

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université frères Mentouri Constantine**  
**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département de Biologie Animale**

N° d'ordre : 257/Mag/2008

N° de série : 012/SN/2008

Mémoire

*Présenté pour obtenir le Diplôme de Magister*

*En Biologie Moléculaire et Cellulaire.*

*Option : Génétique des pathologies humaines*

Thème

*DIAGNOSTIC GENOTYPIQUE DIRECT DES MYOPATHIES DES  
CEINTURES :*

*g- SARCOGLYCANOPATHIES ET  $\alpha$ -SARCOGLYCANOPATHIES*

*Présenté par : RAMI ABLA*

Devant le jury :

M <sup>elle</sup> BENLATRECHE C.	Prof. C.H.U.de Constantine	Président
M <sup>r</sup> HAMRI A.	Prof. C.H.U.de Constantine	Rapporteur
M <sup>r</sup> ABADI N.	Prof. C.H.U.de Constantine	Examineur
M <sup>me</sup> SATTI D.	Prof. Université de Constantine	Examineur

Année Universitaire 2007/2008

## *Remerciements*

Je tiens tout d'abord à remercier tous les membres du Conseil Pédagogique : Pr BENLATRACHE, Pr ABADI, Pr SATTA, Pr NAIMI.

J'exprime toute ma reconnaissance au Professeur HAMRI Chef du Service de Neurologie qui n'a ménagé aucun effort pour me permettre de travailler dans les meilleures conditions possibles au niveau de son service.

Je saisis cette occasion pour témoigner ma gratitude et mes vifs remerciements au Professeur BENLATRACHE en sa qualité de Médecin Chef Responsable du Laboratoire de Biochimie et Présidente du jury.

Je prie le Professeur ABADI de trouver ici l'expression de mes remerciements et toute ma reconnaissance car son dévouement, sa compétence, sa patience et son aide m'ont permis d'acquérir l'expérience nécessaire pour exercer dans un laboratoire de Génétique et Biologie Moléculaire.

C'est avec beaucoup d'humilité et de respect que je remercie Professeur SATTA dont, je me dois de signaler l'enseignement exemplaire.

Tous mes remerciements vont au Docteur SIFI Yamina pour sa gentillesse, sa disponibilité et son accueil généreux pendant sa consultation.

Je tiens aussi à témoigner de ma gratitude au Docteur SIFI Karima qui m'a initié aux techniques de Biologie Moléculaire.

Enfin, je remercie tous ce qui m'ont soutenu et aidé par leurs conseils durant la période de mes études et particulièrement : Amel, Manel, Messaouda, Yasmina, Hadia, Zoubida, Yamina, Hakima, Mr Brihmat, Mr Boulkroune, Mr Belloum et mes collègues de la post-graduation : Nadira, Hanane, Sabrina, Moufida, Zeineb, Wissem, Warda, Jallila, Fethi et Adam.

## Abréviations

50 DAG	Alpha- Sarcoglycane
A2	Alpha- Sarcoglycane
AAV2	Adeno Associated Virus 2
AD	Autosomique Dominante
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AR	Autosomique Récessive
BBP	Bleu De Bromophenol
BET	Bromure D'ethidium
BMD	Dystrophies Musculaires De Becker
CPK	Créatine Phosphokinase
DAG	Dystrophin Associated Glycoprotein
DAP	Dystrophin Associated Protein
DG	Dystroglycane
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DMC	Dystrophies Musculaires Des Ceintures Dystrophies Musculaires Des Ceintures à Transmission Autosomique
DMC1	Dominante Dystrophies Musculaires Des Ceintures à Transmission Autosomique
DMC2	Récessive
DMD	Dystrophies Musculaires De Duchenne
DMP	Dystrophies Musculaires Progressives
DMSO	Dimethyle Sulfoxyde
DO	Densité Optique
ECG	Electrocardiogramme
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétra acétique
EMG	Electromyographie
FSH	Dystrophie Musculaire Facio-Scapulo-Humérale
kb	Kilo base
kDa	Kilodalton
LGMD	Limb-Girdle Muscular Dystrophy
LGMD1	Limb-Girdle Muscular Dystrophy à Transmission Autosomique Dominante
LGMD2	Limb-Girdle Muscular Dystrophy à Transmission Autosomique Récessive

