

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE SAAD DAHLEB-BLIDA
Faculté Des Sciences Agronomiques Vétérinaires et Biologiques

Département de Biologie



Mémoire de fin d'études

*Présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master en SNV
Option : Biosignalisation Cellulaire et Moléculaire et Immunologie (BCMI)*

**Etude morphologique, histoenzymologique et immunohistochimique
des dysferlinopathies diagnostiquées au Centre de Pierre et Marie
Curie (CPMC), Alger**

Soutenance le: 22 /09/2013

Réalisé par :

M^{elle} : BENTATA Meriem

Devant les jurés

M^r : MOHAMED SAID R.

M^{me} : AMOKRANE A.

M^{me} : BENAZOUZ F.

M^{me} : BENAHMED M.

MAA (USDB) Président

MAA (USDB) Examinatrice

MAA (USDB) Examinatrice

MAA (CPMC) Promotrice

Promotion : 2012 - 2013

Résumé

Les dysferlinopathies constituent un groupe de dystrophies musculaires autosomiques récessives comprenant principalement la myopathie des ceintures de type 2B et la myopathie distale de Miyoshi. Elles sont causées par des mutations dans le gène *DYF* qui se situe dans la région chromosomique 2p13. Il est exprimé principalement dans le muscle squelettique et cardiaque, mais également dans d'autres tissus (placenta...) et d'autres types cellulaires tels que les monocytes/macrophages. La dysferline fait partie de la famille des Ferlines. Elle est localisée au sarcolemme de la fibre musculaire squelettique adulte, où elle joue un rôle dans sa réparation et dans la fusion des membranes, et elle aurait aussi une implication dans le système immunitaire par l'activité phagocytaire des macrophages. Nous avons mis en évidence par des techniques histologiques, histoenzymologiques et immunohistochimiques des anomalies musculaires liées à un déficit en dysferline, et cela avec un ciblage de cette dernière et des autres protéines musculaires membranaires par un ensemble d'anticorps spécifiques. Ces modifications cellulaires et tissulaires que sont l'inégalité de taille de fibres, l'élargissement fibreux de tissu conjonctif endomysial et pérимysial et la présence d'infiltrat inflammatoire, révèlent un phénomène de nécrose/régénération et la réaction inflammatoire qu'il a induit.

Mots clés : dysferline, dysferlinopathie, histoenzymologie, histologie, immunohistochimie.

Abstract

The dysferlinopathies set up a group of muscular dystrophies autosomal recessives including mainly limb girdle muscular dystrophy type 2B and Miyoshi myopathy. They are caused by mutations in the dysferlin-encoding *DYSF* which is located on chromosome 2p13. It is expressed mainly in the skeletal and cardiac muscle, but also in other tissues (placenta...) and cellular types such as the monocyte/macrophage. The dysferline belongs to the family of Ferlines. It is localized with the sarcolemme of adult skeletal muscle fiber, where she plays a role in the repair and the fusion of the membranes, and it would have also an implication in the immune system by the phagocytic activity of the macrophages. We showed by histological and histoenzymologique and immunohistochemistry techniques the anatomo-pathological and cyto-pathological abnormalities of dysferlinopathy, and that with a targeting of the dysferline and another proteins by a cluster of spécifiques antibodies. The cellular and tissue modifications reveal by inequality of fiber size and widening endomysial and perimysial tissue with an installation of fibrosis, necrosis and regeneration.

Keywords: dysferlin, dysferlinopathy, , histoenzymology, histology, immunohistochemistry.

ملخص

الديسفاغليوباتي هي مجموعة من ضمور العضلات مقهورة وأهمها ضمور العضلات أطرافهم الزنار (LGMD) نوع 2 ب و اعتلال عضلي البعيد لميوشي. سببها طفرات في الجين الذي DYSF يقع في منطقة الكرموزومات 2 ب 13. ويعبر عن ذلك بشكل رئيسي في الهيكل العظمي وعضلات والقلب، ولكن أيضا في الأنسجة الأخرى (مشيمة..). وأنواع الخلايا مثل حيدات / البالعات . الديسفاغليين هو جزء من أسرة الفاغليين . وهي تقع في غمد الليف العضلي ، حيث أنها تلعب دورا في إصلاح والنصهار الغشاء ، ولها أيضا دور في الجهاز المناعي عن طريق نشاط أكلة الضامة. أثبتنا من خلال تقنيات نسيجية، ومناعية توسيمية تشوهات نسيجية وخلوية ، وذلك مع استهداف الديسفاغليين و بروتينات اخرى و ذلك بمجموعة من الاجسام المضادة المتخصصة. التغييرات الخلوية والنسجية التي كشفت عنها متمثلة في عدم المساواة في حجم الألياف وتمديد النسيج الاندوميسيالي وبيغيميسيالي وأحيانا تثبيت من التليف، نخر والتجدد. وفي اغلب الاحيان ازدياد في تسرب الخلايا الالهابية.

الكلمات الدالة : الديسفاغليين، الديسفاغليوباتي، تقنيات نسيجية، تقنية التوسيم النسيجي.

Remerciements

*Je tiens ici à remercier en premier lieu ma promotrice docteur **BENAHMED**. Je ne vous remercierai jamais assez pour la confiance que vous m'avez accordée, votre enthousiasme et pour l'amour que vous portez à votre métier. Merci d'avoir encadré tout le travail présenté ici, et de m'avoir donné les moyens de mener à bien tous les différents projets. Merci de m'avoir transmis cette formation scientifique et votre passion, à la fois directement lors de nos discussions et par les responsabilités que vous avez pu me confier. Ce fut vraiment un plaisir et un bonheur de travailler avec vous et les gens qui vous entourent.*

*Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et mes remerciements à **M^r MOHAMED SAID** , pour m'avoir fait l'honneur d'en être le président, ainsi qu'au **Mme BENAZOUZ** et **Mme AMOKRANE** pour avoir accepté d'être les examinatrices de mon travail.*

*Je tiens à remercier vivement Madame Dr. **DJAZOULI-ALIM F.Z.** pour leur aide et leur précieux conseils couplés à leur qualité scientifique et pédagogique, Je la remercie également pour m'avoir encouragée, soutenue tout au long du mémoire avec bienveillance.*

*Je remercie mon mari **BOUNADJAD Youcef** pour son soutien et son encouragement de chaque instant et son amour sans cesse, et bien sûr, à sa famille.*

J'adresse une pensée toute particulière et je témoigne toute mon affection à mes chers parents et ma famille qui ont su m'apporter tout leur soutien, leurs pensées, leurs prières et leur amour à distance mais à tout instant.

*Finalement, Je remercie à tous mes amis Sihem, Amel, Hanan pour leur amitié. Une grande reconnaissance, d'une part à mon amie **ABBAS F/Z** pour ses conseils, encouragements, ainsi que sa famille pour son amitié.*

SOMMAIRE

	Page
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I: DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES	
I. 1. Données anatomo-fonctionnelles sur le muscle strié squelettique.....	2
I.1.1. Architecture du muscle strié squelettique.....	3
I.1.2. Structure de la fibre musculaire striée squelettique	3
I.1.3. Hétérogénéité fonctionnelle des fibres musculaires.....	4
I.2. Classe de la dysferline dans l'ensemble des maladies neuro-musculaires.....	4
I.2.1. Expression et localisation subcellulaire de la dysferline.....	6
I.3. L'implication de la dysferline dans la physiologie du muscle.....	6
I.3.1. Implication dans la fusion et la réparation des membranes.....	6
I.3.2. Implication dans l'activité phagocytaire	7
I.4. Gene et architecture moléculaire de la dysferline.....	9
I.5. La dysferline et la famille de ferlines.....	10
I.6. Variants transrationnels.....	11
I.7. Physio-pathologie des dysferlinopathies.....	12
I.7.1. Spectre phénotypique.....	12
I.7.1.1. Myopathie de Miyoshi.....	12
I.7. 1.2. La myopathie des ceintures de type 2 (LGMD2B).....	12
I.7.1.3 Formes mineures de dysferlinopathies.....	13
I.8. Stratégie diagnostique.....	13
I.9. Perspectives thérapeutiques.....	14

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	
II.1. Matériels non biologiques.....	15
II.2. Matériel biologiques.....	15
II.3. Prélèvement des échantillons.....	15
II.4. Identification des échantillons.....	15
II.5. Fixation et cryoconservation des prélèvements.....	16
II.6. Confection des coupes au cryostat.....	16
II.7. Méthodes d'étude morphologique.....	17
II.7. 1. Coloration à l'Hématoxyline-Éosine.....	17
II.7.2. Coloration au Trichrome de Gomori.....	17
II.8. Méthode d'étude histoenzymologique.....	17
II.8. 1. Coloration de la Succinate Déshydrogénase (SDH).....	18
II.8.2. Coloration du nicotinamide-adénine-dinucléotide-tétrazolium-réductase (NADH-TR).....	18
II.9. Technique immunohistochimique.....	18
II.10. Montage des coupes entre lames et lamelles.....	20
II.10. Observations et acquisition d'images numérique.....	20
CHAPITRE III. RESULTATS	
III.1. Les données cliniques.....	21
III.2. Processus dystrophique au niveau tissulaire et cellulaire.....	24
III.3. Modifications subcellulaires.....	29
III.3. Etude de la distribution de la dysferline et des protéines du complexe dystrophine musculaire dans les dysferlinopathies	34
CHAPITRE IV. DISCUSSION	35
CONCLUSION	39
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
ANNEXES	

LISTE DES ABREVIATIONS

CPK	Créatine Phospho-Kinase
DACM	myopathie du compartiment distal antérieur
DHPLC	chromatographie liquide haute pression en phase liquide dénaturante
ETn	early retrotransposon
F	Filamenteux
Fer-1L1	Fer-1 Like number 1
FKRP	Fukutin Related Protein
FR	Fast Resistant
G	Globulaire
HLA	Human leucocyte antigen
HE	Hématoxyline Eosin
LDH	déshydrogénase lactique
LGMD	Limb Girdle Muscular Dystrophy
MM	Miyoshi distal Myopathy
NAD-TR	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Tétrazolium-Réductase
OCT	Optimum Compound Tissue
POMT	Proteines O-Mannosyl transférase
S	Slow
SDH	Succinate Déshydrogénase
TG	Trichrome de Gomori

Trim32
tubule-T

Tripartite-motif-containing protein 32
tubule transverse

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1 : Muscle strié squelettique	2
Figure 2 : Disposition des myofilaments dans le muscle strié au repos.....	4
Figure 3 : localisation des différentes protéines impliquées dans les maladies neuromusculaires. Localisation transmembranaire de la dysferline.....	5
Figure 4 : Principe général de réparation membranaire après rupture de la membrane plasmique.....	7
Figure 5 : implication de processus inflammatoire dans la dysferlinopathie.....	8
Figure 6 : Organisation du gène DYSF	9
Figure 6 : Localisation des exons « optionnels » 1a, 5a, 17 et 40a en fonction des domaines structurels protéiques de la dysferline.....	9
Figure 7 : Scores d'homologie entre les différents membres de la famille des ferlines.....	10
Figure 8 : Organisation des motifs protéiques des principales ferlines humaines.....	11
Figure 14 : Coupe histologique d'un tissu musculaire normal.....	23
Figure 15 : Coupe histologique représentant les anomalies tissulaires qui accompagnent le processus dystrophique de dysferlinopathie.....	25
Figure 16 : Phénomène de fibrose dans un tissu musculaire dystrophique.....	26
Figure 17 : Phénomènes de nécrose/régénération dans un tissu musculaire dystrophique.....	26
Figure 18 : Phénomènes de segmentation des fibres hypertrophiques fragilisées.....	27
Figure 19 : Phénomène d'inflammation observé dans la dysferlinopathie.....	27
Figure 20 : noyaux internalisés.....	29
Figure 21 : techniques oxydatives SDH et NADH.....	31
Figure 22 :cas témoin. Immunomarquage des protéines membranaires dans le muscle normal.....	32
Figure 23 : processus dystrophique non dystrophinique	33

LISTE DES TABLEAUX

Page

Tableau 1	les différents anticorps utilisés en immunohistochimie.....	18
Tableau 2	la distribution de marquage de dysferline et les autres protéines.....	34

Le muscle, producteur de force et de mouvement, est un système complexe dans son organisation morphologique macroscopique et microscopique, ainsi que dans les phénomènes biochimiques et moléculaires de sa contraction (Alberts et al., 1995). Différents caractères fonctionnels et morphologiques font distinguer le muscle strié cardiaque et le muscle lisse à contraction involontaire, du muscle strié squelettique qui est sous contrôle volontaire.

Ce dernier type musculaire est un tissu contractile qui permet le maintien du tonus postural et les mouvements du corps. Il représente entre 40 à 50% de la masse totale de celui-ci (Mekrami et Brignol., 2003).

Les pathologies dues à un défaut dans les fibres musculaires sont regroupées sous le terme de myopathies, et sont caractérisées par une atrophie musculaire conduisant le plus souvent à une altération et à une perte des fonctions motrices. Elles peuvent être d'origine génétique ou acquises. Plus de 80 myopathies d'origine génétique ont été identifiées. Ces pathologies appartiennent à la catégorie des maladies rares (moins d'un cas sur 2000) et se répartissent en différentes classes en fonction de l'âge d'apparition des symptômes et de la présentation de l'atteinte musculaire. (Fernandez, 2010 ; Petiot, 2004). Parmi ces classes, le groupe le plus complexe est celui des dystrophies musculaires qui comprend au moins 25 pathologies différentes dont les dystrophies des ceintures (LGMD pour Limb Girdle Muscular Dystrophy). Les dystrophies des ceintures ont été historiquement regroupées en raison de leur atteinte prédominante de la musculature des ceintures pelvienne et scapulaire. (Emmanuelle, 2008).

Dans l'ensemble des dystrophies musculaires, un déficit en dysferline protéine impliquée dans la réparation membranaire (Morrée et al., 2010) est responsable de trois pathologies : La dystrophie musculaire des ceintures de type 2B (LGMD2B), la myopathie distale de Miyoshi et la myopathie du compartiment distal antérieur (DACM). Cet ensemble de pathologies regroupées porte le terme de Dysferlinopathies. (Ueyama et al., 2002)

Dans notre travail nous avons étudié les aspects histologique et histoenzymologique et immunohistochimique des dysferlinopathies à partir des biopsies musculaire de patients algériens atteints de cette maladie dans laboratoire d'anatomie pathologie du centre Piere et Marie CURIE d'Alger, d'autant plus qu'aucune étude antérieure n'a été faite dans ce sens. Ainsi l'objectif de notre travail est de :

- L'identification différentielle et un recensement exhaustif des personnes atteints de dysferlinopathie
- Mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques
- L'orientation des études de la biologie moléculaire et les conseils génétique, dans l'intérêt évident de l'avancement des stratégies thérapeutiques.

II.1. Matériel non biologique

Le matériel utilisé dans toute notre expérimentation (du conditionnement de biopsies jusqu'à la coloration et l'observation) ainsi que les réactifs sont listés dans l'annexe 2

II.2. Matériel biologique

Notre étude prospective a porté sur des biopsies congelées à une température de -80°C à partir de l'année 2008 jusqu'en 2012, elles sont issues de patients présentant des signes cliniques de dystrophies des ceintures. Les biopsies sont réalisées au niveau de différents services de Neurologie d'Alger.

II.3. Prélèvement des échantillons

Les biopsies musculaires sont généralement réalisées par des médecins des neurologues ou des chirurgiens. Le geste s'effectue sous anesthésie locale, sauf chez les nouveau-nés et les petits enfants pour lesquels une anesthésie générale est nécessaire. Sachant que les biopsies sont pratiquées de préférence sur le deltoïde du membre supérieur ou le quadriceps du membre inférieur.

La dissection doit se faire avec un ciseau et dans le sens des fibres. Elle doit comporter suffisamment de tissu musculaire, 2 à 3 fragments de 1 à 1.5 cm de longueur pour 5mm de diamètre de muscle. Les fragments destinés à l'étude en microscopie photonique (histoenzymologie et immunohistochimie) sont placés immédiatement dans un récipient vide et fermé hermétiquement, reposant sur une couche de glaçons dans un thermos. Il doit être remis le plus rapidement possible au laboratoire d'anatomie pathologique du Centre Pierre et Marie Curie (CPMC) par un technicien spécialiste (délai maximum souhaité: 1 heure), pour une analyse tissulaire approfondie.

