

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur de la Recherche Scientifique

جامعة سعد دحلب البلدية

Faculté Science de la nature et de la vie

Département de Biologie et physiologie cellulaire



## Mémoire

Présenté en vue l'obtention du diplôme de master 2 en

Biologie moléculaire et cellulaire

## Thème

**Dystrophinopathies (Duchenne /Becker/porteuse) evaluation morphologique de la fibrose et profil d'expression des dystrophines en immunohistochimie**

*Soutenu par :*

AMEUR Yamina

LARBI Amel

Devant le jury :

Mme AISSANI.R	maitre de conférence B	U.S.D.Blida	présidente
Mme AMOKRANE.A	maitre Assistante A	U.S.D.Blida	examinatrice
Pr BENAHMED.M	maitre de conférence A	C.P.M.C.Alger	promotrice

*Le 10/09/2020*

## Résumé

Les dystrophinopathies sont des affections musculaires liées à des mutations dans le gène de la dystrophine. Ce sont des pathologies récessives liées à l'X dont les formes les mieux connues sont les dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker mais d'autres formes ont été plus récemment décrites : cardiomyopathie isolée, intolérance à l'effort, femme porteuse symptomatique. La dystrophine est une grande protéine qui assure le lien entre le cytosquelette contractile et la matrice extracellulaire, par l'intermédiaire d'un complexe protéique appelé complexe membranaire de la dystrophine, et joue un rôle majeur dans le maintien de l'intégrité des fibres musculaires lors de la contraction. Dans notre étude ; nous nous sommes focalisés sur l'étude des aspects morphologiques observés ; apprécier le pourcentage de fibrose et évaluer les dystrophines en immunohistochimie .

Nous avons utilisé des anticorps anti dystrophine, les sous unités du complexe des sarcoglycanes (Sarc- $\alpha$ , Sarc- $\beta$ , Sarc- $\gamma$  et Sarc - $\delta$ ). La  $\beta$ -dystroglycane ( $\beta$ DG) et les myosines (MHC-s et MHC-s). De plus nous avons démontré les anomalies anatomo- histologique et cytopathologiques au cours de la dystrophie musculaire de Duchenne et de Becker (non seulement la dystrophine fait défaut, mais l'expression des protéines constitutive du complexe membranaire). Ces signes tissulaires et cellulaires comprenant la présence d'une hétérogénéité de fibre musculaire dans la forme et la taille avec parfois la présence de segmentation, de nécrose et de régénération. Enfin, la fibrose, c'est un signe fréquemment retrouvées dans le tissu dystrophique de façon générale et dans le type DMD et DMB.

**Mots clés** : dystrophine, Dystrophinopathies ; dystrophie musculaire, Duchenne ; Becker ; immunohistochimie

## Abstract

Dystrophinopathies are muscle conditions linked to mutations in the dystrophin gene. These are X-linked recessive pathologies, the most well-known forms of which are Duchenne and Becker muscular dystrophies, but other forms have been described recently isolated cardiomyopathy, intolerance of effort, symptomatic women. Dystrophin is a large protein that links the contractile cytoskeleton to the extracellular matrix, via a protein complex called the dystrophin membrane complex, and plays a major role in maintaining the integrity of muscle fibers during contraction. In our study ;we focused on the study of morphological aspect observed ;assessed the percentage of fibrosis and evaluating dystrophin in immunohistochemistry. We used anti bodies, anti dystrophin, and against the sub units of sarcoglycan complex ( $\alpha$ -Sarc,  $\beta$ - Sarc,  $\gamma$ -Sarc, and  $\delta$ -Sarc) and against the dystroglycan ( $\beta$ -DG) and myosin (MHC-s and MHC-f). We demonstrated anatomopathological and cyto -pathological abnormality in Duchenne and Becker muscular dystrophy, both dystrophin and DGC protéin are missing. These signs included muscle cell heterogeneity in the in shape and size presenting segmentation and necrosis and regeneration. Finally, fibrosis is important signs commonly found in dystrophie tissue and especially in the types DMD and BMD.

**Keywords :** dystrophin, Dystrophinopathies, muscular dystrophy, Duchenne ; Becker ; immunochemistry.

## الملخص

اعتلال الديستروفين هو حالات عضلية مرتبطة بطفرات في جين الديستروفين هذه الأمراض المتتحية المرتبطة بالكروموسوم أكس وأشهر أشكالها هي شلل دوشين وبيكر العضلي ولكن تم وصف أشكال أخرى مؤخرا اعتلال عضلة القلب المعزول عدم تحمل المجهود والإناث الحاملة للأعراض. الديستروفين هو بروتين كبير يربط الهيكل الخلوي المقلص بالمصفوفة خارج الخلية عبر مركب بروتين يسمى مجمع الديستروفين ويلعب دورا رئيسيا في الحفاظ على سلامة الهيكلية بسبب تغيرات مرضية الياف العضلات أثناء الإنكماش، في هذه الدراسة ركزنا على الجانب المورفولوجي الملاحظ للبنيات، تحديد نسبة الفيروز وتقييم الديستروفين بتقنية التوسيم النسيجي. لقد قمنا باستخدام أجسام مضادة للديستروفين ووحدات مركب الصاغوغليكان والميوزين. النتائج المتحصل عليها أثبتت وجود تشوهات نسيجية وخولوية ناجمة عن ضمور العضلات في الشلل العضلي لدوشان وبيكر (ليس فقط الديستروفين مفقودا أيضا التعبير عن البروتينات المكونة لمركبه). تشمل هذه العلامات النسيجية عدم التجانس في شكل وحجم الألياف العضلية المتواجدة أحيانا. وظاهرة التجديد لبعض الألياف العضلي.

الكلمات الدالة. اعتلال الديستروفين. الديستروفين، الشلل العضلي. دوشان بيكر. تقنية التوسيم النسيجي.

## **Remerciements**

*Nous voudrions tout d'abord, exprimer notre profonde gratitude envers le Dieu, le tout puissant de nous avoir donné le courage, et la volonté de parvenir à la fin de notre parcours universitaire.*

*Nous saisissons cette occasion pour adresser nos remerciements à mon encadreur, Mme BENAHMED Meryem qu'est à l'origine de ce sujet de mémoire, pour sa confiance, ses aides, sa disponibilité et pour avoir mis à notre disposition les ressources nécessaires à la réalisation de ce travail.*

*Nous adressons également nos respectueux remerciements aux :*

*Membres de jury ; Mme Aissani d'avoir accepté de présider notre jury de soutenance, et Mme Amokrane pour avoir accepté d'être l'examinatrice de notre travail. Ainsi pour leur précieux temps accordé à l'étude de notre mémoire.*

*Un témoignage de notre profonde reconnaissance s'adresse à Mme Saadi Leila, pour ses qualités humaine et professionnelle.*

*Nous tenons à exprimer toute notre reconnaissance à nos familles pour leur soutien, et encouragement, rien n'aurait été possible sans le soutien de nos proches.*

*Nous voudrions ajouter notre remerciement, à tous les membres de la promotion BMC. Enfin, notre profonde reconnaissance à toute personne qui a participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

## Dédicace 1

Je dédie ce modeste travail à :

A mes parents .Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour dont ils ne cessent de me combler. Que dieux leur procure bonne santé et longue vie.

A celui que j'aime beaucoup et qui m'a soutenue tout au long de ce projet : mon fiancé Bilal, et bien sûr à mes frères Nacer et Amine, sans oublier ma petite sœur Ferial et ma cousine Siham que j'aime.

A toute ma famille et mes amies. A mon binôme AMEUR Yamina et toute la famille LARBI et SELMANE .Et a tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible, je vous dis merci.

*Amel*

## *Dédicace 2*

*Je dédie ce travail :*

*A mes parents quoi que je fasse ou que je dis, je ne saurais jamais vous remercier comme il se doit, que ce travail traduit ma gratitude, mon affection, mon respect, à toi :*

*Ma très chère ; maman, **Bakhta**, qui m'a soutenu épauler et encouragé durant toutes mes années d'étude pour que je puisse atteindre mes objectifs, ta présence à mes côtés été toujours ma source de force pour affronter les différents obstacles.*

*Mon cher papa ; **Mohamed**, qui n'a jamais cessé de formuler des prières à mon égard, qui m'a toujours guidé, et qui été toujours présent pour moi, j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.*

*Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de bien que je ne vous en acquitterais jamais assez.*

*A mon marie ; **Moussa**, à mes sœurs ; **Youssra, Abir**, je vous souhaite une vie pleine de bonheur.*

*Mes **tantes**, mes **ancles**, leurs **époux** et **épouse**, toutes mes **cousins** et mes **cousines**, veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond.*

*Mon binôme ; **LARBI Amel**, pour sa compréhension et sa patience.*

*A tous ce qui m'ont enseigné au long de ma vie scolaire.*

*Mes **amies**, en souvenir des plus beaux instants qu'on a passé ensemble*

*Et à tous ceux qui me sont chères, à tous ceux qui m'aiment.*

**Yamina**

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	
<b>I.1. Le Muscle Squelettique : Généralités.....</b>	<b>2</b>
<b>I.1.1. Structure du muscle squelettique.....</b>	<b>6</b>
<b>I.1.2. Hétérogénéité des fibres musculaires chez l’homme .....</b>	<b>9</b>
<b>I.1.3. Croissance et régénérescence musculaire.....</b>	<b>9</b>
<b>I.2. Classification des maladies neuromusculaires .....</b>	<b>10</b>
<b>I.3. Dystrophinopathies de type Duchenne et Becker.....</b>	<b>10</b>
<b>I.3.1. Historique.....</b>	<b>11</b>
<b>I.3.2. Données cliniques .....</b>	<b>11</b>
<b>I.3.2.1. Dystrophie musculaire de Duchenne .....</b>	<b>12</b>
<b>I.3.2.2. Dystrophie musculaire de Becker.....</b>	<b>12</b>
<b>I.3.2.3. Dystrophinopathies chez les filleset femmes porteuses DMD/BMD .....</b>	<b>13</b>
<b>I.3.3. La dystrophine : protéine musculaire.....</b>	<b>15</b>
<b>I.3.3.1. structure de la dystrophine musculaire et des Partenaires</b>	
<b>I.3.3.2. Gène DMD et isoformes de la dystrophine .....</b>	<b>16</b>
<b>I.3.3.3. Mutation de gène DMD .....</b>	<b>19</b>
<b>I.3.3.4. Physiopathologie.....</b>	<b>20</b>
<b>I.4 Stratégie diagnostique .....</b>	<b>20</b>
<b>I.5. Strategies thérapeutiques.....</b>	<b>21</b>
<b>I.5.1. Approche pharmacologique .....</b>	<b>22</b>
<b>I.5.2. Thérapie génique.....</b>	<b>23</b>
<b>I.5.3. Thérapie cellulaire.....</b>	<b>24</b>
<b>CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES</b>	
<b>II.1. Matériel biologique .....</b>	<b>24</b>
<b>II.2. prélèvement des échantillons.....</b>	<b>24</b>

<b>II.3. identification des échantillons .....</b>	<b>25</b>
<b>II.4 Fixation et cryoconservation des prélèvements.....</b>	<b>25</b>
<b>II.5. Confections des coupes au cryostat.....</b>	<b>25</b>
<b>II.6. Méthodes d'étude morphologique.....</b>	<b>25</b>
<b>II.6.1. Coloration à l'hématoxyline-Eosine .....</b>	<b>26</b>
<b>II.6.2. Coloration au Trichrome de Gomori .....</b>	<b>26</b>
<b>II.7. Méthodes d'étude biochimique .....</b>	<b>26</b>
<b>II.7.1. Coloration de la succinate Déshydrogénase (SDH).....</b>	<b>27</b>
<b>II.7.2. Coloration du Nicotinamide Adénine dinucléotide tétrazolium réductase (NADH-TR) .....</b>	<b>27</b>
<b>II.8. Méthode d'étude immunohistochimique .....</b>	<b>29</b>
<b>II.9. Technique d'immunoperoxydase indirecte sur coupes congelées .....</b>	<b>29</b>
<b>II.10. Montage des coupes entre lames et lamelles.....</b>	<b>29</b>
<b>II.11. Observation et acquisition d'images numérique .....</b>	<b>30</b>
<b>III. Traitement des données et analyse statistique des résultats .....</b>	<b>30</b>
<b>CHAPITRE III.RESULTATS.....</b>	<b>31</b>
<b>CHAPITRE IV : DISSCUSSION .....</b>	<b>44</b>
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>50</b>
<b>ANNEXES</b>	
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure1</b> .....	<b>2</b>
<b>Figure 2</b> .....	<b>3</b>
<b>Figure 3</b> .....	<b>4</b>
<b>Figure 4</b> .....	<b>6</b>
<b>Figure 5</b> .....	<b>8</b>
<b>Figure 6</b> .....	<b>11</b>
<b>Figure 7</b> .....	<b>13</b>
<b>Figure 8</b> .....	<b>13</b>
<b>Figure 9</b> .....	<b>14</b>
<b>Figure 10</b> .....	<b>14</b>
<b>Figure 1</b> .....	<b>17</b>
<b>Figure 12</b> .....	<b>32</b>
<b>Figure 13</b> .....	<b>32</b>
<b>Figure 14</b> .....	<b>33</b>
<b>Figure 15</b> .....	<b>34</b>
<b>Figure16</b> .....	<b>34</b>
<b>Figure 17</b> .....	<b>35</b>
<b>Figure 18</b> .....	<b>35</b>
<b>Figure 19</b> .....	<b>37</b>
<b>Figure 20</b> .....	<b>37</b>
<b>Figure 21</b> .....	<b>38</b>
<b>Figure 22</b> .....	<b>38</b>
<b>Figure 23</b> .....	<b>39</b>
<b>Figure 24</b> .....	<b>39</b>
<b>Figure 25</b> .....	<b>40</b>
<b>Figure 26</b> .....	<b>40</b>
<b>Figure 27</b> .....	<b>41</b>
<b>Figure 28</b> .....	<b>43</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

AChR	Acetylcholine Receptor
AD	autosomique Dominante
AR	Autosomique Récessive
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ATPase	Adénosine TriPhosphatase
Ca	Calcium
CMT	Charcot Marie Tooth
CD	Cluster différenciation
CPK	Créatine Phospho-Kinase
Cys	cysteine
DAB	Di-Aminobezidine
DAPC	Dystrophin-Associated Protein Complex
DM	Distal Myopathy
DMB	Dystrophies Musculaires de Becker
DMD	Dystrophies Musculaires de Duchenne
DMED	Dystrophie Musculaire d'Emery-Dreifuss
DMFSH	Dystrophie Musculaire Facio-Scapulo-Humérale
DMOP	Dystrophie musculaire oculopharyngée
DMP	Dystrophie musculaire Progressive
DP	Dystrophin Protein
DRP	Dystrophin related protein
Dys	Dystrophine
FKRP	Fukutin-Related Protein
GABA	Gama Amino Butyric Acid
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
GRMD	Golden Retriever Muscular Dystrophy
HE	Hematoxyline Eosine
HFMD	Hypertrophic feline muscular dystrophy
HLA	Human Leukocyte Antigen
IGF	Insulin-Like growth factor
IL-6	Interleukine-6
IRM	imagerie par résonance magnétique
JNM	Jonction NeuroMusculaire
KDa	kilodaltons
Kb	kilobase
LDH	Lactate déshydrogénase

LGMD	Limb-GirdleMuscularDystrophy
LZ	liéauzink
MAST	MicrotubuleAssociatedSerine/Threonine kinase
MC	MyopathieCongénitale
MD	MyopathieDistale
mdx	musculardystrophyX-linked
MEC	MatriceExtracellulaire
MLPA	MultiplexLigationdependentProbe Amplification
MRF	Myogenic Regulatory Factor
Myf-5	Myogenic factor5
MyoD	Myogenic differenciation
NADH-TR	NicotonicAcidDehydrogenase-Tetrazoliumreductase NCL-
GAMP	Novocastra Lyophilized-GoatAnti-MousePeroxidase
NFkB	NeuclearFactorKappa B
NO	Nitric Oxyde
Nos	Monoxyded'azotesynthase
OCT	OptimumCompoundTissue
Pax	Pairedboxgene
PBs	PhosphateBufferedsaline
PCR	PolymeraseChainReaction
PH	Potentiel Hydrogene
Pm	Promoteur
PROMM	ProximalMyogenic Myopathy
RX	RecessiveliéàX
S	Sporadique
TM	Transmission maternelle
TNF $\alpha$	TumorNecrosisFactors
TRIM32	Tripartite motif-containing32

# Glossaire

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

**Maladie rare :** une maladie est dite rare quand elle touche moins d'une personne sur

2000(Urtizberea, 2009).

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

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

**Unité motrice :** est formée par une terminaison axonale d'un motoneurone innervant plusieurs

fibres musculaires de même type histologique (Seratrice, 2008).

# **Données bibliographiques**



## Introduction

Les dystrophinopathies représentent l'ensemble des maladies héréditaires liées à des mutations dans le gène de la dystrophine et sont caractérisées par une faiblesse et une dégénérescence des muscles squelettiques. Les formes les plus connues sont les dystrophies musculaires de Duchenne (DMD) et de Becker (BMD). La DMD, dans sa forme classique, a été décrite en 1868 par Duchenne de Boulogne, mais « l'histoire de la dystrophine » connaît un rebondissement majeur à la fin des années 1980 lorsque Monaco et Hoffman identifient en Xp21.2, par clonage positionnel, le gène impliqué dans cette affection (Monaco AP, 1986 ; Hoffman EP, 1987). L'identification du gène leur permet de remonter vers la protéine, qu'ils nomment alors « dystrophine ». Il s'agit de pathologies de transmission récessive liée à l'X. La DMD est caractérisée par une absence quasi totale de dystrophine dans le muscle, tandis que la BMD est liée à une réduction de la quantité de dystrophine ou à la production d'une dystrophine de taille anormale.

Nous nous proposons dans ce travail de rapporter une série de 28 cas de dystrophie musculaire de Duchenne et de Becker ayant bénéficié d'une étude de processus dystrophique. Colligés sur une période allant de 2013 à 2019 au niveau du « Centre Pierre et Marie Curie » d'Alger.

Notre travail a pour but d'étudier la dystrophie par une étude immunohistochimique fiable, en utilisant trois anticorps dirigés contre les parties (N-terminal (Dys 3), central (Dys 1) et terminal (Dys2) de la dystrophine. Nous avons démontré la caractérisation du muscle dystrophique : nécrose -régénération, et fibrose-infiltration inflammatoire.

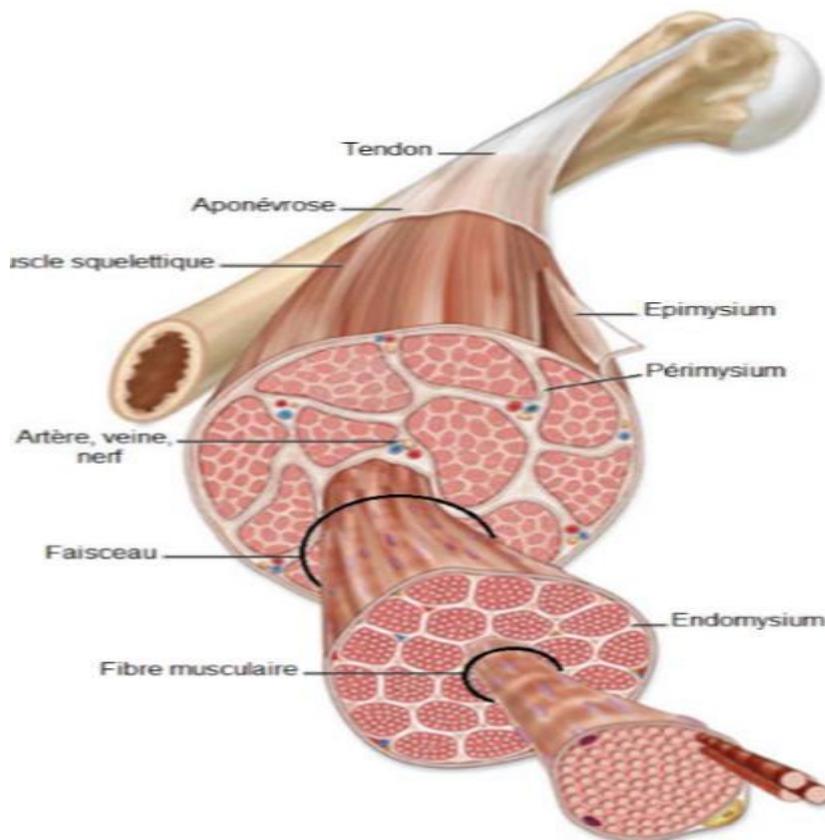
Pour atteindre les objectifs que nous nous sommes assignés, nous avons adopté la stratégie suivante :

Dans un premier temps nous avons fait une description générale de notre population en étudiant la description de nos variables indépendantes : Age, sexe, caractères histologique et immunohistochimiques. Et nous avons effectué une analyse statistique corrélative entre les paramètres.

## I.1 Le Muscle Squelettique : Généralités

### I. 1.1. Structure du muscle squelettique

Le muscle squelettique est constitué de cellules musculaires striées ou rhabdomyocytes appelées fibres musculaires. Elles sont regroupées en faisceaux imbriqués les uns dans les autres et maintenus ensemble par différentes couches de tissu conjonctivo-vasculaire qui se répartit en trois niveaux : l'épimysium qui recouvre l'ensemble d'un muscle, le péri-mysium autour de chaque faisceau et l'endomysium qui entoure chaque fibre musculaire (Fig.1) (Turrina et al, 2013).

