0620
Fibseg	0,0268	0,0517	0,0049	-	0,0400	0,2545	0,1308	0,0374	0,0096	-0,1132	0,0096
Dys1	0,3197	0,6142	0,2585	0,8632	-	0,7947	0,4951	0,3893	0,5204	0,4714	0,5204
Dys2	0,4314	0,9470	0,3722	0,2656	0,0000	-	0,6689	0,3093	0,4136	0,3746	0,4136
Dys3	0,2345	0,9208	0,8689	0,5720	0,0225	0,0009	-	-0,0231	0,1189	0,0700	0,1189
α-sarc	0,5491	0,8449	0,8968	0,8721	0,0811	0,1724	0,9208	-	0,7480	0,6331	0,5516
β-sarc	0,3649	0,8721	0,7894	0,9670	0,0156	0,0624	0,6077	0,0001	-	0,5095	0,7981
γ-sarc	0,8895	0,8127	0,6939	0,6251	0,0310	0,0943	0,7630	0,0021	0,0183	-	0,7077
δ-sarc	0,3649	0,4914	0,7894	0,9670	0,0156	0,0624	0,6077	0,0095	0,0000	0,0003	-

Au dessus de la diagonale, sont indiqués les coefficients de corrélations de Pearson (r), au dessous les probabilités (p) associées

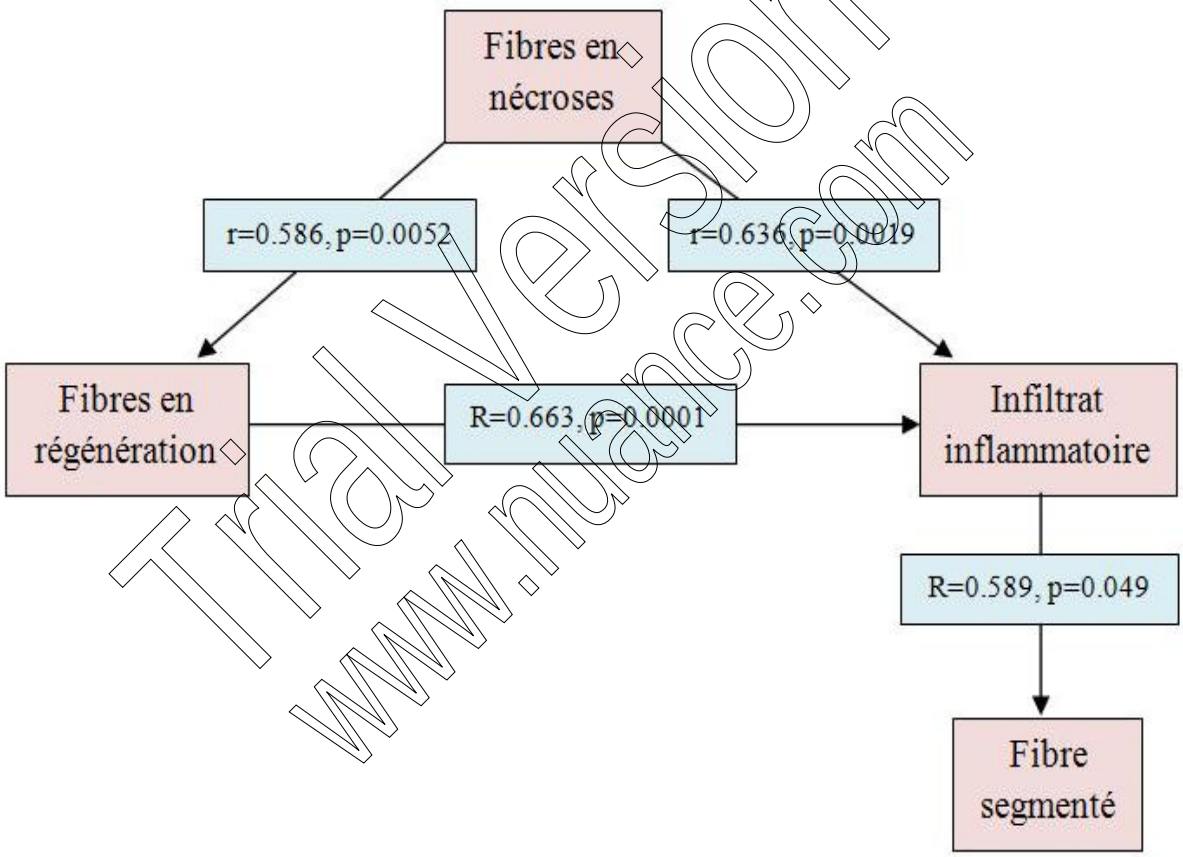
Les corrélations sont positives lorsque les chiffres sont proches de +1 et sont négatives lorsque les chiffres sont proches de -1

Ces corrélations sont significatives lorsque les probabilités sont < 0.05 et non significatives lorsque les probabilités sont > 0.05

Trial Version www.nuance.com

Pour visualiser les fortes relations des différents paramètres nous avons établis les diagrammes suivants à partir les résultats du tableau IV. Les flèches indiquent les relations entres les variables alors que les valeurs du coefficient (r) indiquent la nature de la corrélation, en revanche les probabilités (p) indique la solidité de la corrélation.

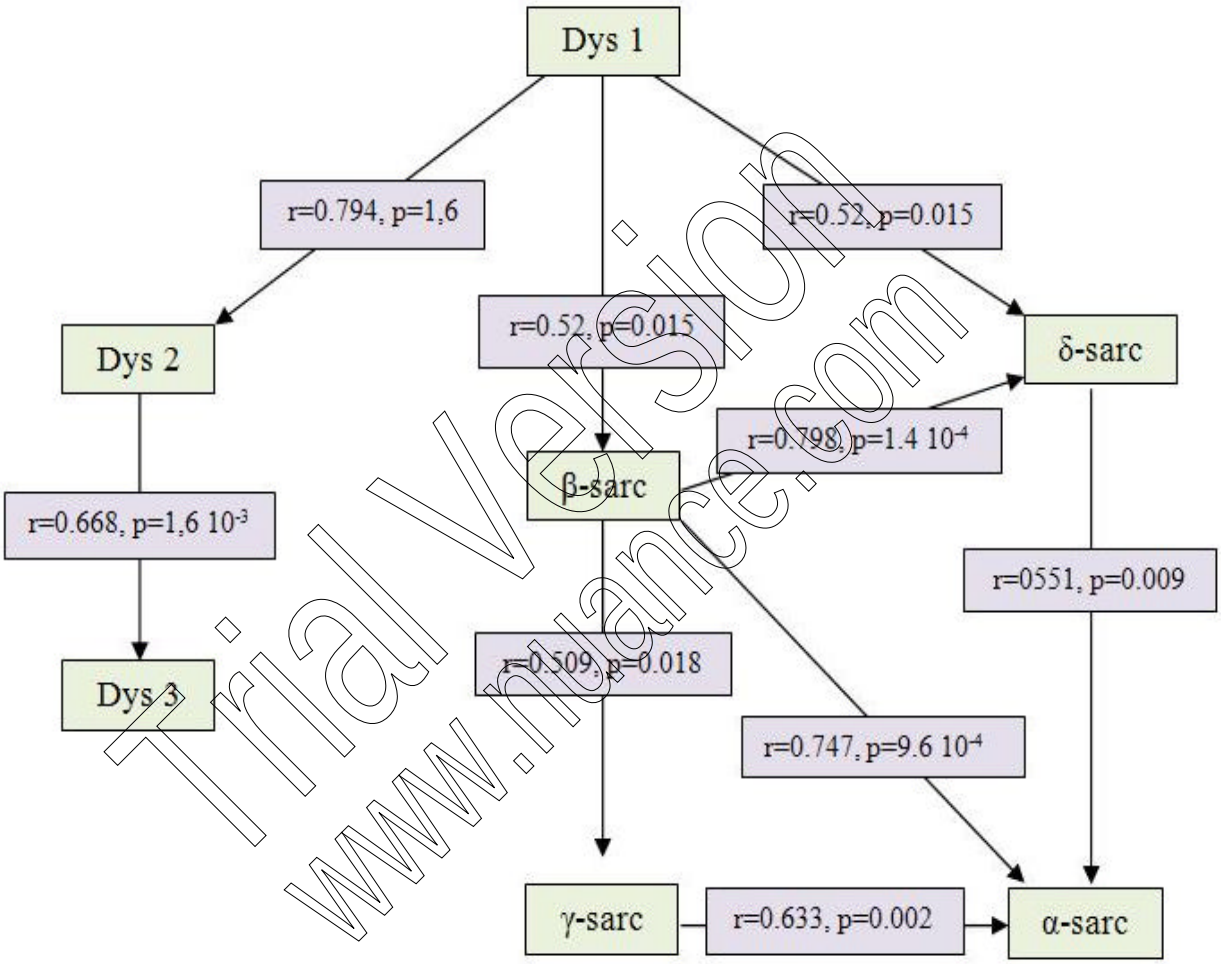
Le diagramme (Fig. 21) a permis d'établir une multitude relations entres les différents lésions histologiques. Il en ressort que le phénomène de nécrose à une corrélation positive avec le processus inflammatoire et avec le phénomène de régénération. De plus le processus de l'inflammation serait en rapport avec la segmention des fibres musculaires.