II.4. Identification des échantillons

Chaque biopsie musculaire est accompagnée d'une fiche de patient donnant accès aux informations suivant :

- Non/ prénom, âge et sexe
- Antécédents personnels et familiaux du patient
- Le siège, la date du prélèvement 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, électromyogramme
- Les hypothèses diagnostiques.
- Les prises médicamenteuses éventuelles

II.5. Fixation et cryoconservation des prélèvements

Pour la congélation, nous avons réalisés au minimum deux fragments dont les extrémités pincées sont éliminées. Ces fragments sont orientés dans le sens de la longueur des fibres, puis montés sur un support de liège enrobé par l'OCT (Optimum Compound Tissue), et congelés rapidement dans l'isopentane lui-même refroidi dans l'azote liquide de -160°C pendant 3 minute. S'il existe des fragments supplémentaires (mêmes fragmentés ou mal orientés) ils sont réservés pour les études biochimiques (western blot...) et leur congélation se fait directement dans l'azote liquide. Le stockage se fera à -80°C. Un autre fragment est fixé dans le formol à 10% pour la confection des blocs en paraffine.

II.6. Confection des coupes au cryostat

Des coupes transversales de 5 à 7 μm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un cryostat réglé à une température de -20°C , puis étalées sur des lames normales (pour l'histologie standard), des lames silanisées (annexe.3) pour l'analyse immunohistochimique, et sur des lamelles pour faire une étude histoenzymologique, puis mises sécher à l'air libre pendant une heure.

Les étalements peuvent être conservé à 80°C emballés dans du papier aluminium et colorer ultérieurement. Dans le cas où la coloration est prévue les heures qui suivent la coupe, les lames sont conservées à $+4^{\circ}\text{C}$.

NB: Nous avons confectionné au moins 4 lamelles pour l'histoenzymologie, 6 lames non silanisées pour les colorations usuelles et spéciales et 15 lames silanisées pour l'étude immunohistochimique.

II.7. Méthodes de l'étude morphologique

II.7.1. Coloration à l'Hématoxyline-Éosine (H&E)

Cette coloration nous permet d'observer l'histologie globale du tissu musculaire. L'Hématoxyline de Harris permet de mettre en évidence les noyaux colorés en bleu violet tandis que l'Eosine colore les composants cytoplasmiques en rose.

Les lames sont incubées dans l'Hématoxyline pendant 10 minutes puis dans l'Eosine pendant 5 minutes (annexe.4).

On peut apprécier :

- Le diamètre et la forme des fibres apparaissant rose
- la position des noyaux (en bleu noir)
- les petites cellules basophiles en régénération, possédant un gros noyau vésiculaire et un cytoplasme peu volumineux
- éventuelles cellules en nécrose
- présence d'infiltrat inflammatoire

II.7.2. Coloration au Trichrome de Gomori

Avec le trichrome, on observe une différence de couleur : certaines fibres sont claires et d'autres sont plutôt sombres. Sachant que le trichrome colorie les mitochondries en rouge, les cellules sombres sont riches en mitochondries, ce sont donc des fibres de type 1, les cellules claires sont pauvres en mitochondries et sont de type 2. On peut ainsi connaître l'état du tissu conjonctif péri et endomysial.

Après l'immersion dans l'Hématoxyline, les lames sont incubées dans le Trichrome de Gomori qui seront ainsi rincer dans l'eau acidifiée suivi par la déshydratation dans les différent bains d'alcool. (Annexe. 4)

II.8. Méthode de l'étude histoenzymologique :

Cette technique oxydative étudie l'activité des différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale et donc on peut observer à la fois le nombre des mitochondries et leur répartition. Ainsi les fibres de types I sont plus fortement colorées que les types II après incubation des lamelles dans les solutions SDH ou NADH et rinçage.

Les deux enzymes colorés sont :

- Nicotinamide adénine dinucléotide tétrazolium réductase (NADH-TR) : est présente dans les mitochondries, le reticulum sarcoplasmique et de tubules T. Donc la coloration met en évidence le réseau intermyofibrillaire
- Succinate Déshydrogénase (SDH) : complexe de la chaîne respiratoire mitochondriale. Elle met en évidence les mitochondries.

II.9. Technique immunohistochimique

La technique immunohistochimie que nous avons pratiquée, nous permet d'étudier l'expression de certaines protéines musculaires membranaires, l'accumulation de protéines myofibrillaires et le phénotypage des cellules inflammatoires et grâce à la réaction antigène-anticorps.

Les principaux anticorps primaires monoclonaux (tab.1) de souris sont dirigés contre :

- Les protéines du complexe membranaire de la dystrophine : Dystrophines 1, 2 et 3,
- les sarcoglycane Alpha, Bêta, Gamma et Delta,
- le beta-dystroglycane,
- la dysferline,
- Les chaînes fast et slow de la myosine,
- Human leucocyte antigen (HLA classe I), complexe d'attaque du complément C5b9 et contre les lymphocytes T (CD3, CD4, CD8), les lymphocytes B (CD20) et les macrophages (CD68).

Tableau. I : les différents anticorps utilisés en immunohistochimie

Anticorps Dilution	Nomenclature	Clone
Anti-dystrophine (domaine central) pur	NCL-DYS1	DY4/6D3
Anti-dystrophine(C-ter) 1:10	NCL-DYS2	DY8/6C5
Anti-dystrophine(N-te) 1:10	NCL-DYS3	DY10/12B2
Anti- α -sarcoglycane	NCL-a-SARC	Ad1/20A6

Matériel et Méthodes

1:10		
Anti- β -sarcoglycane	NCL-b-SARC	β Sarc/5B1
1:50		
Anti- δ -sarcoglycane	NCL-d-SARC	δ Sarc3/12C1
1:50		
Anti- β -dystroglycane	NCL-b-DG	43D1G1/8D5
1:50		
Anti-dysferlin	NCL-HAMLET	Ham1/7B6
1:80		
Anti-chaine lourde de la myosine rapide (faste)	NCL-MHCf	WB-MCHf
1:80		
Anti-chaine lourde de la myosine lente (slow)	NCL-MHCs	WB-MCHs
1:80		
Anti-C5b-9	Anti-human C5b9	aE11
1:25		
Anti-HLA ABC	Anti-HLA A,B ,C	W6/32
1:25		
Anti-human CD3 (région cytoplasmique)	Anti-CD3	F7.2.38
1:25		
Anti-human CD 4(domaine externe)	Anti-CD4	4B12
1:25		
Anti-human CD8	Anti-CD8	C8/144B
1:25		
Anti-human CD20	Anti-CD20	L26
1:25		
Anti-human CD68		Anti-CD68
1:25		

- Principes de la technique:

Nous avons utilisées des anticorps commercialisés par le laboratoire Novocastra (Leica Biosystems).

Les incubations des coupes sont faites à une température ambiante et dans une chambre humide où ces coupes sont incubées séparément par les différents anticorps primaires (Tab. I) pendant 1 heure; 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. Entre chaque étape, il ya un lavage deux fois 5 minutes dans un tampon PBS.

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. 3)

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 (Faramount Aqueous Mounting Medium) qui renferme l'azide de sodium (NaN_3) et qui 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-méthylméthacrylamide) 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 dans l'obscurité et à température ambiante.

II.11. Observations des lames

L'observation s'est faite avec un microscope photonique à différents grossissements ($G \times 10$, $G \times 20$, $G \times 40$)

Notre travail porte sur l'étude de fiches de patients pris en charge cliniquement au niveau du service de Neurologie du Centre Hospitalo-Universitaire (C.H.U) MUSTAPHA BACHA et des autres C.H.U d' ALGER, et qui présentent un déficit total ou partiel en dysferline sur les biopsies musculaires adressées au CPMC.

III.1. Les données cliniques

SEXE	Age	Age de début	Signes de début	Taux de CK x Normale
F	31	29	courir	25
H	32	18	courir	15
H	36	20	escalier	10
F	20	16	escalier	37
F	41	23	courir	15
H	53	25	Courir + escalier	NP
H	23	16	escalier	40
H	26	19	escalier	30
H	35	18	crampe	116
H	29	17	escalier	50
H	15	8	courir	9
H	25	12	courir	48
H	20	14	escalier	NP

Courir : difficultés à courrir

Escalier : difficultés à monter les escaliers

NP : non précisé

- Répartition des résultats le sexe et l'âge de début signe

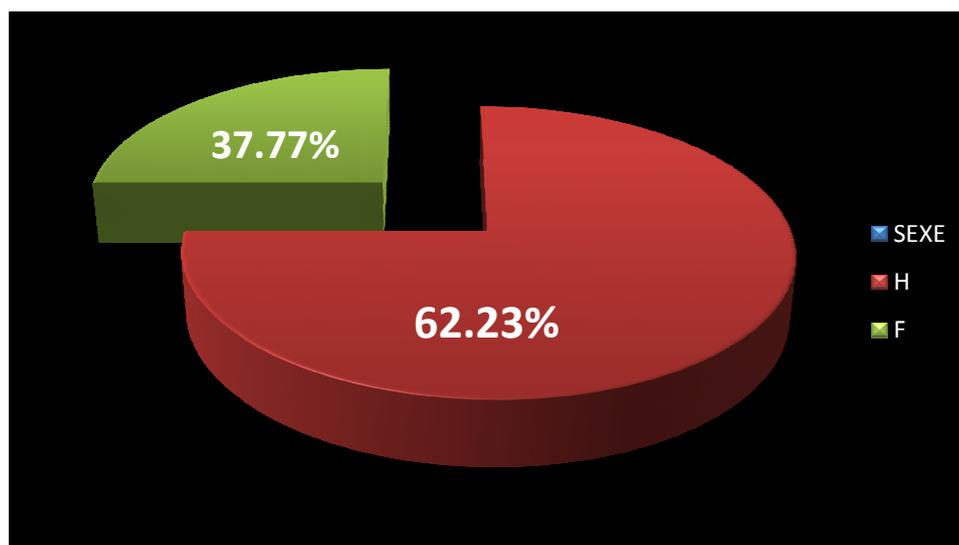


Figure.11 : répartition de patient selon le sexe

Parmi nos 13 patients ayant bénéficié d'une biopsie musculaire pour suspicion de dysferlinopathies, sont des 9 Hommes et 4 femmes.

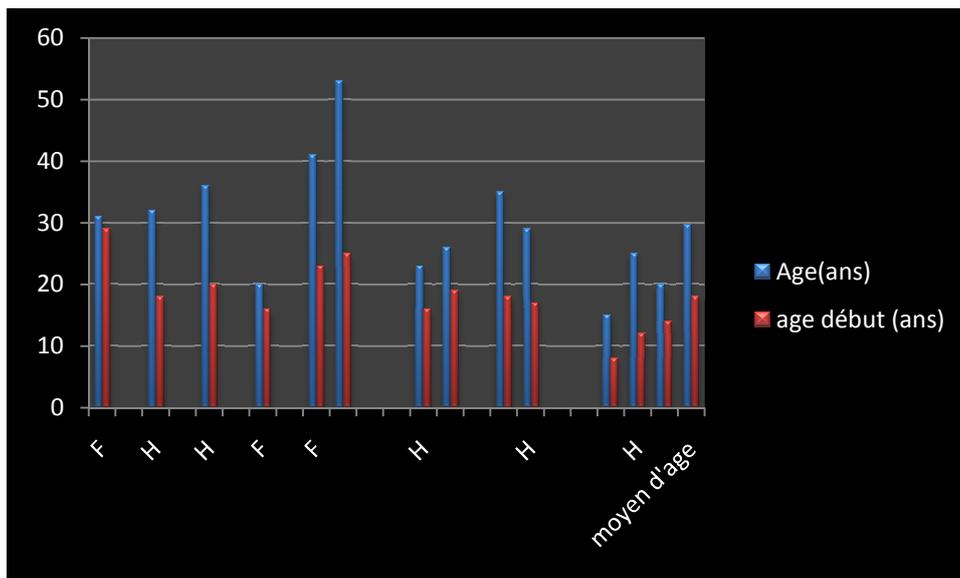


Figure.12 : répartition selon l'âge de début de la maladie et l'âge au moment du diagnostic

L'âge au moment de la biopsie varie entre 15 et 53 ans (moyenne d'âge est de 30 ans)

Les symptômes cliniques apparaissent, en moyenne, 18 ans avant le diagnostic

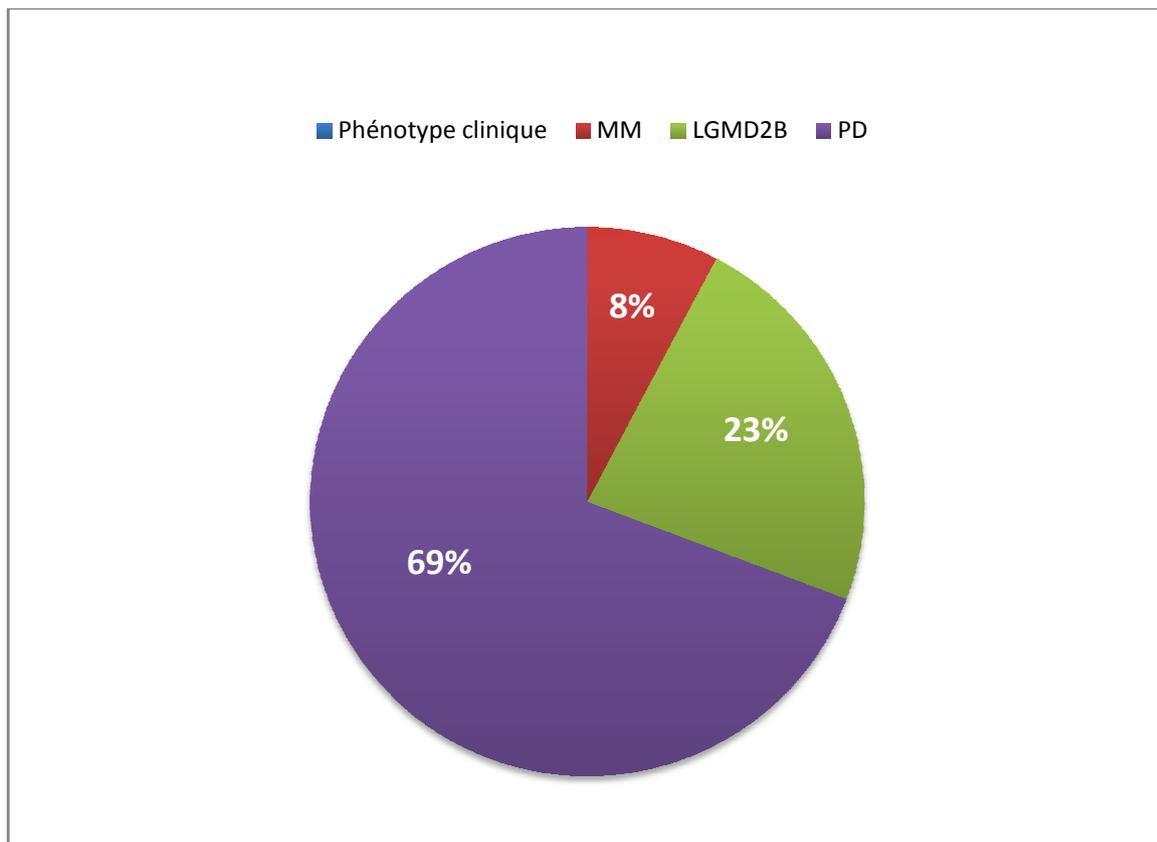


Figure.13 : Répartition selon le tableau clinique : LGMD2B, myopathie distale de Miyochi (MM) et formes mixtes proximodistales PD.

Après analyse des biopsies musculaires, nous avons obtenu :

- seul patient présent un phénotype de MM (soit 8%).
- 23% ont un tableau de LMGD2B.
- la majorité des cas présentent un phénotype mixte proximo-distal PD (soit 69 %).

III.2. Processus dystrophique au niveau tissulaire et cellulaire

Dans le muscle normal (Fig.14), les fibres musculaires ont pratiquement toutes le même diamètre et sont cohésives, parfaitement accolées par une couche de tissu conjonctif très fine, avec des noyaux qui se situent à la périphérie sous la membrane.



Figure 14 : coupe histologique d'un tissu musculaire normal.

A noter l'égalité de taille de fibres musculaires (f) qui sont séparées par une couche fine de tissu conjonctif périmysial et endomysial (flèche). Hématoxyline & Eosine Gx200

Le tissu musculaire malade est totalement modifié par la présence de fibres musculaires hétérogènes de type atrophiques (petite taille) et hypertrophiques (grande taille). Cette modification dans l'organisation de tissu musculaire apparait aussi dans l'élargissement de tissu interstitiel endomysial (fig.15).