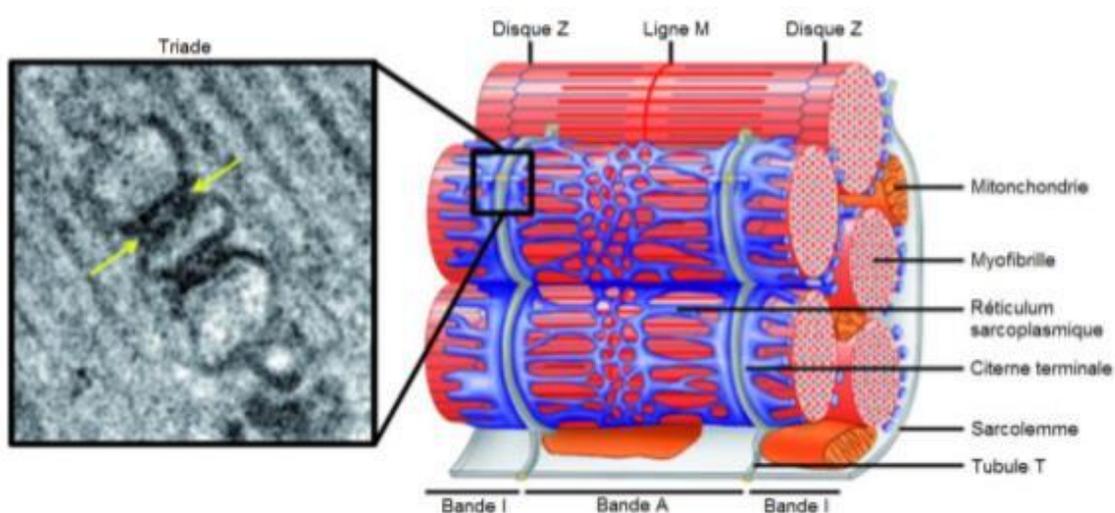


**Figure 1 : structure du muscle squelettique**

D'après: Williams & Warwick. Gray's Anatomy. Thirty-seventh edition. Churchill Livingstone. ISBN0-443-04177-6.

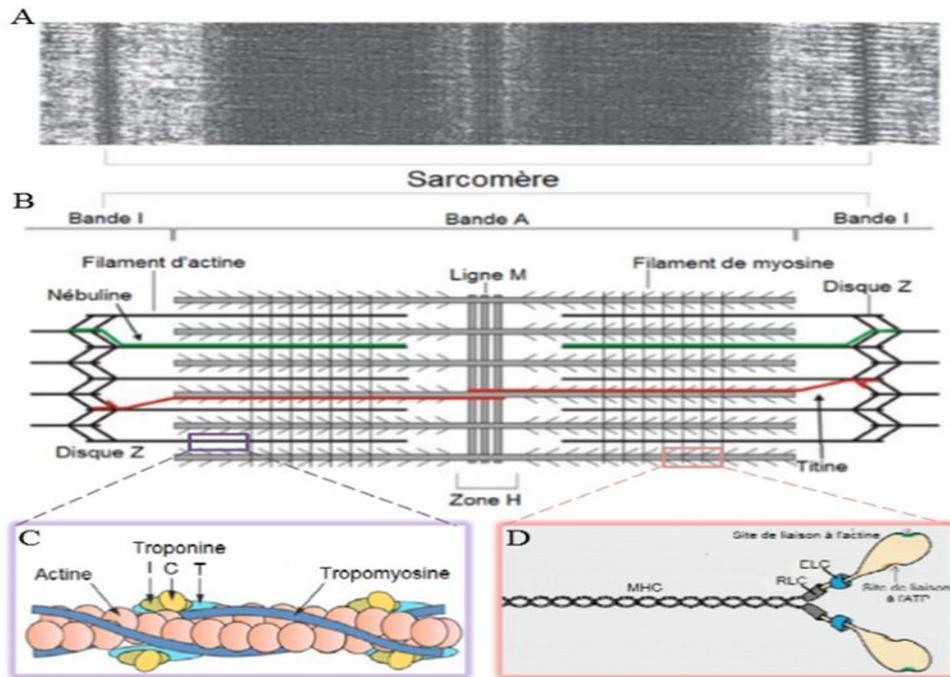
Les fibres musculaires ont la forme d'un cylindre allongé. Elles sont parallèles les unes aux autres et ont un diamètre qui va de 10 à 100µm. Leur longueur varie de 100µm à 30 cm (Turrina et al, 2013). La fibre musculaire mature est plurinucléée, résultant de la fusion de plusieurs cellules immatures appelées myoblastes caractérisées par des noyaux qui forment une chaînette en position centrale. Ces noyaux vont se déplacer à la périphérie lors de la myogenèse (Mekrami et Brignol, 2003 ; Bougeon, 2008).

Le sarcolemme est la membrane plasmique qui délimite la fibre musculaire. C'est une structure continue qui parcourt la fibre musculaire et contribue à l'intégrité mécanique. Il présente une particularité unique dans le tissu musculaire puisqu'il se prolonge vers l'intérieur de la cellule pour former un réseau de tubules transversaux, aussi nommés tubules T (Ishikawa, 1968). Le sarcolemme entoure le réticulum sarcoplasmique (RS), ce dernier est formé par des canaux longitudinaux qui débouchent dans des cavités, appelées citernes terminales. Ces citernes entourent les tubules T et l'ensemble forme la « Triade de Pallade » jouant un rôle dans le transfert et le stockage du calcium intracellulaire ( $Ca^{2+}$ ) (Al-Qusairi & Laporte, 2011) (Fig.2).



**Figure 2: Organisation de la «Triade de Pallade» dans le muscle squelettique.**  
D'après: Al-Qusairi & Laporte, 2011.

Le sarcoplasme est le nom donné au cytoplasme de la fibre musculaire. Il contient, en plus des constituants cytoplasmiques habituels, le cytosquelette myofibrillaire constitue le support de la contraction musculaire et qui est aligné selon l'axe de la fibre musculaire. Chaque myofibrille est composée d'une chaîne d'unités contractiles répétitives disposées en segments appelées sarcomères, limitées par une strie Z. Ces sarcomères ont un aspect strié dû à des indices de réfraction différents des diverses zones des fibres (Fig.3A). Ainsi, on peut observer des bandes sombres dites bandes A (Anisotrophe) coupées en leur milieu par une rayure plus claire : la zone H (de l'allemand Heller signifiant « plus pâle »), seulement visible lorsque les fibres musculaires sont au repos. Cette zone H est interrompue en son milieu par une zone plus sombre : la ligne M (de l'allemand Mittel, « centre »). On observe également des bandes claires dites bandes I (Isotrophe) au centre desquelles se trouve une région plus foncée : le disque Z (de l'allemand Zwischen, « entre »). La région d'une myofibrille comprise entre deux disques Z, d'une longueur d'environ 2,4  $\mu\text{m}$ , constitue le sarcomère, unité contractile de la fibre musculaire (Bloom & Fawcett, 1962 ; Sciote & Morris, 2000) (Fig.3B). Ce sarcomère placé en série, contient deux types de myofilaments : l'un épais de myosine, et l'autre fin d'actine. Au niveau de cette structure, les filaments fins sont attachés de part et d'autre d'un matériel protéique essentiel, le disque Z, tandis que les filaments épais s'attachent au niveau de la ligne M. C'est le chevauchement des filaments fins et épais qui constituent la bande A. En plus du réseau d'actine-myosine, le sarcomère contient également deux autres réseaux de filaments : la titine et la nébuline. (Fig.3C et 3D) (Bloom & Fawcett, 1962 ; Sciote & Morris, 2000)



**Figure 3: Structure du sarcomère, des filaments d'actine et des filaments épais de myosine dans un muscle squelettique.** D'après: Al-Qusairi & Laporte, 2011; Gordon et al, 2000

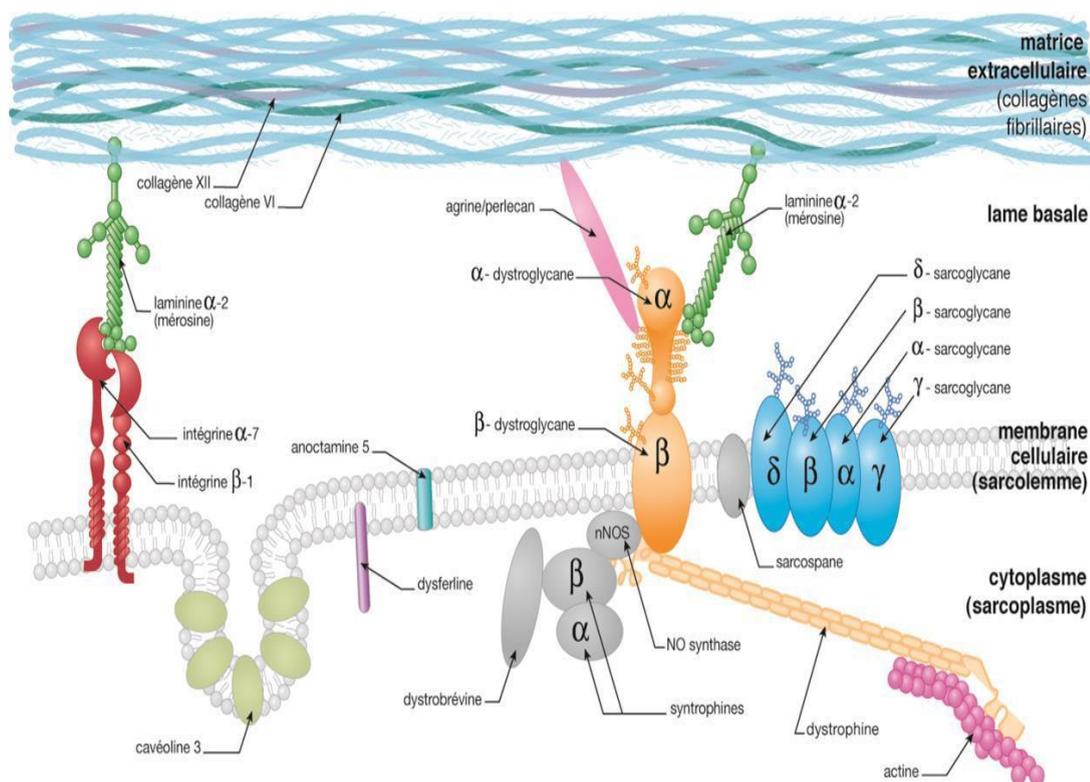
**A.** Photographie en microscopie électronique d'une coupe longitudinale de muscle squelettique

**B.** Schéma montrant les composants principaux du sarcomère.

**C** Schéma d'un filament fin d'actine

**D.** Schéma d'un filament épais de myosine

Pour maintenir l'intégrité cellulaire et contribuer à la mécano-transduction, les filaments intermédiaires du cytosquelette servent d'échafaudage qui connecte les sarcomères d'une part aux autres organites (tels que les mitochondries ou le noyau), et, d'autre part à la membrane cytoplasmique par le biais de costamères. Les principaux composants des costamères sont le système vinculine- taline- intégrines et le complexe dystrophine-glycoprotéines (DGC) (Henderson 2017; Oakes 2014) (Fig.4). La coordination entre l'unité contractile de base, le sarcomère, et le réseau complexe du cytosquelette est cruciale pour l'activité contractile des fibres musculaires. Des mutations touchant l'un des composants du cytosquelette sont directement responsables de différents types de dystrophies musculaires.



**Figure 4 : Protéines du costamère qui font le lien entre la cellule musculaire et son environnement.** (AFM, 2017)

### 1.1.2 Hétérogénéité des fibres musculaires chez l'homme :

En 1923, Needham décrivait deux types de muscle squelettique possédant chacun un type de fibres spécifiques (Needham, 1926):

- Des muscles lents dits « rouges » ayant des fibres riches en myoglobine et en mitochondrie, caractérisés par un métabolisme oxydatif et impliqués dans une activité tonique. Ces fibres seront appelées fibres de type I.
- Des muscles rapides dits « blancs » ayant des fibres pauvres en myoglobine et en mitochondrie, caractérisés par un métabolisme glycolytique et impliqués dans une activité intense. Ces fibres seront nommées fibres de type II.

L'analyse des différents types d'unités motrices, le marquage d'une enzyme impliquée dans le métabolisme oxydatif, la succinate déshydrogénase (SDH) (Close, 1967 ; Schiaffino et al, 1970) et le marquage de l'activité ATPase (Brooke & Kaiser, 1970) ont permis de distinguer trois types de fibres musculaires : type I (dites « lentes oxydatives »), type IIA (dites « rapides

oxydatives et glycolytiques ») et type IIB (dites « rapides glycolytiques »). Toutes ces fibres ont des caractéristiques structurales, fonctionnelles et métaboliques différentes résumées dans le Tableau 1.

*Tableau 1: Caractéristiques fonctionnelles, structurales et métaboliques des différents types de fibres musculaires chez l'homme. D'après Schiaffino, 2010; Schiaffino & Reggiani, 2011.*

Nomenclature	I	IIA	IIX
<i>Caractéristiques fonctionnelles</i>			
Unité motrice	Slow Fatiguable Resistant (S)	Fast Fatiguable Resistant (FR)	Fast Fatigable (FF)
Contraction	Lente	Rapide	Rapide
Résistance à la fatigue	+++	++	+
<i>Caractéristiques structurales</i>			
Couleur	Rouge	Rose	Blanche
Surface plaque motrice	+	+++	+++
Réticulum sarcoplasmique	+	+++	+++
Vascularisation	Elevée	Intermédiaire	Faible
Nombre de mitochondries	+++	++	+
Epaisseur du disque Z	+++	++	+
Richesse en collagène	+++	++	++
<i>Caractéristiques métaboliques</i>			
ATPase myofibrillaire	+	+++	+++
Teneur en glycogène	+	++	+++
Teneur en lipides	+++	++	+
Contenu en myoglobine	+++	++	+
Enzymes glycolytiques	+	++	+++
Enzymes mitochondriales	+++	++	+

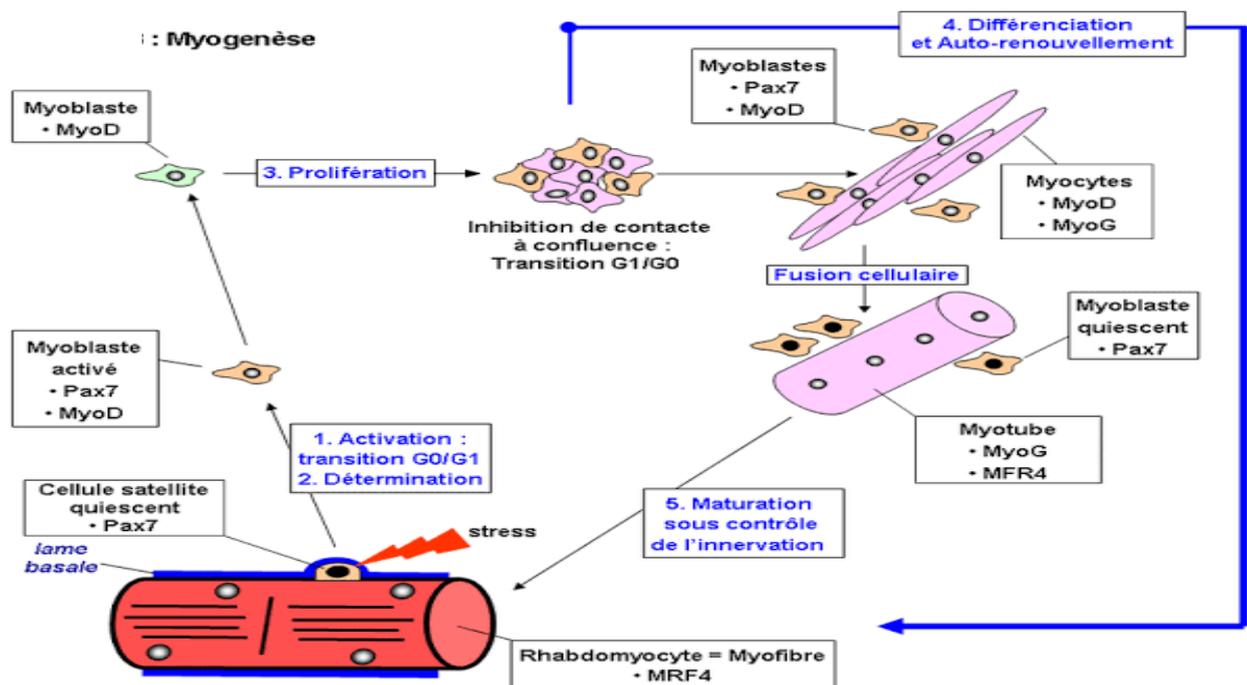
+++ : activité élevée, ++ : activité moyenne, + : activité faible.

La distribution de ces types de fibres est variable dans les muscles du corps humain. Les muscles squelettiques, et notamment les muscles de la jambe (ex, le muscle vastus lateralis), sont hétérogènes dans leur composition en fibres musculaires. Ceci leur permet une flexibilité dans l'utilisation d'un même muscle pour diverses tâches allant d'une activité continue peu intense (ex, posture), à des mouvements de contraction répétés (ex, locomotion), en passant par des contractions rapides et intenses (ex, saut ou coup de pied).

### I. 1.3 Croissance et régénérescence musculaire :

D'un point de vue cellulaire, le muscle possède une caractéristique de plasticité importante grâce à ses capacités de croissance et de régénération. A l'origine de cette particularité se trouve une réserve de cellules souches ou cellules satellites localisées entre le sarcolemme et la lame basale, capable à chaque instant de s'engager dans le processus myogénique.

Les cellules souches sont présentes dans toutes les masses musculaires, où elles résident dans un état quiescent jusqu'au moment où des signaux viennent les solliciter lors de la croissance musculaire postnatale, lors d'exercices ou plus généralement lors d'endommagement des fibres musculaires (Lagha et al., 2005 ; Mayeuf et Relaix, 2011). L'engagement de ces cellules progénitrices dans le programme de prolifération et de différenciation musculaire est induit par l'activation des facteurs de régulation myogéniques formant les MRF (Myf5, MyoD, myogénine et MRF4) et le facteur de transcription Pax (fig. 5) (Serratrice, 2008).



**Figure 5 : Myogenèse** (Schiaffino S al., 2011). La myogenèse est sous contrôle de facteurs de transcription « clés » MRF : Pax7, MyoD, myf-5, myogénine, MRF4.

Dans le cas d'un muscle dystrophique, la dégénérescence musculaire causée par la fragilité des fibres suscite une demande constante en cellules satellites. Cette forte sollicitation fait en sorte que des cellules myogéniques d'un patient dystrophique vieillissent prématurément (Renault 2002). Avec l'épuisement de la réserve de cellules satellites, les

muscles dystrophiques perdent graduellement leur faculté de régénérescence et on observe un déclin constant de l'état du patient. Les fibres musculaires endommagées ne pouvant plus être réparées, elles sont progressivement remplacées par un tissu conjonctif fibreux et adipeux.

## **I.2 Classification des maladies neuromusculaires :**

Les données histologiques, les caractéristiques génétiques ou les données de la biologie moléculaire ont permis de parfaire la classification des maladies neuromusculaires. Ces maladies portent donc souvent plusieurs appellations : la maladie de Werdnig-Hoffmann est aussi dite «amyotrophie spinale infantile» ; la maladie de Steinert «dystrophie myotonique», etc....

La classification résulte donc aujourd'hui de plus d'un siècle de découvertes médicales. Les progrès technologiques continuent, et la classification est toujours en évolution (annexe 1). Mais l'observation attentive permet peu à peu d'établir recoupements et différences selon l'âge de début de la maladie, la localisation de la faiblesse musculaire et son évolution.

## **I.3. Dystrophinopathies de type Duchenne et Becker**

### **I.3.1. Historique**

La dystrophinopathies est décrite en 1868 par Duchenne de Boulogne (ou Guillaume Benjamin Amand Duchenne, 1806-1875). Bien que, William Little (1810-1894) et Edward Meyron (1807-1880) l'aient caractérisée avant cette date (Camirand, 2004). Duchenne, en 1868, découvrit que ce trouble était relié aux muscles. Il proposa alors des critères diagnostiques basés sur des observations anatomiques et des stimulations électriques. Il décrivit aussi le remplacement du tissu musculaire par le tissu fibreux ou conjonctif aux biopsies musculaires. Finalement, il observa que l'hydrothérapie et des massages accompagnés de stimulations électriques pouvaient améliorer la condition des patients pendant les phases initiales du développement de la maladie. C'est ainsi que ses travaux plus poussés lui ont valu l'attribution de son nom à cette myopathie (Camirand, 2004).

En 1886, Gowers observa que les cas isolés de dystrophie étaient plus rares que les cas familiaux avec des antécédents du côté de la mère. Il observa même qu'une femme pouvait avoir des enfants dystrophiques dont les pères étaient différents. Il décrivit aussi la manière que ces enfants se levaient d'une position couchée jusqu'à se mettre debout (Dunant, 2003).

### **I.3.2. Données cliniques**

Les dystrophinopathies sont des maladies dégénératives héréditaires progressives de la fibre musculaire. Elles sont transmises de manière récessive, lié à une mutation anormale du gène DMD situé au niveau du chromosome X dans la bande Xp21, codant une protéine appelée Dystrophine qui est responsable du maintien de l'architecture cellulaire des muscles (Konagaya, Honda et al. 1995). Le spectre de ces atteintes comprend des dégénérescences musculaires progressives allant d'une forme asymptomatique à de formes plus graves. Les groupes les plus importants sont la dystrophie musculaire de Duchenne et dystrophie musculaire de Becker (Tuffery-Giraud, Beroud et al. 2009).

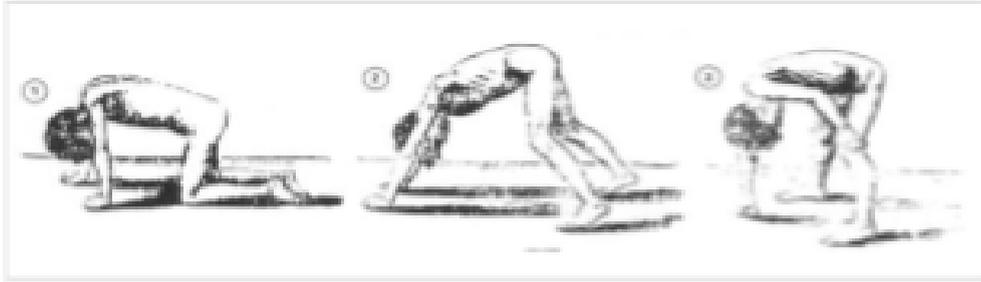
#### **I.3.2.1. Dystrophie musculaire de Duchenne**

La Dystrophie musculaire de Duchenne (DMD), doit son nom au Docteur Guillaume Duchenne qui en fit sa description en 1858 (Duchenne 1867). Elle est la plus fréquente et la plus sévère des dystrophinopathies, avec une incidence estimée à 1 naissance sur 3500 garçons et une prévalence de 3,5 sur 100 000 (Centers for Disease and Prevention 2009). Elle se manifeste essentiellement chez les hommes et atteint toutes les ethnies.