Trial Version
www.nuance.com

Figure 21: Diagramme récapitulatif des liaisons entre les différentes lésions histo-pathologiques

Pour ce qui est des marquages de la dystrophine et des différentes sous unités du complexe des sarcoglycanes, le diagramme (fig. 22) indique la présence des corrélations plus ou moins significatifs entre des différents domaines de la dystrophine et entre le domaine central de la dystrophine et les deux sous unités (β et δ) du complexe sarcoglycanes et entres toutes les unités de ce complexe.



Trial Version
www.nuance.com

Figure 22 : Diagramme récapitulatif des liaisons entre la dystrophine et les sous unités des sarcoglycanes

Discussion

Trial Version
www.nuance.com

Les dystrophies musculaires constituent un groupe hétérogène de désordres neuromusculaires tant sur le plan génétique, moléculaire que clinique. Parmi ce groupe on retrouve celles causées par une expression défectueuse des protéines sarcolemmales comme par exemple la dystrophine (Sewry, 2010). En matière d'anatomopathologie, plusieurs dystrophies musculaires se ressemblent, il est donc important d'avoir recourt à des techniques qui nous permettent d'établir un diagnostic différentiel; l'immunohistochimie joue un rôle majeur dans la révélation de la présence, la réduction ou l'absence d'une protéine donnée, ce qui va spécifier par conséquent le type de dystrophie musculaire.

Dans notre étude, nous avons essayé d'abord d'étudier les cas de dystrophies musculaires sur le plan anatomopathologique par des colorations histologiques et histo-enzymologiques puis de confirmer le type par immunomarquage de la dystrophine, impliqué dans la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) et de Becker (DMB) et un autre groupe de protéines associées à la dystrophine.Les biopsies des cas que nous avons examinés et traités par des techniques histologiques et histoenzymologiques montrent la présence de plusieurs anomalies de la matrice extracellulaire et des fibres musculaires.

Les anomalies de la matrice extracellulaire sont reflétées d'emblé par : la présence d'une fibrose importante inter-fibrillaire et entre les faisceaux, d'infiltrations des cellules inflammatoires qui reflètent la présence de phénomène de nécrose cellulaires.

Les anomalies des fibres musculaires remarquées par l'hétérogénéité dans la taille et la forme avec parfois une segmentation, une centralisation ou internalisation des noyaux et une répartition anormale des mitochondries et du réticulum endoplasmique ainsi que par l'installation de la nécrose dans certaines de ces fibres et le phénomène de régénération pour d'autres. Un autre critère observé, est l'aspect hypercontracté de quelques fibres musculaires.

En effet, une variation dans la taille des fibres musculaires dont quelques unes présentent des noyaux internalisés séparées par une couche épaisse de tissu conjonctif avec la présence de dégénérescence de certaines et régénérescence pour d'autres a été observée chez des cas dystrophiques (Tanveer et *al*., 2009; Sewry, 2010), le phénomène de phagocytose n'a pas été écarté par ces auteurs. De plus, la diminution de la taille de certaines fibres musculaires au sein d'un même faisceau pourrait être une atrophie pour les fibres lents de type I et les fibres rapides de type II et l'augmentation de la taille d'autres pourrait s'expliquer par une hypertrophie compensatrice telles que ça a été reporté par Fanzani et collaborateurs (2012).

Trial Version
www.nuance.com

La présence de fibres hypertrophiques segmentées et des fibres hypercontractés est une caractéristique de la dystrophie musculaire de Duchenne, Ces fibres prenant une couleur foncé en techniques histoenzymologiques impliquerait une richesse en activités enzymatiques oxydatives (SDH et NADH-TR); l'activité oxydative de l'enzymes SDH de la chaine respiratoire mitochondriale permet d'apprécier la répartition des mitochondries tandis que l'enzyme NADH-TR réticulaire permet d'apprécier le réseau intermyofibrillaire (Fernandez et *al*., 2010).

L'existence des fibres musculaires hypercontractés dans le muscle dystrophique est peut être expliqué par une augmentation de l'entrée de calcium dans la fibre musculaire. Sa haute concentration intracellulaire entraîne une hypercontraction et une activation des protéases. Celles ci dégradent les protéines et amplifient une cascade de réactions aboutissant à la destruction de la fibre musculaire (AFM, 2012).

En outre, la nécrose est la lésion dégénérative de base. Elle commence par une altération segmentaire des fibres hypertrophiques avec une homogénéisation de leur sarcoplasme suivie d'une destruction des membranes. Elle se traduit sur le plan biologique par une augmentation très importante des créatines phospho-kinase sériques reflétant probablement le degré de la nécrose. Cette mort cellulaire s'accompagne toujours par un processus régénératif dans le même secteur, ceci implique une prolifération myoblastique à partir des cellules souches dites satellites visant à réparer le muscle squelettique. Il est à noter que généralement les fibres nécrotiques et/ou régénératives réalisent des petits groupes surtout dans les dystrophies musculaires de type Duchenne et de type Becker (Fernandez et *al*., 2010).

Notre étude montre la présence des fibres en nécrose identifiées par leur cytoplasme pale, souvent envahies par des éléments inflammatoires. En effet, une étude sur des patients DMD par Derek et collaborateur (2002) révèle la présence de fibres nécrotiques phagocytées avec l'existence d'un infiltrat inflammatoire péri et endomysiale à prédominance cellulaire de type macrophage et lymphocyte T CD4+.

Les fibres musculaires en régénération sont identifiées par la basophilie de leur sarcoplasme, qui reflète un contenu important en acides ribonucléiques et des noyaux clairs et vésiculeux de position centrale prédominante, parfois périphérique en fonction du stade de leur migration et la maturation de myotube.