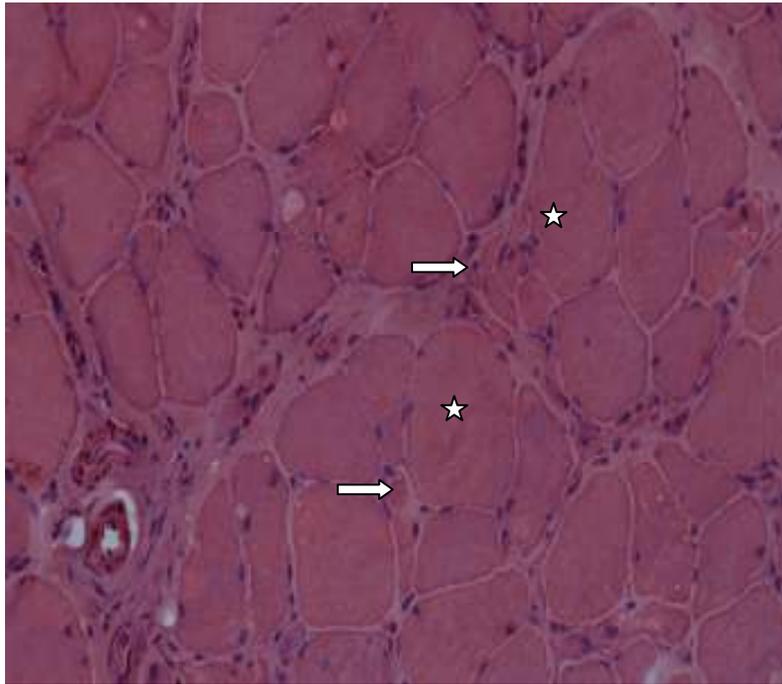


Figure 15 : Coupe histologique représentant les anomalies tissulaires qui accompagnent le processus dystrophique de dysferlinopathie.

Les fibres musculaire sont hétérogènes et de taille inégale. Flèches : les fibres atrophiques. Astérisques : les fibres hypertrophiques. Hématoxyline & Eosine. Gx200

- La fibrose

L'augmentation importante du tissu conjonctif interstitiel endomysial survient pour compenser la modification de taille de fibres musculaires et en remplacement des fibres nécrosées et non régénérées. (Fig.16)

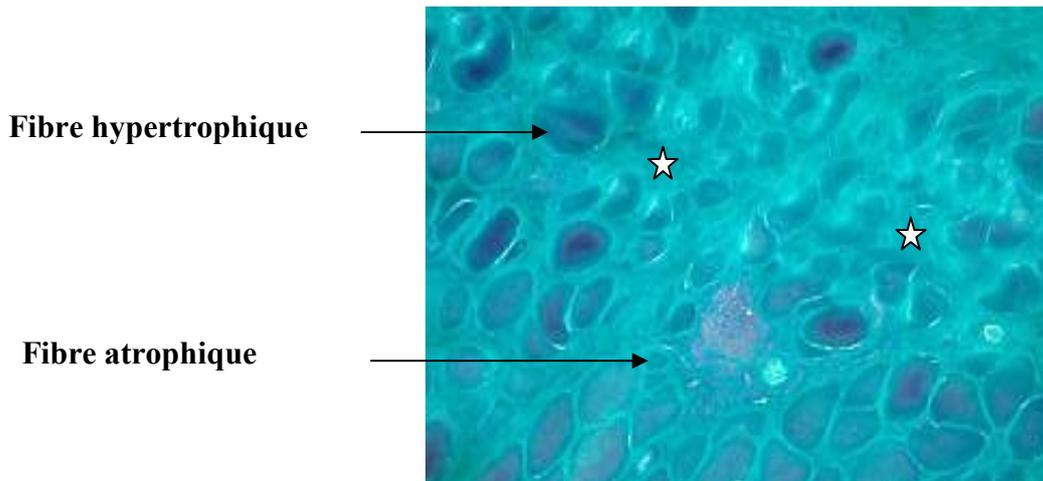


Figure 16. Phénomène de fibrose dans un tissu musculaire dystrophique. Elargissement du tissu interstitiel périnysial et endomysial par de la fibrose (astérisques)
A : Hématoxyline & Eosine. B : Trichrome de Gomori. Gx200

- La nécrose

Les cellules inflammatoires envahissent le tissu musculaire dystrophique dans certaines régions, ce qui reflète la présence de fibres dégénératives et nécrosées. Les fibres en nécrose perdent leur affinités tinctoriales, paraissent pâles avec des limites floues (Fig. 17 A)

- La régénération

Les fibres en régénération sont des fibres jeunes entre les fibres adultes. Elles sont caractérisées par leur petite taille, leur cytoplasme basophile et leurs gros noyaux centraux ou périphériques. (Fig.17 B)

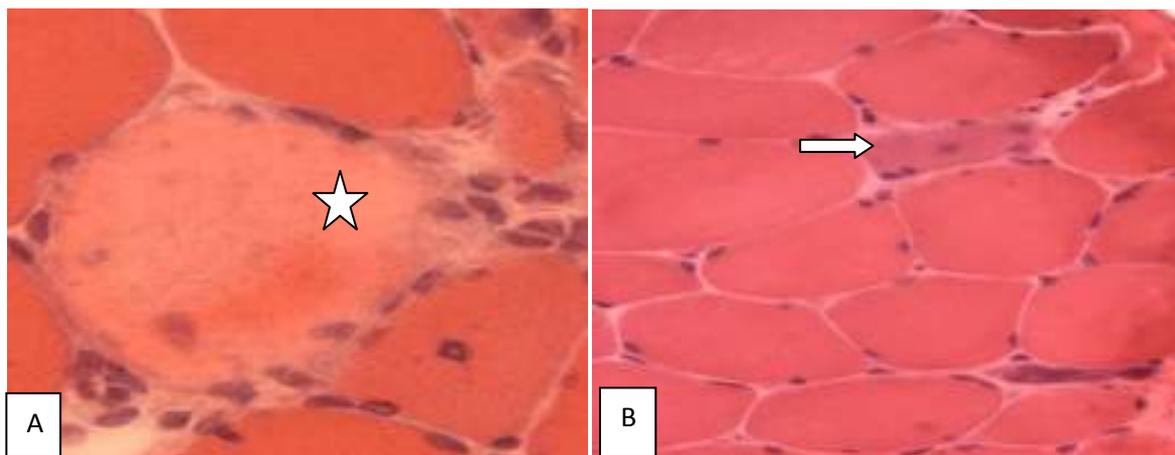


Figure17. Phénomènes de nécrose/régénération dans un tissu musculaire dystrophique. Fibres musculaires en nécrose entourées de macrophages (étoiles). Fibre jeune basophile en régénération (flèches). A et B: HE Gx400

- **La segmentation**

La Figure 18 démontre de façon claire la segmentation de certaines fibres musculaires lors de processus dystrophique. Des fissurations s'installent dans certaines fibres musculaires.

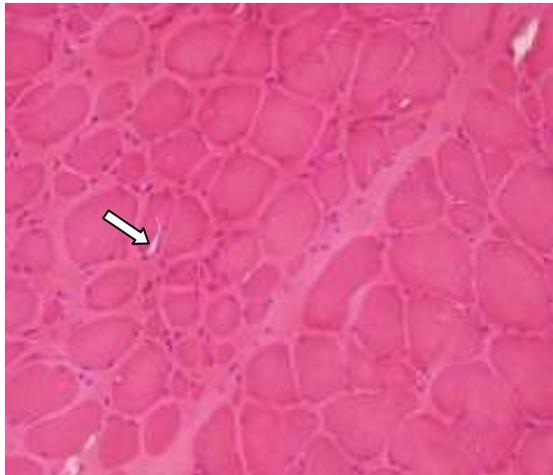


Figure18 : Coupe histologique représentant la segmentation des fibres hypertrophiques fragilisées.

Fibres de calibre inégal avec fibres atrophiques éparses et fibres segmentées (flèches). HE. Gx200

- **L'infiltrat inflammatoire**

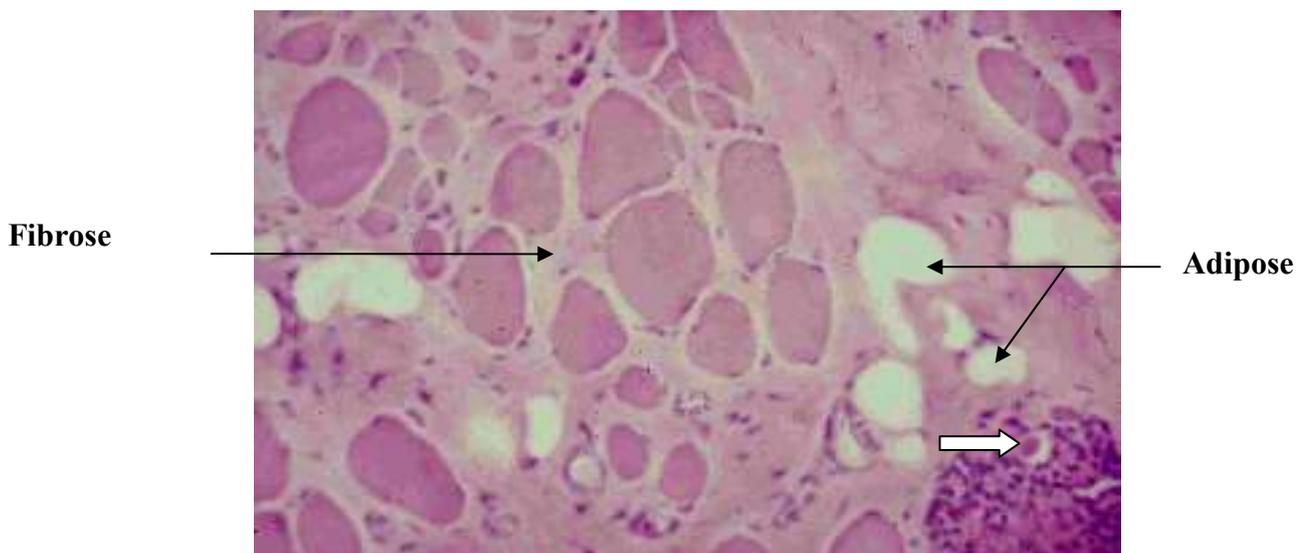


Figure 19 : Phénomène d'inflammation observé dans la dysferlinopathie.

Les macrophages phagocytaires entourent les fibres musculaires en nécrose (flèche)

- La distribution des anomalies tissulaire sur les biopsies des patients

patients	Fibrose	Fibres en nécrose	Fibre en régénération	Infiltrat inflammatoire
1	+++	+	+	++
2	+	++	+	+
3	-	+	+	+
4	+	+	+	-
5	++	+	+	++
6	+	+	+	+
7	-	+	+	-
8	+	+	+	+
9	++	+	+	+
10	+	-	-	-
11	++	+	+	+
12	+	+	++	+
13	+	+	-	-

(+) présence

(-) absence

III.3. Modifications subcellulaires

Nous avons observé aussi d'autres modifications au niveau cellulaire, comprenant:

- Centralisation nucléaire

La fibre musculaire normale possède plusieurs noyaux à sa périphérie. Mais les fibres musculaires dystrophiques présentent des noyaux à la fois périphériques et centraux (Fig. 20) témoins de la désorganisation des sarcomères.

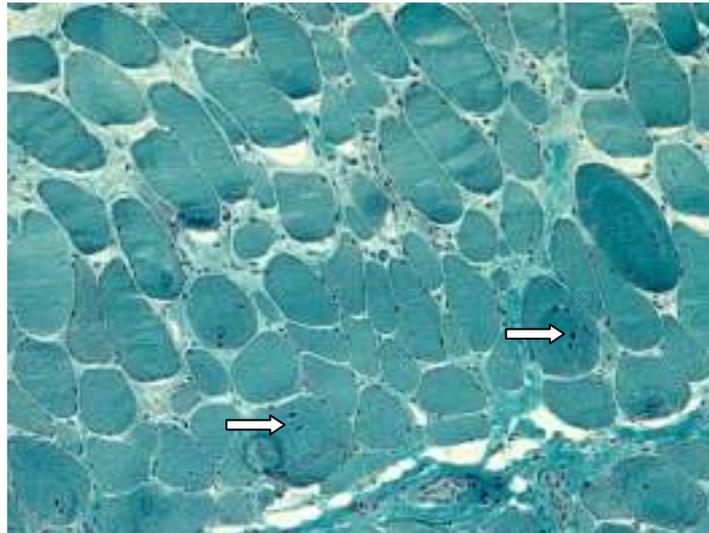


Figure 20 : noyaux internalisés (flèche) dans certaines fibres musculaires. Trichrome de Gomori. Gx200

- Répartition anormale des mitochondries et du réticulum endoplasmique

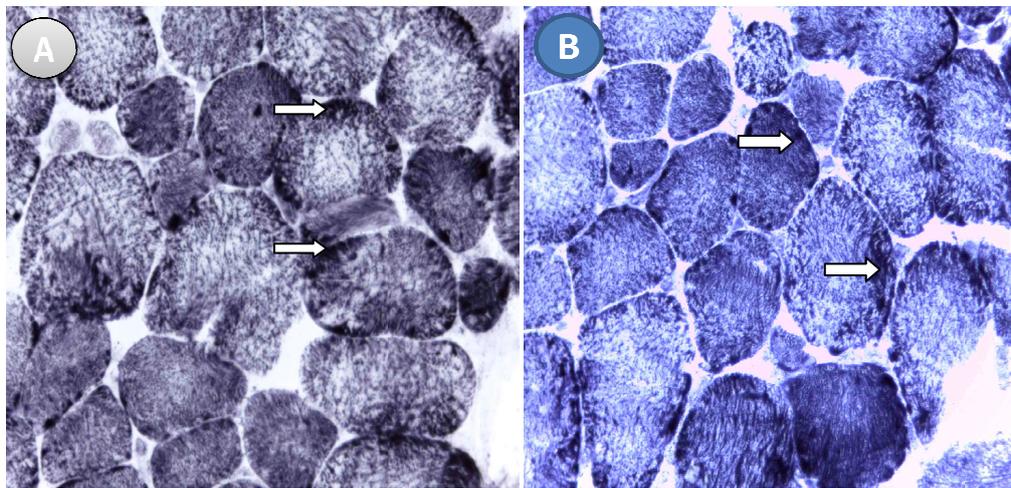


Figure 21 : techniques oxydatives SDH (A) et NADH (B)

Les techniques histo-enzymologiques oxydatives ont mis en évidence des remaniements du réseau intermyofibrillaire, montrant une condensation mitochondriale sous sarcolemmiques (flèches).

III.4. Etude de la distribution de la dysferline et des protéines du complexe dystrophine musculaire dans les dysferlinopathies

Une étude immunohistochimique a été réalisée sur plusieurs cas suspects de dysferlinopathies par un immunomarquage de dysferline et d'autres protéines de complexe dystrophine musculaire. Nous avons utilisé systématiquement plusieurs anticorps :

1/ anti-dysferline

2/ anti- α , - β , - γ et δ sarcoglycanes

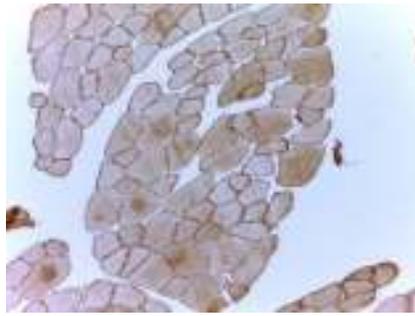
3/ anti-dystrophines : Dys1, Dys2 et Dys3 dirigés respectivement contre son domaine central, son domaine C-terminal et son domaine N-terminal.

4/ anti- β -dystroglycane.

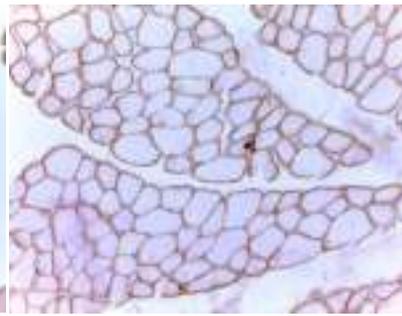
5/anti-mérosine

Dans le tissu musculaire normal (cas témoin), toutes les protéines sus-citées prennent un marquage membranaire sauf la dysferline qui peut prendre un marquage membranaire et cytoplasmique (Fig.22) (Tab.II).