A la phase préclinique, il est décrit un retard à la marche. Ensuite apparaissent les premiers symptômes vers l'âge de 5 ou 6 ans avec des difficultés à la marche, un signe de Gowers (Figure 6), une accentuation de la lordose lombaire et une aggravation de la marche sur la pointe des pieds associée à une hypertrophie musculaire des mollets et une rétraction des tendons d'Achille. Les membres inférieurs et les muscles du tronc sont les plus touchés. Les patients perdent la marche vers 10 ans. La plupart des patients développent une cyphose-scoliose rapidement évolutive justifiant une stabilisation chirurgicale par arthrodeèse. Au niveau respiratoire, la croissance permet une évolution normale de la fonction respiratoire pendant les dix premières années de la vie. Ensuite l'évolution reste constante jusqu'à environ 16 ans, puis apparaît une dégradation progressive de celle-ci avec, en moyenne, une capacité vitale forcée égale à 20% de la théorique à 21 ans (Rideau, Jankowski et al. 1981).

Une atteinte cardiaque est quasiment constamment associée (Finder, Birnkrant et al. 2004, Kohler, Clarenbach et al. 2009). Dans 1/3 des cas, un retard mental est diagnostiqué. Depuis la généralisation de la ventilation mécanique. La principale cause de décès est

d'origine cardiaque et survient en moyenne à l'âge de 30 ans (Matsumura, Saito et al. 2011, Schram, Fournier et al. 2013).



*Figure 6 : Signe de Gowers, A manual of the nervous system, (Philadelphia, 1895).*

### **I.3.2.2. Dystrophie musculaire de Becker**

La dystrophie musculaire de Becker a été décrite pour la première fois en 1955 par le Professeur Becker comme une maladie distincte de la dystrophie musculaire de Duchenne (Becker and Kiener 1955). Elle est moins fréquente que les DMD et affecte principalement les garçons avec une incidence à la naissance de 1/ 31 000 garçons avec une prévalence de 6 sur 1 000 000 (Bushby, Thambyayah et al. 1991, Centers for Disease and Prevention 2009). Les symptômes dans la BMD sont moins graves et débutent plus tard que dans DMD, la progression est plus lente principalement caractérisée par une faiblesse progressive des muscles squelettiques. Les patients sont encore ambulants à 20 ans. Dans la BMD, les mutations entraînent l'expression d'une dystrophine tronquée mais fonctionnelle ou d'une quantité réduite de protéine. Par conséquent, les patients de BMD peuvent vivre jusqu'à 50ans. La cardiomyopathie dilatée représente la première cause de mortalité chez ces patients [Heffner, 2015].

### **I.3.2.3. Dystrophinopathies chez les filles et femmes porteuses DMD/BMD**

Les filles sont habituellement asymptomatiques mais un faible pourcentage de femmes conductrices présente des formes modérées de la maladie. L'âge moyen d'apparition des premiers symptômes est de 12 ans mais varie de 2 à 45 ans selon les formes. Les premiers signes sont une marche sur la pointe des pieds associée à une pseudo-hypertrophie des mollets. On constate une atteinte initiale des muscles de la ceinture pelvienne puis de la

ceinture scapulaire, les muscles distaux étant épargnés. Les crampes d'effort sont fréquentes et l'incapacité à la marche s'installe vers 30 ans. L'insuffisance respiratoire restrictive est de gravité variable et peut apparaître tardivement. En l'absence de traitement spécifique, le décès survient en moyenne vers 42 ans dû à une infection pulmonaire et/ou une défaillance cardiaque (Ammendola, Russo et al. 2006).

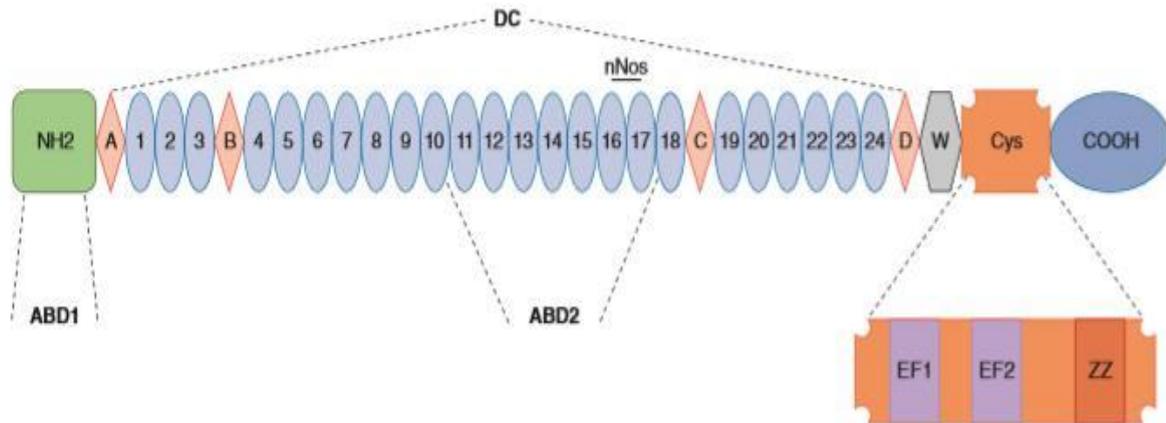
### **I.3.3. La dystrophine : protéine musculaire**

La dystrophine est une protéine subsarcolemmale, qui fait partie du complexe dystrophine-glycoprotéines, le DGC, formant un pont entre le cytosquelette (filament d'actine) et la matrice extracellulaire, et assurant un rôle structural important dans le maintien de l'intégrité membranaire durant les cycles répétés de contraction musculaire. Le DGC est également impliqué dans la signalisation cellulaire via l'interaction de plusieurs de ses composants, notamment la dystrophine avec des protéines de signalisation telles que l'oxyde nitrique synthétase neuronale (nNOS), la Grb2 et la cavéoline 3. (Le Rumeur et al, 2010). (figure .9)

#### **I.3.3.1. structure de la dystrophine musculaire et des partenaires**

La dystrophine est une grande protéine de 3685 acides aminés (427 kDa), en forme de bâtonnet qui possède une grande analogie structurale avec la spectrine et l'alpha -actinine (Le Rumeur et al ,2010). Elle est composée de quatre domaines distincts (fig.7) :

- Domaine N- terminal (NH<sub>2</sub>) contenant un domaine de liaison avec l'actine ABD1 (actine-Binding – domaine 1).
- Domaine central composé de motifs répétés (1 à 24) de type spectrine et de quatre zones charnières (A à D), il comporte un deuxième domaine de liaison à l'actine (ABD2) et un domaine de fixation pour l'isoforme neuronal de la nitric oxyde synthétase (nNOS). Le domaine WW est riche en cystéines (cys) et permet l'interaction de la dystrophine avec le complexe DGC (dystrophine glycoprotéin complex). Sites potentiels de fixation au calcium (EF1, EF2) et au zinc (ZZ).
- Domaine COOH : composé de deux hélices  $\alpha$  qui permettent la liaison de la dystrophine à la syntrophine et à la dystrobrevine, deux protéines cytoplasmiques sous sarcolemmiques. (Letrucq et al ,2015)



**Figure 7 : Représentation schématique de la structure de la dystrophine avec ses quatre domaines fonctionnels** (Letrucq et al ,2015).

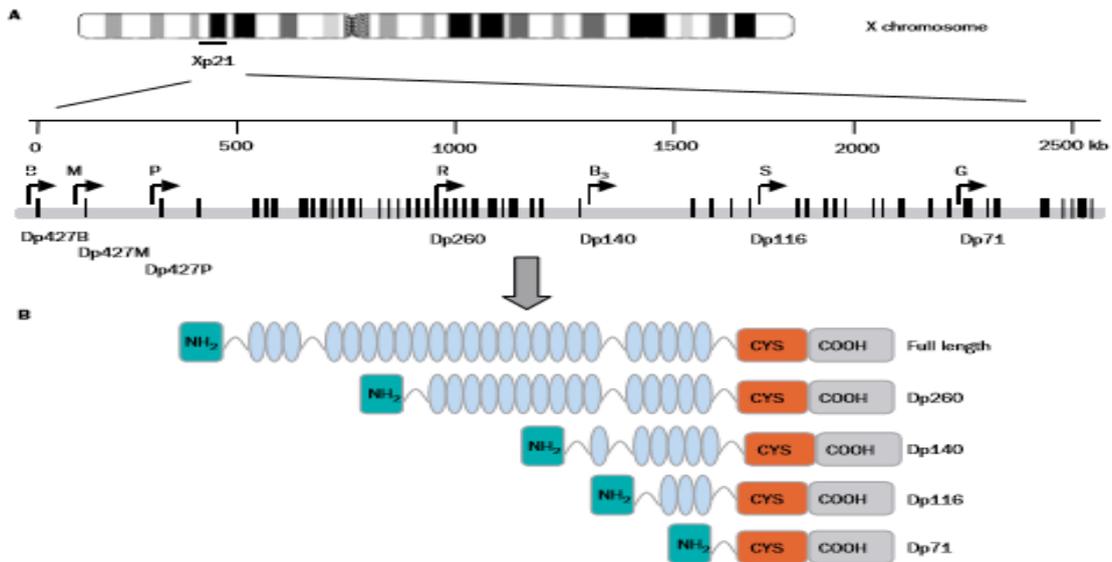
### I.3.3.2. Gène DMD et isoformes de la dystrophine

Le gène DMD localisé sur le bras court du chromosome X (XP21-2), est le plus grand gène humain connu à ce jour. Avec une taille de 2,2 millions de paires de base, il occupe 0.1% du génome humain et 1.5 % de la séquence du chromosome X. La durée de la transcription de ce gène immense est estimée à 16 heures. L'ARN messager long de 14 kilobases (kb) est composé de 79 exons qui ne constituent que 0.6% de la séquence globale de gène. Ainsi plus de 99% de gène est constitué d'introns, souvent de très grand de taille (>200kb) (Muntoni et al, 2003).

À l'extrémité 5' du gène, il existe trois promoteurs qui régulent l'expression d'isoformes pleine longueur de la dystrophine (427KDa) et qui diffèrent par leur exon 1 :

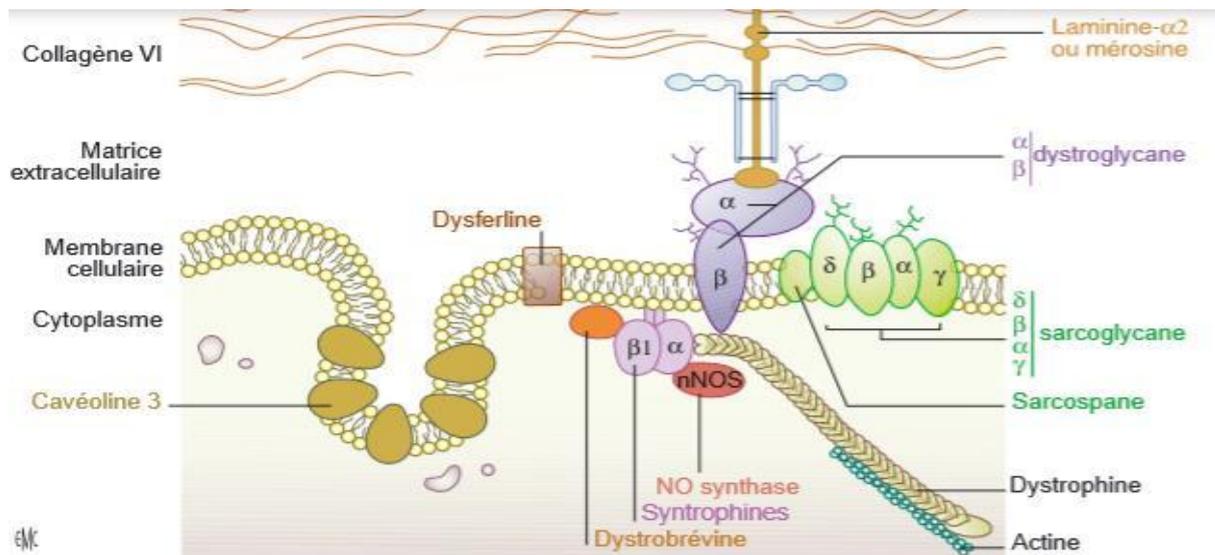
- l'isoforme cérébrale (promoteur B) dans les neurones du cortex et l'hippocampe,
- l'isoforme musculaire (promoteur M) exprimé dans les muscle squelettiques et cardiaques,
- et - l'isoforme spécifique des cellules de Purkinje (promoteur P) (Daoud et al ,2009).

Le gène de la dystrophine possède aussi quatre promoteurs internes qui donnent naissance à des protéines plus courtes dépourvues de l'extrémité N-terminale, mais possédant l'extrémité COOH-terminale. Pour chaque promoteur interne, un exon unique s'ajoute à l'exon 30, 45, 56 et 63 pour générer respectivement des protéines de 260KDa (Rétine), 140KDa (Cerveau), 116 KDa (cellule de Schwann) et 71 KDa (générale). (Fernandez et al ,2010) (Fig.8)



**Figure 8 : Représentation du gène DMD et d'une partie de ses différentes isoformes.** (Muntoni et al ,2003).

(A) Les flèches indiquent la position des promoteurs le long du gène DMD et les barres noires celle des exons ;  
 (B) Représentation des isoformes les plus décrits.



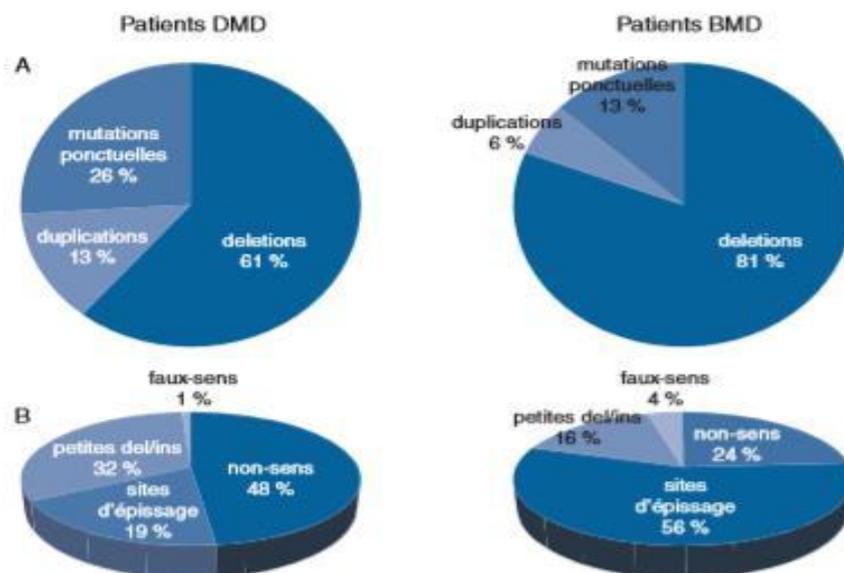
**Figure 9 : le complexe protéique associé à la dystrophine.** (Fernandez et al ,2010)

### **I.3.3.3. Mutation de gène DMD**

La majorité des mutations sont de grands réarrangements intragéniques correspondant à des délétions ou des duplications d'un ou plusieurs exons. Les délétions sont majoritaires (<60%des mutations) et sont retrouvées préférentiellement dans deux régions du gène (point chaud délétionnels) autour des exons 2 à 20 (15% des délétions) et des exons 45 à 55 (74%des délétions). Les duplications sont plus rares (13% et 6% des mutations DMD et BMD, respectivement et sont retrouvées plus fréquemment en début de gène (figure 10 A). (Tuffery et al .2009).

Contrairement aux grands réarrangements, les mutations ponctuelles sont réparties tout le long de la séquence codante et sont généralement privées, contribuant à la grande hétérogénéité allélique de la DMD. On observe que leur fréquence et leur nature diffèrent entre les formes cliniques. En effet, la majorité des mutations ponctuelle des patients DMD sont des mutations non-sens (48 %), tandis que les mutations ponctuelles chez les patients BMD consistent majoritairement en des mutations d'épissage (56%) (figure 10 B). (Tuffery et al ,2003. Trabelsi et al ,2014).

La production de dystrophine dépend de l'impact de la mutation sur le cadre de lecture (Règle de Monaco) et la fonctionnalité de la dystrophine anormale dépend des domaines impliqués (Règle de Chamberlain)



**Figure 10 : Les mutations du gène DMD chez les patients DMD et BMD. (Leturcq et al ,2015).**

(A) Fréquence des différents types de mutations (délétions, duplications, mutations ponctuelles) chez les patients DMD et BMD.

(B) fréquence des différents types de mutations ponctuelles (non -sens, épissage, petite délétion ou insertions de quelques nucléotides, faux – sens).

#### I.3.3.4. Physiopathologie :

Alors que l'origine génétique des dystrophinopathies est parfaitement identifiée, les mécanismes précis qui conduisent aux processus de nécrose, d'inflammation et de fibrose musculaires observés tout au long de la maladie restent partiellement inexpliqués. Au cours de la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD), non seulement la dystrophine fait défaut, mais l'expression des protéines constitutives du **CPAD** est également très réduite. Il est intéressant de rappeler que l'absence de quelque autre protéine du **CPAD** est responsable de l'apparition d'une dystrophie musculaire, d'expression phénotypique variable que ce soit par la sélectivité de l'atteinte musculaire, l'âge de survenue ou la présence d'une cardiomyopathie.

Du fait de l'absence de dystrophine, la membrane devient à la fois fragile et perméable : l'augmentation des concentrations de calcium intracellulaire, un des premiers biomarqueurs identifiés expérimentalement, déclenche un processus typique de nécrose et fibrose dans les différents types de muscles. La dérégulation de l'homéostasie calcique est un événement précoce dans la physiopathologie et relativement commune au sein des dystrophies musculaires. Plusieurs mécanismes principaux sont avancés pour expliquer la dégénérescence musculaire au cours de la DMD, à la fois chez les humains et dans les modèles animaux (Fig. 9) (Vallejo-Illarramendi A et al, 2014).

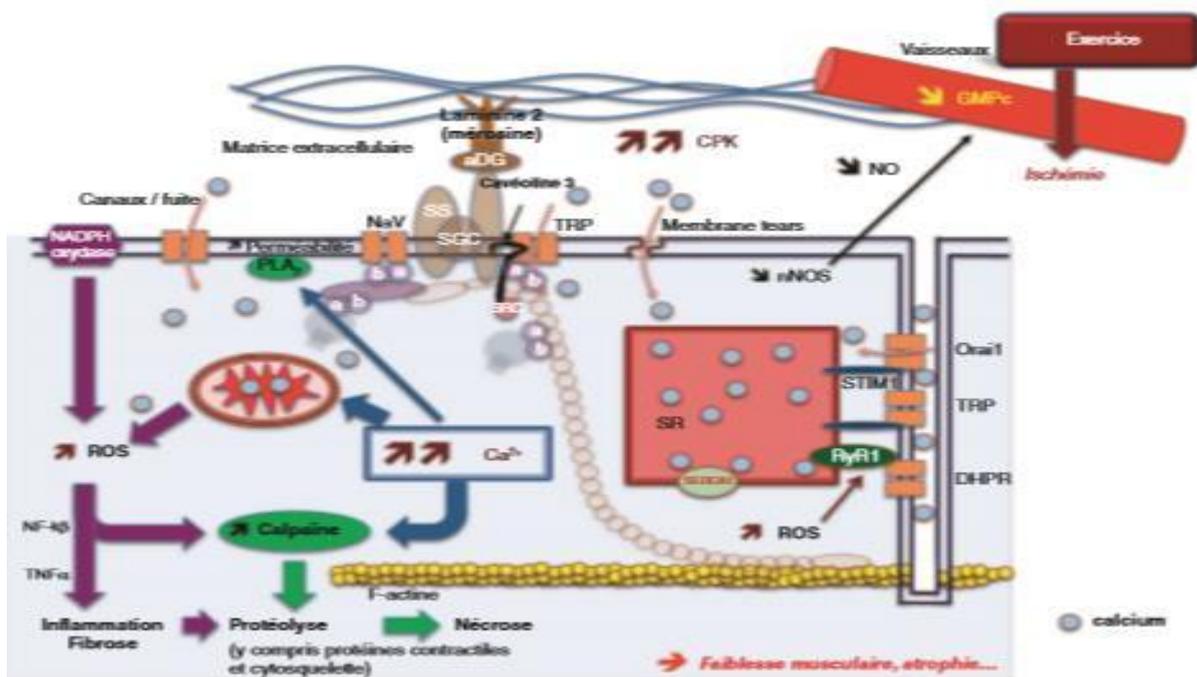


Figure 11 : Principaux mécanismes physiopathologiques (Y. Péréon et al.,2015).

#### ☐ Fragilité de la membrane vis-à-vis du stress mécanique

L'action mécanique de contraction des fibres musculaires génère des microlésions du sarcolemme, en l'absence du lien entre membrane de la fibre musculaire et myofibrilles que représentent la dystrophine et le CPAD (Campbell KP, 1995 ; Petrof BJ et al ; 1993). La fibre musculaire squelettique est grandement fragilisée par l'absence de ces protéines, le costamère n'assurant plus son rôle. Un biomarqueur fondamental de la maladie, présent dès la naissance bien avant l'apparition des premiers symptômes, est l'élévation importante de la créatine kinase (CK). Elle suggère fortement qu'il existe une perméabilité accrue de la membrane musculaire permettant aux enzymes solubles de passer librement hors de la cellule. Les

premières études de muscle squelettique en microscopie électronique au cours de la DMD ont montré des ruptures focales de la surface membranaire, associées à des contractures des myofibrilles avoisinantes. Ceci a conduit à formuler l'hypothèse que le dommage membranaire était une caractéristique précoce de l'affection et que l'entrée de calcium dans la cellule se faisait par ces points de rupture. Expérimentalement, cette perméabilité accrue de la membrane a été confirmée de façon répétée par l'utilisation de marqueurs tels que l'albumine ou le Bleu Evans (Hamer. PW et al, 2002).