Trial Version
www.nuance.com

A la longue, les cycles de nécrose-régénération se succèdent, les mécanismes de la régénération sont dépassés et la dégénérescence l'emporte, entraînant l'apparition d'un manque de la force musculaire. Petit à petit, les fibres musculaires s'atrophient et leur nombre diminue et puis seront progréssivement remplacées par du tissu conjonctif cicatriciel (fibrose) et du tissu graisseux (adipose) (Derek et *al*., 2009; AFM, 2012).

D'un autre coté, par l'utilisation de l'immuno-marquages de la dystrophine et de certaines de ses protéines associées nous avons montré que ces anomalies tissulaires pourraient être à l'origine de l'absence totale ou partielle de la dystrophine. En effet, cette dernière est une protéine impliquée dans la stabilité membranaire et la liaison entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette subcellulaire en interaction avec un complexe protéique de sarcoglycanes via la β-dystroglycane. Son déficit partiel et/ou la réduction de sa taille rend ce complexe instable et la membrane des fibres musculaires plus fragile ce qui aboutit à la modification structurale des fibres musculaires induisant leurs dégénérescence (Jung et *al*., 2012).

Par conséquence, les anomalies structurales pourraient être à l'origine de la dystrophine déficiente dans les muscles squelettiques des patients atteint par la dystrophie musculaire de Duchenne où l'immunomarquage montre son absence totale sauf quelques cas qui présentent un marquage normal dans un petit groupe de fibres musculaires dites révertantes, ce qui renforcent la théorie de la quantité de la dystrophine chez ces patients. Tandis qu'un marquage soit faible et/ou discontinu avec les trois anticorps anti dystrophine utilisées, soit absent avec l'un des trois anticorps et présent avec les autres anticorps anti-dystrophine chez les patients atteints par la dystrophie musculaire de Becker. Le plus souvent c'est le marquage avec l'anticorps Dys2 qui est normal et celui de la Dys1 et la Dys3 qui est absent et la quantité où la qualité de la dystrophine explique la présence des atteintes modérées dans la dystrophie musculaire de Becker en comparaison de celles observés en cas de dystrophie musculaire de Duchenne (Fernandez et *al*., 2010).

Les résultats obtenus à partir de notre étude sur les biopsies musculaires de 21 dystrophinopathes révèlent :

- Une absence totale de l'immumarquage de la dystrophine par les trois anticorps chez un groupe de 7 patients.
- Une absence de la Dys1 et Dys2 avec une présence de la Dys3 chez 2 patients.
- Une absence de la Dys1 et Dys 3 avec une présence de la Dys2 chez 2 patients.

Trial Version www.nuance.com

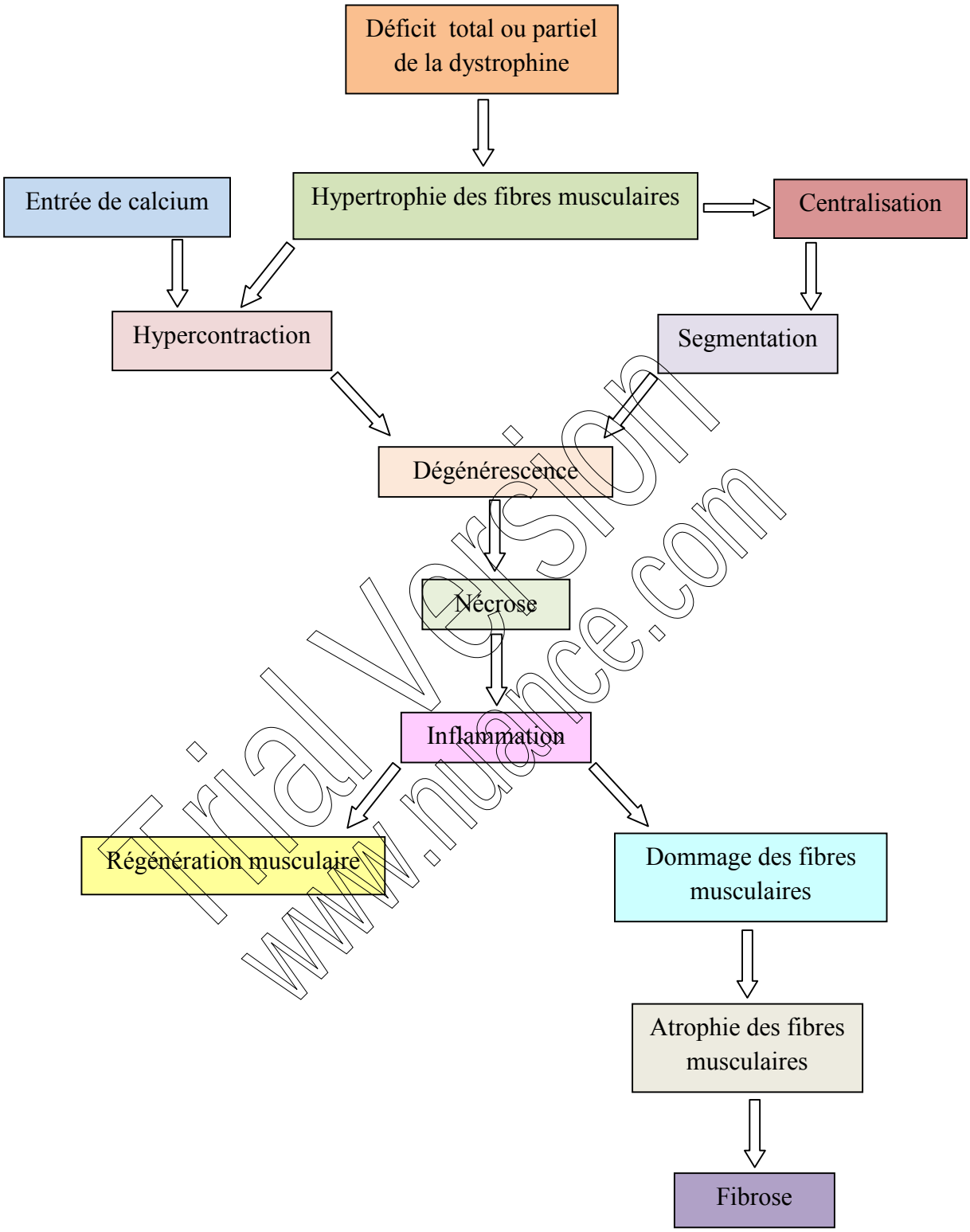
- Une absence de la Dys2 et Dys 3 avec présence de la Dys1 chez 2 patients.
- Une absence de la dys 3 avec la présence de Dys1 et Dys 2 chez 3 patients.
- Une présence faible de l'immunomarquage par les trois anticorps chez 5 patients.

En effet, Une étude immunohistochimique est effectué par Tanveer et collaborateurs (2009) montre une absence totale de l'immunomarquage chez 35 patients DMD à l'exception de quartes cas qui présentent un marquage réduit et inégale entre les fibres par l'anticorps Dys1 et était inégal et discontinu par les autres anticorps. De plus quatre patients DMB montrèrent un immunomarquage négatif de la dystrophine.

Une étude est effectué au Maroc en (2009) par Bellayou et collaborateurs montre l'existence d'une relation entre la déficience de la dystrophine et la perturbation du complexe protéique des sarcoglycanes, suggéré par une réduction de la α et la δ sarcoglycane et de la partie C-terminale de la dystrophine ou l'absence totale de cette dernière. Cette relation étroite est illustrée dans notre étude qui montre une diminution de marquage des sarcoglycanes, probablement relative à la déficience de la dystrophine dans la DMD et DMB malgré la positivité membranaire de la β-dystroglycane, observée chez tous les patients de notre étude. De ce faite, il est à noter que la β-dystroglycane est impliquée dans de variables processus cellulaire à savoir : le développement, l'adhésion cellulaire et la signalisation dans différent tissu non musculaires (Russo et *al*., 2000; Winter, 2001).