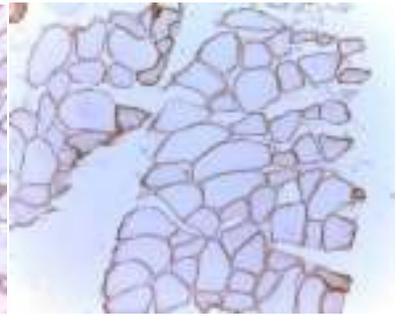
Les 13 patients étudiés dans notre série, ont été retenus pour le diagnostic de dysferlinopathie sur la base de l'étude immunohistochimique de leur biopsie musculaire. L'analyse des différentes protéines musculaires en immunohistochimie révèle soit une absence totale d'immuno-marquage de la dysferline (Fig.23.A) soit une hétérogénéité de marquage (Fig.23.B), avec une élimination dans tous les cas les autres déficits protéiques. (Tab.2)



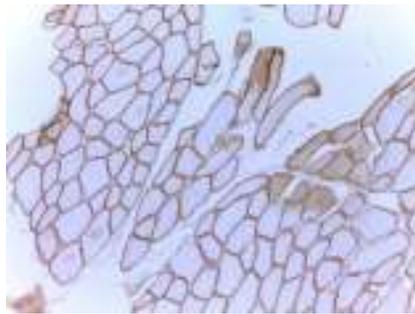
Dysferline : + membranaire et
Cytoplasmique



Dystrophine 1: +



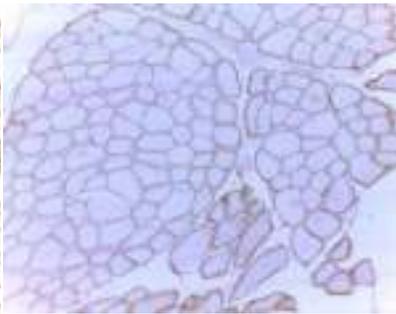
Dystrophine 2 :+



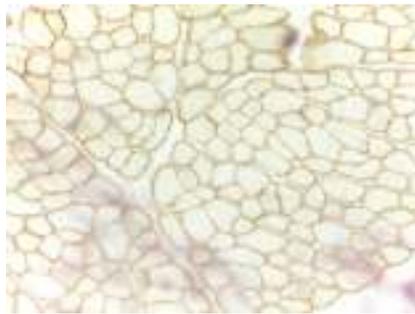
Dystrophine 3 +



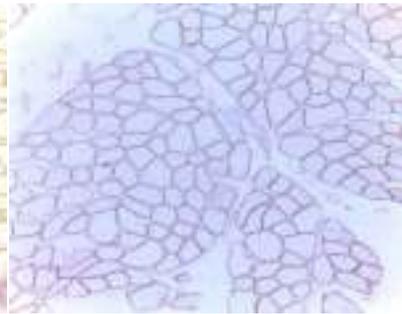
α -sarcoglycane : +



δ -sarcoglycane :+



Deltasarcoglycane : +



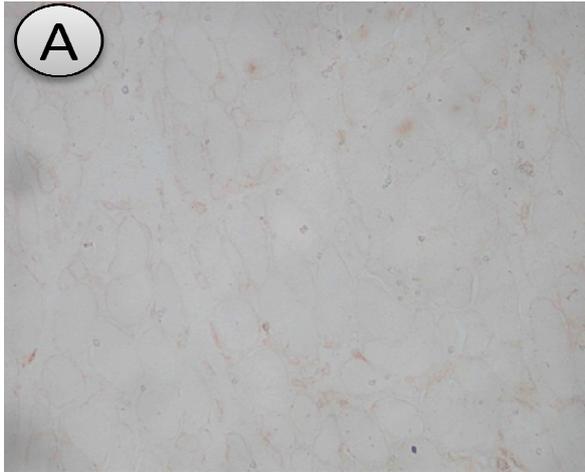
Beta sarcoglycane :+



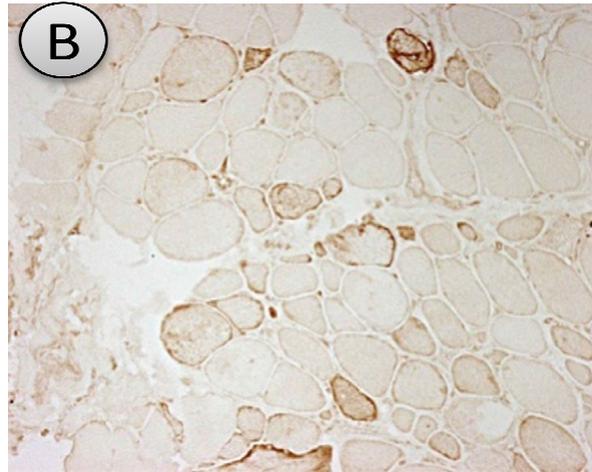
Mérosine : +

Figure 22 : cas témoin.

Immumarqueage des protéines membranaires dans le muscle normal. Positivité membranaire intense et continue de toutes les fibres musculaires pour les différentes protéines. A noter la positivité membranaire et cytoplasmique de la dysferline



Dysferline négative



Dysferline hétérogène : quelques sont positives



Dystrophine 1 positive



Dystrophine 2 positive



Dystrophine 3 positive



A-Sarcoglycane positive



B-sarcoglycane positive



G-sarcoglycane positive



D-sarcoglycane positive



Mérosine positive

Figure.23 :
processus dystrophique non dystrophinique avec dysferline négative ou hétérogène et positivité des autres protéines musculaires membranaires.

Tableau .II : la distribution de marquage de dysferline et les autres protéines

patients	dysferline	Dystr1.2.3 ; a,b,g,d sarc ; BDG et Merosine
1	-	+
2	-	+
3	-/+	+
4	-/+	+
5	-	+
6	-	+
7	-	+
8	-/+	+
9	-	+
10	-	+
11	-	+
12	-/+	+
13	-/+	+

(+) marquage normal

(- /+) hétérogénéité de marquage

(-) absence de marquage

Les dysferlinopathies sont dues à des mutations du gène DYSF codant la protéine dysferline et correspondent à trois maladies cliniquement distinctes : la dystrophie des ceintures de type 2B, la myopathie distale de Miyoshi et la myopathie du compartiment distal antérieur. La dysferline est une protéine sarcolemmale qui appartient à la famille des ferlines. Elle est impliquée dans les processus de réparation de la membrane musculaire. En l'absence de dysferline, la membrane musculaire n'est plus réparée entraînant une dégénérescence des fibres.

L'investigation clinique des 04 familles rapportées dans cette étude permet de faire ressortir la particularité clinique des Dysferlinopathies de part la faiblesse musculaire qui est à la fois proximale et distale. Elle a également permis de démontrer l'hétérogénéité phénotypique observée en inter et en intra familiale. Cette particularité clinique, très suggestive du diagnostic, ainsi que le bilan paraclinique (enzymes musculaires, biopsie musculaire) permettent de poser le diagnostic de Dysferlinopathie avec une forte probabilité.

Nous avons démontré par des analyses histologiques et histoenzymologiques des anomalies cellulaires et tissulaires de dystrophie musculaire. Ces anomalies se traduisent par augmentation d'infiltrat inflammatoire et de fibrose, nécrose/régénération et dans quelque une segmentation.

L'analyse des différentes protéines musculaires en immunohistochimie permet d'éliminer les autres déficits protéiques. Cependant, un déficit en dysferline peut être secondaire à une calpaïnopathie (LGMD 2A) ou à une cavéolinopathie (LGMD 1C). Dans ces cas, le marquage à la dysferline est très faible mais jamais totalement absent.

Ce diagnostic reste à être confirmé par l'étude génétique à la recherche d'une mutation du gène de la Dysferline localisé sur le chromosome 2p.

Les dystrophies musculaires sont génétiquement et cliniquement hétérogènes et sont communément caractérisées par une atrophie, une faiblesse progressive des muscles et une élévation du taux sérique de créatine kinase. Les manifestations de la maladie sont variables, allant de la simple fatigabilité jusqu'à des formes entraînant la perte de la marche. Sur le plan histologique, les dystrophies musculaires se distinguent par un remaniement du tissu musculaire, résultant d'un processus de dégénération/régénérescence des fibres. Ces processus sont responsables du remaniement du tissu musculaire conduisant à la présence de foyers inflammatoires, de fibrose et d'adipose.

Dans ce travail nous avons voulu étudier ces différents paramètres dans un échantillon de patients Algériens où l'analyse de biopsie musculaire a été effectuée au laboratoire d'anatomopathologie de CPMC d'Alger.

Dans notre étude, 13 patients ont été inclus avec le diagnostic de dysferlinopathie. Nous avons noté une prédominance masculine : 9 hommes (62.23%) et 4 femmes (37.77 %).

L'âge de début des symptômes varie entre 12 et 29 ans (moyenne d'âge 18 ans) ce qui concorde avec les données de Hyung Jun Park et al (2012), Nguen et al(2004) où l'âge de début a été noté habituellement avant 30 ans.

L'analyse de la topographie de l'atteinte musculaire nous a montré qu'un seul patient présent un phénotype de MM (soit 8%), que 23% ont un tableau de LMGD2B, et la majorité des cas présentent un phénotype mixte proximo-distal PD (soit 69 %). Ces résultats sont inférieurs à ceux Satish V Khadilkar (2008), qui a observé une égalité de pourcentage de MM et de LMGD2B (43%) et (14%) pour les formes PD, cela pourrait être dû à la répartition géographique de nos patients ou à la taille de l'échantillon puisqu'il a travaillé sur 28 cas.

Dans les trois formes il existe une importante variabilité interfamiliale et intrafamiliale de la topographie et la chronologie d'atteinte. En effet, le type de mutation n'est pas corrélé avec la sévérité du phénotype, ni même avec la présentation clinique. Un des meilleurs exemples illustrant ce point est que nos 13 patients, appartiennent à 4 familles algériennes différentes, on observe trois phénotypes cliniques (MM, LGMD, PD) et qui est dû à la même mutation. Ces résultats sont notés généralement dans la littérature.

Une étude est effectuée en Corée (2011) par Hyung Jun Park et al (2012) montre une élévation de taux créatine-kinase. Cette augmentation est illustrée dans notre étude avec un taux de 9 à 116 fois la normale.

Nous nous sommes intéressées en premier lieu sur l'aspect histopathologique du muscle en mettant en évidence le processus de dystrophie musculaire. Puis nous avons ciblé par une

technique immunohistochimique la dysferline et d'autres protéines de complexe dystrophine musculaire par utilisation de plusieurs anticorps spécifiques.

Les anomalies cellulaires et tissulaires comprennent la présence d'une hétérogénéité de taille et de forme de fibres avec la présence de nécrose et de régénération et parfois une segmentation, et enfin l'installation de fibrose et l'inflammation sont des signes très fréquents dans les dysferlinopathies.

La présence de fibres hypertrophiques est souvent associée à l'atrophie par une diminution de taille de fibres de type I et II. L'augmentation de taille des fibres pourrait s'expliquer par un processus compensateur comme rapporté par Julien Vinit et collaborateur en 2012.

Les fibres hypertrophiques comportent souvent des remaniements structuraux comme les centralisations nucléaires témoins d'une désorganisation des sarcomères et les segmentations qui sont liées à la fragilité de la membrane cytoplasmique, ceci a été observé aussi par Satish V Khadilkar en 2008

Les fibres peuvent être le siège d'une surcharge (glycogène) ou comporter une opacité de leur sarcoplasme avec un arrondissement exagéré de leurs contours (Malicdan et al. 2005).

Une autre anomalie observée dans les biopsies musculaires de patient atteint de dysferlinopathies est la nécrose qui touche généralement les fibres lésées.

Quand une lésion se produit sur la membrane ou sarcolemme des fibres musculaires, elle entraîne une entrée massive de calcium conduisant à une contraction anormalement soutenue des myofibrilles puis à leur destruction. La région lésée est détruite par des protéases intrinsèques à la fibre musculaire. Sur le plan histologique de notre étude, les lésions se traduisent par une disparition de noyaux et une modification des affinités tinctoriales des fibres musculaires lésées : une coloration pâle dans les régions nécrotiques. Ceci a été observé aussi par (Urtizbera et al., 2008).

Cette lésion musculaire s'accompagne toujours par un phénomène de régénération qui débute par l'activation et la multiplication de cellules satellites. Ces cellules prolifèrent en forme de myoblastes et fusionnent rapidement pour former des myotubes. Ces cellules sont caractérisées par des noyaux centraux. La persistance de ces noyaux centraux est un bon marquage de fibres régénérées (Hyung Jun Park., 2012).

La littérature montre généralement que le nombre de mitoses que peut subir une cellule satellite est limité. Ce phénomène de régénération s'épuise. Toutefois, le nombre de nouvelles fibres ne suffit pas à compenser des lésions importantes du muscle squelettique ; dans ce cas, les fibres musculaires squelettiques sont remplacées par un tissu fibreux cicatriciel (fibrose) ou un tissu adipeux (adipose). Ceci est bien illustré dans nos résultats où nous avons

observé cette fibrose sur 11/13 biopsies musculaires essentiellement sur coloration HE et TG, cependant Nguen et al ont pu la voir dans 100% de leurs biopsies.

La membrane lésée laisse échapper de la fibre une partie de ses composants et en particulier les créatines kinases. La libération massive de facteurs pro-inflammatoires permet le recrutement de macrophages qui phagocytent les fibres lésées, en absence de dysferline. Mais ils causent également des dommages supplémentaires aux cellules voisines saines (Hitomi, 2008).

Nous avons observé une prédominance des infiltrats de cellules immunitaires dans 9 / 13 cas. Ces infiltrats diffèrent, d'un point de vue immunologique et cytologique, de ceux classiquement retrouvés dans les polymyosites (PM). Les macrophages sont deux fois plus nombreux chez les patients atteints de dysferlinopathies, tandis que les cellules CD8+ sont, chez eux, moins abondantes (De Luna et al., 2010). Une mauvaise interprétation de ces infiltrats inflammatoires peut donc conduire à une erreur de diagnostic. Près de 25% de nos patients avaient initialement eu un diagnostic de polymyosite, qui est l'une des myopathies inflammatoires la plus courante chez les adultes. Cette confusion peut malheureusement conduire à l'usage de thérapeutiques inutiles voire dangereuses telles qu'une administration orale de corticostéroïdes ou d'immunosuppresseurs qui présentent des risques à long terme.

En dehors de lésion typique de dystrophie musculaire, l'immuno-marquage sur des lames montre une absence ou une diminution de fixation de l'anticorps anti-dysferline sur la membrane. En effet, la dysferline joue un rôle primordial dans la fusion et la réparation membranaire et intervient dans l'activité phagocytaire de macrophage. Une mutation de cette protéine entraîne une accumulation de dégâts au niveau du sarcolemme des cellules musculaires qui se traduisent par une augmentation d'infiltrat inflammatoire, nécrose/régénération et l'installation anormale de tissu fibreux et adipeux.

Le marquage de dysferline est négatif ou bien présente une hétérogénéité membranaire et cytoplasmique. Sur nos 13 patients qui appartiennent à 4 familles différentes algériennes, l'analyse immunohistochimique montre :

- 8/13 absence totale de marquage de dysferline (61.5%).
- 5/13 diminution de marquage membranaire et cytoplasmique / positivité de quelques fibres (38.5%).
- 13/13 marquage positif membranaire des dystrophines 1,2 et 3 ; les sarcoglycanes a,b,g,d ; la beta-dystroglycane et la mérosine. (100%)

Une étude en 2006 par Sun Shunchang et al sur une population Chinoise montre un déficit total et partiel de dysferline sans nous donné les détails sur la proportion de marquage.

L'analyse des différentes protéines musculaires en immunohistochimie permet d'éliminer les autres déficits protéiques. Cependant, un déficit protéique n'est pas toujours le signe d'une dysferlinopathie, puisqu'on peut observer un déficit secondaire en dysferline dans d'autres pathologies telles que les sarcoglycanopathies, les dystrophinopathies et les calpaïnopathies (Anderson et al., 2000; Beckmann and Spencer, 2008). Elle peut également être observée dans les cavéolinopathies LGMD1C (Eymard et al., 2000). On parle alors de dysferlinopathies secondaires.

Toutefois l'immunohistochimie (IHC) seule est insuffisante. Il est nécessaire de réaliser un western blott (WB), afin d'éviter des erreurs d'orientation diagnostique, et permettant de mettre en évidence à la fois la dystrophine, la dysferline, les sarcoglycanes.

Cependant, la technique de WB multiplex est une technique difficile nécessitant de grande quantité de matériel biologique. C'est pourquoi 5 patients issus de 02 familles différentes (Familles F4 et F1) ont bénéficié d'analyse de biologie moléculaire en France. Cette analyse montre une absence de dysferline compatible avec le diagnostic.