### ❑ **Dérégulation de l'homéostasie calcique**

Le calcium cytosolique est augmenté au cours de la DMD, y compris au repos. Cette élévation des concentrations intracellulaires calciques provoque l'activation critique de plusieurs voies de signalisation, incluant la calpaïne, protéinase dépendant du calcium, qui dégrade les protéines et contribue à la mort cellulaire médiée par les mitochondries]. L'augmentation du calcium intracellulaire relève de plusieurs mécanismes qui s'associent (Allen DG et al, 2011) : les quatre principales voies d'entrée de calcium sont :

- les canaux de fuite naturellement présents à la surface du sarcolemme et dont l'ouverture est majorée au cours de la DMD ;
- les ruptures focales du sarcolemme ;
- les canaux mécanosensibles (stretch activated cation channels) du sarcolemme. Ces canaux mécanosensibles appartiennent à la vaste famille TRP (transient receptor potential) (Gailly P, 2012). Les canaux TRPC1 et TRPC4 sont exprimés sur le sarcolemme des fibres musculaires squelettiques et participent normalement à la régulation du calcium et du magnésium. Ils sont associés aux CPAD via l' $\alpha$ -syntrophine 1, dont l'expression est diminuée au cours de la DMD. Leur activité est augmentée au cours de la DMD, peut-être du fait d'étirements excessifs de la membrane plasmique qui n'est plus correctement rattachée aux myofibrilles par le costamère. D'autres canaux, tels que le TRPC3 ou le TRPV2 sont peut-être également impliqués.
- les canaux SOCE (store operated calcium entry) du système tubulaire transverse, qui gèrent le niveau de stockage du calcium dans le réticulum sarcoplasmique. Ce mécanisme, d'individualisation relativement récente, joue un rôle important dans l'homéostasie du calcium lors du couplage excitation-contraction, en particulier lors du développement ou du remodelage musculaire. Le système SOCE permet le réapprovisionnement du réticulum sarcoplasmique (RS) en calcium lors de contractions répétées, il repose sur le couplage de

deux structures : Orai1, canal hautement sélectif pour le calcium, localisé dans le système tubulaire transverse, et STIM1, protéine transmembranaire du réticulum sarcoplasmique. Tous deux sont également des membres de cette famille de canaux TRP. STIM1 fait office de détecteur de calcium et contrôle l'ouverture d'Orai1. Leur expression est très élevée (multipliée par trois) chez la souris mdx, avec une plus forte activité SOCE pouvant contribuer à l'élévation du calcium intracellulaire (Zhao X et al ; 2012).

D'autres protéines, dont l'expression est réduite dans la DMD, sont impliquées dans la dérégulation calcique : la calséquestrine qui suggère des capacités restreintes de séquestration du calcium dans le RS, la sarcaluménine qui régule la recapture du calcium vers le RS via la pompe ATPase calcique SERCA ou encore la calpastatine, inhibiteur endogène spécifique de la calpaïne (Vallejo-Illarramendi A et al., 2014).

## **I.4 Stratégie diagnostique**

Chez l'enfant, les deux principaux modes d'entrée dans la maladie sont l'apparition d'un déficit musculaire d'évolution progressive après l'acquisition de la marche ou la découverte fortuite et présymptomatique d'une forte élévation des créatines phosphokinases (CPK) (le plus souvent à l'occasion d'un bilan hépatique). Dès que le doute se pose au clinicien, un dosage des CPK est réalisé. L'électromyogramme et l'imagerie musculaire sont peu utilisés chez l'enfant et face à un tableau évocateur de dystrophie musculaire, une biopsie musculaire est souvent pratiquée en première intention pour confirmer le diagnostic de dystrophie musculaire et pratiquer des techniques d'immunohistochimie et de western blot pour identifier la protéine déficiente. Si le diagnostic de dystrophinopathie est confirmé, un prélèvement sanguin du patient est envoyé au laboratoire de génétique moléculaire pour un premier screening du gène par technique de polymérase chain reaction (PCR) semi-quantitative et multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). Si aucun grand remaniement (délétion ou duplication) n'est retrouvé, un échantillon de sang et si possible de muscle sont envoyés au laboratoire de référence régional pour une recherche de mutation ponctuelle. La stratégie utilisée actuellement consiste dans un premier temps en l'étude des transcrits puis le séquençage d'une partie ou de la totalité du gène. La découverte de la mutation chez le patient doit alors amener à la recherche de la mutation chez sa mère afin de préciser le conseil génétique.

Actuellement, face à un tableau très évocateur de DMD, les tests génétiques simples sont parfois réalisés en première intention ; la biopsie musculaire n'est alors plus indispensable pour le diagnostic mais elle permet d'évaluer la quantité résiduelle de dystrophine, qui est corrélée au pronostic.

Chez l'adulte, les tableaux cliniques sont généralement moins caractéristiques et les diagnostics différentiels plus nombreux (notamment les dystrophies musculaires des ceintures : sarcoglycanopathies). Un bilan généralement plus complet (électromyogramme, imagerie musculaire) est généralement pratiqué. La biopsie musculaire reste cependant l'examen clé du diagnostic.

Dans tous les cas, les explorations cardiaques (électrocardiogramme et échographie cardiaque) et respiratoires (épreuves fonctionnelles respiratoires) sont indispensables à l'évaluation initiale et au suivi des patients (Fernandez C et al.,2010).

## **I.5. Stratégies thérapeutiques**

Actuellement et depuis plusieurs années, de nombreuses pistes de recherche sont suivies pour tenter de mettre au point un traitement curatif de la DMD, avec trois axes de recherche prioritaires : le développement de nouveaux traitements pharmacologiques, la thérapie génique, qui intervient directement sur le gène de la dystrophine, la thérapie cellulaire qui consiste en la transplantation de cellules saines dans les muscles des patients atteints (Nelson SF et al. ,2009 ; Muntoni F ,2007).

### **I.5.1. Approche pharmacologique**

Plusieurs pistes sont explorées, parmi elles nous citons :

- L'inhibition de la myostatine : la myostatine est un peptide d'origine musculaire, membre de la famille Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), qui limite la croissance des cellules musculaires, en agissant de façon autocrine. L'inhibition de la myostatine améliore le phénotype du modèle murin de maladie de Duchenne, la souris mdx, et favorise la transplantation de myoblastes dans ce même modèle (Benabdallah BF et al.,2008 ; Parsons SA et al,2006). Pour l'instant il n'y a pas encore d'étude chez l'homme.

- La ciclosporine, molécule inhibitrice de la voie calcium/ calmoduline calcine urine dépendante, est aussi un immunosuppresseur. Elle limite l'évolution de la maladie chez les souris mdx (De Luca A et al ., 2005).

- La glutamine : la supplémentation orale par glutamine diminuerait la dégradation protéique chez les patients atteints de maladie de Duchenne mais une étude randomisée récente en double aveugle n'a pas montré de bénéfice fonctionnel significatif (Mok E et al., 2006 ; 2009).

### **I.5.2. Thérapie génique**

La très grande taille de la dystrophine a rendu difficile l'utilisation de la thérapie génique conventionnelle par transfection à l'aide de vecteurs viraux, car la capacité de 8 kilobases des vecteurs adénoviraux classiques est insuffisante pour contenir l'ADN complémentaire entier de 14 kilobases de la dystrophine. Même si actuellement les nouveaux vecteurs plasmides non viraux peuvent contenir de larges inserts, leur stratégie de délivrance de l'ADNc aux myocytes est compliquée et il est apparu que l'une des perspectives thérapeutiques crédibles était la délivrance par un adénovirus d'un transgène de taille réduite mais aboutissant à une protéine fonctionnelle, appelée mini- ou micro-dystrophine. Un minitranscrit de 6,2 kilobases mimant une délétion des exons 17-48, décrite par England chez un BMD peu atteint, a été généré (England SB et al., 1990). La minidystrophine qui en résulte semble complètement fonctionnelle (Harper SQ et al., 2002). La délivrance de ces minidystrophines se fait chez la souris par voie intramusculaire. Les principaux problèmes restent la mise au point d'une voie d'administration plus facile, la possibilité d'une réponse auto-immune dans le muscle dystrophique qui est souvent inflammatoire et le risque de mutagenèse puisqu'une fraction des vecteurs adénoviraux s'intègre au génome (Van Deutekom JC, 2003). Actuellement, ces stratégies sont un peu délaissées au profit de l'exon skipping ou saut d'exons et la lecture forcée.

### **I.5.3. Thérapie cellulaire**

Le but de la thérapie cellulaire est d'apporter des cellules provenant d'un donneur sain et donc porteuses d'un gène de la dystrophine normal dans les muscles de patients atteints de dystrophinopathie sévère afin que ces cellules se différencient in situ en cellules musculaires qui auraient alors une dystrophine normale. Il peut s'agir d'injection de précurseurs musculaires (myoblastes) directement dans les muscles des patients atteints (Gussoni E et al., 1990 ; Skuk D, 2006) et peut-être à l'avenir d'injections intra-artérielles de mésangioblastes (cellules souches associées aux vaisseaux) (Sampaolesi M et al., 2006) ou de l'injection de cellules souches embryonnaires pluripotentes qui ont la capacité de se différencier en cellules musculaires à leur contact (Darabi R, 2008).

# **Matériels et méthodes**

## **II.1. matériels biologiques**

Notre étude a porté sur des biopsies musculaires cryoconservées à une température de  $-80^{\circ}\text{C}$ , issues de patients présentant des signes cliniques de dystrophies musculaires. L'examen clinique s'est déroulé au niveau du service de neurologie du centre hospitalo-universitaire (C.H.U) MUSTAPHA BACHA.

## **II.2. prélèvement des échantillons**

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

L'incision doit être faite dans le sens de l'arrangement longitudinal des fibres musculaires et doit comporter suffisamment de tissu qui est séparé en plusieurs fragments. Les échantillons sont par la suite rapidement placés dans un récipient sous froid (glaçon) et menu d'une fermeture hermétique pour être transporté au laboratoire ; dans notre étude, il s'agit au service d'anatomie et de cytologie pathologique du centre de Pierre et Marie Curie (CPMC) pour une analyse tissulaire approfondie.

## **II.3. identification des échantillons**

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

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

- l'identité du patient : nom, prénom, âge et sexe.
- le siège, la date et le nom du médecin préleveur.
- l'âge du début et le mode d'évolution de la maladie.
- les symptômes cliniques.

- les données paracliniques : dosages enzymatiques, imagerie musculaire.
- les hypothèses diagnostiques.

## **II.4 Fixation et cryoconservation des prélèvements**

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

## **II.5. Confections des coupes au cryostat**

Les fragments de tissu portés sur le support de liège sont fixés sur un support de métal et enrobés par l'OCT. L'ensemble est placé dans le cryostat réglé à  $-20^{\circ}\text{C}$  pour que le tout devienne un seul bloc dur. Des coupes de 5 à 7  $\mu\text{m}$  d'épaisseur sont confectionnées, puis elles sont étalées sur des lamelles ou des lames silanisées et mises à sécher à l'air libre. Une coloration rapide au Bleu de toluidine est réalisée pour déterminer le sens des fibres.

Dans le cas où la coloration est prévue les heures qui suivent la coupe, les lames sont conservées à  $+4^{\circ}\text{C}$ , dans le cas où elle est programmée ultérieurement, les lames et les lamelles sont emballées dans un papier aluminium et conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## **II.6. Méthodes d'étude morphologique**

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

### **II.6.1. Coloration à l'hématoxyline-Eosine**

C'est une technique de coloration topographique, c'est la technique la plus utilisée en histologie animale et en anatomie pathologique de routine. L'hématoxyline colore les

structures acides en bleu violet, et l'éosine colore les structures basiques en rose .dans une cellule animale, la plupart des structures acides se concentrent dans le noyau sous forme d'ADN nucléaire, alors que la plupart des composants cytoplasmiques sont de nature basique. Ainsi les noyaux apparaissent bleu-violet tandis que les cytoplasmes sont colorés en rose sauf s'ils contiennent une grande quantité d'ARN, prenant alors, dans ce cas la coloration violette. Par conséquent les lames sont incubées dans l'hématoxyline pendant 10 minutes puis dans l'éosine pendant 5 minutes (annexe 4).

## **II.6.2. Coloration au Trichrome de Gomori**

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

Après l'immersion dans l'hématoxyline, les lames sont incubées dans le Trichrome de Gomori qui sera suivie d'un lavage avec de l'eau acidifiée suivi d'une déshydratation et un montage (annexe 4).

## **II.7. Méthodes d'étude biochimique**

Les techniques oxydatives sont le lien entre la morphologie et la biochimie du tissu .elles étudient l'activité des différents complexes de la chaines respiratoires mitochondriale sont plus fortement colorées par ces techniques. Deux techniques inclus principalement les colorations des enzymes sont utilisées :

### **II.7.1. Coloration de la succinate Déshydrogénase (SDH)**

Sur des coupes de tissu on fait agir une solution de Succinate de Sodium (substrat) et le nitrobleu de tetrazolium de couleur jaune pour mettre en évidence l'activité métabolique oxydative de la succinate déshydrogénase lors de l'incubation des coupes à 37°C dans la solution SDH, le Succinate de Sodium est transformé par l'enzyme en fumarate avec libération d'hydrogène. Les atomes d'hydrogène se combinent au nitrobleu de tétrazolium qui vire du jaune au bleu dans les zones de tissu qui contiennent l'enzyme tandis que les zones tissulaires dépourvues de l'enzyme restent de couleur jaune (annexe4).

## **II.7.2. Coloration du Nicotinamide Adénine dinucléotide tétrazolium réductase (NADH-TR)**

Le NADH-TR enzyme oxydative présente dans les mitochondries, le réticulum sarcoplasmique et les tubules T. Au cours de l'incubation des coupes dans la solution NADH-TR à 37 C°, l'activité enzymatique de ce dernier libère l'hydrogène du substrat dont l'hydrogène libéré est transféré au tétrazolium. Avec l'addition de l'hydrogène, le tétrazolium est converti en colorant en colorant formazan bleu pourpre mis en évidence la répartition de l'activité enzymatique dans le réseau inter myofibrillaire. (Annexe 4).

## **II.8. Méthode d'étude immunohistochimique**

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

L'utilisation d'un panel d'anticorps primaires monoclonaux (Tableau N°2) de souris dirigée contre les trois domaines de la dystrophine et d'autre protéine musculaire est nécessaire pour identifier les réactions faussement Négative ; pour la différenciation des dystrophies musculaires et aussi pour orienter l'analyse des mutations génétique lors du diagnostic.

Les anticorps sont originaires du laboratoire Novocastra (Leica Biosystèmes).

Ils sont commercialisés sous forme lyophilisée .la liquéfaction est faite par un volume de 1 ml d'eau distillée stérile juste avant l'utilisation pour la première fois, le produit doit se conserver à +4C°.

**Tableau 2** : liste des anticorps utilisés.

Anti gène	Anti corps	Nomenclature	Clone	Dilution
<p>La dystrophine est une protéine sub-sarcolemmale de 227 KDa joue un rôle primordial dans le maintien de l'architecture cellulaire</p> <p>La <math>\alpha</math>, <math>\beta</math>, <math>\gamma</math> et <math>\delta</math> sarcoglycanes sont des protéines transmembranaires de 50, 43,43,35 KDa se lient entre elle et fonctionnent comme une protéine unique et se lient à la <math>\beta</math>-dystroglycane de 35KDa formant un lien entre la dystrophine et MEC.</p>	Anti -dystrophine (domaine centrale)	NCL-Dys1	Dy4/6D3	Pure
	Anti -dystrophine (C-ter)	NCL-Dys2	Dy8/6C5	1 :10
	Anti -dystrophine (N-ter)	NCL-Dys3	Dy10/12B2	1 :10
		NCL-a-SARC	Ad1/20 A6	1 :10
	Anti- $\alpha$ -sarcoglycane	NCL-b-SARC	$\beta$ Sarc/5B1	1 :50
	Anti- $\beta$ -sarcoglycane	NCL-g- SARC	35DAG/21B5	1 :50
	Anti - $\gamma$ -sarcoglycane	NCL-d-SARC	Sarc3/12C1	1 :50
	Anti- $\delta$ -sarcoglycane	NCL-b-DG	43DAG1/8D5	1 :50
	Anti- $\beta$ -dystroglycane			
	<p>La chaîne lourde de myosine de 200KDa dans laquelle se trouve l'activité ATPasique de la molécule qui fournit l'énergie nécessaire à la contraction.</p>	Anti chaîne lourde de la myosine rapide	NCL-MHCf	WB-MHCf
Anti chaîne lourde de la myosine lente		NCL-MHCs	WB-MHCs	1 :20

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

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

La mise en évidence de l'activité peroxydase est réalisée par incubation des lames avec un substrat chromogène : 3-3' diaminobenzidine tétrachloride (DAB). Après la révélation les lames sont rincées dans l'eau distillée pendant 10 minutes. Une courte coloration est réalisée à l'hématoxyline afin de mettre en évidence les noyaux (annexe 4).

## **II.10. Montage des coupes entre lames et lamelles**

Le montage des coupes se fait entre lames et lamelles avec un milieu de montage permanent aqueux ou non aqueux, constituant un revêtement solide qui facilite la manipulation et la conservation.

Le milieu de montage aqueux (faramount aqueous mounting medium) renferme l'azide de sodium ( $\text{NaN}_3$ ) 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 à l'obscurité et à température ambiante.

## **II.11. Observation et acquisition d'images numérique**

Les coupes sont analysées sous microscopie optique Zeiss (Axioscop40) et sont photographiées avec un appareil photo numérique adapté (LeiKa Lazes).

### **III. Traitement des données et analyse statistique des résultats**

Les données d'étude histologique et immunohistochimique des patient (N=28) ont été représenté sous forme de tableaux et figures puis analysées par des logiciels PAST (vers 1,37) et SYSTAT (vers, 12, spss2009).

La corrélation est positive lorsque les chiffres se rapprochent de +1 et elle est négative lorsque les chiffres se rapprochent de -1.

La corrélation est absente lorsque les chiffres égale à 0 et se rapprochent de 0 dans l'intervalle de (-0,5 ; +0.5).

La corrélation a été conforté à une probabilité, elle est significative lorsque les chiffres sont  $<0.05$  et elle n'est pas significative lorsque les chiffres sont  $>0.05$ .

# Résultats

## 1. Données épidémiologiques

### 1.1. Age et sexe

Notre population d'étude est représentée par 28 patients dont 2 de sexe féminin (une femme de 50 ans une fillette de 13 ans) et 26 patients de sexe masculin dont l'âge va de 3 ans à 26 ans. La moyenne d'âge est de 13 ans. (Voir annexe 5)

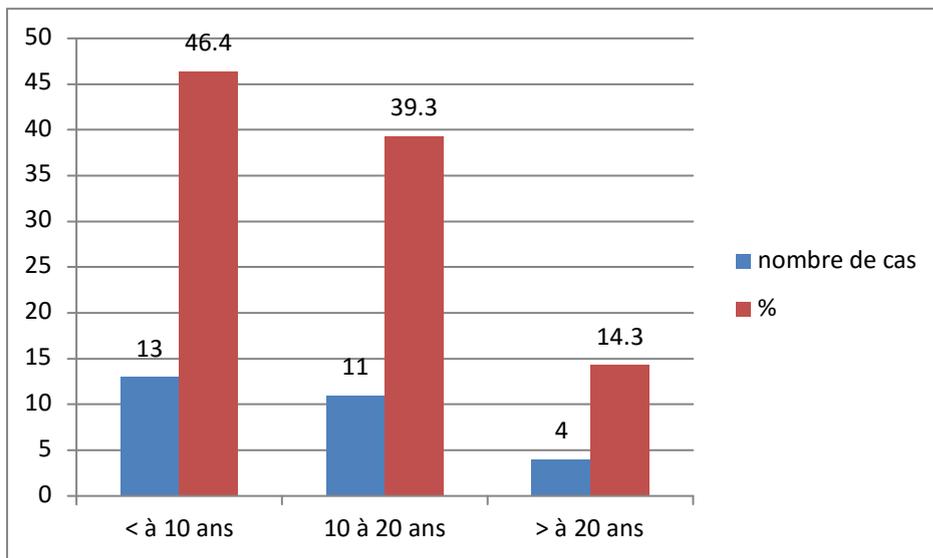


Figure 12 : Répartition des patients selon leur âge au moment de la biopsie musculaire

### 1.2. Début des symptômes

Le début de la maladie va de l'âge de 2 ans à 30 ans. L'âge moyen du début de la maladie est de 6 ans.

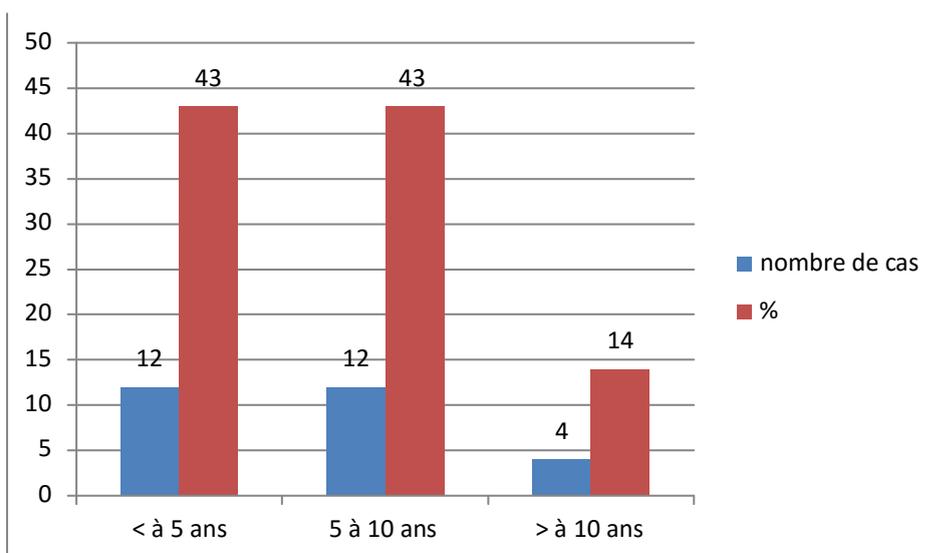


Figure 13 : Répartition des patients selon leur âge au début de la maladie

### 1.3. Taux des enzymes musculaires CPK

Les taux de CPK sont élevés et dans plus de la moitié des cas ils dépassent 20 fois les taux normaux

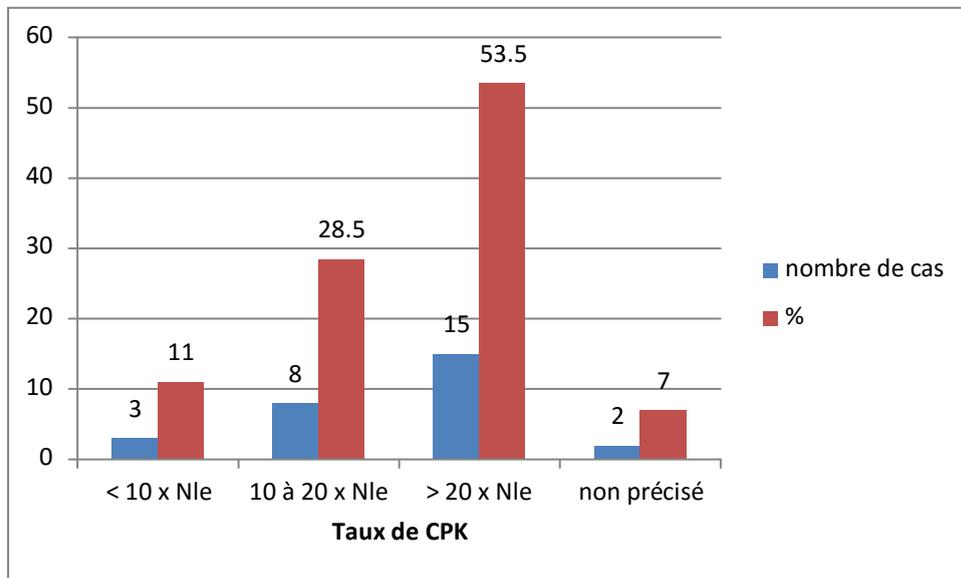


Figure 14 : Répartition des patients selon le taux des enzymes CPK

### 1.4. Complications

Tous les patients présentent une amyotrophie des muscles ceintures soit des membres inférieurs soit des quatre membres.