LGMD2C	Gamma Sarcoglycanopathie
LGMD2D	Alpha Sarcoglycanopathie
MB	Méga base
pb	Paire De Base
PCR	Polymerase Chain Reaction
PK	Protéinase K
SCARMD	Severe Childhood Autosomal Recessive Muscular Dystrophy
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SG	Sarcoglycane
SGCA	Le Gène Sarcoglycane Alpha
SGCG	Le Gène Sarcoglycane Gamma
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
TBE	Tris Buffered EDTA
TE	Tris EDTA
$\alpha$ -DG	Alpha- Dystroglycane
$\alpha$ -SG	Alpha- Sarcoglycane
$\beta$ -DG	Béta- Dystroglycane
$\beta$ -SG	Beta-Sarcoglycane
$\gamma$ -SG	Gamma- Sarcoglycane

# Sommaire

<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>
<i>Revue bibliographique</i>	
<b>I. Myopathies des ceintures : Sarcoglycanopathie .....</b>	<b>3</b>
<b>I-1. Définition .....</b>	<b>3</b>
<b>I-2. Classification .....</b>	<b>5</b>
<b>I.3. Tableau clinique.....</b>	<b>7</b>
<b>II. Découverte des Sarcoglycanopathies.....</b>	<b>8</b>
<b>II.1. La dystrophine .....</b>	<b>9</b>
<b>II.2. Les protéines associées à la dystrophine.....</b>	<b>11</b>
<b>II.2.1 Les complexes des glycoprotéines .....</b>	<b>11</b>
<b>A. Le complexe des dystroglycanes (DG) .....</b>	<b>11</b>
• <b>Alpha- dystroglycane (<math>\alpha</math>-DG).....</b>	<b>11</b>
• <b>Béta- dystroglycane (<math>\beta</math>-DG) .....</b>	<b>12</b>
<b>B. Le complexe des sarcoglycanes.....</b>	<b>14</b>
• <b>Alpha- Sarcoglycane .....</b>	<b>15</b>
• <b>Beta-Sarcoglycane (<math>\beta</math>-SG).....</b>	<b>15</b>
• <b>Gamma- Sarcoglycane (<math>\gamma</math>-SG) .....</b>	<b>15</b>
• <b>Delta- Sarcoglycane (<math>\delta</math>-SG) .....</b>	<b>16</b>
• <b>Epsilon- Sarcoglycane (<math>\epsilon</math>-SG) .....</b>	<b>16</b>
• <b>Le <math>\zeta</math>-sarcoglycane .....</b>	<b>16</b>
<b>C. Le complexe des syntrophines.....</b>	<b>17</b>
• <b>L' <math>\alpha</math>1-syntrophine.....</b>	<b>17</b>

• La $\beta$ 1-syntrophine .....	17
• La $\beta$ 2-syntrophine .....	18
• les $\gamma$ 1- et $\gamma$ 2-syntrophines .....	18
D. Autres protéines non classées .....	19
III .Retentissement protéique .....	20
IV. Rôle des sarcoglycanes.....	20
V. Spectre des mutations.....	21
VI. Distribution géographique-mutations récurrentes et effets fondateurs.....	25
VII. Corrélation génotype/phénotype.....	27
VIII. L'hétérogénéité génétique des myopathies autosomiques récessives .....	28
IX. Pathologie moléculaire des sarcoglycanopathies. ....	30
IX.1. L'alpha-sarcoglycanopathies.....	30
IX.2. Gamma- sarcoglycanopathies.....	32
X. Le conseil génétique et le diagnostique prénatal .....	34
XI. Démarches thérapeutiques.....	35

## *Partie pratique*

### *Méthodologie*

I. Patients .....	37
II. Méthodes .....	38
II.1. L'enquête familiale.....	38
II.2. Les examens complémentaires.....	38
II.3. Analyse moléculaire .....	39
II.3.1. Extraction ADN.....	39

<b>II.3.2. Mise au point de la PCR/digestion pour le diagnostic génotypique direct des <math>\alpha</math>-sarcoglycanopathie pour la mutation R77C.....</b>	<b>43</b>
--	-----------

<b>II.3.3. Mise au point de la SSCP pour diagnostic des</b>	
<b>Gamma-sarcoglycanopathie.....</b>	<b>47</b>
<b>Résultats.....</b>	<b>51</b>
<b>Discussion .....</b>	<b>62</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>67</b>
<b>Références bibliographique.....</b>	<b>69</b>

**Annexes**

## *Introduction*

Depuis l'avènement de la génétique moléculaire, les gènes des maladies héréditaires à transmission mendélienne sont devenus accessibles. Ce nouvel éclairage a permis d'asseoir des diagnostics sur une base objective, celle de l'étiologie génétique.