- 1) Alberts et al., (1995). *Histology of Muscle*. Chapter 16, 847-855.
- 2) Ampong, B. N., Imamura, M., Matsumiya, T., Yoshida, M., and Takeda, S. (2005). Intracellular localization of dysferlin and its association with the dihydropyridine receptor. *Acta Myol* 24, 134-44.
- 3) Aoki, M. (2001). "LGMD2B (dysferlin deficiency)." *Ryoikibetsu Shokogun Shirizu*(35):84-7.
- 4) Argov, Z., M. Sadeh, et al. (2000). "Muscular dystrophy due to dysferlin deficiency in Libyan Jews. Clinical and genetic features." *Brain* 123 (Pt 6): 1229-37.
- 5) Bansal, D., Miyake, K., Vogel, S.S., Groh, S., Chen, C.C., Williamson, R., McNeil, P.L. and Campbell, K.P. (2003) Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature*, 423, 168 – 172.
- 6) Bansal, D. and K. P. Campbell. (2004). "Dysferlin and the plasma membrane repair in muscular dystrophy." *Trends Cell Biol* 14(4): 206-13.A
- 7) Bashir, R., Britton, S., Strachan, T., Keers, S., Vafiadaki, E., Lako, M., Richard, I., Marchand, S., Bourg, N., Argov, Z. et al. (1998). "A gene related to *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor *fer-1* is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B". *Nat. Genet.*, 20, 37 – 42.
- 8) Bittner, R. E., Anderson, L. V., Burkhardt, E., Bashir, R., Vafiadaki, E., et al. (1999). Dysferlin deletion in SJL mice (SJL-Dysf) defines a natural model for limb girdle muscular dystrophy 2B. *Nat Genet* 23, 141-2.
- 9) Bushby K-M and Beckmann J-S (1995). "The limb-girdle muscular dystrophies proposal for a new nomenclature." *Neuromuscul Disord* 5(4): 337-43.
- 10) Chérin P. (1999). "Muscle, fatigue, sport et infection. *Elsevier Masson*" ., 20 : 794-803
- 11) Confalonieri, P., Oliva, L., Andreetta, F., Lorenzoni, R., Dassi, P., et al. (2003). Muscle inflammation and MHC class I up-regulation in muscular dystrophy with lack of dysferlin: an immunopathological study. *J Neuroimmunol* 142, 130-6.
- 12) Daniele N, I. Richard, et al. (2007). "Ins and outs of therapy in limb girdle muscular dystrophies." *Int J Biochem Cell Biol* 39(9): 1608-24.
- 13) De Luna, N., Gallardo, E., Sonnet, C., Chazaud, B., Dominguez-Perles, R., et al. (2010). "Role of thrombospondin 1 in macrophage inflammation in dysferlin myopathy". *J Neuropathol Exp Neurol* 69, 643-53.
- 14) Doherty, K. R. and E. M. McNally (2003). "Repairing the tears: dysferlin in muscle membrane repair." *Trends Mol Med* 9(8): 327-30.

- 15) 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.
- 16) Emmanuelle Campana-Salort, Martin Krahn, Marc Bartoli, Isabelle Richard, Jean Pouget, Nicolas Levy. (2008). "Dystrophies musculaires des ceintures : stratégie diagnostique, bases moléculaires". *Revue du Rhumatisme* 75 :142–150
- 17) Eymard, B., Laforet, P., Tome, F. M., Collin, H., Leroy, J. P., et al. (2000). "Miyoshi distal myopathy: specific signs and incidence". *Rev Neurol (Paris)* 156, 161-8.
- 18) Fardeau, M., D. Hillaire, et al. (1996). "Juvenile limb-girdle muscular dystrophy. Clinical, histopathological and genetic data from a small community living in the Reunion Island." *Brain* 119 (Pt 1): 295-308.
- 19) Fernandez C., Maues de paula A., Figarella-Branger D., Pellissier J- F. (2010). "Biopsie musculaire". *EMC (paris). Neurologie*. 17-030-G-10
- 20) Glover, L., and Brown, R. H., Jr. (2007). "Dysferlin in membrane trafficking and patch repair". *Traffic* 8, 785-94.
- 21) Hitomi, J., Christofferson, D. E., Ng, A., Yao, J., Degterev, A., et al. (2008). "Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway". *Cell* 135, 1311-23.
- 22) Ho, M., Gallardo, E., McKenna-Yasek, D., De Luna, N., Illa, I. and Brown, R.H. Jr. (2002). "A novel, blood-based diagnostic assay for limb girdle muscular dystrophy 2B and Miyoshi myopathy". *Ann. Neurol.*, 51,129– 133.
- 23) Ho, M., Post, C.M., Donahue, L.R., Lidov, H.G., Bronson, R.T., Goolsby, H., Watkins, S.C., Cox, G.A. and Brown, R.H. Jr. (2004). "Disruption of muscle membrane and phenotype divergence in two novel mouse models of dysferlin deficiency". *Hum. Mol. Genet.*, 13, 1999 – 2010.
- 24) Hyung Jun Park, Ji-Man Hong, Gyoung Im Suh, Ha Young Shin, Seung Min Kim, Il Nam Sunwoo, Bum Chun Suh, and Young-Chul Choi. (2012). "Heterogeneous Characteristics of Korean Patients with Dysferlinopathy". *Korean Med Sci* ; 27: 423-429
- 25) Julien Vinit, Maxime Samson Jr. Jean-Baptiste Gaultier, Annie Laquerriere. (2010). "Dysferlin deficiency treated like refractory polymyositis". *Clin Rheumatol* .29:103–106.

- 26) Klinge, L., Laval, S., Keers, S., Haldane, F., Straub, V., et al. (2007). "From T-tubule to sarcolemma: damage-induced dysferlin translocation in early myogenesis". *Faseb J* 21, 1768-76.
- 27) Mahjneh, I., G. Marconi, et al. (2001). "Dysferlinopathy (LGMD2B): a 23-year followup study of 10 patients homozygous for the same frameshifting dysferlin mutations." *Neuromuscul Disord* 11(1): 20-6.
- 28) Malicdan M. and I. Nonaka (2008). "Distal myopathies a review: highlights on distal myopathies with rimmed vacuoles." *Neurol India* 56(3): 314-24.
- 29) Mekrami S et Brignol T.-N. (2003). "Le muscle squelettique". *AFM* (Paris). 8p.
- 30) Morrée A., Hensbergen PJ., van Haagen HHHBM., Dragan I., Deelder AM., et al. (2010) "proteomic analysis of the dysferlin protein complex unveils its importance for sarcolemmal maintenance and integrity". *Plos one* 5(11)
- 31) MURRAY, GRANNER, MAYES et RODWELL. *Précis de biochimie de Harper*. 23^{ème} édition, De Boeck Université, Les Presses de l'Université de Laval, 1995, 919 pages.
- 32) Nguyen K, Bassez G, Figarella-Branger D, F. Leturcq F, Eymard B, Lévy N, Pouget J. (2004). "Les dysferlinopathies : aspects phénotypiques et génétiques". *Rev Neurol (Paris)* 160 : 1, 1S12
- 33) Osborn, S. L., Diehl, G., Han, S. J., Xue, L., Kurd, N., et al. (2010). "Fas-associated death domain (FADD) is a negative regulator of T-cell receptor-mediated necroptosis". *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 13034-9.
- 34) Petiot P, Urtizberea JA. (2004). "Diagnostic des maladies musculaires". *EMC-Neurologie*. 137–155
- 35) Popineau Christophe., Paulo Fernandes Carlos., et all. (2005). "physiologie des étirements" 4^{ème} édition .Paris.
- 36) Poussard Sylvie et Dargelos Elise. (2009). "Vieillesse musculaire : impact de la protéolyse intracellulaire calcium-dépendante". Paris.
Pramono, Z. A., P. S. Lai, et al. (2006). "Identification and characterization
- 37) Pramono, Z. A., P. S. Lai, et al. (2006). "Identification and characterization of a novel human dysferlin transcript: dysferlin_v1." *Hum Genet* 120(3): 410-9.
- 38) Rayavarapu, S., Van der meulen, J. H., Gordish-Dressman, J., Hoffman, E. P., Nagaraju, K., et al. (2010). "Characterization of Dysferlin Deficient SJL/JMice to Assess Preclinical Drug Efficacy: Fasudil Exacerbates Muscle Disease Phenotype". *Plos one* 5, 12981.

- 39) Robinson, J. M., Ackerman, W. E. t., Behrendt, N. J., and Vandre, D. D. (2009). "While dysferlin and myoferlin are coexpressed in the human placenta, only dysferlin expression is responsive to trophoblast fusion in model systems". *Biol Reprod* 81, 33-9.
- 40) Salani, S., S. Lucchiari, et al. (2004). «Developmental and tissue-specific regulation of a novel dysferlin isoform." *Muscle Nerve* 30(3): 366-74.
- 41) Selcen, D., Stilling, G., and Engel, A. G. (2001). "The earliest pathologic alterations in dysferlinopathy". *Neurology* 56, 1472-81.
- 42) Selva-O'Callaghan, A., Labrador-Horrillo, M., Gallardo, E., Herruzo, A., Grau-Junyent, J. M., et al. (2006). "Muscle inflammation, autoimmune Addison's disease and sarcoidosis in a patient with dysferlin deficiency". *Neuromuscul Disord* 16,208-9.
- 43) Serratrice G. (2006). "Introduction aux affections musculaires". 17-171-A-80
- 44) Serratrice J. (2008). " Muscle normale". *EMC(Paris), Appareil locomoteur*.14-006-A-10.11p
- 45) Satish V Khadilkar, Rakesh K Singh, Pankaj Agarwal, Martin Krahn, Nicolas Levy.(2008). "Twenty-two year follow-up of an Indian family with dysferlinopathy-clinical, immunocytochemical, western blotting and genetic features". Department of Neurology, Grant Medical College and Sir J J Group of Hospitals, Byculla, Mumbai, India
- 46) Takahashi.T, M. Aoki, et al. (2003). "Dysferlin mutations in Japanese Miyoshi myopathy: relationship to phenotype." *Neurology* 60(11): 1799-804.
- 47) Tuffery-Giraud, S., Beroud, C., Leturcq, F., Yaou, R. B., Hamroun, D., et al. (2009). "Genotypephenotype analysis in 2,405 patients with a dystrophinopathy using the UMD-DMD database: a model of nationwide knowledgebase". *Hum Mutat* 30, 934-45.
- 48) von der Hagen, M., S. H. Laval, et al. (2005). "The differential gene expression profiles of proximal and distal muscle groups are altered in pre-pathological dysferlindeficient mice." *Neuromuscul Disord* 15(12): 863-77.
- 49) Ueyama, H., Kumamoto, T., Horinouchi, H., Fujimoto, S., Aono, H., et al. (2002). "Clinical heterogeneity in dysferlinopathy". *Intern Med* 41, 532-6.
- 50) Urtizberea JA, Bassez G, Leturcq F, Nguyen K, Krahn M, Levy N. (2008). "Dysferlinopathies". *Neurol India* 56:289–297.

Annexe 1 : Classification des dystrophies musculaires

Les dystrophies des ceintures ont été historiquement regroupées en raison de leur atteinte prédominante de la musculature des ceintures pelvienne et scapulaire. (Emmanuelle Campana-Salort .2008). Suivant leur mode de transmission génétique, elles sont réparties en LGMD1 pour les formes dominantes et LGMD2 pour les récessives (Bushby and Beckmann 1995). Elles sont distinguées par l'addition d'une lettre capitale en fonction de leur chronologie d'identification (LGMD1A à 1H et LGMD2A à 2O) (Daniele, Richard et al. 2007).

Dystrophies musculaires des ceintures de transmission autosomique dominante (LGMD1)

Pathologie	Locus	Gène	Protéine	Taux de CpK	Age de début	symptômes
LGMD1A	5q31	<i>TTID</i> ou <i>MYOT</i>	Myotiline	1 à 3 x N	adulte	Faiblesse proximale
LGMD1B	1q21.2	<i>LMNA</i>	Lamine A/C	1 à 3 x N	Tout âge	Faiblesse des membres proximaux inférieur
LGMD1C Cavéolinopathie	3p25	<i>CAV3</i>	Cavéoline-3	3 à 10 x N	Tout âge	Crampes Légère faiblesse proximale
LGMD1D	6q23 CMD1F	Inconnu	Inconnue	2 à 4 x N	<25 ans	cardiomyopathie dilatée faiblesse des muscles proximaux
LGMD1E	7q	Inconnu	Inconnue	1 à 3 x N	9-49 ans	Proximale du membre inférieur et de la faiblesse du membre supérieur
LGMD1F	7q31.1-32.2	Inconnu	Inconnu	1 à 20 x N	1-58 ans	Proximale du membre inférieur et de la faiblesse du membre supérieur
LGMD1G	4q21	Inconnu	Inconnu	1 à 9 x N	30-47 ans	faiblesse proximale des membres inférieurs

Dystrophies musculaires des ceintures de transmission autosomique récessive (LGMD2).

Pathologie/forme	Locus	Gène	Protéine	Taux de CpK	Age de début	Atteintes
2A Calpainopathie	15q15.1-q21.1	CAPN3	Calpaïne-3	10 x N	7-15	Proximale, adhérence de la ténosynoviale, décollements scapulaire
2D Dysferlineopathie	2p16.3-p16.1	DYSF	Dysferline	Parfois > 100 x N	17-20 ans	Distale et/ou proximale (après le développement du homoplata)
2C Gamma-Sarcoglycanose	10q13	SGCG	Gamma-Sarcoglycan	Autonome 10 x N	Tout âge, héréditaire	Faiblesse proximale
2D Alpha-Sarcoglycanose	17q12-q21.8	SGCA	Alpha-Sarcoglycan ou Alpha2	Autonome 10 x N	Deuxième décennie	Faiblesse proximale
2E Delta-Sarcoglycanose	4q12	SGCB	Delta-Sarcoglycan	Autonome 10 x N	Deuxième décennie	Faiblesse proximale
2F Delta-Sarcoglycanose	5q18	SGCD	Delta-Sarcoglycan	Autonome 10 x N	Très variable	Faiblesse proximale
2G Tardéonopathie	11q13	TARDBP	Tarbéonine	Autonome 10 x N	Proxième décennie	Proximale et/ou distale, des membres inférieurs, proximal des membres supérieurs
2H	9q21-q21.1	HNRNP9	Protéine 9 (HNP9)	Autonome 10 x N	Proxième décennie	Proximale des membres inférieurs et/ou
2I	16q13.3	HNRN9	Protéine de 16 (HNP9) ou HNP9ans	Autonome 10 x N	Quatrième décennie	Proximale, membres supérieurs
2J	2q31	TTN	Titine	Hétérozygote (HNP9ans)	5-20 ans	Proximale
2K	5q24.1	POW1	Protéine 10-Mannose 6-phosphotransférase	Autonome 10 x N	1-3 ans	légère faiblesse proximale
2L	11p15-p12	ANKK5	Anchoredin	4-4,45 x N	12 ans	Proximale et distale
2M	3q21	FIGN	FUSINE	4-2,45 x N	4 mois-4 ans	Proximale, membres supérieurs
2N	14q24.8	POW2	Protéine 10-mannose 6-phosphotransférase 2	4-2,45 x N	18 mois et asymptomate à 5 ans	légère hypotrophie proximale

Les myopathies distales

Pathologie/forme	Locus	Gène	Protéine	Taux de CpK	Age de début	Atteintes
la myopathie de Laing	14q12	MYH7	chaîne lourde de la myosine	10-150 x N	début infantile	début à la loge antérieure des jambes
la myopathie de Nonaka	9p13.3	GNE	GNE	10-150 x N	début chez l'adulte jeune	début à la loge antérieure des jambes épargne des quadriceps
la myopathie de Miyoshi	2p13.3-p13.1	DYSF	Dysferline	> 100 x N	17-25 ans	atteinte distale début à la loge antérieure des jambes
la myopathie de Welander	2q22	NEB	Nebuïne	N	quatrième décennie	début à la loge antérieure des jambes inclusions tubulo-filamenteuses atteinte des muscles des mains
la myopathie de Udd/Markosherly-Griggs	2q31	TTN	Titine	N	quatrième décennie	début à la loge antérieure des jambes
myopathie distale avec faiblesse des cordes vocales	5q31.2	MATR3	Matrine 3	N	quatrième décennie	faiblesse des jambes (muscles péroniers) et des mains faiblesse des cordes vocales et du pharynx

Annexe 2 : Produits et Matériel

Produits et réactifs utilisés	référance
Acétone (C ₃ H ₆ O).....	(Sigma-Aldrich, réf.24201)
Acide acétique glacial (C ₂ H ₄ O ₂ ,1%).....	(Sigma-Aldrich, réf. 537020)
Acide périodique.....	(Sigma-Aldrich, réf. P5463)
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 (C ₂₀ H ₈ Br ₄ O ₅)	
Hématoxyline de Haris (C ₁₆ H ₁₄ O ₆	(Panreac, réf. 253949)
Isopentane ou 2 – Methylbutane (C ₅ H ₁₂).....	(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)
Nitrobleu tetrazolium chloride 98%.....	(réf.N6876)
OCT.....	(Tissue-Tek ® OCT™ Compound, réf.4583)
PBS	(Dako, réf.S3024)
Silane ou 3-Triethoxysilylpropylamine (C ₉ H ₂₃ NO ₃ Si).....	(Sigma Aldrich, réf.A3648)
Succinate de sodium	
Xylène (C ₈ H ₁₀).....	(Sigma Aldrich, réf.534056)
β-NADH ou β-DPNH (C ₂₁ H ₂₇ N ₇ Na ₂ O ₁₄ P ₂).....	(Sigma-Aldrich, réf. N8129)

Matériel:

Appareil photo numérique
Bac en verre
Chambre humide (pour l'incubation)
Congélateur-80°C
Cryostat (Leika, réf. CM1850)

Dakopen (Dako, réf. S2002)

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

Lamelles de verre couvres objets

Micropipettes (1-10 μ l, 10-100 μ l, 100-1000 μ l)

Microscope optique Ziss (axioskop 40)

ph mètre (HANNA instruments, PH 211)

Annexe3 : 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.4: Fiches techniques

1. Coloration Histochimiques

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

1. Colorer dans un bain d'Hématoxyline de Harris pendant 10min.
2. Rincer à l'eau distillée jusqu'à ce que l'eau reste incolore.
3. Colorer dans un bain d'Eosine pendant 5min.
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 5-10min.
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

1.3. Noir soudan :

1. Incuber à T° C dans une solution de noir soudan pendant 20 minutes.
2. Rincer à l'eau de robinet.
3. Colorer dans un bain d'Hématoxyline de Harris pendant 2 minutes.
4. Rincer à l'eau pendant 10 minutes.
5. Montage à la glycérine gélatinée.