A la lumière de ces résultats nous proposons le diagramme suivant pour expliquer la physiopathologie de la dystrophie musculaire de Duchenne et de Becker :

Trial Version
www.nuance.com



Trial Version
www.nuance.com

Diagramme hypothétique de la physiopathologie de la dystrophie musculaire de Duchenne et Becker en relation avec les cas étudiés.

De façon générale, La littérature note généralement une apparition des premiers signes de la maladie entre l'âge 2 à 5 ans chez les patients DMD, vers 10 ans jusqu'à 40 ans chez les patients DMB et vers la trentaine chez les femmes symptomatiques (Dimitri., 2012). Selon ces données nous avons répertoriés nos patients dans deux classes, la première inclue 17 patients atteints d'un phénotype clinique en faveur d'une dystrophie musculaire à évolution progressive de type Duchenne avec une moyenne de début de la maladie entre 2 et 6 ans confirmé par l'étude morphologique qui montre la présence d'un processus dystrophique sévère où le muscle est très remanié avec une disparition des fibres musculaires qui sont remplacés par une fibrose très abondant sauf le patient N° 17 , le début de sa maladie est présumé à l'âge de 8 ans tandis que notre étude morphologique indique la présence d'une atteinte très sévère, révèle la probabilité d'un début plus précoce. La deuxième inclue trois patients atteints de dystrophie musculaire de Becker avec un âge de début entre 10 et 16 ans. Parmi les patients de notre étude, nous avons une femme qui présente des symptômes depuis l'âge de 29ans.

L'histoire familiale et le mode de transmission de la maladie lié au chromosome X est remarquée chez le patient N°14 qui est atteint d'une dystrophie musculaire de Duchenne suspecté par la clinique et confirmé par notre étude immunohistochimique, lui transmettre par sa mère qui présente une faiblesse musculaire commence par la ceinture pelvienne à l'âge de 29 ans, l'étude de sa biopsie musculaire (patiente N°21) montre la présence d'un processus dystrophique peu remanié avec un immunomarquage faible et hétérogène de la dystrophine et des sarcoglycanes en accord avec une femme porteuse symptomatique de la maladie et transmettrice de l'anomalie génique.

Trial Version
www.nuance.com

Conclusion

Trial Version
www.nuance.com

L'absence totale ou partielle de la dystrophine dans les muscles squelettiques est à l'origine d'altérations anatomo-pathologiques très graves mènent à la perte progressive de l'activité contractile normale de la fibre musculaire et aboutit à leur dégénérescence. L'absence totale de cette protéine donne un forme sévère de dystrophie musculaire de type Duchenne (DMD), se traduit par une faiblesse musculaire progressive sévère chez le jeune garçon. Tandis que Son absence partielle donne la dystrophie musculaire progressive de type Becker (DMB) qui se présente par une atteinte modéré.

Par des approches histologiques, histoenzymologiques et immunohistochimiques, nous avons démontrés les anomalies anatomo-histologiques et cytopathologiques provoquées par la déficience de la dystrophine dans ces deux formes de dystrophie musculaire, ce qui explique son rôle primordial dans le maintien de l'architecture de la fibre musculaire par la liaison de l'unité contractile à la matrice extra cellulaire via l'association avec d'autres protéines formant le complexe protéique associé à la dystrophine.
Ces signes tissulaires et cellulaires comprennent la présence d'une hétérogénéité de forme et de taille entre les fibres musculaires, avec parfois d'une segmentation et une hypercontraction, d'un nécrose dégénératif, souvent infiltré par des cellules inflammatoires et une régénération compensatrice et enfin d'une fibrose plus ou moins remanié.

Malgré l'effectif très restreint des cas étudiés, nous avons essayé d'effectuer une analyse statistique qualitative des données et de démontré l'existence des corrélations entre les différents paramètres apportées par nos résultats explique un peu la relation entre eux.

Mais, il sera intéressant de compléter notre étude surtout pour :

Confirmer les résultats immunohistochimiques par le western-blot afin d'établir le degré d'altération de la dystrophine par détermination de son poids moléculaire et le dosage de sa concentration.

Vérifier les lignés cellulaires impliquées dans l'inflammation par immunomarquage.

Établir un screening de toutes les protéines du complexe protéique associé à la dystrophine.

Enfin, comprendre la fibrose par l'étude des processus moléculaires qui mènent les fibrocytes à changer leur comportement sécrétoire vis à vis les molécules de la matrice extracellulaire et la relation avec la dystrophine.

La compréhension de tous ces phénomènes pourra aider à bien gérer la maladie.

Trial Version
www.nuance.com

Références bibliographiques

TrialVersion
www.nuance.com

1- AFM (Association Française contre les Myopathies), 2008. Dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker. *AFM>Myoinfo*, 16p.

2- AFM (Association Française contre les Myopathies), 2011. Avancées dans les myopathies des ceintures. *AFM>Myoinfo*, 12p.

3- AFM (Association Française contre les Myopathies), 2012. Avancées dans les dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker. *AFM>Myoinfo*, 31p.

4- Bacou F et Vigneron P, 1998. Propriétés des fibres musculaires squelettiques, Influence de l'innervation motrice. *INRA.*, **28** (6A): 1387-1453.

5- Banks G.-B., Chamberlain J.-S., Froehner S.-C. 2009. Truncated dystrophins can influence neuromuscular synapse structure. *Molecular and Cellular Neuroscience*. USA. *Elsevier Masson*., **40** : 433–44.

6- Bellayou H., Hamzi H., Rafai M.-A., Karkouri., Slassi M., Azeddoug H., Nadifi. 2009. Duchenne and Becker muscular dystrophy: contribution of a molecular and immunohistochemical analysis in diagnosis in Morocco. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 5p.

7- Benchaouir R., Meregalli M., Farini A., Belicchi M., Battistelli M., Bresolin N., Torrente Y. 2008. Réhabilitation de la dystrophine humaine dans le modèle scid/mdx après greffe de cellules souches de patients DMD corrigées par saut d'exon. » *Medecine/Sciences.,* **24** : 99-101.

8- Jasmin B.-J., Angus L.-M., Belanger G., Chakkalakal J.-V., Gramolini1 A.-O., Lunde J.-A., Stocksley M.- A., Thompson J. 2002. Multiple regulatory events controlling the expression and localization of utrophin in skeletal muscle fibers: insights into a therapeutic strategy for Duchenne muscular dystrophy. *Elsevier Masson*., *Journal of.,* **96**: 31–42.

9- Berthelot J-.M., 2008. Muscle and endocrine disorders. France. *Elsevier Masson. Revue du Rhumatisme*., **75**: 172–177.

10- Bioulac B., Burbaud P., Cazalets J.-R., GrossG. 2004. Fonctions motrices. *EMC. Neurologie*., 17-002-D-10. 36p.

11- Bjarne U., 2012. Distal myopathies – New genetic entities expand diagnostic challenge. *Elsevier Masson*. Finland., **22**:5-12.

12- Bordeneuve V.-P., 2008. Introduction sur les aspects génétiques des neuropathies. *EMC* (paris*)*., *Neurologie*.17-084-E-10. 12p.