Les dystrophies musculaires des ceintures forment un groupe de maladies progressives, elles se transmettent sur le mode autosomique récessif ou dominant. Les différents sous-groupes peuvent être différenciés par l'analyse des protéines ou des gènes.

En effet, chaque année, de nouveaux gènes ou de nouvelles protéines sont identifiés dans ce groupe très hétérogène.

Les LGMD (Limb Girdle Muscular Dystrophy) ont une large distribution géographique dans le monde. Elles ont été rapportées dans les pays du Maghreb, en Europe, au Moyen-Orient, en Turquie, au Japon, en Australie, aux U.S.A, au Brésil, etc.....

Actuellement, il est possible d'identifier plusieurs sous-groupes de dystrophies musculaires des ceintures de type 2 (formes autosomiques récessives), en s'appuyant sur les mutations des gènes et/ou les défauts des produits des gènes. La nouvelle classification des LGMD2 regroupe 7 types : LGMD2A , LGMD2B , LGMD2C, LGMD2D, LGMD2E, LGMD2F, LGMD2G.

Nous allons nous intéresser particulièrement aux LGMD2C et LGMD2D.

- **g- SARCOGLYCANOPATHIE(LGMD2C)** :c'est une maladie précoce à évolution rapide, caractérisée par une perte progressive de la force musculaire, le gène est localisé au niveau de la région 13q12. La mutation connue, symbolisée «  $\Delta$ 521T » est une délétion d'une thymine qui interrompt le cadre de lecture et provoque l'absence de la  $\gamma$ - SARCOGLYCANE dans la membrane musculaire.



- **$\alpha$ -SARCOGLYCANOPATHIE(LGMD2D) :** les malades présentent une dystrophie musculaire avec une créatine Kinase élevée, une nécrose –régénération sans fibrose marquée et un déficit en  $\alpha$ -SARCOGLYCANE, le gène est localisé dans la région 17q21. Les mutations responsables de la maladie sont des mutations non sens, frame-shift, délétions.

Dans notre pays, où ces affections sont relativement fréquentes du fait du taux élevé de consanguinité, mettre au point et appliquer une démarche diagnostique fondée sur l'étiologie moléculaire serait d'une grande aide permettant de résoudre le problème de diagnostic des polymorphismes cliniques rencontrés dans les dystrophies musculaires des ceintures, affections fréquentes d'évolution très handicapante, constituant actuellement un problème majeur de santé publique.

L'étude des LGMD2C dans la population de Constantine portera sur la recherche de la mutation  $\Delta 521T$  par la technique de la SSCP, et l'étude des LGMD2D portera sur la recherche de la mutation R77C par la PCR/digestion.

Les objectifs de ce travail étaient de :

Mettre au point la technique de diagnostic moléculaire direct des LGMD2D par la recherche de la mutation R77C par PCR/digestion.

Mettre au point la technique de diagnostic moléculaire direct des LGMD2C par la recherche de mutations  $\Delta 521T$  par SSCP.

*Revue*  
*bibliographique*

## **I. Myopathies des ceintures : Sarcoglycanopathies**

### **I-1. Définition**

Le terme de myopathie recouvre un ensemble de lésions non inflammatoires et non tumorales de la fibre musculaire striée, c'est un groupe de pathologies neuromusculaires qui consiste en une détérioration progressive des fibres musculaires, engendrant faiblesses musculaires et invalidités.

Les myopathies constituent un groupe hétérogène de maladies génétiques recouvrant les affections dégénératives primitives de la fibre musculaire striée, excluant d'une part les anomalies du développement embryonnaires du muscle, d'autre part les lésions dégénératives musculaires secondaires à des lésions du système nerveux central ou périphérique. [1]

Parmi les myopathies humaines, on s'intéressera aux Dystrophies Musculaires des Ceintures DMC.