1.4. PAS (Periodic Acid Schiff) :

1. Passer les lamelles dans l'alcool 95°.
2. Incuber à l'abri de la lumière à T° C dans la solution d'acide periodique 0.5% pendant 10 minutes.
3. Rincer à l'eau distillée.
4. Incubation à T° C dans une solution de schiff pendant 30 minutes.

5. Rincer à l'eau courante pendant 10 minutes.
6. Déshydrater successivement dans les bains d'alcools 95°, 100°(I), 100°(II) et passer dans le xylène (I) et (II).
7. Montage au baume du Canada

2. Coloration Histoenzymologique

2.1. Coloration au Succinate Déshydrogénase (SDH)

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

2.2. Coloration Nicotinamide DéshydrogénaseTétrazolium Réductase(NADH-TR)

1. Ajuster la solution à PH7.4, Incuber les lamelles à 37°C pendant 30min.
2. Rincer à l'eau distillée
3. Monter par le Faramount

3. Immunohistochimie

1. Coupes congelées de 5-7 µm d'épaisseur.
2. Laisser sécher les lames à l'air libre et à température ambiante pendant 1heure
3. Entourer chaque prélèvement sur la lame au DakoPen (Dako-réf.S2002).
4. Incuber avec l'Anticorps primaire dilué à T° C ambiante en chambre humide, avec couvercle pendant 1heure.
5. Enlever l'excès d'Anticorps primaire avec l'eau distillée à l'aide d'une seringue.
6. Laver les coupes dans le PBS (sachet de PBS(S2430) +1Leau distillée) 2×5minutes
7. Incuber avec l'Anticorps secondaire dilué (GAMP, 1:50) à T° C ambiante dans une chambre humide et avec couvercle pendant 1heure.
8. Laver les lames dans le tampon PBS 2 ×5 minutes
9. Couvrir les échantillons de solution DAB (1goutte de chromogène DAB/1mldetampon) (Dako,réf. K3465)10minutes
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

I.1. Données anatomo-fonctionnelles sur le muscle strié squelettique

L'organisme comporte plus de 400 muscles striés squelettiques qui représentent près de 40% du poids du corps chez l'animal adulte comme chez l'Homme. Ils sont responsables des mouvements du squelette et d'organes. Il s'agit des muscles capables de contraction volontaire. (Mekrami et Brignol., 2003).

Les muscles striés squelettiques s'insèrent généralement sur les pièces osseuses du squelette par l'intermédiaire des tendons. Ils peuvent parfois se prolonger par une aponévrose ou un fascia. Le tissu musculaire strié squelettique est formé par l'essentiel de cellules appelées fibres musculaires striées. (Fig.1)

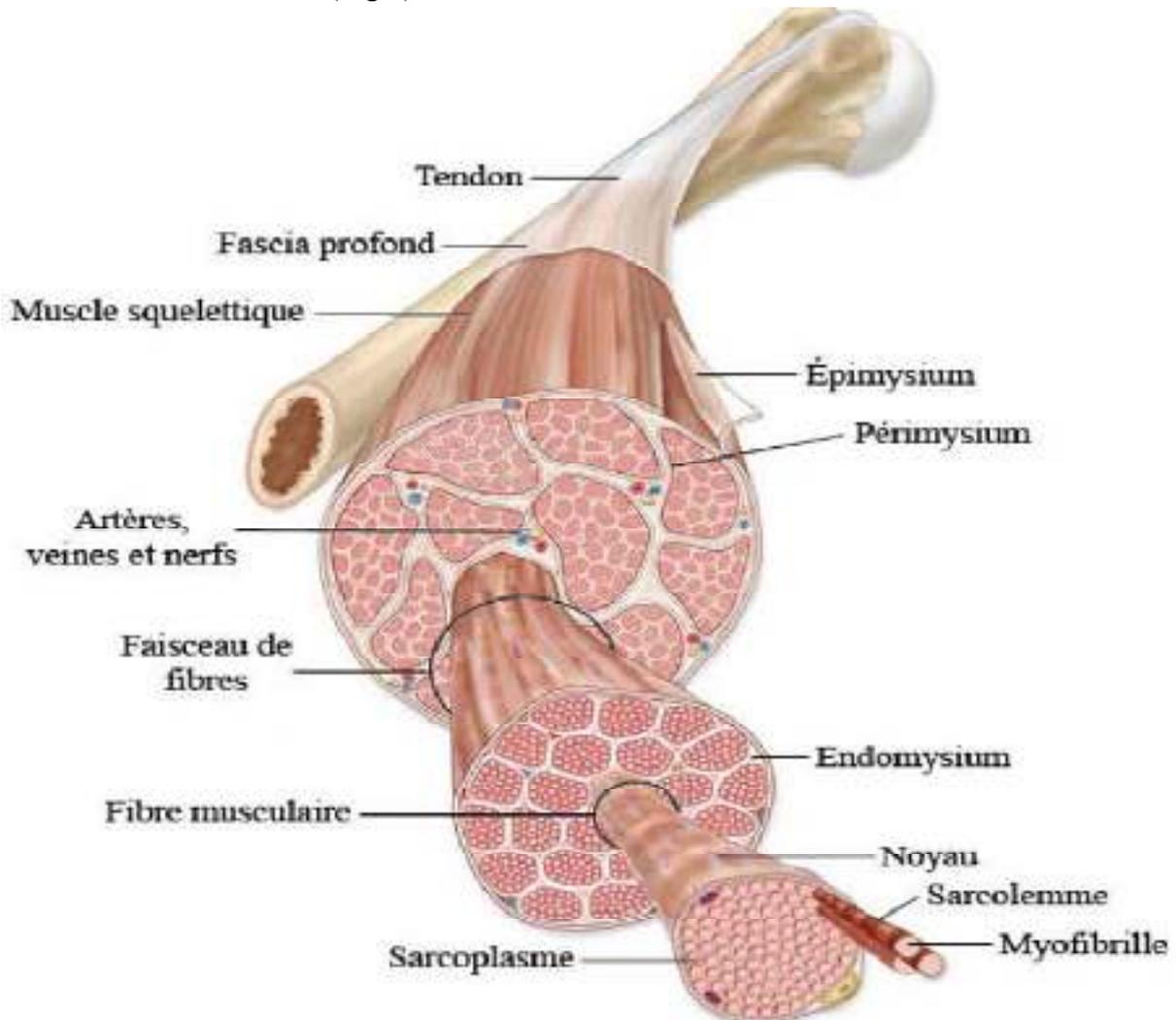


Figure1: Muscle strié squelettique. A: Anatomie du muscle squelettique , elle est attaché à l'os par un tendon est entouré par deux membranes:le fascia profond et l'épimysium (Dominique,2009).

I.1.1. Architecture du muscle strié squelettique

Le muscle strié squelettique est constitué de fibres qui sont regroupées en paquets allongés ou faisceaux musculaires. La cohésion de l'ensemble est assurée par une charpente conjonctive qui se condense pour constituer trois zones :

- l'endomysium disposé entre les fibres à l'intérieur d'un faisceau,
- le pérимыsium qui entoure les faisceaux de cellules musculaires,
- l'épimysium qui représente l'enveloppe délimitant le muscle (Fig.1).

Les fibres musculaires sont responsables de la contraction tandis que le tissu conjonctif (particulièrement du pérимыsium et de l'endomysium) constitue une armature de soutien pour les fibres et les relie aux tissus adjacents. Le tissu conjonctif sert également de lieu de passage pour les vaisseaux et les nerfs du muscle. (Fernandez et al., 2010).

I.1.2. Structure de la fibre musculaire striée squelettique

Les cellules musculaires striées squelettiques ont une forme cylindrique très allongée. Elles sont rangées en parallèle et ne s'anastomosent jamais entre elles. Elles constituent l'unité fonctionnelle du muscle. Les fibres sont délimitées par une membrane plasmique, connue sous le nom de sarcolemme, doublée d'une lame basale (fig. 1). Dans la fibre musculaire, le sarcolemme s'invagine en de multiples sites tout au long de la fibre. Ces invaginations, appelées tubules transverses (tubules-T), permettent de conduire le potentiel d'action au cœur de la fibre. Chaque fibre musculaire est formée de myofibrilles, elles mêmes constituées de l'assemblage des structures contractiles. (Mekrami et Brignol., 2003).

Les myofibrilles sont le support de la contraction. Constituées de bandes et de disques, elles donnent à la fibre musculaire son aspect strié. Le disque sombre ou bande A, séparé en deux par une bande claire, la bande H, elle-même coupée en deux par une ligne M, centrale, plus sombre. Sa taille est constante lors de la contraction. Le disque clair, ou bande I, est divisé en deux par la strie Z. sa longueur varié selon l'importance de l'étirement. Ainsi est constitué le sarcomère, entre deux stries Z dont le rapprochement et l'écartement sous-tendent la contraction (fig.2). (Serratrice, 2008)

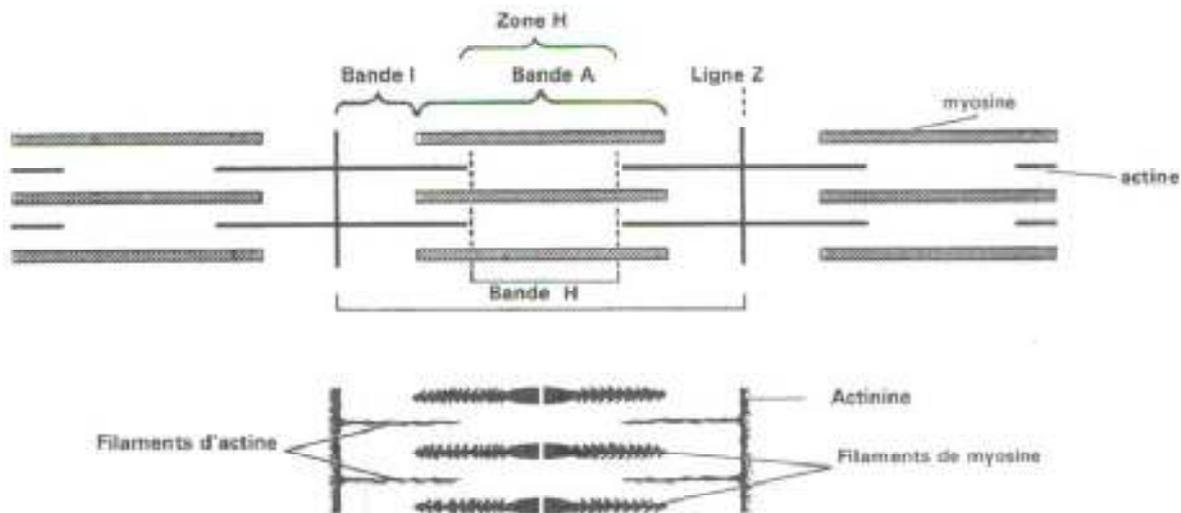


Figure 2: Disposition des myofilaments dans le muscle strié au repos (Murray, 1995)

Au niveau moléculaire, les myofibrilles sont formées par une disposition ordonnée des myofilaments épais et fins. Les premiers composés de myosines (environ 260 molécules) 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 chaînes d'actine F est la base de la formation des filaments fins. et aussi deux autres protéines régulatrices, la tropomyosine et la troponine participent à l'organisation de ces filaments fins (Fig. 2) (Chérin, 2009).

I.1.3. Hétérogénéité fonctionnelle des fibres musculaires

La classification morpho-fonctionnelle des fibres musculaires se base sur leurs propriétés contractiles et métaboliques qui déterminent leur vitesse de contraction et leur fatigabilité. Les fibres de Type I ou encore dite type S (slow) sont des fibres équipées pour un métabolisme aérobie et une activité prolongée à faible tension, et donc résistantes à la fatigue. Les fibres de Type II B ou encore dite type F (fast) correspondent aux fibres blanches à l'origine d'une activité phasique, à secousses brèves et la fatigue y est rapide. Les fibres de Type II A sont dites FR (fast resistant) à activité intermédiaire : leur tension est modérée mais leur durée de contraction est relativement brève. Ces fibres sont relativement résistantes à la fatigue et sont le point de départ d'une activité phasique prolongée. (Serratrice, 2008)

I.2. Classe de la dysferline dans l'ensemble des maladies neuromusculaires

Les maladies neuromusculaires se répartissent en dystrophies musculaires progressives, dystrophies musculaires congénitales caractérisées par le même type d'atteinte mais présentes dès la naissance, myopathies distales, myopathies à excès de filaments, syndromes myotoniques caractérisés par une persistance de la contraction musculaire après la fin d'un effort volontaire, paralysies périodiques et myopathies métaboliques.

Les dystrophies musculaires sont génétiquement et cliniquement hétérogènes, dues à un déficit de l'une des protéines musculaires qu'elle soit membranaire, cytoplasmique ou nucléaire (Fig.3). Elles ont en commun une atrophie, une faiblesse progressive des muscles et une élévation du taux sérique de créatine kinase. Les manifestations de la maladie sont variables, allant de la simple fatigabilité jusqu'à la perte de la marche. Ces maladies peuvent s'accompagner de complications cardiaques et respiratoires qui peuvent entraîner la mort des patients. Sur le plan histologique, les dystrophies musculaires se distinguent par un processus de nécrose / régénérescence des fibres. Les conséquences du défaut génétique entraînent la nécrose des fibres musculaires qui induit une réaction inflammatoire afin d'éliminer les fibres mortes (Fardeau et al., 1996). Les cellules satellites en périphérie sortent alors de leur quiescence et génèrent en fusionnant de nouvelles fibres musculaires. Ce processus est responsable du remaniement du tissu musculaire conduisant à la présence de foyers inflammatoires, de fibrose et d'involution graisseuse (Fardeau et al., 1996).

Les plus fréquentes des dystrophies musculaires sont les dystrophinopathies (dystrophies de Duchenne et de Becker) et les dystrophies des ceintures. Dans ces dernières, nous allons aborder les dysferlinopathies.