13- Bougeon P. 2008. Les myopathies innées et acquises. Faculté de pharmacie. *Limoges* (87), **471**: 10-21.

14- Brignol T-N. 2006. Dystrophie musculaire de duchenne. copyright *AFM* : 5p.

Trial Version
www.nuance.com

15- Brignol A. 2009 (3e éd.). Principales maladies neuromusculaires. *AFM*. 32p.

16- Bunyan D-J., Skinner A-C., Ashton E-J., Sillibourne J., Brown T., Collins A-L., Cross N-C-P., Harvey J-F and D O. Robinson D-O. 2008. Simultaneous MLPA-Based Multiplex Point Mutation and Deletion. *ISSN*, **35**:135-140.

17- Chamberlain J.-S., 2002. Gene therapy of muscular dystrophy. *Oxford University Press*, *Human Molecular Genetics*., **11**(20) : 2355–2362.

18- Chérin P. 1999. Muscle, fatigue, sport et infection. *Elsevier Masson*., **20** : 794-803.

19- Derek J.-B., Andrew W., Sarah E.-N and Kay E.-D. 2002. Function and Genetics of Dystrophin and Dystrophin-Related Proteins in Muscle. *The American Physiological Society., 10.1152/physrev.0002*., **82**: 291–329.

20- Desguerre I., Mayer M., Christov C., C. Leturcq C., Chelly J., Gherardi R.-K. 2009. Hétérogénéité clinique et critères pronostiques de la myopathie de Duchenne. France. *Elsevier Masson., Maladies neuromusculaires*., ***16**:681-683*.

21- Dimitri D et Eymard B. 2012. Myopathies inflammatoires, myopathies nécrosantes auto-immunes, myopathies génétiques de l'adulte : frontières diagnostiques. France. *Elsevier Masson. revue de médcine interne*., **33** : 134-142.

22- Dominique J.-C. 2009. Amélioration du taux de greffe de cellules myogéniques pour la dystrophie musculaire de Duchenne. *Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval dans le cadre du programme de maîtrise en Biologie moléculaire et cellulaire pour l'obtention du grade de Maître*. Faculté de Médecine Université Laval. Québec.79p.

23- Emery A. 2002. The muscular dystrophies. *Lancet.* UK., **359**: 687-695.

24- Fanzani A., Viviane M.-C., Penna F et Martin W. 2012. Molecular and cellular mechanisms of skeletal muscle atrophy: an update. *Springer-Verlag*., **3**:163-179.

25- Fayssoil A., Orlikowski D., Nardi O, Annane D. 2008. Atteintes cardiaques au cours de la myopathie de Duchenne. *Elsevier Masson., Cardiologie/Maladies rares.* France., **37**: 648-653.

26- Fernandez C., Halbert C., Maues de paula A., Figarella-Branger D., Charbol B., Pellissier J-F. 2010. Dystrophies musculaire liées au gène DMD: myopathie de Duchenne, myopathie de Becker, forme féminine et atypique. *EMC*., **15**: 17-175-B-10. 16p.

27- Fernandez C., Maues de paula A., Figarella-Branger D., Pellissier J-F. 2010. Biopsie musculaire. *EMC* (paris*). Neurologie.*, 17-030-G-10, 23p.

TrialVersion www.nuance.com

28- Galinier M., Lairez O., Roncalli J., Dumenteil N., Maury P., Pathak A., Biendel C. 2011. Cardiomyopathies dilatées primitives et secondaires. *EMC* (paris*). Cardiologie.*, 11-044-C-10. 13p.

29- Guis S., Krahn N., Fernandez C., Mattei J-P., Levyet N., Bendahan D. 2010. Pathologies des muscles striés squelettiques. *EMC* (Paris). *Apareil locomoteur*., 15-143-A10.

30- Hermans M.C-E., Pinto Y-M., Merkies I.S-J., Die-Smulders C.E-M., Crijns H.J.G.M., Faber C.G. 2010. Hereditary muscular dystrophies and the heart. *Elsevier Masson*., **20**:479-492.

31- Héron D. 2008. Conseil génétique dans les myopathies. *Elsevier Masson*. France., **56**: 110-116.

32- Jin H., Tan S., Hermanowski J., Böhm S., Pacheco S., McCauley J.-M., Greener M.-J., Hinits Y., Hughes S.-M., Sharpe P.-T and Roberts R.-G. 2007. The dystrotelin, dystrophin and dystrobrevin superfamily: new paralogues and old isoforms. *BioMed Centra., BMC Genomics*., **8**: 20p.

33- Kuntzer T. 2001. Maladies neuromusculaires. *Association de la Suisse Romande et Italienne contre les myopathies (ASRIM)*. 88p.

34- Krahn M., Lévy N., Danièle N., Richard I et Bartoli M. 2008. Novel therapeutic strategies for muscular dystrophies. *Elsevier Masson.* France., **75**: 181–186.

35- Lafrenière J.-F. 2007. Utilisation de facteurs motogéniques afin d'améliorer le succès de la thérapie cellulaire pour le traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne. *Thèse présentée à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval dans le cadre du programme de doctorat en Biologie moléculaire et cellulaire pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor.* Faculté de Médecine Université Laval. Québec. 212p.

36- Lagha M, Rocancourt D, Relaix F. 2005.Origine du muscle squelettique : rôles de Pax3/Pax7. Med *médecine/science*. **21** : 801-3.

37- Lapidos K.- A., Kakkar R and McNally E.- M. 2004. The Dystrophin Glycoprotein Complex: Signaling Strength and Integrity for the Sarcolemma. *ISSN*., American Heart Association. **94** : 1023-1031.

38- Lee Sohn R et Gussoni E. 2004. Stem cell therapy for muscular dystrophy. *Expert Opin. Biol. Ther*. USA. **4** (1) : 9p.

39- Mayeuf A, Relaix F. 2011. La voie Notch « Du développement à la régénération du muscle squelettique ». *médecine/science*. **27** : 521-526.

40- Mekrami S et Brignol T.-N. 2003. Le muscle squelettique. *AFM* (Paris). 8p.

Trial Version www.nuance.com

41- Messina S., Vita G.-L., M. Aguennouz., Sframeli M., Romeo S., Rodolico C., Vita G. 2011. Activation of NF-KB pathway in Duchenne muscular dystrophy: relation to age. *Department of Neurosciences, Psychiatry and Anaesthesiology, University of Messina*., Italy.16-23p.

42- Muntoni F., Torelli S and Ferlini A. 2003. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol.* **2** : 731–740.

43- Nakagaki W-R. et Camilli J-A. 2012. Carence en tissu osseux et en dystrophine musculaire chez la souris mdx. *Elsevier Masson*., Brésil. 6p.

44- Ozawa B.-E. 2010. Our trails and trials in the subsarcolemmal cytoskeleton network and muscular dystrophy researches in the dystrophin era. *Proc. Jpn. Acad., Ser.* **86** : 798-821.

45- Petiot P et Urtizberea J-A. 2004. Diagnostic des maladies musculaires. *EMC-Neurologie*. **1**: 137–155.

46- Pichavant C. 2010. Thérapie génique de la dystrophie musculaire de duchenne. *Thèse présentée à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval dans le cadre du programme de doctorat en Biologie cellulaire et moléculaire pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor*. Faculté de Médecine Université Laval. Québec. 179p.

47- Pichavant C., Aartsma-Rus A., Clemens P-R., Davies K-E, Dickson G., Takeda S., Wilton S-D., Wolff J-A., Wooddell C-I , Xiao Xiao., Tremblay J-P. 2011. Current Status of Pharmaceutical and Genetic Therapeutic Approaches to Treat DMD. *The American Society of Gene and Cell* Therapy. 11p.