Deux patients présentent des complications cardiaques à type de cardiomyopathie dilatée : la femme de 50 ans et un garçon de 13 ans décédé des suites de sa cardiopathie.

Un seul patient a perdu la capacité de marcher à l'âge de 10 ans (en fauteuil roulant).

## 2. Données Morphologiques

### 2.1. Le processus dystrophique

Toutes les biopsies musculaires de notre série présentent des modifications dystrophiques dans l'organisation du tissu musculaire (fig. 12).

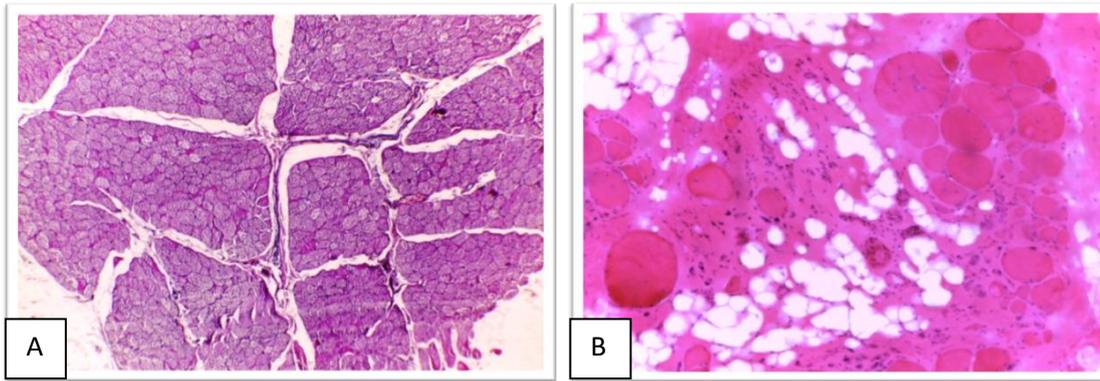


Figure 15 : (A) Le muscle squelettique normal. Les faisceaux sont entourés du périnysium dans lequel passent des artères et des veines qui forment le réseau capillaire au niveau de l'endomysium. (B) HE (Gx10) : Processus dystrophique sévère. Importante fibroadipose entre les fibres musculaires raréfiées.

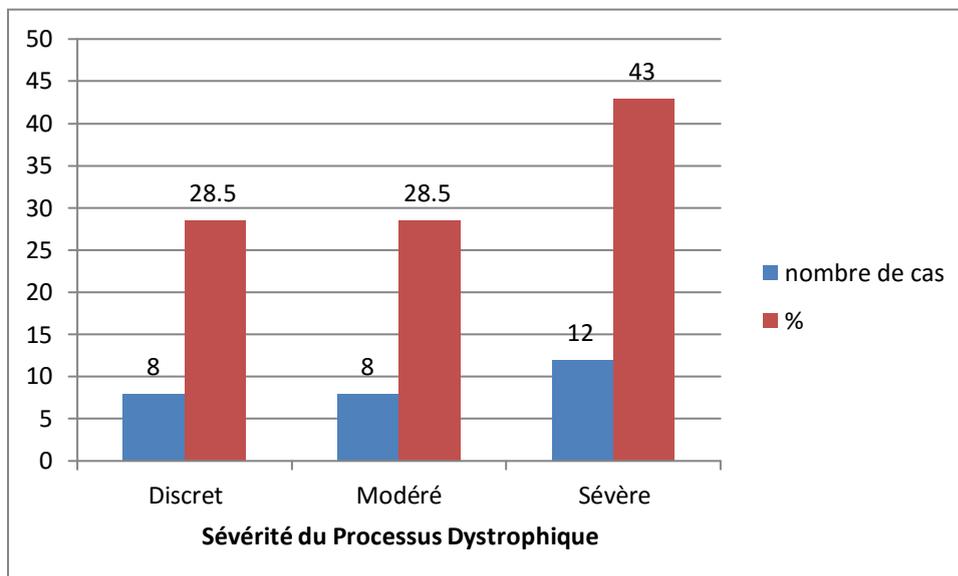


Figure16 : Répartition des cas selon la sévérité du processus dystrophique

Près de la moitié des cas ont sur leur biopsie un processus dystrophique très évolué et sévère

## 2.2. Les lésions élémentaires du processus dystrophique

### 2.2.1. Inégalité de calibre des fibres musculaires

L'inégalité de diamètre des fibres musculaires est présente dans tous les échantillons biopsiques des patients. Cette inégalité est d'autant plus marquée avec la présence conjointe de fibres atrophiques, de fibres fragmentées et de fibres hypertrophiques. En plus de la modification de la forme et de la taille des fibres musculaire dystrophique un autre aspect anormal est observé, il comprend la segmentation de certaines fibres.

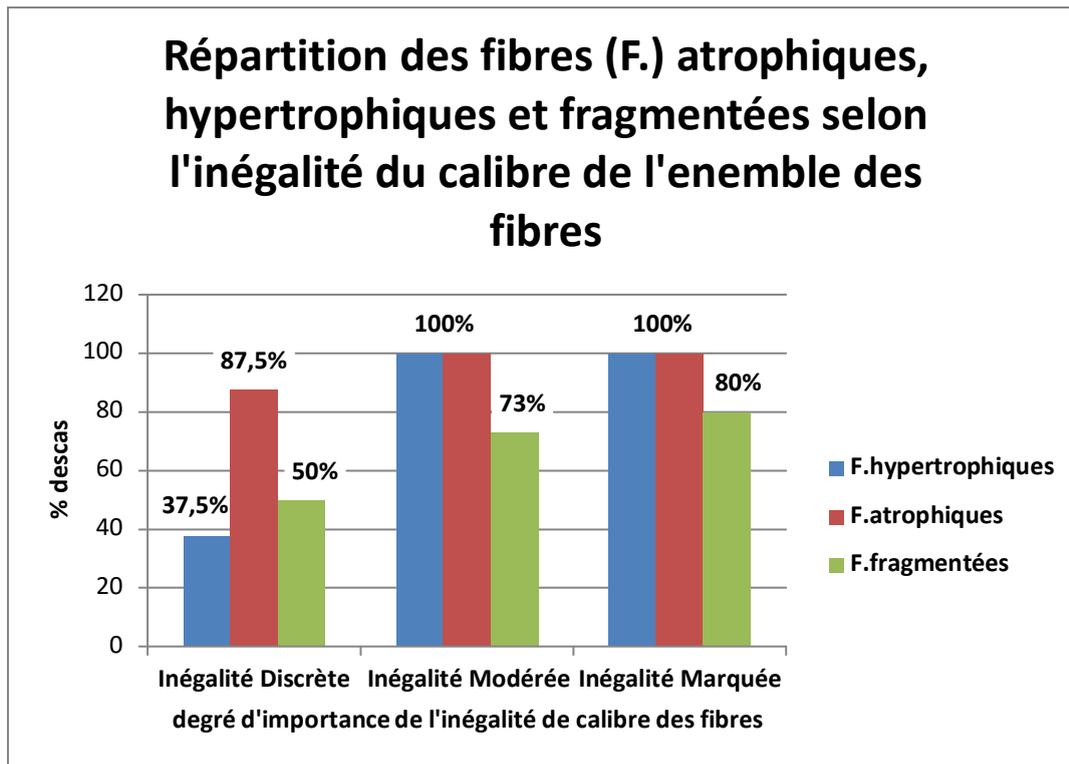


Figure 17 : Répartition des fibres atrophiques, hypertrophiques et fragmentées selon l'importance de l'inégalité de calibre des fibres musculaires

### 2.2.2. La nécrose

Des fibres nécrosées pales massivement infiltrées de macrophages, envahissent le tissu musculaire dystrophique des certaines régions (**fig. 18 A**). Des fibres en nécrose sont retrouvées sur 26 biopsies, soit 93% des cas.

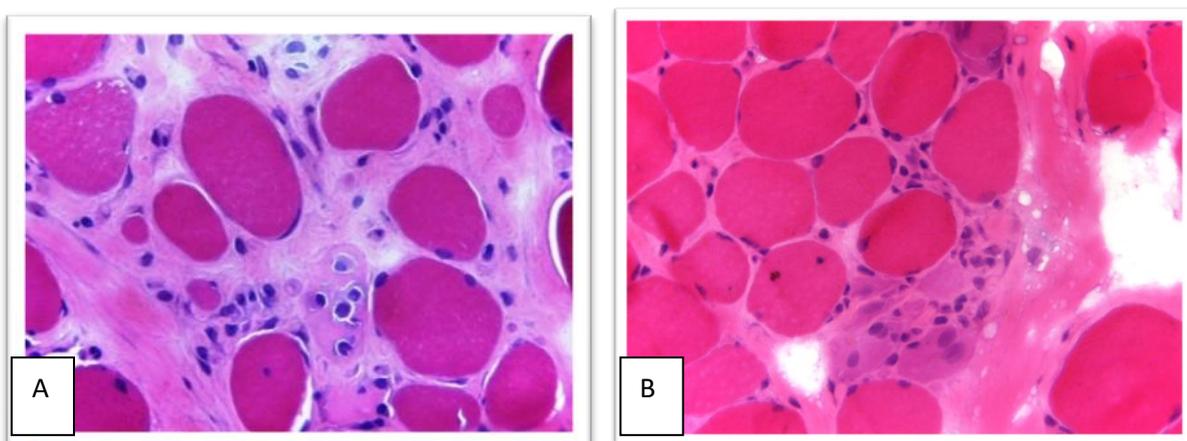


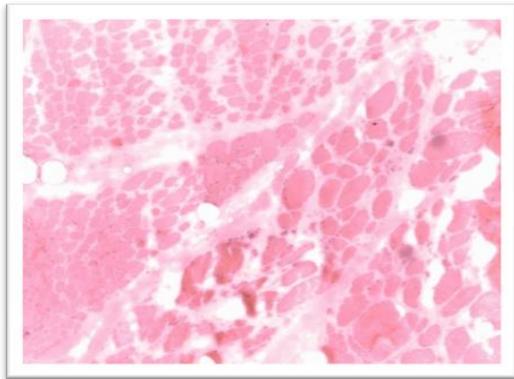
Figure 18 : (A) fibres musculaires nécrosées pales massivement infiltrées de macrophages (  ) et fibrose dissociant l'ensemble des fibres(\*). (B) : Groupe de fibres en régénération dont le cytoplasme est basophile et le noyau vésiculeux et nucléolé.

### 2.2.3. La régénération

Des fibres musculaires en régénération sont observées sur 16 biopsies musculaires soit 57 % de notre effectif de 28 patients. Les fibres en régénération sont souvent regroupées, reconnues par leurs petites tailles, leurs cytoplasmes basophiles et leurs noyaux vésiculeux et nucléolés. (fig. . 18 B)

### 2.2.4. La Fibrose interstitielle

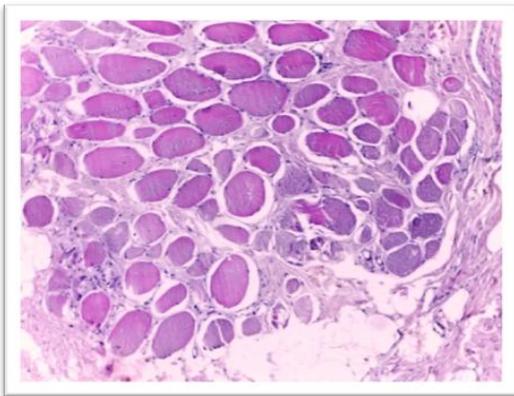
**La fibrose endomysiale** est observée dans 92 % des cas. Elle est (1) discrète (moins de 25% de la surface musculaire analysée) dans 28,5% des cas, (2) modérée (entre 25 et 50% de la surface musculaire) dans 25% des cas et (3) marquée ( plus de 50% de la surface musculaire) dans 39,5% des cas restants. **La Fibroadipose périnysiale** est notée chez 15 patients de la population globale, soit 53.6%



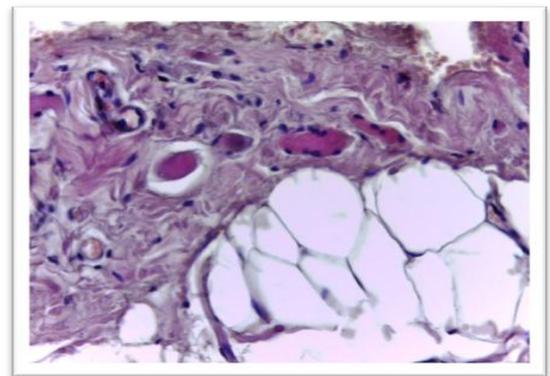
A



B

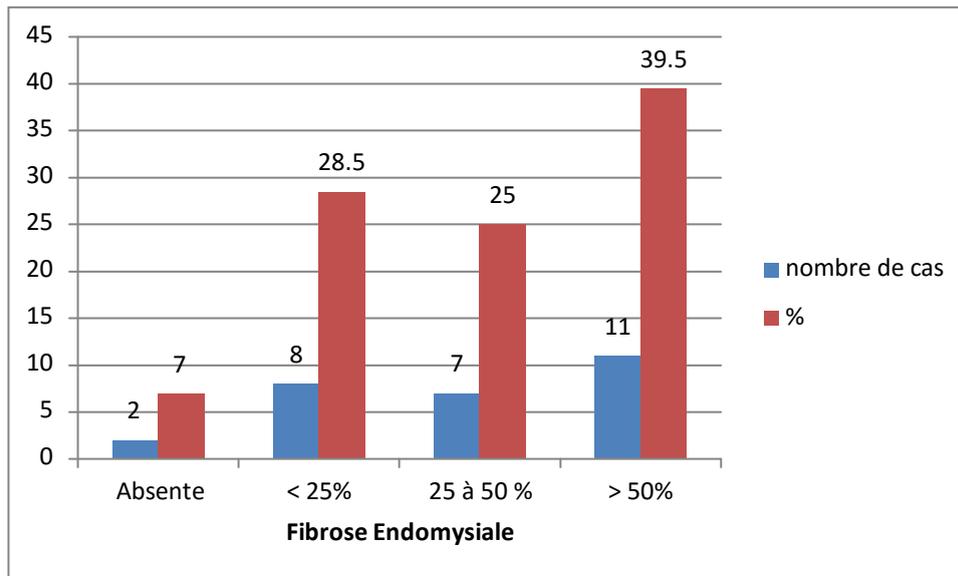


C



D

*Figure 19 : Processus dystrophique de sévérité croissante. (A) (Gx10) et (B) (Gx40) HE en congélation : Inégalité de calibre des fibres musculaires (fibres atrophiques arrondies et fibres hypertrophiques) et Fibrose endomysiale modérée. (C) (Gx10) et (D) (Gx40) HE en paraffine : Raréfaction des fibres musculaires remplacées par une fibrose endomysiale marquée et adipose périnysiale.*



**Figure 20 : Répartition des cas selon l'importance de la fibrose endomysiale**

### **3. Etude de la distribution de la dystrophine dans les dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker**

Les biopsies musculaires des cas pathologiques suspects de dystrophie musculaire de Duchenne et de Becker ont fait l'objet d'une étude approfondie par l'immunomarquage de la dystrophine, Il est nécessaire, pour une étude immunohistochimique fiable, d'utiliser trois anticorps dirigés contre les parties N-terminale (DYS 3), centrale (DYS 1) et C-terminale (DYS 2) de la dystrophine.

Chez le sujet normal, le marquage obtenu est membranaire, continu et intense sur l'ensemble du sarcolemme. Chez un patient atteint de DMD de façon générale, le domaine central et le domaine N-terminal de la dystrophine sont complètement absents et le domaine C-terminal est très faiblement présent.

Dans notre série, l'expression des dystrophines est résumée dans la figure 21

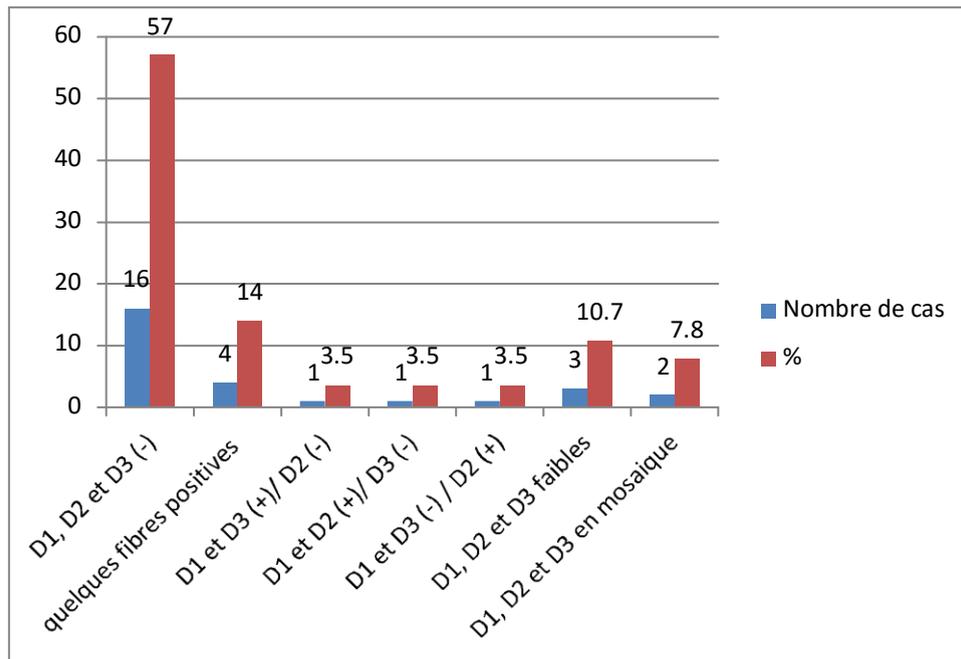


Figure 21 : Répartition des cas selon l'expression des différentes dystrophines (D1, D2 et D3)

La corrélation des différents modes d'expression des dystrophines en fonction de la sévérité du processus dystrophique montre la négativité des 3 dystrophines s'accompagne d'un processus dystrophique sévère dans 62,5% des cas.