Les dystrophies musculaires des ceintures << LGMD Limb Girdle Muscular Dystrophy >> forment un groupe hétérogène de maladies des muscles, ce sont des maladies génétiques que l'on distingue selon leur mode de transmission, autosomique dominant ou autosomique récessif.

Elles sont une entité nosologique indépendante des autres dystrophies musculaires telles que la myopathie de Duchenne DMD ou la dystrophie musculaire Facio-Scapulo-Humérale FSH.

Elles sont cliniquement et génétiquement hétérogènes, elles se manifestent par une dégénérescence progressive des muscles proximaux des ceintures pelviennes (muscles du bassin) et scapulaires (muscles des épaules). [2.1]

On va s'intéresser aux Dystrophies musculaires autosomiques récessives et plus spécifiquement aux sarcoglycanopathies, qui constituent un groupe d'affections liées à des glycoprotéines intégrées à la membrane plasmique. Les quatre sarcoglycanes du muscle squelettique ( $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ ) ont un seul domaine transmembranaire, un domaine intracellulaire

relativement court et un large domaine extracellulaire, ce sont des protéines de 35 à 50 kDa glycosylées au moins sur un résidu, cliniquement et génétiquement hétérogène. Elles se caractérisent par une dégénérescence progressive des muscles proximaux des ceintures scapulaires et pelviennes, on les désigne sous les noms de LGMD2. [3.4]

## **I-2. Classification**

Les tentatives de classification des myopathies ont été multiples et variées.

En 1884 Erb a été le premier à classer ses propres observations et celles faites par Duchenne ainsi que celles de Landouzy et Déjerine sous le terme général de Dystrophies Musculaires.[5]

Il a fallu attendre près d'un siècle et le renouveau de la pathologie musculaire lié à l'avènement de nouvelles techniques (histochimie, microscopie électronique,...) pour que Walton et Nattrass en 1954 proposent une nouvelle classification portée sur les différents modes de transmissions héréditaires en plus des éléments histologiques et cliniques[6]. C'est ainsi qu'il a été possible de distinguer les formes récessives liées au sexe (myopathies de Duchenne (DMD) et myopathies de Becker (BMD)), les formes à transmissions autosomiques dominantes (myopathies de Landouzy-Déjerine) et les formes autosomiques récessives. [7]

1983 Ben Hamida et al ont rapporté une étude portant sur 93 enfants tunisiens présentant une forme de myopathie autosomique récessive sévère appelée SCARMD (Severe Childhood Autosomal Recessive Muscular Dystrophy). Pour aucune de ces entités, l'étiologie n'était soupçonnée. Un seul élément biologique commun étant l'élévation de la créatine kinase sérique témoignant du processus de nécrose musculaire. Seule la transmission génétique était établie.

A partir des années 90, les nouvelles méthodes de la génétique moléculaire ont permis de distinguer les locus et d'identifier les gènes mutés, ce qui a permis de classer les syndromes cliniques en fonction du locus chromosomique en causes. Les généticiens ont regroupé toutes les myopathies autosomiques récessives sous le terme de LGMD2 (2 pour indiquer la transmission autosomique récessive et LGMD1 pour les myopathies à transmission autosomique dominante).

La nouvelle nomenclature purement génétique des dystrophies musculaires progressives DMP est basée sur le caractère d'hérédité dominant (LGMD1) ou récessif (LGMD2). Les différentes formes génétiques sont définies par des lettres.

Cette nouvelle classification prouve l'hétérogénéité clinique et génétique des myopathies autosomiques récessives, mais elle reste difficile à utiliser par les cliniciens.

**Tableau 1 : Loci des dystrophies musculaires des  
Ceintures et leurs produits génétiques correspondants [13]**

DMC1 = autosomique dominant ; DMC2 = autosomique récessif

<b>Nom</b>	<b>Locus du gène</b>	<b>Protéine</b>
DMC1A	5q31	Myotiline
DMC1B	1q21.2	Lamine A/C
DMC1C	3p25	Cavéoline-3
DMC1D	6q23	Inconnue
DMC1E	7q35	Inconnue
DMC1F	7q31.1-q31.2	Inconnue
DMC2A	15q15.1-q21.1	Calpaïne-3
DMC2B	2p13.3-p13.1	Dysferline
DMC2C	13q12	$\alpha$ -sarcoglycane
DMC2D	17q12-q21.3	$\gamma$ -sarcoglycane
DMC2E	4q12	$\beta$ -sarcoglycane
DMC2F	5q33.3	$\delta$ -sarcoglycane
DMC2G	17q12	Téléthonine
DMC2H	9q31-q34.1	TRIM32
DMC2I	19q13.32	FKRP
DMC2J	2q24.3	Titine