48- Prochniewicz E., Henderson D., Ervasti J.-M., and Thomas D-D. 2009. Dystrophin and utrophin have distinct effects on the structural dynamics of actin. *PNAS*., vol 106. **19**: 7822-7827.

49- Robert R..-G. 2001. Dystrophins and dystrobrevins. *Genome Biology.*, Vol 2. **4**: 7p.

50- Schoeffler M., Wallet F., Robert M.-O., Tramoni G., Workineh S., Viale J.-P., Duperret S., 2008. Elévation de troponine I à coronarographie normale chez un patient porteur d'une myopathie de Duchenne. *Elsevier Masson*. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation.*, France. **27 :** 345–347.

51- Seemann N., Selby K., Adam L-M., Biggar D., H Kolski, Goobie S., Yoon G and Campbell C., 2011. Symptomatic dystrophinopathies in female children. *Elsevier Masson Neuromuscular Disorders*., Canada. **2**: 172–177.

52- Serratrice J. 2008. Muscle normale. *EMC(Paris), Appareil locomoteur.* 14-006-A-10.11p.

53- Serratrice J., Figgarela D., Schleinitz N., Pelissier F et Serratrice G 2008. Myopathies inflammatoires. *EMC(Paris),* Neurologie. 17-185-A-10. 23p.

Trial Version www.nuance.com

54- Sewry C.-A., 2010. Muscular dystrophies: an update on pathology and diagnosis. *Springer-Verlag*., Acta Neuropathol. **120**:343–358.

55- Tanveer N., Sharma M., Sarkar., Gulati S., Kalra V., Singh S., Bhatia R. 2009. Diagnostic utility of skin biopsy in dystrophinopathies. *Elsevier Masson. Clinical Neurology and Neurosurgery.,* France **111**: 496–502.

56- Tselikas L., Rodrigues E., Jammal M., Tiev K., Chayet C., Josselin-Mahr L., Gain M., Toledano C., Cabane J., Kettaneh A. 2011. Dystrophie musculaire de becker a revelation tardive. À propos d'un nouveau patient et de 12 observations de la littérature. *Elsevier Masson. La Revue de médecine interne*. France. **32** :181–186.

57- Urtizberea A. 2009. La prise en charge dans la dystrophie musculaire de Duchenne. *AFM>Myoinfo*. 79p.

58- Young Jung, M.-D., Jong Hee Chae, M.-D., Sue Kyung Park, M.-D., Je Ho Kim, M.-D., Jung Yoon Kim, M.-D., Sang Joon Kim, M.-D., Moon Suk Bang, M.-D. 2012. Te Correlation Analysis of Functional Factors and Age with Duchenne Muscular Dystrophy. *Annals of Rehabilitation Medicine.* **36**: 22-32.

59- Xiomara X.-Q et Tsao C.-Y. 2012. Childhood Onset of Limb-Girdle Muscular Dystrophy. *Elsevier Masson*. **46**:13-23.

60- Willmann R., Possekel ., Dubach-Powell J., Meier T., Ruegg M.-A., 2009. Mammalian animal models for Duchenne muscular dystrophy. *Elsevier Masson*., *Neuromuscular Disorders*. **19:** 241–249.

61- Zucconi E., Valadares M.- C ., Vieira N.- M. Bueno C.-R.., Secco M., Jazedje T., Silva H.-C., Vainzo M., Zatz M. 2009. Ringo: Discordance between the molecular and clinical manifestation in a Golden Retriever Muscular Dystrophy dog. *Elsevier Masson*., *Neuromuscular Disorders*. 7p.

Final Version
www.nuance.com

Annexes

Trial Version
www.nuance.com

Annexe 1 : Classification des maladies neuromusculaires (Emery, 2002 ; Petiot et Urtizberea, 2004 ; Bordeneuve, 2008 ; Héron, 2008 ; Hermans et *al*., 2010 ; Bjarne, 2011 ; Xiomara, 2012).

Maladies	**Mode de transmission**	**Localisation**	**Protèines (produit du gène)**
Dystrophies musculaires progressives (DMP			
DMD	XR	Xp21	Dystrophine
BMD	XR	Xp21	Dystrophine
Formes mineures de dystrophinopathies	S ou XR	Xp21	Dystrophine
DMFSH	AR	4q35	?
DMOP	AD	14q	PAB 2
EDMD type1	XR	Xq28	Emerine
EDMD type2	AD ou AR	1q21.2	LamineA/C
Myopathies distales :			
MD de Miyochi	AR	2p13.1	Dysferline
MD de Welander	AD	2p13	?
MD de Nonaka	AR	9p12-p11	GNE
MD de Laing	AD	14q11	MYH7
MD de Udd		2q31	Titine
Dystrophies musculaires congénitales :			
DMC1A	AR	6q22-23	Mérosine
DMC1B	AR	1q42	?
DMC1C	AR	19q13.3	FKRP
DMC1D	AR	22q12.3-13.1	LARGE
DMC d'Ulrich	AR	21q22.3, 2q37	COLA1-A6
DMC de Fukuyama	AR	9q31	Fukutine
Muscle Eye brain	AR	1p32-p34	POMGnT1
Rigid Spine Syndrom	AR	1q35-36	SEPN1
Syndrome de Walker-Warburg	AR	14q24.3, 9q34.1	POMT1, POMT2
Myopathies des ceintures :			

Trial Version www.nuance.com

LGMD1A	AD	5q31	Myotiline
LGMD1B	AD	1q21.2	Lamine A/C
LGMD1C	AD	3p25	Caveoline-3
LGMD1D	AD	7q	?
LGMD1E	AD	6q23	?
LGMD1F	AD	7q32	?
LGMD1G	AD	4q21	?
LGMD2A	AR	15q15	Calpaine-3
LGMD2B	AR	2p13.1	Dysferline
LGMD2 C	AR	13q12	γ- sarcoglycane
LGMD2 D	AR	17q21	α –sarcoglycane
LGMD2 E	AR	4q12	β- sarcoglycane
LGMD2 F	AR	5q33	δ- sarcoglycane
LGMD2G	AR	17q12	Télethonine
LGMD2H	AR	9q31- q33	TRIM32
LGMD2I	AR	19q13.3	FKRP
LGMD2J	AR	2q31	Titine
LGMD2K	AR	9q34.1	POMT1
LGMD2L	AR	11p14	ANO5
LGMD2M	AR	9q31	Fukutine
Dystrophies myotoniques			
Maladie de Steinert	AD	19q13.2-q13.3	Myotonine/kinase
PROMM	AD	3q13.3-q24	ZNF9
Myopathies congénitales			
Némaline myopathie	AD	1q21-q23	Tropomyosine 3
	AR	2q21-q22	Nébuline
	AR	19q13.4 1q42.1	Troponine T1
	AD, AR ou S	9p13.2-p13.1	α-actine 2
	AD, AR ou S		Tropomyosine 2
Myopathies myotubulaire	XR	9p13.2-p13.1	Tropomyosine 2
Myopathies centronucléaire	AD ou AR	Xq28	Myotubularine
Myopathies à central core	DR	19p13.2	?
Myopathies à multiminicores	AD ou AR	1p36	SEPN1