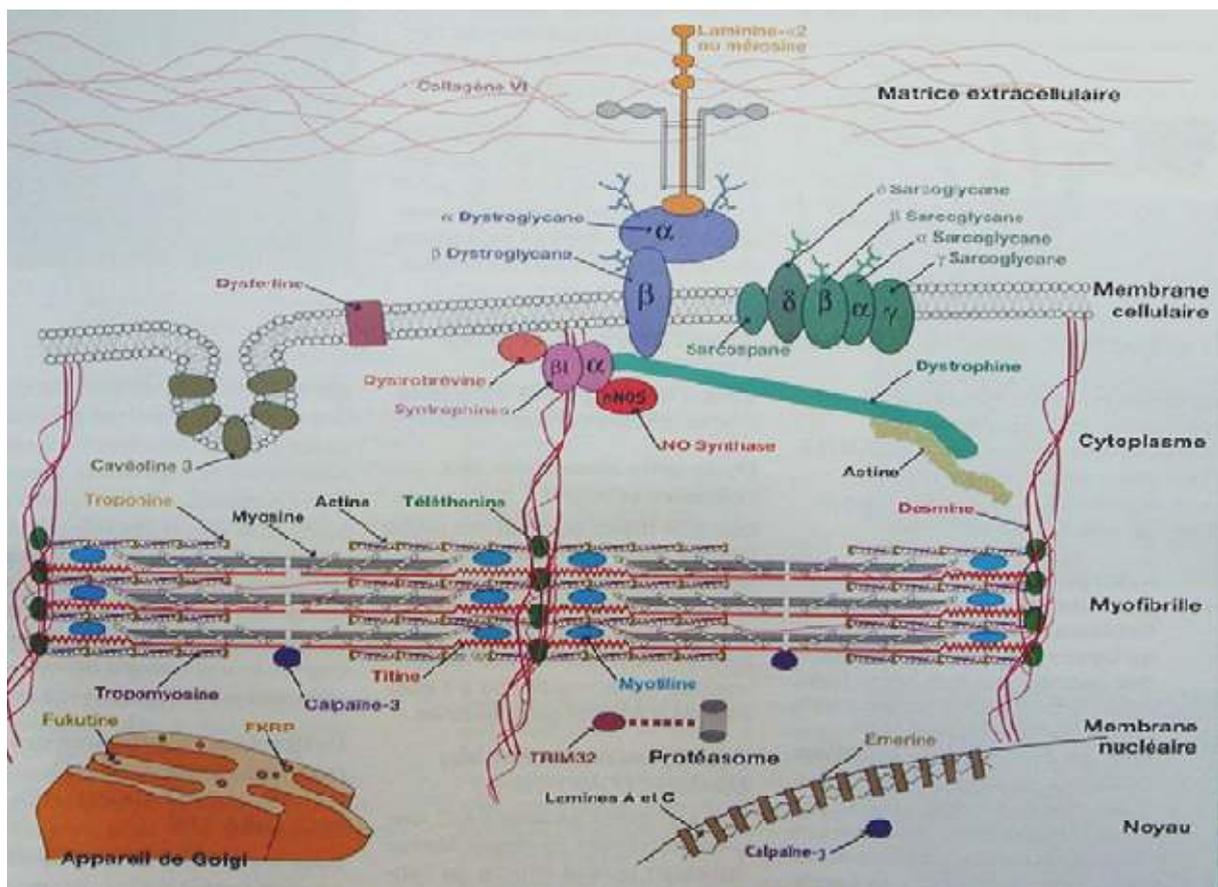


Figure 3 : localisation des différentes protéines impliquées dans les maladies neuromusculaires. Localisation transmembranaire de la dysferline. (Emmanuelle. 2008)

I.2.1. Expression et localisation subcellulaire de la dysferline

Chez l'adulte, la protéine dysferline est exprimée majoritairement dans le muscle squelettique, le cœur et dans les cellules immunitaires de type monocytes/macrophages, mais aussi dans plusieurs autres tissus, y compris le tissu cérébral, pulmonaire et les trophoblastes (Robinson et al., 2009). Bien que fortement exprimée dans la fibre musculaire adulte (De Luna et al., 2004), le gène *DYSF* commence à être exprimé à partir des 5^e et 6^e semaines du développement embryonnaire humain.

Elle est également retrouvée dans le cytoplasme associée au réseau de tubules-T (Ampong et al., 2005; Klinge et al., 2007). Dans les monocytes, la dysferline est exprimée à la membrane des cellules (Ho et al., 2002)

I.3. L'implication de la dysferline dans la physiologie du muscle

La dysferline est une protéine dont les fonctions restent encore mal connues. Cependant, il a été établi qu'elle jouerait un rôle au niveau du tissu musculaire dans la réparation membranaire, ainsi que dans la fusion des membranes. De plus la dysferline aurait une implication dans le système immunitaire par l'activité phagocytaire des macrophages.

I.3.1. Implication dans la fusion et la réparation des membranes :

La cellule musculaire est une longue et large cellule multinucléée résultant de la fusion de plusieurs cellules. En raison de la taille de cette cellule et de sa fonction contractile, elle est fréquemment soumise à des stress membranaires et dispose donc de mécanismes de réparation rapides et efficaces qui lui sont propres et qui font intervenir des protéines particulières, dont la dysferline.

La dysferline partage beaucoup de similitude avec les protéines *fer1* et la synaptotagmine VII qui sont des protéines impliquées respectivement dans la fusion des spermatozoïdes et dans la sécrétion des vésicules de cellules neuronales. Des mutations dans le gène *fer-1* ont montré des perturbations dans la spermatogenèse conduisant à des spermatozoïdes non fertiles. En effet, durant la spermatogenèse, de grandes vésicules appelées organelles membranaires (OM) fusionnent à la membrane plasmique générant un pseudopode. Chez les mutants *fer-1*, les OM ne fusionnent pas à la membrane bien qu'ils y soient correctement dirigés. L'homologie de la dysferline avec *fer-1* a permis de suggérer un rôle de cette protéine dans la fusion des vésicules intracellulaires avec le sarcolemme (Bashir et al., 1998). Cette hypothèse est renforcée chez les patients atteints de LGMD2B ou de myopathie de Miyoshi ou chez les souris déficientes en dysferline, chez lesquels on note une accumulation de vésicules sous le sarcolemme, ce qui suggère un déficit dans la fusion de ses vésicules à la membrane. (Selcen et al., 2001)

Plus récemment, l'équipe de Campbell a montré que la dysferline était impliquée dans le processus de réparation membranaire, mécanisme calcium dépendant (Bansal et al., 2003). Dans les fibres musculaires normales, le processus faisant intervenir la dysferline peut être

décrit comme présenté dans la figure 4; la dysferline est localisée à la membrane plasmique et dans le réseau de tubules-T (fig.4 a). Lorsqu'une rupture se produit au niveau du sarcolemme suite à une lésion due à un effort physique par exemple, le calcium extracellulaire pénètre massivement la fibre. Ce calcium active de nombreuses protéines, dont la dysferline, qui vont être recrutées au site de la lésion. Ce complexe protéique associé à la dysferline permet le recrutement, l'accumulation (fig.4 b) et la fusion de vésicules à la membrane (fig.4c) afin de refermer la déchirure et d'assurer ainsi la survie de la fibre (fig.4d).

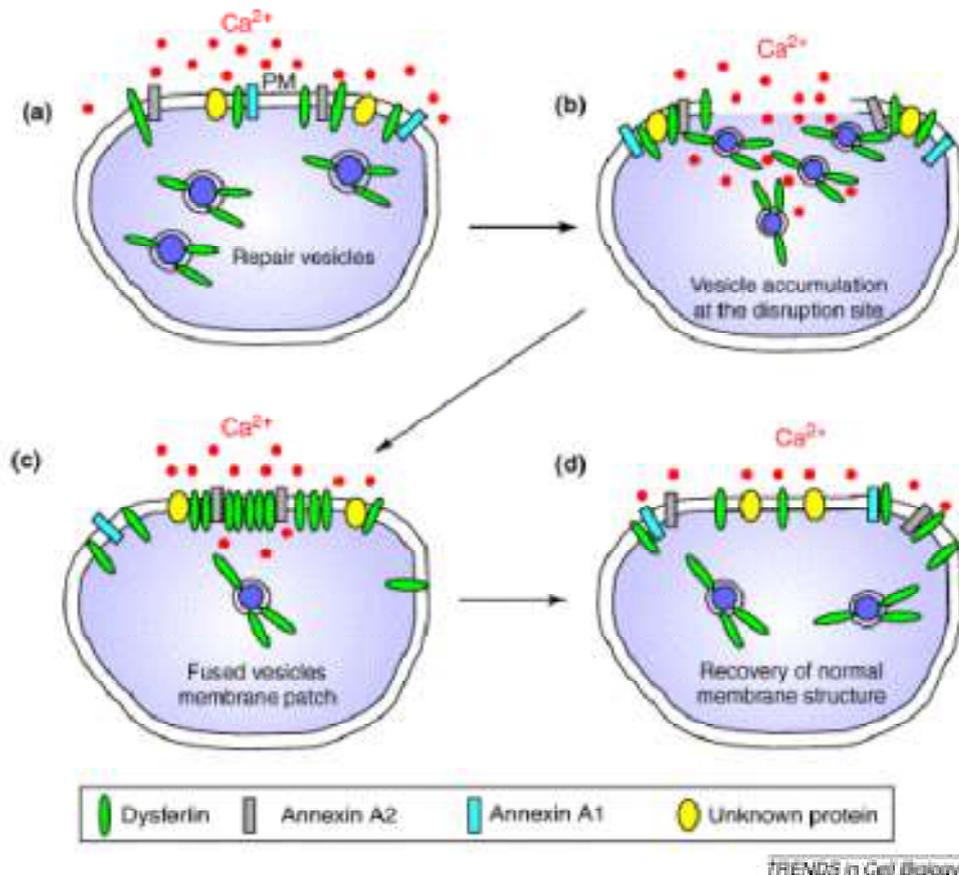


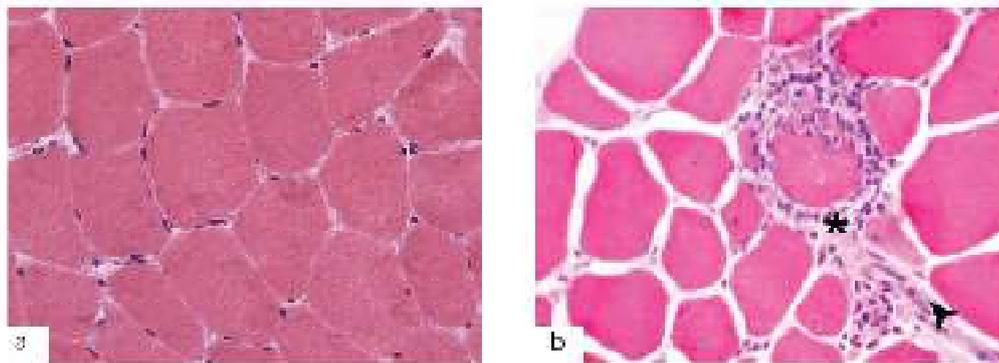
Figure.4: Principe général de réparation membranaire après rupture de la membrane plasmique. (Bansal et Campbell., 2004)

I.3.2. Implication dans l'activité phagocytaire

Comme dans d'autres dystrophies musculaires, l'absence de dysferline entraîne une accumulation de dégâts au niveau du sarcolemme des cellules musculaires. Le mécanisme, par lequel ces lésions membranaires conduisent à la mort cellulaire, est inconnu, mais il est possible que le calcium, qui s'accumule dans la fibre musculaire lésée, active des protéines impliquées dans la transduction des voies de mort cellulaire ou induise directement une nécrose par activation de protéase (Fig.5 a). L'absence de dysferline entraîne un phénotype distinct des autres dystrophies, dans lesquelles on constate souvent un niveau élevé

d'inflammation dans le muscle. De plus, il est important de rappeler que les monocytes/macrophages expriment la dysferline à un niveau équivalent à celui des myocytes cardiaques. En réponse à des lésions cellulaires et/ou la mort cellulaire, le système immunitaire s'active pour permettre l'élimination des cellules nécrosées (Osborn et al., 2010). Toutefois il peut également causer des dommages supplémentaires aux cellules voisines saines par une boucle de rétroaction positive (Fig. 5b).

A



Contrôle

LGMD2B

B

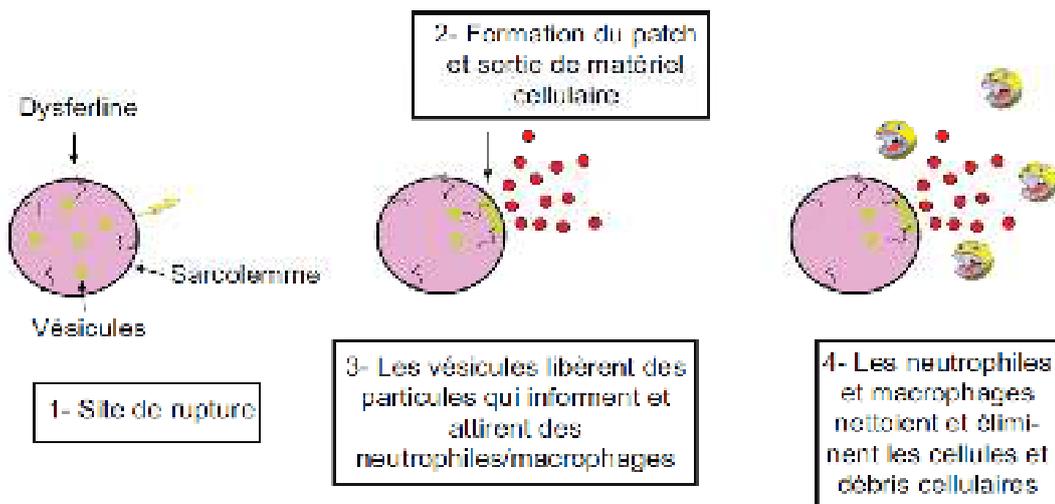


Figure 5 Implication du processus inflammatoire dans les dysferlinopathies (Hitomi et al., 2008)

A. Histologies réalisées sur des biopsies musculaires. a. Chez le contrôle, les fibres musculaires sont parfaitement accolées, et les noyaux sont à la périphérie (marquage violet). b. Chez le patient LGMD2B, il y a une centronucléation des noyaux ainsi que la présence d'un infiltrat inflammatoire (astérisque) ainsi que de fibrose (flèche).

B. Représentation schématique du processus inflammatoire. 1 - En présence de dysferline, la rupture survenue au niveau du sarcolemme va permettre l'entrée de calcium et la libération de facteurs pro-inflammatoires.

2 et 3 - Il y a alors formation d'un patch, qui lors de sa fusion avec le sarcolemme, va permettre la libération de particules inflammatoires. 4 - Finalement, ces particules permettent le recrutement de macrophages et de neutrophiles, qui phagocyteront alors, les débris cellulaires. En absence de dysferline et donc de réparation membranaire, la libération massive de facteurs pro-inflammatoires permet le recrutement de macrophages qui phagocytent la fibre lésée mais également les fibres musculaires adjacentes.

I.4. Gène et architecture moléculaire de la dysferline

Chez l'Homme, le gène *DYSF* est localisé sur le bras court du chromosome 2 (2p13). Il appartient à la catégorie des gènes de grande taille avec onze introns d'une taille supérieure à 5000bp et cinq introns d'une taille inférieure à 300bp. Sa séquence codante est, quant à elle, constituée de 6243 paires de bases, fragmentée en 55 exons de taille relativement équivalente (50-150bp) à l'exception de cinq petits exons (de moins de 50pb : exon 10, 15, 17, 35 et 36) (Fig.6) (Aoki et al., 2001).