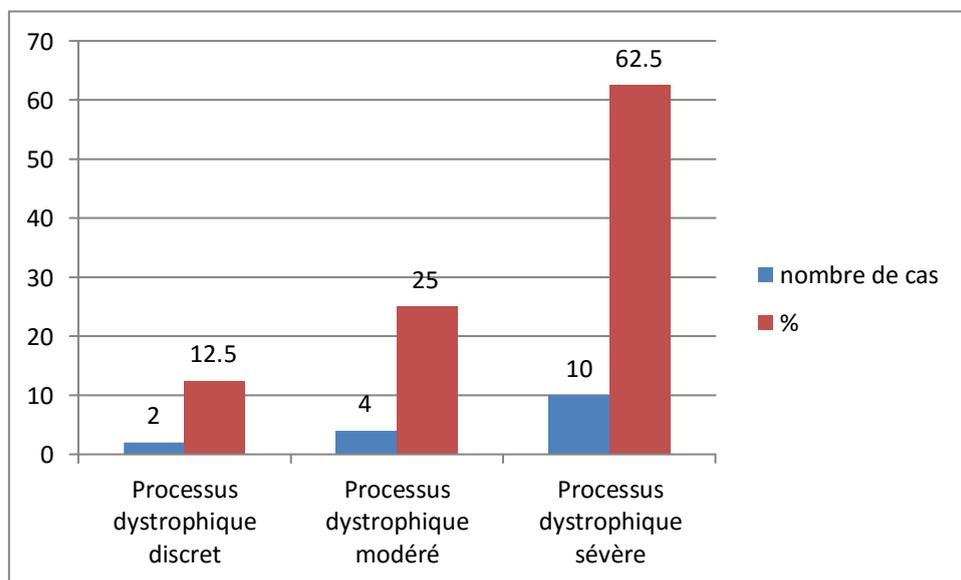
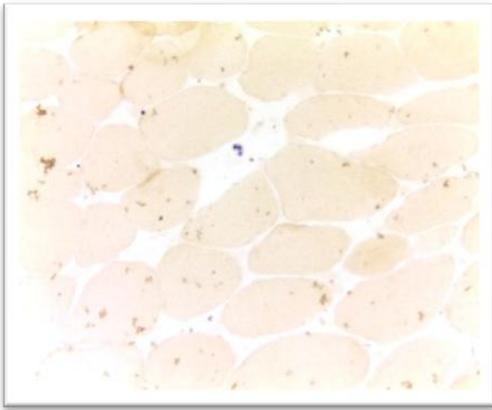
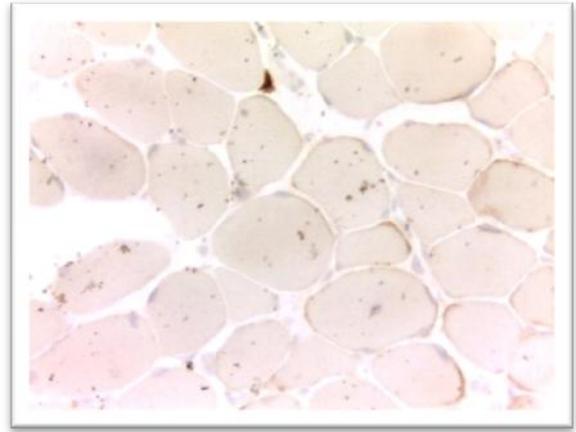


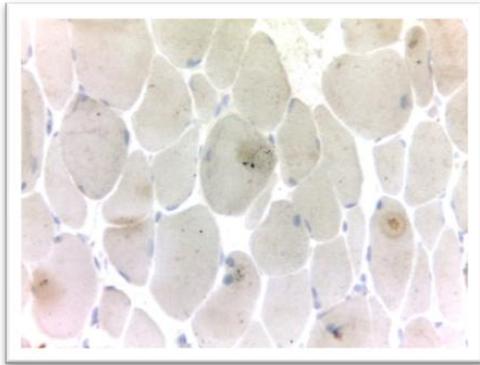
Figure 22 : Répartition des cas dystrophines-triples négatifs selon la sévérité du processus dystrophique



**A**

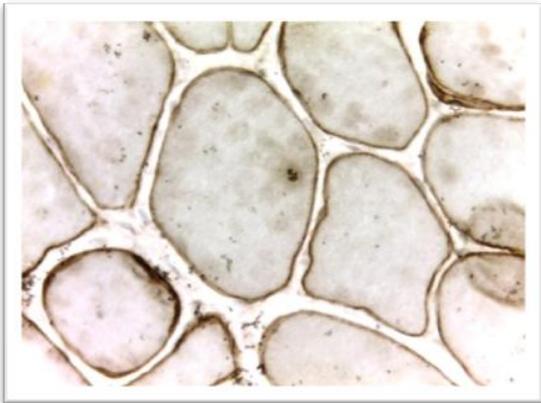


**B**

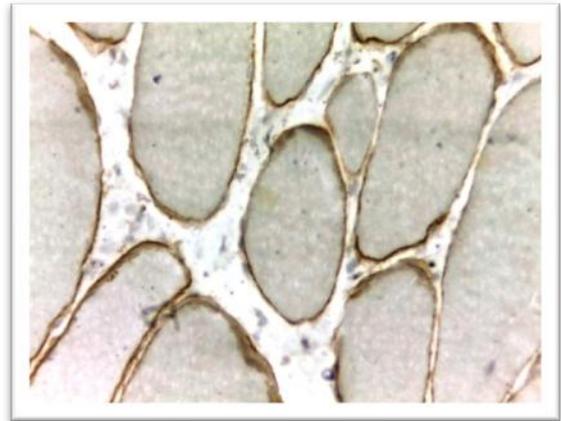


**C**

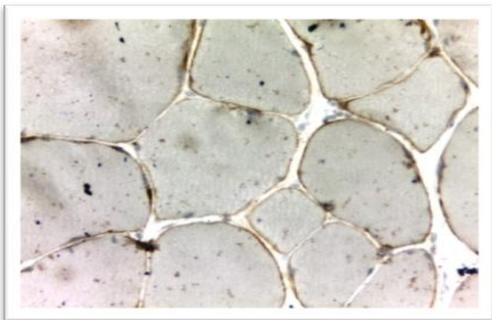
*Figure: Analyse IHC des dystrophines chez un patient DMD. (A) (Gx40) Dystrophine 1 : Absence de positivité membranaire. (B) (Gx40) Dystrophine 2 : persistance d'une faible positivité discontinue de quelques fibres dites révertantes. (C) (Gx40) Dystrophine 3 : Absence de positivité membranaire.*



Dys 1 (+) hétérogène

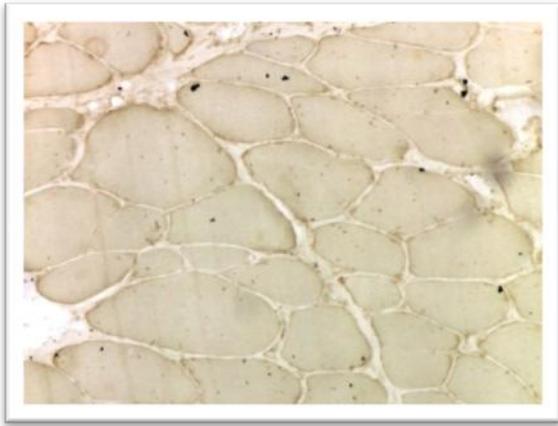


Dys 2 (+) hétérogène

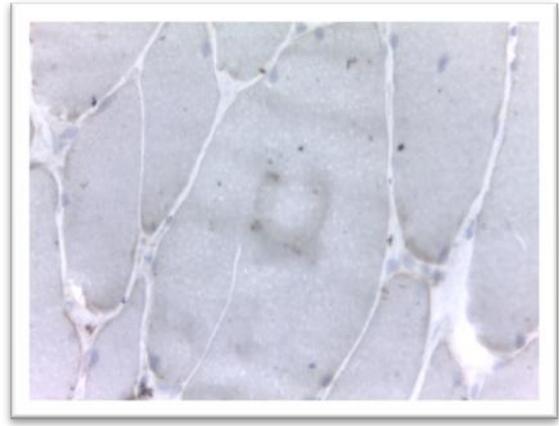


Dys 3 (+) hétérogène

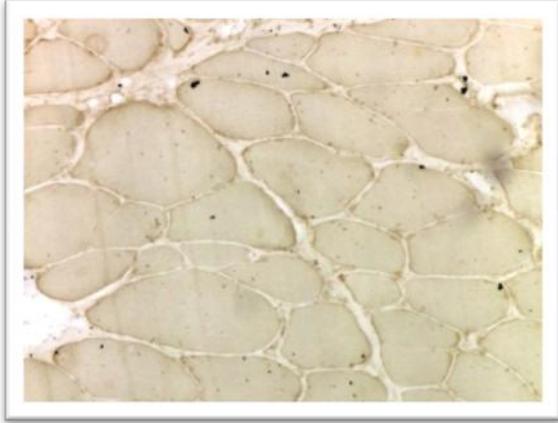
*Figure: Les Dystrophines 1, 2 et 3 sont faibles hétérogènes (positivité membranaire d'intensité faible et discontinue).*



Dys 1 (-)

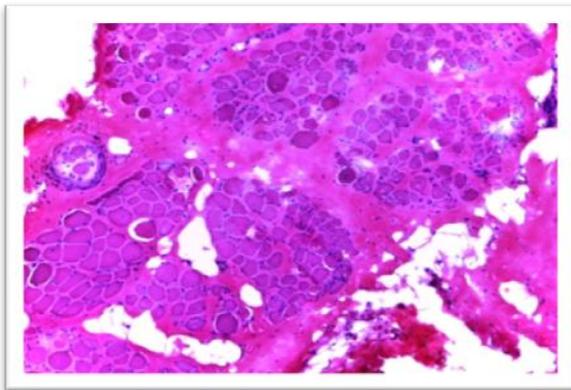


Dys 2(-)

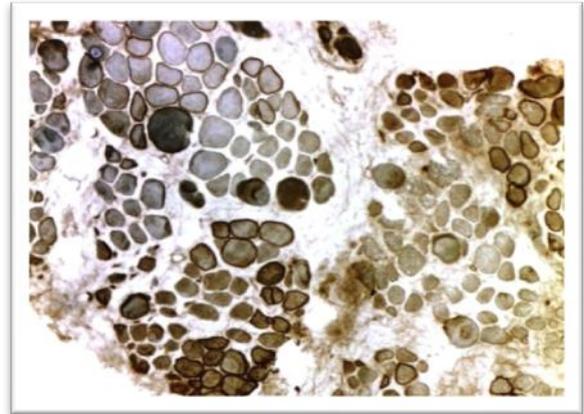


Dys 3 (-)

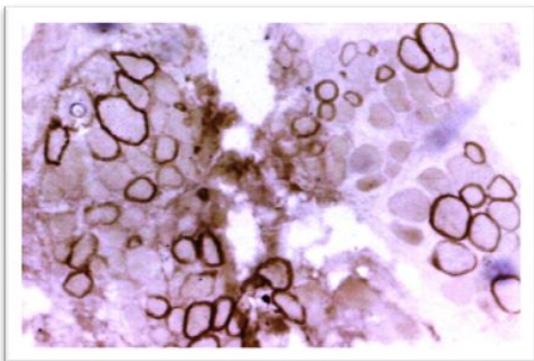
*Figure : Les Dystrophines 1, 2 et 3 sont négatives.*



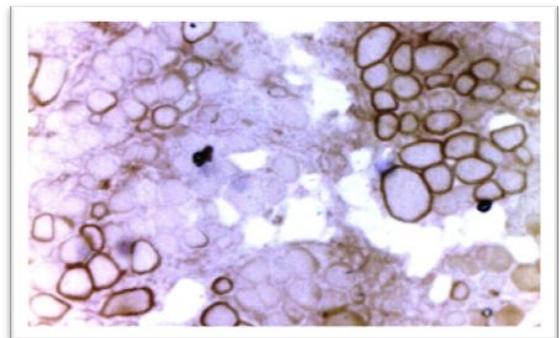
HE aspect dystrophique



Dys 1 (+) en mosaïque



Dys 2 (+) en mosaïque



Dys 3 (+) en mosaïque

*Figure 26 : expression en mosaïque des dystrophines 1, 2 et 3 (alternances de clusters de fm positives et de fm négatives : la patiente est porteuse symptomatique de dystrophinopathie = diagnostic différentiel avec sarcoglycanopathie*

#### 4. Classification phénotypique des patients

Selon les données de l'immunohistochimie corrélées aux données cliniques, les patients de notre série sont classés comme suit :

- En DMD : les cas avec négativité totale des dystrophines, les cas avec quelques fibres révertantes et les cas avec deux domaines éteints de la dystrophine, au total : 21 cas
- En DMB : les cas avec positivité faible et discontinue des 3 dystrophines et les cas avec la négativité d'un seul domaine de la dystrophine, au total : 5 cas
- En Porteuses symptomatiques : les deux cas de sexe féminin avec une expression en mosaïque des dystrophines

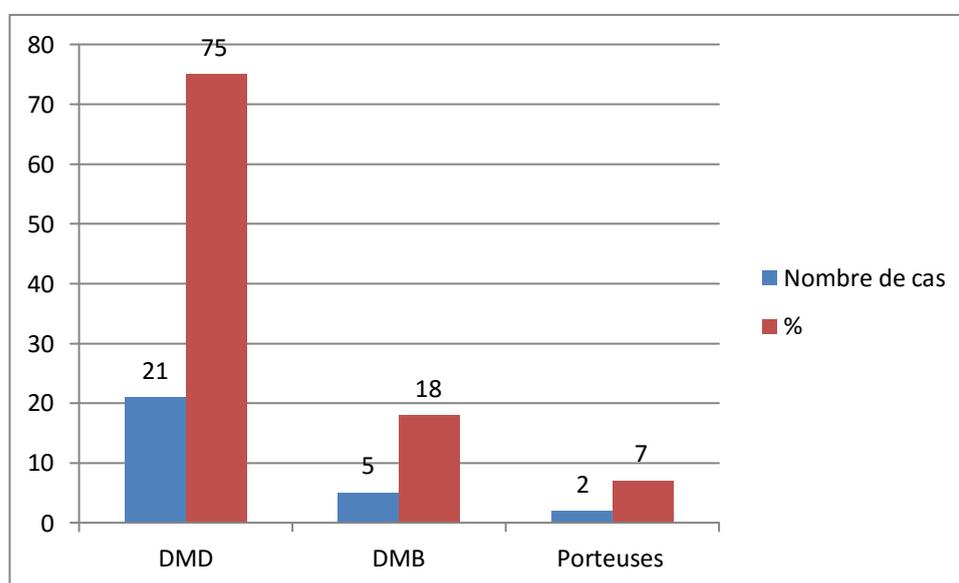


Figure 27 : Répartition des patients selon le diagnostic phénotypique IHC

#### 5. Corrélation des paramètres morphologiques et immunohistochimiques

Le tableau des données brutes a été soumis à une analyse de corrélation dans le but d'apprécier d'éventuelles relations entre les paramètres anatomo-pathologique et immunohistochimiques. Le coefficient de corrélation de Pearson  $r$ , est sollicité pour comparer des variables numériques.

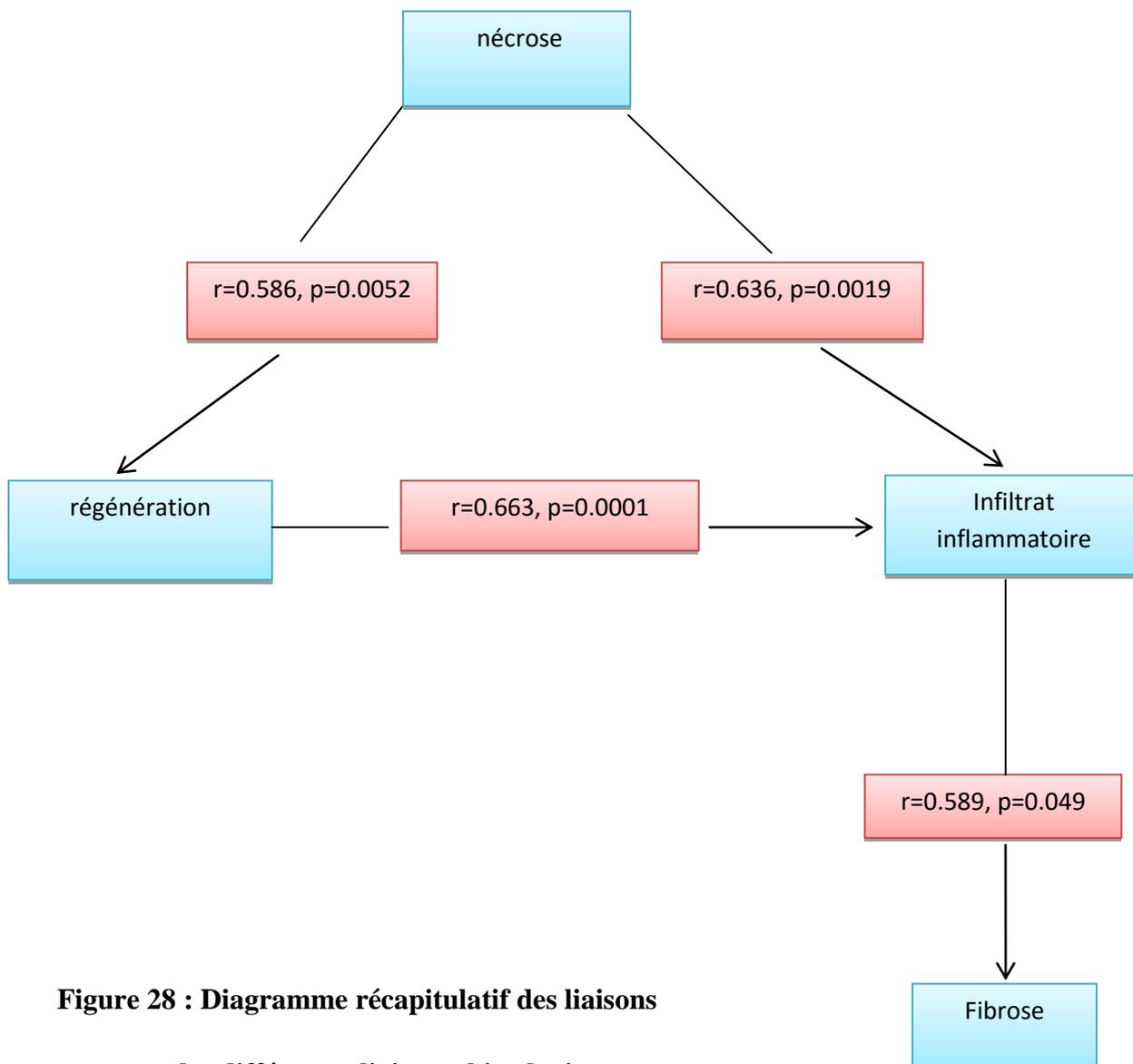
Le tableau 3 : indique les valeurs du coefficient de corrélation de Pearson ainsi que les probabilités associées.

**Tableau 3** : Corrélation entre paramètres anatomo-pathologiques et immunohistochimique.

	Fibrnéc	fibreg	inf	fibseg	Dys1	Dys2	Dys 3	Asarc	Bsarc	Gsarc	Dsarc
Fibrnéc	-	0.5863	0.6364	0.4824	0.2282	0.1814	0.2712	0.1386	0.2083	0.0323	0.2083
Fibreg	0.0052	-	0.6633	0.4301	0.1168	0.0155	0.0231	0.0455	0.0374	0.0550	0.1589
Inf	0.0019	0.0010	-	0.5892	0.2582	0.2052	0.0383	0.0302	0.0620	0.0913	0.0620
Fibrseg	0.0268	0.0517	0.0049	-	0.0400	0.2545	0.1308	0.0374	0.0096	0.1132	0.0096
Dys1	0.3197	0.6142	0.2585	0.8632	-	0.7947	0.4951	0.3893	0.5204	0.4714	0.5204
Dys2	0.4314	0.9470	0.3722	0.2656	0.0000	-	0.6689	0.3093	0.4136	0.3746	0.4136
Dys3	0.2345	0.9208	0.8689	0.5720	0.0225	0.0009	-	0.0231	0.1189	0.0700	0.1189
Asarc	0.5491	0.8449	0.8968	0.8721	0.081	0.1724	0.9208	-	0.7480	0.6331	0.5516
Bsarc	0.3649	0.8721	0.7894	0.9670	0.0156	0.0624	0.6077	0.0001	-	0.5095	0.7981
Gsarc	0.8895	0.8127	0.6939	0.6251	0.0310	0.0943	0.7630	0.0021	0.183	-	0.7077
Dsarc	0.3649	0.4914	0.7894	0.9670	0.0156	0.0624	0.6077	0.0095	0.000	0.0003	-

En dessous de la diagonale, sont indiqués les coefficients r de Pearson, au-dessus le risque associé

Pour visualiser les fortes relations des différents paramètres nous avons établi le diagramme suivant (**fig.28**). Les flèches indiquent les relations entre les variables alors que les valeurs du coefficient indiquent la nature de la corrélation, en revanche les probabilités indiquent la solidité de la corrélation. Le diagramme a permis d'établir une multitude de relations entre différents lésions anatomo-pathologiques. Il en ressort que le phénomène de nécrose est en relation avec le processus inflammatoire et le phénomène de régénération. De plus la segmentation serait en rapport avec l'inflammation.



**Figure 28 : Diagramme récapitulatif des liaisons entre les différentes lésions histologiques.**

# Discussion

Les dystrophinopathies et plus particulièrement la DMD sont des affections musculaires graves pour lesquelles de grands progrès ont été faits depuis la fin des années 1980 pour ce qui concerne le diagnostic histologique, moléculaire et la prise en charge symptomatique, mais elles restent à ce jour des pathologies incurables. En matière d'anatomopathologie, plusieurs dystrophies musculaires se ressemblent, il est donc important d'avoir recourt à des techniques qui nous permettent d'établir un diagnostic différentiel ; l'immunohistochimie joue un rôle majeur dans la révélation de la présence, la réduction ou l'absence d'une protéine donnée, ce qui va spécifier par conséquent le type de dystrophie.

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

Les anomalies de la matrice extracellulaires sont reflétées d'emblée par : la présence de fibrose importante inter-fibrillaire et entre les faisceaux, d'infiltrations cellulaires importantes qui reflètent la présence de phénomène de phagocytose.

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

En effet, une dégénérescence, une régénération et des fibres hypertrophiques «opaques» isolées et un remplacement significatif du muscle par de la graisse et du tissu conjonctif sont démontrés dans les biopsies musculaires chez les cas dystrophiques ( Engel AG ;1984).

Les fibres «opaques» sont également appelées hypercontractées, hyalines ou grosses fibres foncées. Leur origine n'est pas claire mais ils pourraient être produits au moment de la biopsie musculaire et être un artefact de prélèvement tissulaire, peut être renforcé par la fragilité de la membrane plasmique; ainsi, leur importance dans la DMD a été contestée.

Expérimentalement, l'hypercontraction se développe lorsque des défauts dans la membrane plasmique permettent l'afflux de liquide extracellulaire riche en calcium. (Uchino M, 1988).

En outre, les fibres nécrotiques sont retrouvées dans nos échantillons pourrait être la conséquence d'une dégénérescence de fibres musculaires qui ont perdues leur intégrité suite à une perturbation du réseau fibrillaire intracellulaire qui est expliqué par certaine regroupement des organites dans des régions du cytoplasme et/ou à la segmentation et à l'hypercontraction.

La plupart des fibres nécrotiques sont envahies par des cellules mononuclées, quelques-unes n'ont pas de cellules envahissantes dans leur cytoplasme et un cinquième sont essentiellement remplacées par des cellules mononuclées envahissantes.<sup>314</sup> Une variabilité accrue de la taille des fibres musculaires est également observée, avec des fibres plus grosses que la normale chez les patients plus jeunes.

Des infiltrats de cellules inflammatoires sont observés dans le pérимыsium, l'endomysium et les espaces périvasculaires et consistent principalement en cellules T cytotoxiques et macrophages.<sup>325</sup> Une autre caractéristique frappante est le développement de la fibrose endomysiale et pérимыsiale avec progression de la maladie. Au cours de la période néonatale, la distribution du tissu conjonctif est normale mais, progressivement, la fibrose et l'accumulation de tissu adipeux remplacent les fibres musculaires en dégénérescence; au stade avancé de la maladie, il ne reste que quelques fibres musculaires, séparées par de grandes zones de tissu conjonctif et de graisse.

Il est à noter que généralement les fibres nécrotiques et/ou régénératives intéressent de petits groupes de fibres dans les dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker (Fernandez et al ., 2010).