Trial Version www.nuance.com

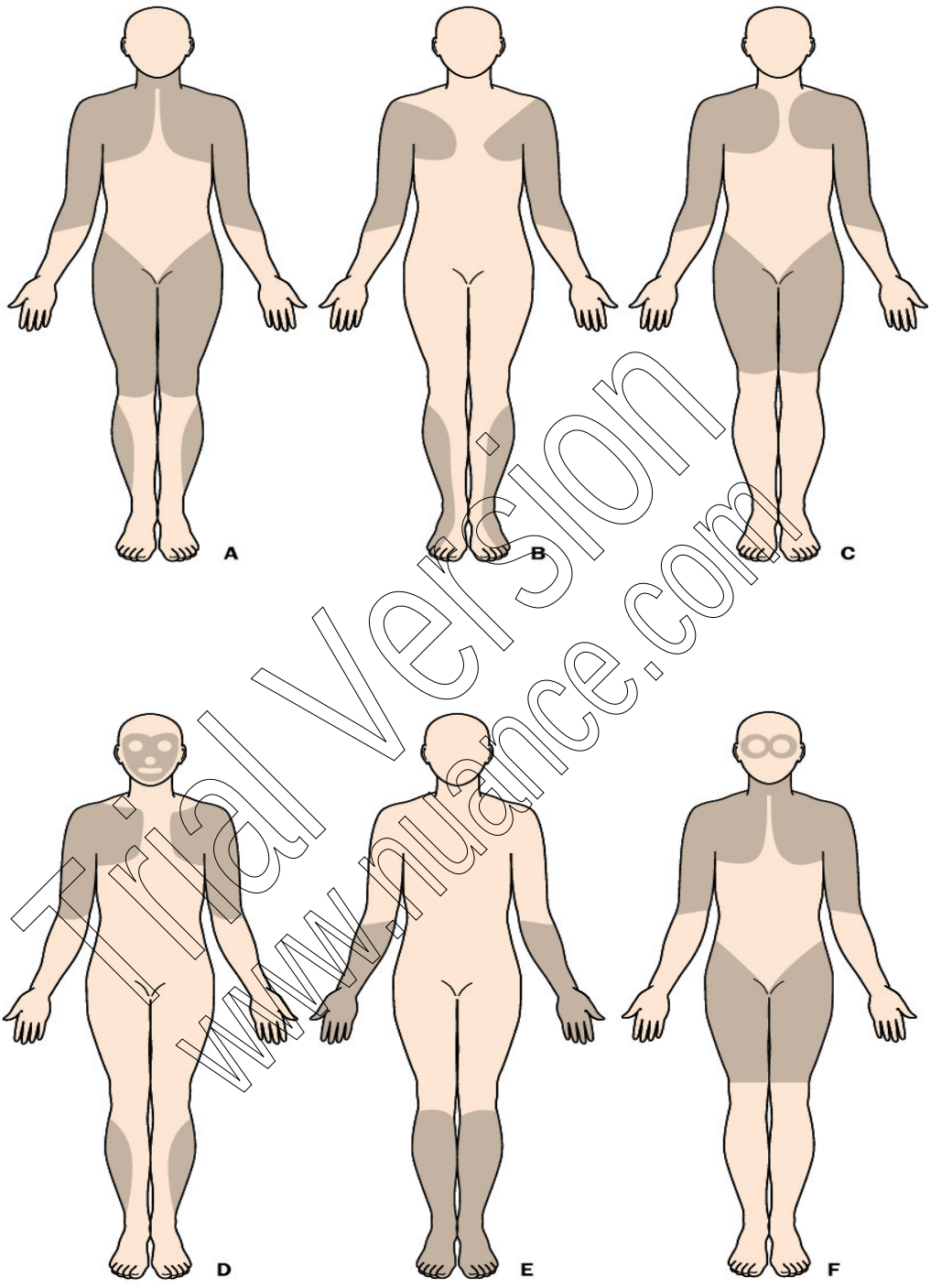
Myotonies Congénitales			
Myotonie Congénitale de Thomson	AD	7q35	Canal chlore
Myotonie Congénitale de Becker	AR	7q35	Canal chlore
Myotonie chondrodysplasique	AR	1p34 -p36.1	Perlecan
Myopathies métaboliques			
Myopathies mitochondriales	TM		
Lipidoses musculaires :			
Myopathie avec déficit en CPTII	AR	1p32	Carnitine palmitoyl transférase II
Myopathie avec déficit en carnitine	AR	5q33.1	Carnitine
Myopathie avec déficit en acyl CoA déshydrogénase	AR	12q22-qter	Acyl CoA Déshydrogénase
Glycogénoses musculaires :			
Maladie de pompe	AR	17q25.2-25.3	Maltase acide
Maladie de Mac Ardle	AR	11q13	Phosphorylase
Maladie de Tarui	AR	12q13.3	Phosphofructokinase
Maladie de Cori	AR	1p21	Enzyme débranchante
Myopathies inflammatoires			
Polymyosites Dermatomyosites Myosites à inclusion	Acquise		
Maladies de jonction neuromusculaire			
Myasthénie acquise	Autoimmune		
Myasthénie infantile familiale	AR	17pter	
Déficit en acétylchlinesrérase	AR	3p24.2	CollagèneQ
Déficit en récepteur de l'acétylcholine (RACH)	AR	17p13	Sous-unité ε du RACH
Maladies du motoneurone			

Trial Version www.nuance.com

Amyotrophie spinale infantile I/II	AR	5q12.2-13.3	SMN ou Survival Motor Neuron
Amyotrophie spinale infantile III	AR	5q12	SMN
Amyotrophie spinale infantile IV	AR	5q12	SMN
Neuropathies héréditaires sensitivo-motrices			
CMT1A	AD	17p11.2-p12	PMP-22
CMT1B	AD	1q22-q23	MPZ
CMT1D	AD	10q21.1-p12	EGR2
CMT1C	AD	16p13.1-p12.3	LITAF
CMT1E	AD	8p21	NGR2
CMTX	DX	Xq13.1	Cx32/GJB1
DI-CMTA	AD	1q24.1-q25.1	?
DI-CMTB	AD	19p12-p13.2	Dynamine
DI-CMTC	AD	1p34-p35	YARS
CMT2A1	AD	1p36.2	KIF1B β
CMT2A2	AD	1p36.2	MFN2
CMT2B	AD	3q21	RAB7
CMT2C	AD	12Q23-24	?
CMT2D	AD	7p15	GARS
CLT 2E	AD	8p21	NEFL
CMT 2F	AD	7q	HSPB1
CMT 2K	AD	12Q12-3	GDAP1
CMT 2L	AD	12q24	HSPB8
AR-CMT2A	AR	1q21.1	LMNA
AR-CMT2B	AR	19q13.3	MED25
AR-CMT2G/K	AR	8q13-q21.1	GDAP1
CMT4A	AR	8q13-q21.1	GDAP1
CMT4B1	AR	11p22	MTMR2
CMT4B2	AR	11p15	MTMR13
CMT2C	AR	5q32	KIAA1985/SH3TC2
CMT4D	AR	8q24.3	NDRG1
CMT 4E	AR	10q21.1	EGR2
CMT 4F	AR	19q13.1	PRX
CMT 4H	AR	12P11.2	FGD4

Trial Version www.nuance.com

Annexe 2 : Répartition de la faiblesse musculaire dans les DMP.



Trial Version
www.nuance.com

A : dystrophie musculaire de Duchenne et de Becker; **B:** dystrophie musculaire d'*Emery-Dreifuss* ; **C:** dystrophie musculaire des ceintures *;* **D:** dystrophie musculaire facio-scapulo-humérale; **E:** myopathie distale; **F:** dystrophie musculaire oculopharyngée (Emery, 2002).