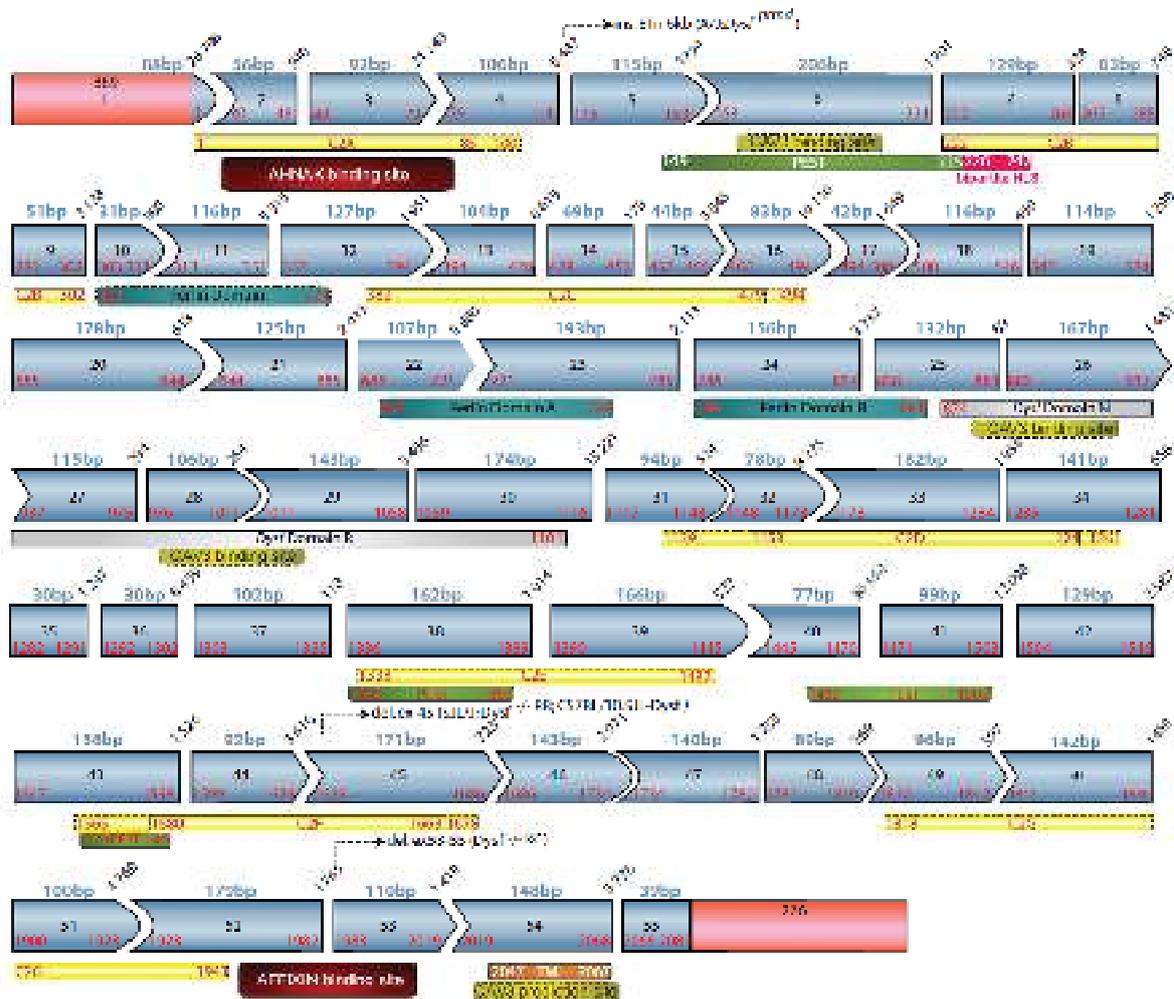


Figure.6: Organisation du gène DYSF. (Giraud et al., 2009)

Représentation des 55 exons du gène humain de la dysferline (en bleu). Les boîtes rouges correspondent aux 5' et 3'. En haut de chaque exon, la longueur en paires de bases est indiquée. A l'intérieur des boîtes, la position du premier résidu et du dernier est écrite en rouge. Les longueurs des introns sont mentionnées entre les exons. De même, les flèches pointillées représentent les anomalies génétiques dans le gène de dysferline chez trois modèles de souris.

I. 5. La dysferline et la famille des ferlines

La dysferline, aussi appelé Fer-1L1 pour Fer-1 Like number 1, a été le premier membre identifié de la famille des ferlines. Six autres membres ont été identifiés par la suite par homologie dans les bases de données du génome humain (Fig.7): Fer 1L2 à Fer1L6. Deux protéines de cette famille ont fait l'objet d'un intérêt particulier et ont reçu un nom de protéine : Fer 1L2 : otoferline et Fer 1L3 : myoferline.

Les ferlines peuvent être classées en deux sous-familles. Un premier groupe comprenant la dysferline, la myoferline et fer1L5 ; et un autre constitué de l'otoferline, Fer1L4 et Fer1L6 (Doherty and McNally., 2003).

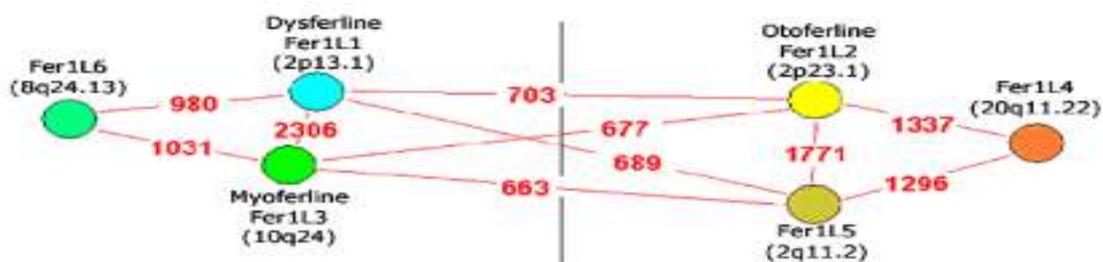


Figure. 7 : Scores d'homologie entre les différents membres de la famille des ferlines. (Doherty et McNally., 2003)

Les 6 membres de la famille des ferlines sont représentés sur le schéma. Leur nom et leur position génomique sont indiqués. Ils sont regroupés en deux sous-familles en fonction de leur score d'homologie. Les nombres sur les lignes connectant les différentes protéines indiquent les scores d'homologie obtenus en BLAST pour les séquences d'acides aminés : plus le nombre est élevé, plus l'homologie est grande. La position des gènes indique également approximativement leur similarité : plus ils ont proches, plus leur similarité est élevée.

Le transcrit *DYSF* code la dysferline, une protéine de 2080 résidus d'acides aminés, avec un poids moléculaire théorique de 237 kDa, qui est localisée à la membrane plasmique de la fibre musculaire squelettique adulte et dans les tubules-T (Ampong et al., 2005; Klinge et al., 2007).

La dysferline est constituée de sept domaines C2 (C2A à C2G) répartis le long de la séquence peptidique, de deux domaines Fer et deux domaines Dysf FN et deux Dysf FC en position centrale et d'un domaine transmembranaire en position C-ter. Parmi les domaines C2, trois se trouvent du côté N-terminal de la protéine (C2A à C2C) et 4 du côté C-terminal (C2D à C2G) (fig.8). La dysferline est donc une protéine composite dont l'existence de ces domaines et la compréhension de leurs rôles seraient importants pour la physiologie et la physiopathologie des dysferlinopathies (Bansal et Campbell., 2004).

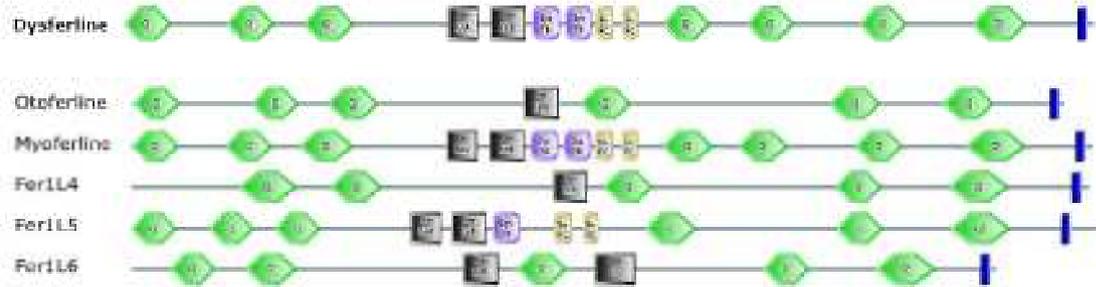


Figure 8 : Organisation des motifs protéiques des principales ferlines humaines. (Glover et Brown., 2007)
 Motif de liaison au calcium C2 en vert, domaine transmembranaire TM en bleu, domaine Fer en noir, domaine dysferline N-terminal DysfFN en violet et domaine C-terminal DysfFC en ocre.

I.6. Variants transrationnels

Le transcrit majoritaire du gène *DYSF* couvre la séquence de la dysferline des exons 1 à 55. Il existe d'autres formes correspondant à des épissages alternatifs. La première est celle décrite par Pramono et al., 2006 désignée *DYSF_v1*. Cette isoforme diffère du transcrit original par l'utilisation d'un exon initial différent situé dans l'intron 1. Il en résulte une protéine avec une séquence en N-ter modifiée. Il est intéressant de noter que la forme modifiée *DYSF_v1* est plus proche de la forme murine que *DYSF* (Pramono, 2006).

D'autres isoformes ont par la suite été rapportées. Ces formes ont été identifiées dans des cultures cellulaires humaines de muscle mais ne représentent qu'une minorité de l'ensemble des transcrits de la dysferline. Trois variants sont décrits : l'exon 5a, localisé entre les exons 5 et 6, l'exon 17 et l'exon 40a, localisé entre les exons 40 et 41 (Salani, 2004). Ces trois exons codent des séquences peptidiques en dehors des domaines structuraux, leur inclusion ou exclusion ne modifie donc pas les domaines conservés de la dysferline (Pramono et al., 2009) (Fig.9). Cependant, l'expression tissulaire de ces variants n'a pas été étudiée et le rôle fonctionnel des différents transcrits résultants n'est pas connu.

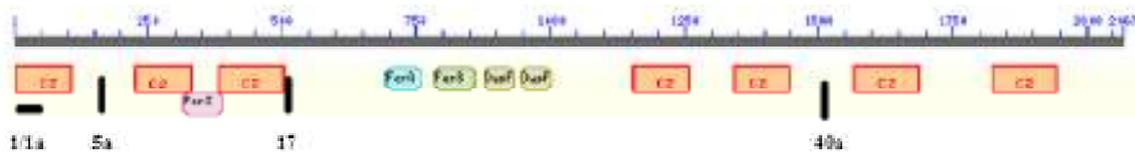


Figure.9: Localisation des exons « optionnels » 1a, 5a, 17 et 40a en fonction des domaines structuraux protéiques de la dysferline. (Salani, 2004).

I.7. Physiopathologie des dysferlinopathies

Les dysferlinopathies sont un ensemble de dystrophies musculaires progressives à transmission autosomique récessive, dues à des mutations dans le gène DYSF.

I.7.1. Spectre phénotypique :

Les dysferlinopathies primaires ont certaines caractéristiques communes parmi lesquelles, un début chez le sujet jeune (entre 15 et 35 ans) (annexe. 1, Tab.I), avec une progression lente conduisant au bout de plusieurs années à la perte de la marche et une élévation importante du taux de créatine phosphokinase ou CPK (de 10 à 100 fois la valeur normale). Une des caractéristiques les plus frappantes des dysferlinopathies est le processus nécrotique retrouvé dans le muscle. Des infiltrats de cellules immunitaires sont fréquemment observés dans ces pathologies, surtout au début de la maladie (Confalonieri et al., 2003; O'Callaghan et al., 2006). Ces infiltrats diffèrent, d'un point de vue immunologique et cytologique, de ceux classiquement retrouvés dans les polymyosites (PM) (les macrophages sont deux fois plus nombreux chez les patients atteints de dysferlinopathies, tandis que les lymphocytes T CD8+ sont, chez eux, moins abondants) (De Luna et al., 2010).

I.7.1.1. Myopathie de Miyoshi

Découverte au Japon en 1963, la myopathie de Miyoshi (MM) est le premier phénotype de dysferlinopathies à avoir été décrit et c'est l'une des formes les plus courantes de myopathie distale autosomique récessive (annexe.1).

L'âge moyen d'apparition des symptômes est de 21 ans (Aoki., 2001) marqué par une faiblesse musculaire et une atrophie, plus marquées au niveau distal des jambes, et plus particulièrement des muscles gastrocnémiens et soléaires.

Au stade précoce de la maladie, les taux sériques d'enzymes musculaires (créatine kinase, déshydrogénase lactique (LDH)) sont massivement élevés et l'histologie du muscle révèle un tableau dystrophique avec de nombreux foyers inflammatoires.

Dans un premier temps, les patients se plaignent de douleurs et gonflement des jambes avec des difficultés à se mettre sur la pointe des pieds. Puis d'autres symptômes apparaissent tels que des difficultés à se tenir accroupi, le pied tombant (signifiant une atteinte du compartiment antérieur de la jambe). Au fil du temps, la faiblesse musculaire peut s'étendre aux muscles du bassin et aux membres supérieurs (Eymard et al., 2000). La progression de la maladie est généralement lente, durant des décennies, mais 10-20% des patients vont néanmoins dépendre d'un fauteuil roulant.

I.7.1.2. La dystrophie musculaire des ceintures de type 2B (LGMD2B)

Décrite pour la première fois en 1998, la LGMD 2B est caractérisée par une atteinte vers 20-30 ans et affecte de façon prédominante la ceinture pelvienne et scapulaire. Elle possède beaucoup de similitudes phénotypiques avec les autres formes de dysferlinopathies, dont notamment des difficultés à la montée d'escaliers, un taux élevé d'enzyme sérique musculaire et de nombreux foyers inflammatoires. L'âge d'apparition est aussi vers la fin de l'adolescence, et la progression est généralement lente. Une faiblesse et une fatigue des

muscles des hanches et des cuisses surviennent initialement puis les épaules et les muscles des membres supérieurs sont atteints, principalement le biceps et les muscles de l'omoplate. Une participation distale (dans le bas des jambes) peut se produire, après des années, et peut aussi aboutir au phénomène de pied tombant décrit dans la MM (Mahjneh et al., 2001).

I.7.1.3. Formes mineures de dysferlinopathies

D'autres présentations cliniques de dysferlinopathies ont également été décrites avec une fréquence plus faible. Cette myopathie est très similaire à la MM, à l'exception près que les premiers muscles atteints sont ceux du mollet au lieu de la ceinture pelvienne. Ils présentent une faiblesse initiale des muscles de la ceinture scapulaire et des muscles distaux des jambes. (Serratrice, 2006). Des formes caractérisées par des atteintes moins prononcées constituent 10% des cas. Ces patients présentent notamment des douleurs dans les jambes sans faiblesse musculaire et aussi des cas caractérisés uniquement par des taux élevés de CK représentant 5% des patients. (Argov et al., 2000).

I.8. Stratégie diagnostique

En raison de la grande taille du gène *DYSF* (55 exons répartis sur 250kb d'ADN génomique), une stratégie pluridisciplinaire est nécessaire avant de confirmer le diagnostic chez les patients ayant une suspicion de dysferlinopathies. Ce diagnostic repose donc sur la combinaison des données de l'examen clinique suivi de l'analyse protéique pour finir avec des analyses de biologies moléculaires. (fig.9)

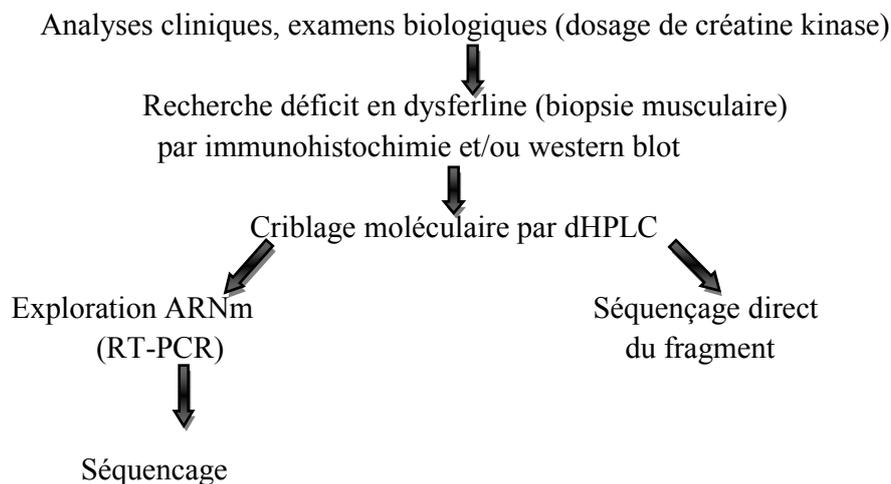


Figure.10 : Stratégie globale pour le diagnostic. (Nguyen et al., 2007)
Stratégie diagnostique multi-étape pour dépister et diagnostiquer les dysferlinopathies

I.9. Perspectives thérapeutiques

L'approche thérapeutique pour les patients avec déficit en dysferline, doit être personnalisée et tenir compte de l'histoire naturelle de la maladie. Les patients MM restent ambulatoires alors que les patients LGMD 2B deviennent grabataires et dépendant d'un fauteuil roulant après deux à trois décennies d'évolution, parfois même moins. Les patients DMAT n'ont besoin que d'attelles pour corriger leur pied tombant (Urtizbera et al., 2008).

La prise en charge est pluridisciplinaire afin d'avoir un suivi régulier des patients, bien évaluer la progression de la maladie et intervenir en conséquence.

Les procédures chirurgicales sont peu utiles chez les patients atteints de dysferlinopathies. Seule la chirurgie du talon d'Achille est proposée aux patients LGMD 2B afin de prolonger la marche. Les arthrodèses de la cheville peuvent aider les patients DMAT qui ont un retentissement important de leur pied tombant. Les traitements médicaux n'ont pas prouvé leur efficacité et plusieurs essais sont en cours d'évaluation pour les corticoïdes, les immunoglobulines intraveineuses et immunosuppresseurs. Les thérapies géniques représentent un espoir pour tous ces patients (Takahashi et al., 2003)