D'un autre côté, par l'utilisation de la dystrophine et de certaines protéines associées nous avons confirmé que ces anomalies tissulaires pourraient être la cause de l'absence totale ou partielle de la dystrophine. Cette dernière c'est une protéine qui assure un lien structurel entre le cytosquelette et le sarcolemme, via un ensemble de protéines appelé « complexe des protéines associées à la dystrophine » (CPAD).son absence partielle ou totale mènent à la perte progressive de l'activité contractile normale de la fibre musculaire induisant leurs dégénérescence (Péréon. Y, 2015).

Par conséquence, ces anomalies structurales pourraient être à l'origine de la dystrophine déficiente dans les muscles squelettiques des patients atteints par la dystrophie musculaire de Duchenne où l'immunomarquage montre l'absence totale de la dystrophine sauf quelques cas qui présentent un marquage normal dans un seul groupe de fibres musculaires. Dans la BMD, deux types de marquages sont observés : un marquage faible avec l'ensemble des anticorps utilisés associé à une variation dans l'intensité du marquage entre les fibres et au sein de la même fibre une absence de marquage avec l'un des trois anticorps associée à un marquage normal avec deux autres anticorps.

En 1989, Hoffman et al. ont suggéré, après analyse des données cliniques et biochimiques de 97 patients, que les patients atteints de DMD et BMD peuvent être divisés en trois catégories :

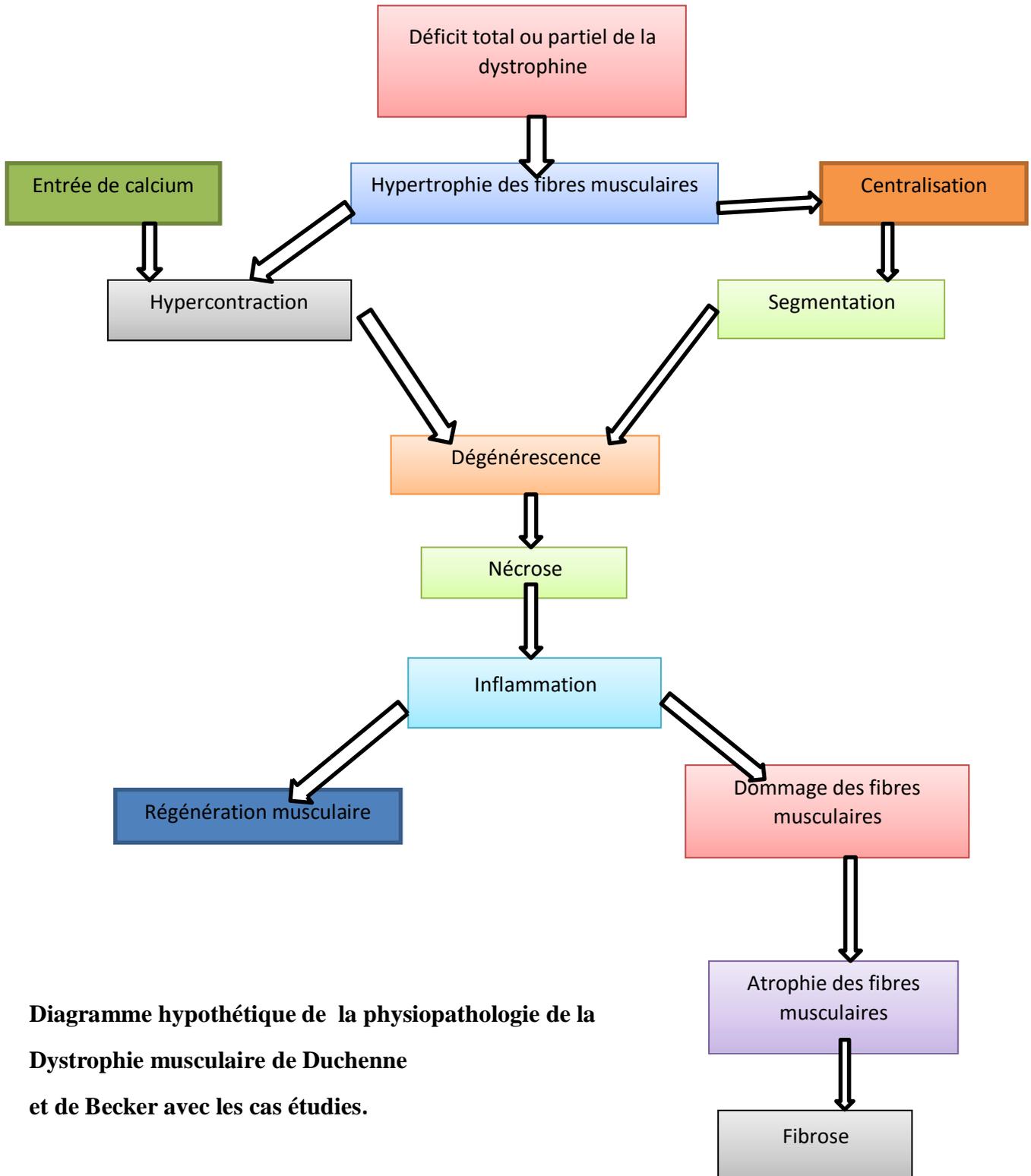
- DMD (fauteuil roulant vers 11 ans, quantité de dystrophine < 3 %) ;
- BMD sévère (fauteuil roulant entre 13-20 ans, quantité de dystrophine 3-10 %) ;
- BMD modérée (fauteuil roulant > 20 ans, dystrophine > 20 %).

Cependant, des patients avec une même quantité de dystrophine peuvent avoir une évolution totalement différente et inversement. Il a même été rapporté un patient ayant un phénotype DMD mais une quantité de dystrophine subnormale. Enfin, il faut savoir qu'environ 10 % des BMD et jusqu'à un tiers des BMD asymptomatiques ou révélées par une intolérance à l'effort peuvent avoir une étude immunohistochimique de la dystrophine normale. Deux explications peuvent être envisagées : soit le domaine tronqué de la protéine ne porte pas sur un site antigénique détecté par les anticorps utilisés, soit l'anomalie génétique n'entraîne que des modifications mineures de la protéine qui est correctement localisée à la membrane et dans l'ensemble fonctionnelle, seules des conditions plus extrêmes comme l'effort permettant de révéler son insuffisance (Serratrice J, 2000).

Les sujets de sexe féminin DMD qu'elles soient porteuses ou symptomatiques peuvent présenter à l'examen histologique de leur biopsie musculaire, un aspect normal non contributif au diagnostic. En revanche, l'immunohistochimie de la dystrophine met en évidence un aspect en mosaïque, avec la présence de myofibre dystrophine-positives, avoisinant de myofibre dystrophine-négatives, d'une très grande valeur diagnostique [Arahata et al, 1989]. Les fibres musculaires dystrophine -négatives et les fibres musculaires dystrophine-positives forment des petits clusters. Cet aspect en mosaïque serait due à la fusion

de myoblastes dystrophiques et de myoblastes normaux au cours de la myogenèse [Arahata et al, 1989].

A la lumière de ces résultats on propose le diagramme suivant pour expliquer la physiopathologie de la dystrophie musculaire de Duchenne et de Becker



**Diagramme hypothétique de la physiopathologie de la Dystrophie musculaire de Duchenne et de Becker avec les cas étudiés.**

Dans notre population d'étude :

La dystrophie musculaire de Duchenne est la plus grave des dystrophies musculaires de l'enfant : notre population a moins de 20 ans dans 90% des cas. À transmission liée à l'X, c'est les garçons qui sont touchés, mais rares exceptions où les porteuses soient symptomatiques : cardiomyopathie le plus souvent. L'atteinte musculaire avec faiblesse musculaire est exceptionnelle chez les filles : nous avons une patiente de 13 ans qui présente un tableau clinique Becker like avec un début de la maladie à l'âge de 10 ans, un processus dystrophique modéré et actif sur la biopsie musculaire. à l'immunohistochimie, l'expression des dystrophiques est en mosaïque avec des fibres négatives et d'autres positives

La femme de 50 ans est la mère d'un des patients de la série. Elle présente une cardiomyopathie dilatée

Les modifications de la structure interne (whorles, fibres lobulées) sont le plus souvent observées chez les patients avec un début de la maladie précoce avant 5 ans; il en est de même pour les fibres hypertrophiques fibres hypertrophiques et la fibrose.

# Conclusion

L'absence totale ou partielle de la dystrophine dans les muscles squelettique est à l'origine d'altération anatomo-pathologique très grave qui mène à la perte progressive de la fonction musculaire.

L'importance de cette protéine est due à son rôle important, dans le maintien de l'intégrité des fibres musculaires, lors de la contraction. L'absence totale de cette protéine donne la DMD (affection musculaire graves) se révèle dans la petite enfance par des chutes, ou une marche dandinant traduisant un déficit musculaire proximale. Son absence partielle donne la forme BMD et, présente une atteinte modérée.

Malgré l'effectif très restreint des cas nous avons essayé d'effectuer une analyse statistique des données et vérifier les corrélations entre les différents paramètres.

Il sera intéressant de compléter notre étude pour :

Une confirmation des résultats immunohistochimiques par un Western-blot, afin d'établir le degré d'altération de la dystrophine.

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

Enfin, la recherche est très active dans ce domaine, et le développement de nouvelles thérapies cellulaire, permet d'espérer pour le futur une amélioration de pronostique des patients.

# **Annexes**

Annexe 1 : Classification des maladies neuromusculaires (Rivière et al., 2005 ; Young-Chul Choi, 2006)

Maladies	Mode de transmission	Localisation chromosomique	Protéine (produit du gène)
<b>Dystrophies musculaires progressives (DMP)</b>			
<b>Dystrophies musculaires de Duchenne de Boulogne</b>	RX	XP21	Dystrophine
<b>Dystrophies musculaires de Becker</b>	RX	XP21	Dystrophine
<b>Formes mineures de dystrophinopathies</b>	RX ou sporadique	XP21	Dystrophine
<b>Limb-girdle muscular dystrophy (LGMD)</b>			
Dystrophie musculaire des ceintures type « Erb » ou LGMD 2A	AR	15q15.1-15q15.3	calpaine 3
Dystrophie musculaire type « ceintures » 2B ou LGMD 2B	AR	2p12-14	dysferline
γ-sarcoglycanopathie (LGMD 2C)	AR	13q12	LGMD2C=SGCG
α- sarcoglycanopathie ou LGMD 2D	AR	17q21	α- sarcoglycane ou adhaline
B- sarcoglycanopathie ou LGMD 2 <sup>E</sup>	AR	4q12	β- sarcoglycane
γ- sarcoglycanopathie ou LGMD2F	AR	13q12	γ – sarcoglycane
Dystrophie musculaire type « ceintures » 2G ou LGMD 2F	AR	17q11-q12	Télétonine
Dystrophie musculaire type « ceintures » 2H ou LGMD 2H	AR	9q31-33	TRIM32
Dystrophie musculaire type « ceintures » 2I ou LGMD 2I	AR	19q13.3	FKRP
Dystrophie musculaire type « ceintures » 2J LGMD2J	AR	2q31	Titine
Dystrophie musculaire type « ceintures » 1A ou LGMD 1A	AD	5q31-q33	Myotiline
Dystrophie musculaire type « ceintures » 1B ou LGMD 1B	AD	1q11-q21	Lamine A et/ou C
Dystrophie musculaire type « ceintures » 1C ou LGMD 1C	AD	3p25	cavéoline3

ceintures » 1C ou LGMD 1C			
Dystrophie musculaire type « ceintures » 1D ou LGMD 1D	AD	6q23	inconnue
Dystrophie musculaire type « ceintures » 1E ou LGMD 1 <sup>E</sup>	AD	6q	Inconnue
Dystrophie musculaire type « ceintures » ou LGMD 1F	AD	2q	Inconnue
Dystrophie musculaire des ceintures dominante LGMD1G	AD	4p21	?
Dystrophie musculaire facio-scapulohumérale (FSH)	AD	4q35	?
Dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss Autosomique dominante	RX	Xq23	Emerine
Dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss Autosomique dominante	AD	1q11-q23	lamine A/C
Dystrophie musculaire oculopharyngée (DMOP)	AD	14q11.2-q13	Poly-A-binding protein 2
<b>Dystrophies musculaires congénitales</b>			
Dystrophie musculaire congénitale avec déficit en mérosine	AR	6q22.23	mérosine ou laminine $\alpha 2$
Dystrophie musculaire congénitale avec déficit secondaire en mérosine	AR	1q42	?
Dystrophie musculaire congénitale sans déficit en mérosine	AR	?	?
Syndrome de la colonne raide (Rigid Spine Syndrom)	AR	1q35-36	SEPN1
Dystrophie musculaire congénitale de type Fukuyama	AR	9q31-q33	fukutine
Syndrome de Walker-Warburg	AR	9q34	POMT1
Syndrome MEB (Muscle-Eye-Brain)	AR	1p32-p34	POMGNT1
<b>Myopathies distales</b>			
Myopathies distales de type Welander	AD	2p13	?
Myopathies distales de type MarkesberyGriggs	AD	2q31-33	TTN

Myopathies distales de type Miyosh	AR	2p13.3-p13.1	Dysferline
Myopathies distales de type Monak	AR	9p1-q1	GNE
<b>Myopathies congénitales</b>			
Nemaline myopathie	AD	1q21-q23	tropomyosine 3 ou TPM-3
	AR	2q21-q22	Nébuline
	AR	19q13.4	troponine T1
	AD, AR ou sporadique	1q42.1	$\alpha$ -actine 2
	AD, AR ou sporadique	9p13.2-p13.1	ropomyosine 2
Myopathie congénitale à central core	AD	19q13.1	récepteur à la ryanodine
Myopathie congénitale centronucléaire	AD ou AR	19p13.2	?
Myopathie congénitale myotubulaire	RX	Xq28	Myotubularine
Myopathie congénitale à multi-minicores	AD ou AR	1p36	SEPN1
<b>Dystrophies myotoniques</b>			
Dystrophie myotonique de Steinert	AD	19q13.2-13.3	myotonine protéine kinase
Dystrophie myotonique de type 2(DM2) Myopathie myotonique proximale (PROMM : proximal myotonic myopathy)	AD	3q21.3	ZNF9
Dystrophie myotonique de type 3 (DM3) (AD) 15q21		15q21	

Rippling muscle disease)	AD	1q41 3p25	CAV
Maladie de Brody	AR	16p12	SERCA1
Dystrophie myotonique de type 2(PROMM)	AD	3q21.3	ZNF9
<b>Myotonies Congénitales</b>			
Myotonie Congénitale de Thomson	AD	7q35	canal chlore musculaire
Myotonie Congénitale de Becker	AR	7q35	canal chlore musculaire
Syndrome de Schwartz-Jampel de type I ou myotonie chondrodysplasique	AR	1p34 -p36.1	Perlecan
Syndrome Schwartz-Jampel type II	AR	5p13.1	LIFR
<b>Paralysies périodiques</b>			
Paralysie périodique hyperkaliémique (adynamie épisodique de Gamstorp) (AD), voir aussi paramyotonie d'Eulenburg		17q13.1-q13.3	Sous-unité $\alpha$ du canal sodium musculaire
Paramyotonie d'Eulenburg, voir aussi paralysie périodique hyperkaliémique	AD	17q13.1-q13.3	Sous-unité $\alpha$ du canal sodium musculaire
Myotonie avec crampes douloureuses, voir aussi paralysie périodique hyperkaliémique	AD	17q13.1-q13.3	Sous-unité $\alpha$ du récepteur aux Dihydropiridines
Myotonie fluctuante, voir aussi paralysie périodique hyperkaliémique	AD	17q13.1-q13.3	SCN4A
Paralysie périodique hypokaliémique type I (maladie de Westphal)	AD	1q31-32	CACNL1A3
Paralysie périodique hypokaliémique type II	AD	17q13.1-q13.3	SCN4
Paralysie périodique avec dysrythmie cardiaque, sensible au potassium ou syndrome d'Andersen	AD	17q23	KCJN2= Kir2.1
Paralysie périodique	AD, AR	11q13-q14	KCNE3

### Maladies inflammatoires du muscle

Polymyosites	Non héréditaires		
Dermamyosites	Non héréditaires		
Myosite à inclusions	Non héréditaires		

### Fibrodysplasie ossifiante progressive

Fibrodysplasie ossifiante progressive (FOP)	AD ou sporadique	4q27-31	
---	------------------	---------	--

### Myopathies métaboliques

Myopathies mitochondriales	Transmission maternelle, AD, AR		
----------------------------	---------------------------------	--	--

#### Lipidoses musculaires :

Myopathie avec déficit en carnitine palmitoyl transférase de type II (CPTII)	AR	1p32	carnitine palmitoyl transférase II
Myopathie avec déficit en carnitine	AR	5q33.1	Carnitine
Myopathie avec déficit en acyl CoA déshydrogénase	AR	12q22-qter	acyl CoA déshydrogénase

#### Glycogénoses musculaires :

Maladie de pompe	AR	17q25.2-25.3	maltase acide
Maladie de Mac Ardle	AR	11q13	phosphorylase musculaire
Maladie de Tarui	AR	12q13.3	phosphofructokinase musculaire
Maladie de Cori	AR	1p21	enzyme débranchante

### Maladies de jonction neuromusculaire

Myasthénie acquise	Non héréditaire, auto-immune		
--------------------	------------------------------	--	--

#### Syndromes myasthéniques congénitaux :

Myasthénie infantile familiale	AR	17pter	
Déficit en acétylchlinesérerase	AR	3p24.2	collagène Q

Déficit en récepteur de l'acétylcholine (RACH)	AR	2q24-q32	Sous-unité $\epsilon$ du récepteur à l'acétylcholine
Syndrome du canal lent	AD	2q24-q32	Sous-unité $\alpha$ du récepteur à l'acétylcholine
	AD	17p11-p12	Sous-unité $\beta$ du récepteur à l'acétylcholine
	AD	17p13	Sous-unité $\epsilon$ du récepteur
Syndrome du canal rapide	AR	2q24-q32	Sous-unité $\alpha$ du récepteur à l'acétylcholine
	AR	17p11-p12	Sous-unité $\beta$ du récepteur à l'acétylcholine
	AR	17p13	Sous-unité $\epsilon$ du récepteur à l'acétylcholine
<b>Maladies du motoneurone</b>			
Amyotrophie spinale infantile de type, I bis et II	AR	5q12.2-13.3	SMN ou Survival Motor Neuron
Amyotrophie spinale infantile de type III	AR	5q12	SMN
Amyotrophie spinale de l'adulte de type IV	AR	5q12	SMN
<b>Neuropathies héréditaires sensitivo-motrices</b>			
CMT1A	AD	17p11.2-p12	PMP-22

CMT1B	AD	1q22-q23	Po
CMT1D	AD	10q21.1-p12	EGR2
CMT1C	AD	16p13.1-p12.3	LITAF
CMTX	DX	Xq13.21	connexine 32
CMT2A1	AD	1p35.p36	KIF1B $\beta$
CMT2A2	AD	1p32-p36	MFN2
CMT2B1	AD	3q13-Q22	RAB7
CMT2B2	AD	19q13.3	?
CMT2C	?	?	?
CMT2D	AD, forme Spinale	7p14	GARS
CLT 2 <sup>E</sup>	AD	8p21	NEFL
CMT 2F	AD	7q11-q21	HSPB1
CMT 2L	AD	12q24	?
CMT4A	AR	8q13-q21.1	GDAP1
CMT4B1	AR	11p22	CMT4B = MTMR2
CMT4B2	AR	11p15	SBF2
CMT2C	AR	5q31-q33	KIAA1985
CMT4D ou Maladie de Lom (HSMN-L)	AR	8q24.3	HSMN-L=NDRG1
CMT 4 <sup>E</sup>	AD, AR	10q21-q22.1	CMT4E = EGR2
CMT4Fou maladie de Dejerine- Sottas	AR	19q13.1- 13.3	CMT4F = PRX
CMT	intermédiaire dominante	19p12-p13.2	DNM2

Abréviations : AD : autosomique dominante ; AR : autosomique récessive ; FKR<sub>P</sub> : fukutinrelated protein ; TCAP : telethonin ; XR : récessive liée à X. PROMM : proximal myotonic myopathy.