Annexe 3 *:* Produits et Matériels

Produits

Acétone (C3H6O) (Sigma-Aldrich, réf. 24201)

Acide périodique (Sigma-Aldrich, réf. P5463)

Acide acétique glacial (C2H4O2, 1%) (Sigma-Aldrich, réf. 537020)

Alcool : 70 %, 95 % et 100% (absolu) (Sigma-Aldrich

Anticorps primaires (Monoclonal, NCL, Novocastra)

Anticorps secondaire (Monoclonal, réf. NCL-GAMP, Novocastra)

Azote liquide

Bleu de toluidine

Diluent (Dako REAL™ Antibody diluent, réf. S2022)

Eau distillé stérile (réf. MS040).

Eosine ou Tetrabromofluoresceine(C20H8Br4O5) (. réf

Hématoxyline de Haris (C16H14O6) (Panreac, réf.253949)

Isopentane ou 2-Methylbutane (C5H12) (Sigma-Aldrich, réf. 277258)

Kit de détection DAB (Dako, Liquid DAB+Substrate chromogen system, réf. K3468)

Milieu de montage aqueux (Daka, Faramonut aqueous mounting medium, S3025)

Milieu de montage non aqueux (Sigma-Aldrich, Fluka Eukitt® quick-hardening mounting, réf. 03989)

β-NADH ou β-DPNH (C21H27N7Na2O14P2) (Sigma-Aldrich, réf.N8129).

Nitroblue tetrazolium chloride 98% (réf. N6876)

OCT (Tissue-Tek® OCT™ Compound, réf. 4583)

PBS (Dako, réf. S3024)

Silane ou 3-Triethoxysilylpropylamine (C9H23NO3Si) (Sigma Aldrich, réf. A3648)

Succinate de sodium

Xylène (C8H10) (Sigma Aldrich, réf. 534056)

Trial Version
www.nuance.com

2. Matériels

Appareil photo numérique (Leika lazes)

Bac en verre

Chambre humide (pour l'incubation)

Congélateur - 80°C ??

Cryostat (Leika, réf. CM1850)

Dako pen (Dako, réf.S2002)

Lames de verre portes objet (CITOGLAS, réf.217205-1)

Lamelles de verre couvres objets (

Micropipettes (1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)

Microscope optique Zaiss (axioskop 40)

PH mètre (HANNA instruments, pH211)

Trial Version
www.nuance.com

Annexe 4 : préparation des solutions

1. Solutions tampon

1.1. Le tampon TRIS 0.2 M PH 7.4

Tris	3.025 g
HCL 0.1N	200 ml
Eau bidistillé	300 ml

Conserver à +4°C

2. Solutions stock

2.1. Hématoxyline de Harris

Pour 1000 ml d'eau distillé

Hématoxyline	5 g
Ethanol absolu	50 ml
Alun de potassium	100 g
Oxyde mercurique	2.5 g

Dissoudre l'Alun de potassium dans de l'eau très chaude
Ajouter l'Hématoxyline dissout dans l'alcool absolu
Faire bouillir rapidement

Trial Version
www.nuance.com

2.2. Trichrome de Gomori (TG)

Pour 1000 ml d'eau distillé

Fast Green FCF	3 g
Chromotrope 2R	4 g
Acide phosphotungstrique	6 g
Acide acétique glacial	10 ml

2.3. Succinate-Déshydrogénase (SDH)

Pour 200 ml de solution :

KH2PO4 anhyde 0.2 M	40 ml	Stock : 27.2 g/L
NA2HPO4 0.2 M	160 ml	Stock : 28.4 g/L
Succinate de sodium	10.8 g	
Nitrate Tetrazolium	200g	

Ajuster la solution à PH 7.6 avec du NAOH à 30%

Aliquoter

Conserver à 4°C

2.4. Nicotinamide Déshydrogénase tetrazolium (NADH-TR)

Tampon TRIS 0.2 M PH 7.4	10 ml
Nitroblue Tetrazolium 1 mg/ml	10mg
DPNH (NADH-TR)	4 mg

Ajuster la solution à PH 7.4

Aliquoter

Conserver à 4°C

Trial Version
www.nuance.com

3. Silanisation des lames

1. Immerger les lames de verre dans le silane dilué par l'acétone à 7% pendant 3 minutes.
2. Plonger les lames dans l'acétone.
3. Rincer les lames avec l'eau distillée.
4. Laissez sécher les lames à l'air libre durant une nuit.

Annexe 5 : fiches techniques

1. Coloration Histochimiques

1.1. Coloration à H&E (Hématoxyline –Eosine)

1. Colorer dans un bain d'Hématoxyline de Harris pendant 10 min.
2. Rincer à l'eau distillée jusqu'à ce que l'eau reste incolore.
3. Colorer dans un bain d'Eosine pendant 5 min
4. Rincer à l'eau distillée pour éliminer l'excès du réactif
5. Déshydrater successivement dans les bains d'alcools 70°, 95°, 100°(I), 100° (II) et passer dans le xylène (I) et (II).
6. Monter par l'Eukitt

1.2. Coloration au TG (trichrome de Gomori)

1. Colorer dans un bain d'Hématoxyline de Harris pendant 5-10 min.
2. Rincer 2 fois à l'eau distillée
3. Colorer dans un bain trichrome pendant 30 min
4. Rincer rapidement les lamelles avec l'eau acétifiée (eau distillée+ un rasade d'acide acétique).
5. Déshydrater successivement dans les bains d'alcools 95°, 100°(I), 100° (II) et passer dans le xylène (I) et (II).
6. Monter par l'Eukitt

2. Colorations Histoenzymologiques

2.1. Coloration au Succinate Déshydrogénase (SDH)

1. Incuber les lamelles à 37°C avec la solution (tampon phosphate 0.2 M- SDH) ajusté à PH 7.6 pendant 2 heures.
2. Rincer à l'eau distillée
3. Monter par le Faramount.

2.2. Coloration Nicotinamide Déshydrogénase Tétrazolium Réductase (NADH-TR)

1. Ajuster la solution à PH 7.4, Incuber les lamelles à 37°C pendant 30 min.
2. Rincer à l'eau distillée
3. Monter par le Faramount.

Trial Version
www.nuance.com

3. Immunohistochimie

1. Coupes congélées de 5-7 µm d'épaisseur.
2. Laisser sécher les lames à l'air libre et à température ambiante. 1 heure
3. Entourer chaque prélèvement sur la lame au Dako Pen (Dako-réf.S2002).
4. Incuber avec l'Anticorps primaire dilué à T°C ambiante en chambre humide, avec couvercle. 1 heure
5. Enlever l'excès d'Anticorps primaire avec l'eau distillée à laide d'une seringue.
6. Laver les coupes dans le PBS (sachet de PBS(S2430) +1L eau distillée) 2×5 minutes
7. Incuber avec l'Anticorps secondaire dilué (GAMP, 1:50) à T°C ambiante dans une chambre humide et avec couvercle 1 heure
8. Laver les lames dans le tampon PBS 2×5 minutes
9. Couvrir les échantillons de solution DAB (1goutte de chromogène DAB /1ml de tampon) (Dako, réf. K3465) 10 minutes
10. Rincer à l'eau distillée 10 minutes
11. Contre colorer à l'hématoxyline (Dako, réf. S2020) 2 minutes
12. Laver rapidement à l'eau courante puis à l'eau distillée
13. Montage aqueux par le Faramount.

Trial Version
www.nuance.com