## Annexe 2 : produits et matériels

### Produits

**Acétone (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O) (Sigma-Aldrich, réf.24261)**

**Acide périodique (Sigma-Aldrich, réf. P5463)**

**Acide acétique glacial (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>, 1%) (Sigma-Aldrich, réf.537020)**

**Alcool : 70% ,95% et100% (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 tetrabromofluorescience(C<sub>20</sub>H<sub>8</sub>Br<sub>4</sub>O<sub>5</sub>) Hématoxyline de

Haris (C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>) (panreac, réf.253949) Isopentance ou 2-

Methylbutance(C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>) (Sigma-Aldrich, réf.277258)

Kit de détection DAB (Dako, liquid DAB+substrate chromogen system, réf. K3468)

Milieu de montage aqueux (Daka,faramonut aqueux mouting medium, S3025)

Milieu de montage mon aqueux (Sigma- Aldrich, Fluka Eukit quick-handening mounting .réf.03989)

β-NADH ou β-DPNH(C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>N<sub>7</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>14</sub>P<sub>2</sub>) (Sigma-Aldrich, réf. N8129)

Nitroblue tetrazolium chloride 98% (réf. N6876)

OCT (tissue –Tek<sup>®</sup>OCT™ Comproud, réf.4583)

PBS (Dako. réf. S3024)

Silane ou 3-Tréthoxysilylpropylamine(C<sub>9</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>3</sub>Si) (Sigma-Aldrich, réf.A3648)

Succinate de sodium

Xylène (C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>) (Sigma Aldrich, réf.534056)

## **2- Matériels**

Appareil photo numérique (LeiKa lazes)

Bac en verre

Chambre humide (pour l'incubation)

Congélateur-80°C

Cryostat (LeiKa, réf. CM1850)

Dac open (Dako, réf. S2002)

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

Lamelles de verre couvres objets

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

Microscope optique Zeiss (axioskop 40)

PH mètre (HANNA instrument, ph 211)

## **Annexe 3 : préparation des solutions**

### **1-solution tampon**

#### **1-1 Le tampon TRIS 0.2 M PH 7.4**

TRIS	3.025g
HCL 0.1 N	200ml
Eau distillé	300ml

Conserver à +4°C

### **2- Solutions stock**

#### **2-1 hématoxyline de Harris**

Pour 1000ml d'eau distillée

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

Dissoudre l'alun de potassium dans de l'eau très chaude

Ajouter l'hématoxyline dissout dans l'alcool absolu

Faire bouillir rapidement

#### **2-2 Trichrome de Gomori (TG)**

Pour 1000 ml d'eau distillée

Fast Green FCF	3g
Chromo trope 2R	4g
Acide phosphotungestrique	6g
Acide acétique glacial	10 ml

#### **2-3 Succinate -Déshydrogénase (SHD)**

Pour 200ml de solution :

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> anhydre 0.2 M	40ml	stock : 27.2g /L
NA <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.2M	160ml	stock : 28.4g/L
Succinate de sodium	10.8g	
Nitrate tetrazolium	200g	

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

Aliquoter

Conserver à 4°C

#### **2-4 Nicotinamide déshydrogénase tetrazolium (NADH-TR)**

Tampon TRIS 0.2M PH7.4	10ml
Nitroblue tetrazolium 1mg/ml	10ml
DP NH (NADH-TR)	4mg

Ajuster la solution à PH 7.4

Aliquoter

Conserver à 4°C

#### **3- Silanisation des lames**

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

## **Annexe 4 : fiches techniques**

### **1- Coloration Histochimique**

#### **1-1 Coloration à H &E (Hématoxyline -Eosine)**

- 1- Colorer dans un bain d'hématoxyline de Harris pendant 10 min
- 2- Rincer à l'eau distillée jusqu'à ce que l'eau reste incolore
- 3- Colorer dans un bain d'Eosine pendant 5 min
- 4- Rincer à l'eau distillée pour éliminer l'excès du réactif
- 5- Déshydrater successivement dans les bains d'alcools 70° ,95° ,100°(1) ,100°(11) et passer dans le xylène (1) et (11)
- 6- Monter par l'Eukit

#### **1-1 coloration au TG (Trichrome de Gomori)**

- 1- colorer dans un bain d'hématoxyline de Harris pendant 5-10 min
- 2- Rincer 2 fois à l'eau distillée
- 3- Colorer dans un bain trichrome pendant 30 min
- 4- Rincer rapidement les lamelles avec l'eau acétifiée (eau distillée + rasade d'acide acétique)
- 5- Déshydrater successivement dans les bains d'alcools 95° ,100°(1) ,100°(11) et passer dans le xylène (1) et (11)
- 6- Monter par l'Eukit

### **2-Coloration Histoenzymologies**

#### **2-1 Colorations au succinate déshydrogène (SDH)**

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

## 2-2 Coloration Nicotinamide Déshydrogène tetrazolium réductase (NADH-TR)

- 1- Ajuster la solution à pH 7.4, incuber les lamelles à 37°C pendant 30 min
- 2- Rincer à l'eau distillée
- 3- Monter par le faramount

## 3- Immunohistochimie

- 1- Coupes congelées de 5-7 µm d'épaisseur
- 2- Laisser sécher les lames à l'air libre et à température ambiante 1 heure
- 3- Entourer chaque prélèvement sur la lames au Dako Pen (Dako-réf.S2002)
- 4- Incuber avec l'anticorps primaire diluent à T°C ambiante en chambre humide, avec couvercle 1 heure
- 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(S24430) +1L eau distillé) 2X5 min
- 7- Incuber avec l'anticorps secondaire diluent (GAMP, 1 ; 50) à T°C ambiante dans une chambre humide et avec couvercle 1 heure
- 8- Laver les lames dans le tampon PBS 2X5 min
- 9- Couvrir les échantillons des solutions DAB (1 goutte de chromogène DAB/1ml de tampon) (Dako, réf. K3465) 10 min
- 10- Rincer à l'eau distillée 10min
- 11- Contre colorer à l'hématoxyline (Dako, réf. S2020) 2 min
- 12- Laver rapidement à l'eau courante puis à l'eau distillée
- 13- Montage aqueux par le faramount.

**Annexe 5** : la caractéristiques généraux des 28 cas étudiés préparé par l'Excel.

CAS	age/Bx	sexe	csg	cas familiaux	onset	CKx Nle	ceinture atteinte
1/ DMD	13	M	0	0	5	12	deux
10/DMD	8	M	0	0	4	12	deux
11/DMD	6	M	1	1	2	6	deux
12/DMD	13	M	1	0	3	48	deux
13/DMD	13	M	1	0	4	43	deux
14/DMD	8	M	0	0	5	10	pelvienne
15/DMD	9	M	0	0	4	15	deux
16/DMB	26	M	0	0	8	20	deux
17/DMD	6	M	1	0	3	10	deux
18/DMD	8	M	1	0	3	40	pelvienne
19/DMD	3	M	1	0	2	20	pelvienne
2/ DMB	26	M	1	1	10	16	deux
20/DMD	5	M	0	0	3	26	deux
21/DMD	10	M	0	0	6	np	deux
22/DMD	4	M	1	1	2	25	deux
23/DMD	11	M	0	0	5	25	deux
24/DMD	18	M	0	0	4	15	deux
25/DMB	19	M	1	0	12	26	pelvienne
26/DMD/ EN FAUTEUIL	9	M	0	0	5	np	pelvienne
27 / FILLE SYMPTÔMTIQUE	13	F	1	0	5	46	deux
28/ PORTEUSE	50	F	1	1	30	15	deux
3/ DMD	6	M	1	1	5	40	deux
4/ DMB	14	M	1	0	11	3	pelvienne
5/DMD	13	M	1	0	5	23	deux
6/DMB	25	M	0	0	14	20	Pelvienne
7/ DMD	7	M	1	1	5	25	Deux
8/ DMD	9	M	0	0	3	20	Deux
9/ DMB	16	M	1	1	6	5	Pelvienne

amyotrophie	tbl cardiaque	inégalité calibre	atrophie	hypertrophie	split
GLOBALE	1	2	2	2	0
OUI	0	2	2	1	1
GLOBALE	0	2	2	1	0
proximale des 2 ceintures	0	3	2	2	1
proximale des 2 ceintures	0	3	2	2	1
PROXIMALE MI	0	2	1	2	1
OUI	0	3	2	2	0

proximale des 2 ceintures	0	2	2	1	1
proximale des 2 ceintures	0	3	2	2	1
proximale des 2 ceintures	0	2	1	1	1
<b>PROXIMALE MI</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
OUI	0	2	2	2	1
proximale des 2 ceintures	0	3	3	1	1
proximale des 2 ceintures	0	2	2	2	1
OUI	0	2	2	0	0
proximale des 2 ceintures	0	2	2	1	1
PROXIMALE MI	0	2	2	0	0
PROXIMALE MI	0	3	2	2	2
OUI	0	2	2	2	1
OUI	0	3	1	1	1
NON	1	1	1	0	0
<b>proximale des 2 ceintures</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
PROXIMALE MI	0	3	2	1	0
PROXIMALE MI	0	3	2	2	2
NON	0	3	2	2	2
OUI	0	2	2	2	1
Globale	0	2	2	0	0
PROXIMALE MI	0	1	1	0	1

<b>Nx internes</b>	<b>nécrose</b>	<b>régénération</b>	<b>f.opaques</b>	<b>Fibroadipose</b>	<b>Dystrophique/Myopathique</b>	<b>P dystrophique</b>
1	1	1	1	3	dystrophique	3
1	1	1	1	1	dystrophique	1
1	1	1	0	2	dystrophique	3
1	0	0	1	3	dystrophique	3
1	1	0	0	1	dystrophique	1
1	1	0	1	2	dystrophique	2
1	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>dystrophique</b>	<b>2</b>
1	1	0	1	1	dystrophique	1
1	1	1	1	1	dystrophique	2
1	1	1	1	2	dystrophique	1
1	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>dystrophique</b>	<b>2</b>
1	1	1	1	2	dystrophique	2
1	0	1	1	3	dystrophique	3
1	0	0	1	3	dystrophique	3
<b>1</b>	1	1	0	3	dystrophique	3
1	1	1	1	2	dystrophique	2
1	1	1	1	3	dystrophique	3
1	1	1	1	3	dystrophique	3
1	0	0	1	3	dystrophique	3
1	1	0	1	0	dystrophique	2
1	0	0	1	0	dystrophique	1

1	1	1	1	1	dystrophique	1
1	1	0	1	2	dystrophique	2
1	0	1	1	3	dystrophique	3
1	0	0	1	3	dystrophique	3
1	0	1	1	1	dystrophique	1
1	1	1	0	3	dystrophique	3
1	0	0	1	1	dystrophique	1

<b>P. Dystrophique actif</b>	<b>dyst 1</b>	<b>dyst 2</b>	<b>dyst 3</b>	<b>A sarc</b>	<b>G sarc</b>
actif	0	0	0	0	0
actif	QLQ F+	0	0	3	3
actif	0	0	0	0	0
non actif	0	0	0	1	1
actif	QLQ F+	QLQ F+	QLQ F+	2	2
actif	0	0	0	0	0
<b>actif</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
non actif	2	0	2	3	3
actif	0	0	0	2	2
actif	QLQ F+	QLQ F+	QLQ F+	2	2
<b>actif</b>	<b>QLQ F+</b>	<b>0</b>	<b>QLQ F+</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
non actif	1	1	1	3	3
actif	0	0	0	2	0
actif	0	0	0	2	0
actif	0	0	0	2	2
non actif	0	0	0	2	2
actif	0	0	0	1	1
non actif	1	1	0	2	2
non actif	0	0	0	1	1
actif	MOSAIQUE	MOSAIQUE	MOSAIQUE	2	2
non actif	3	QLQF(-)	QLQ F(-)	3	3
non actif	0	0	0	1	1
actif	0	1	0	1	1
actif	0	0	0	1	1
non actif	1	1	1	1	1
actif	0	0	0	1	1
actif	0	0	0	0	0
actif	3	1	1	2	2

**1 : présence , 0 : absence**

# **Références bibliographiques**

AFM, Anonyme: Avancées dans les myopathies des ceintures | AFM Téléthon | Juin 2017.

Allen DG, Whitehead NP. Duchenne muscular dystrophy--what causes the increased membrane permeability in skeletal muscle? *Int J Biochem Cell Biol* 2011;43:290-4.

Al-Qusairi L, Laporte J (2011) T-tubule biogenesis and triad formation in skeletal muscle and implication in human diseases. *Skeletal muscle* 1: 26

Ammendola, E., V. Russo, L. Politano, L. Santangelo and R. Calabro (2006). "Is heart rate variability a valid parameter to predict sudden death in patients with Becker's muscular dystrophy?" *Heart* 92(11): 1686-1687.

Benabdallah BF, Bouchentouf M, Rousseau J, Bigey P, Michaud A, Chapdelaine P, et al. Inhibiting myostatin with follistatin improves the success of myoblast transplantation in dystrophic mice. *Cell Transplant* 2008;17:337-50.

Bloom W, Fawcett DW (1962) *A Textbook of Histology: By W. Bloom and D.W. Fawcett, 9 edn.* Philadelphia: Saunders.

Brooke MH, Kaiser KK (1970) Three "myosin adenosine triphosphatase" systems: the nature of their pH lability and sulfhydryl dependence. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 18: 670-672

Bushby, K. M., M. Thambyayah and D. Gardner-Medwin (1991). "Prevalence and incidence of Becker muscular dystrophy." *Lancet* 337(8748): 1022-1024.

Camirand G. (2004). Développement d'un protocole d'induction de tolérance immunologique applicable à la transplantation de myoblastes comme traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne. Thèse présentée à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval dans le cadre du programme de doctorat en Microbiologie et Immunologie pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor. Faculté de Médecine Université Laval Québec. 1-26.

Campbell KP. Three muscular dystrophies: Loss of cytoskeleton extracellular matrix linkage. *Cell* 1995;80:675-9.

Close R (1967) Properties of motor units in fast and slow skeletal muscles of the rat. *The Journal of physiology* 193: 45-55

Daoud F, Angeard N, Demerre B, et al. Analysis of Dp71 contribution in the severity of mental retardation through comparison of Duchenne and Becker patients differency by mutation consequence or Dp71 expersion. *Hum Mol Genet* 2009 ;18 :3779-94.

Darabi R, Gehlbach K, Bachoo RM, Kamath S, Osawa M, Kamm KE, et al. Functional skeletal muscle regeneration from differentiating embryonic stem cells. *Nat Med* 2008;14:134-43.

De Luca A, Nico B, Liantonio A, Didonna MP, Fraysse B, Pierno S, et al. A multi disciplinary evaluation of the effective nesso of cyclosporine a in dystrophic mdx mice. *Am J Pathol* 2005;166:477-89.

Dunant P. (2003). Strategies for molecular therapy of Duchenne muscular dystrophy. Thèse présentée à la Faculté de chimie et pharmacie de l'Université de Ludwig-Maximilians pour obtenir le grade de Docteur. Université de Ludwig-Maximilians-Munich. 3-18.

Engel AG, Arahata K. Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies. II: Phenotypes of autoinvasive cells in polymyositis and inclusion body myositis. *Ann Neurol* 1984;16 (2):20915.

England SB, Nicholson LV, Johnson MA, Forrest SM, Love DR, Zubrzycka-Gaarn EE, et al. Very mild muscular dystrophy associated with the deletion of 46% of dystrophin. *Nature* 1990;343:180-2.

Fernandez C., Halbert C., Maues de Paula A., Figarella-Branger D., Chabrol B., Pellissier J.-F. Dystrophies musculaires liées au gène DMD : myopathie de Duchenne, myopathie de Becker, formes féminine et atypiques. EMC (ElsevierMassonSAS, Paris), Neurologie, 17-175-B-10, 2010.

Finder, J. D., D. Birnkrant, J. Carl, H. J. Farber, D. Gozal, S. T. Iannaccone, T. Kovesi, R. M. Kravitz, H. Panitch, C. Schramm, M. Schroth, G. Sharma, L. Sievers, J. M. Silvestri, L. Sterni and S. American Thoracic (2004). "Respiratory care of the patient with Duchenne muscular dystrophy: ATS consensus statement." *Am J Respir Crit Care Med* 170(4): 456-465.

Gailly P. TRP channels in normal and dystrophic skeletal muscle. *Curr Opin Pharmacol* 2012;12:326-34

Hamer PW, Mc Geachie JM, Davies MJ, Grounds MD. Evans Blue Dye as an in vivo marker of myofibre damage: Optimizing parameters for detecting initial myofibre membrane permeability. *J Anat* 2002;200:69-79.

Harper SQ, Hauser MA, DelloRusso C, Duan D, Crawford RW, Phelps SF, et al. Modular flexibility of dystrophin: implications for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Nat Med* 2002;8: 253-61.

Heffner RR, Moore SA. Muscle Biopsy in Neuromuscular Disease. In: Sternberg's Surgical Pathology. Ed: Mills SE, 6th ed, Philadelphia: Wolters Kluwer. 2015; 1: 113-147.

Henderson, C. A., Gomez, C. G., Novak, S. M., Mi-Mi, L. and Gregorio, C. C. 2017. Overview of the Muscle Cytoskeleton. *Comprehensive Physiology*. 7:891–944.

Hoffman EP, Brown Jr. RH, Kunkel LM. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 1987;51: 919-28.

Gordon AM, Homsher E, Regnier M (2000) Regulation of contraction in striated muscle. *Physiological reviews* 80: 853-924

Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF, et al. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 1999;401:390-4.

Kohler, M., C. F. Clarenbach, C. Bahler, T. Brack, E. W. Russi and K. E. Bloch (2009). "Disability and survival in Duchenne muscular dystrophy." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80(3): 320-325.

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

Le Rumeur E, Winders SJ, Hubert JF. Dystrophin : more than juste the sum of its parts. *Biochim Biophys. Acta* 2010 ; 1804 :1713-22.

Leturcq F, Tuffery -Giraud. Aspects génétiques et moléculaires des dystrophine 2015 ;22 :1253-12511.

Matsumura, T., T. Saito, H. Fujimura, S. Shinno and S. Sakoda (2011). "[A longitudinal cause-of-death analysis of patients with Duchenne muscular dystrophy]." *Rinsho Shinkeigaku* 51(10): 743-750.

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

Mekrami S, Brignol TN. (2003) Le muscle squelettique. Repères Savoir & Comprendre. Association Française contre les Myopathies.

Mok E, Eleouet-Da Violante C, Daubrosse C, Gottrand F, Rigal O, Fontan JE, et al. Oral glutamine and amino acid supplementation inhibit whole-body protein degradation in children with Duchenne muscular dystrophy. *Am J Clin Nutr* 2006;83:823-8.

Mok E, Letellier G, Cuisset JM, Denjean A, Gottrand F, Alberti C, et al. Lack of functional benefit with glutamine versus placebo in Duchenne muscular dystrophy: a randomized crossover trial. *PLoS One* 2009;4: e5448.

Monaco AP, Neve RL, Colletti-Feener C, Bertelson CJ, Kurnit DM, Kunkel LM. Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature* 1986;323:646-50.

Muntoni F, Torelli, Ferlini A, dystrophin and mutation : one gene, several protéins, multiple phenotypes. *Lancet* 2003 ; 44 :731-40.

Muntoni F, Wells D. Genetic treatments in muscular dystrophies. *Curr Opin Neurol* 2007;20:590-4.

Needham DM (1926) Red and white muscles. *Physiological reviews* 6: 1-27

Nelson SF, Crosbie RH, Miceli MC, Spencer MJ. Emerging genetic therapies to treat Duchenne muscular dystrophy. *Curr Opin Neurol* 2009;22:532-8.

Oakes PW, Gardel ML. Stressing the limits of focal adhesion mechanosensitivity. *Curr Opin Cell Biol* 30: 68-73, 2014. 10.1016/j.ceb.2014.06.003

Parsons SA, Millay DP, Sargent MA, McNally EM, Molkenstein JD. Age-dependent effect of myostatin blockade on disease severity in a murine model of limb-girdle muscular dystrophy. *Am J Pathol* 2006; 168:1975-85.

Péréon. Y., S. Mercier, A. Magot. Elsevier Masson SAS. . Physiopathologie de la dystrophie musculaire de Duchenne *Archives de Pédiatrie* 2015;22:12s18-12s23

Petrof BJ, Shrager JB, Stedman HH, et al. Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90: 3710-14.

Renault, V., Thornell, L.E., Butler-Browne, G., and Mouly, V. (2002). Human skeletal muscle satellite cells: aging, oxidative stress and the mitotic clock. *Exp. Gerontol.*37, 1229–1236.

Rideau, Y., L. W. Jankowski and J. Grellet (1981). "Respiratory function in the muscular dystrophies." *Muscle Nerve* 4(2): 155-164.

Sampaolesi M, Blot S, D'Antona G, Granger N, Tonlorenzi R, Innocenzi A, et al. Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature* 2006;444:574-9.

Schram, G., A. Fournier, H. Leduc, N. Dahdah, J. Therien, M. Vanasse and P. Khairy (2013). "All-cause mortality and cardiovascular outcomes with prophylactic steroid therapy in Duchenne muscular dystrophy." *J Am Coll Cardiol* 61(9): 948-954

Schiaffino S, Hanzlikova V, Pierobon S (1970) Relations between structure and function in rat skeletal muscle fibers. *The Journal of cell biology* 47: 107-119

Schiaffino S (2010) Fibre types in skeletal muscle: a personal account. *Acta Physiol (Oxf)* 199: 451-463

- Schiaffino S, Reggiani C (2011) Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiological reviews* 91: 1447-1531
- Sciote JJ, Morris TJ (2000) Skeletal muscle function and fibre types: the relationship between occlusal function and the phenotype of jaw-closing muscles in human. *Journal of orthodontics* 27: 15-30
- Serratrice J, Chabrol B, Attarrian S, Figarella-Branger D. Pseudometabolic dystrophinopathy without immunohistochemical anomaly. *Rev Neurol* 2000;156:175-8
- Serratrice J., 2008. Muscle normale. MC (paris) .appareil locomoteur. 14.006-A-10.11p.
- Skuk D, Goulet M, Roy B, Chapdelaine P, Bouchard JP, Roy R, et al. Dystrophin expression in muscles of Duchenne muscular dystrophy patients after high-density injections of normal myogenic cells. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006;65:371-86.
- Trabelsi M, Beugnet C, Deburgrave N et al. When a midi intronic variation of DMD gene creates an ESE site. *Neuromuscul Disord* 2014 ; 24 :1111-7
- Tuffery -Giraud, Bérout C, Leturcq F et al. Genotype phenotype analysis in 2,405 patients with a dystrophinopathy using the UMD-DMD Databases : a model of nationwide knowledgebase *Hum Mutat* 2009 ; 30 :934-45.
- Tuffery-Giraud, S., C. Beroud, F. Leturcq, R. B. Yaou, D. Hamroun, L. Michel-Calemard, M. P. Moizard, R. Bernard, M. Cossee, P. Boisseau, M. Blayau, I. Creveaux, A. Guiochon-Mantel, B. de Martinville, C. Philippe, N. Monnier, E. Bieth, P. Khau Van Kien, F. O. Desmet, V. Humbertclaude, J. C. Kaplan, J. Chelly and M. Claustres (2009). "Genotype-phenotype analysis in 2,405 patients with a dystrophinopathy using the UMD-DMD database: a model of nationwide knowledgebase." *Hum Mutat* 30(6): 934-945.
- Turrina A, Martinez-Gonzalez MA, Stecco C (2013) The muscular force transmission system: role the intramuscular connective tissue. *Journal of bodywork and movement therapies* 17: 95-102
- Uchino M, Araki S, Miike T. Correlative study of the incidence of opaque, necrotic and regenerative fibers in Duchenne dystrophy. *Acta Neuropathol* 1988;75(3):30812.
- Vallejo-Illarramendi A, Toral-Ojeda I, Aldanondo G et al. Dysregulation of calcium homeostasis in muscular dystrophies. *Exp Rev Molec Med* 2014;16:e16.
- Van Deutekom JC, Van Ommen GJ. Advances in Duchenne muscular dystrophy gene therapy. *Nat Rev Genet* 2003;4:774-83
- Williams & Warwick. *Gray's Anatomy*. Thirty-seventh edition. Churchill Livingstone. ISBN0-443-04177-6.
- Young-Chul Choi MD. (2006). *Molecular and Pathological Diagnosis of Muscular Dystrophies*. HANYANG MEDICAL REVIEWS. 26 (1): 77-93.
- Zhao X, Moloughney JG, Zhang S, et al. Orai1 mediates exacerbated Ca (2+) entry in dystrophic skeletal muscle. *PLoS ONE* 2012;7:e49862.