### **I.3. Tableau clinique :**

Le tableau clinique des sarcoglycanopathies, dans sa forme la plus fréquente, est très proche de celui des dystrophies musculaires de Duchenne et Becker, mais elle touche les enfants des deux sexes. [9]

Le début clinique des LGMD2 survient généralement dans l'enfance et parfois dans l'adolescence.

Les premiers signes cliniques sont difficiles à mentionner dans le début de la vie, on retrouve des signes discrets dès l'âge de un à deux ans, qui se présentent sous la forme de maladresse à la marche et un retard moteur fréquent. [10.9]

Dès l'âge de trois à quatre ans les signes sont visibles : faiblesse musculaire, des chutes fréquentes, difficulté à la marche, incapacité de courir.

Le diagnostic est porté en général entre quatre et six ans : difficultés pour se relever du sol et pour monter les escaliers, associée à une hypertrophie des mollets plus au moins importante. [3.1]

Les rétractions tendineuses et une scoliose sont fréquemment observées dans les stades les plus avancés. Les muscles de la face et les muscles extraoculaires ne sont jamais atteints, le cœur l'est exceptionnellement, les fonctions intellectuelles sont normales.

La perte de la marche survient en général dans la deuxième décennie de la vie.

La variabilité clinique de ces myopathies est très large ; on parle d'une hétérogénéité clinique. Il existe des formes sévères semblables aux DMD et BMD et des formes moins sévères avec un début plus tardif ou ayant une évolution plus lente, et parfois particulièrement bénignes révélées par l'existence de crampes et de douleurs musculaires après effort. [10.9.3]

Cette hétérogénéité clinique existe au sein de la même fratrie, on parle d'hétérogénéité clinique intrafamiliale qui se manifeste par l'intensité des symptômes et l'évolution de la maladie.

La créatine phospho-kinase (CPK) sérique est augmentée de manière constante et en général au-delà de 20 fois la valeur normale, ainsi qu'un électromyogramme (EMG) qui confirme une atteinte musculaire. [10.9.3.1]

## II. Découverte des Sarcoglycanopathies

Grâce à de nouvelles techniques de biologie moléculaire, plusieurs gènes impliqués dans les dystrophies musculaires progressives ont été identifiés. (Tableau 1)

Les gènes incriminés dans les sarcoglycanopathies ont été mis en évidence grâce à la découverte du complexe des protéines du sarcolemme associées à la dystrophine et surtout celle de leur effondrement dans les dystrophinopathies. [11]

Les protéines du sarcolemme associées à la dystrophine sont classées en 3 complexes :

- **Le complexe des dystroglycans (DG)** : constitué de L' $\alpha$ -DG entièrement extracellulaire et la  $\beta$ -DG transmembranaire.
- **Le complexe des sarcoglycans (SG)** : constitué d'au moins 4 glycoprotéines transmembranaires ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - SG) et une protéine de 25 kDa non glycosylée (sarcospane).
- **Le complexe des syntrophines** : qui se trouve du côté intracellulaire.

L'histoire de la découverte des gènes codants pour les sarcoglycans mérite d'être contée, car elle illustre l'enchaînement des progrès découlant de la mise à jour du premier maillon : La dystrophine.



## II.1. La dystrophine

La dystrophine est la protéine déficiente dans les myopathies de Duchenne et de Becker, découverte en 1987 par une approche dite à l'époque « génétique inverse » par la recherche préalable du gène au locus morbide correspondant (locus DMD en Xp21) et le déchiffrement de sa séquence codante.

C'est une protéine qui est localisée dans le sarcolemme où elle forme un réseau cytosquelettique dans le muscle normal, elle constitue 2% du sarcolemme et 50% du cytosquelette sarcolemmale, elle est impliquée dans l'ancrage des protéines du sarcolemme aux protéines cytosquelettiques. [12.10]

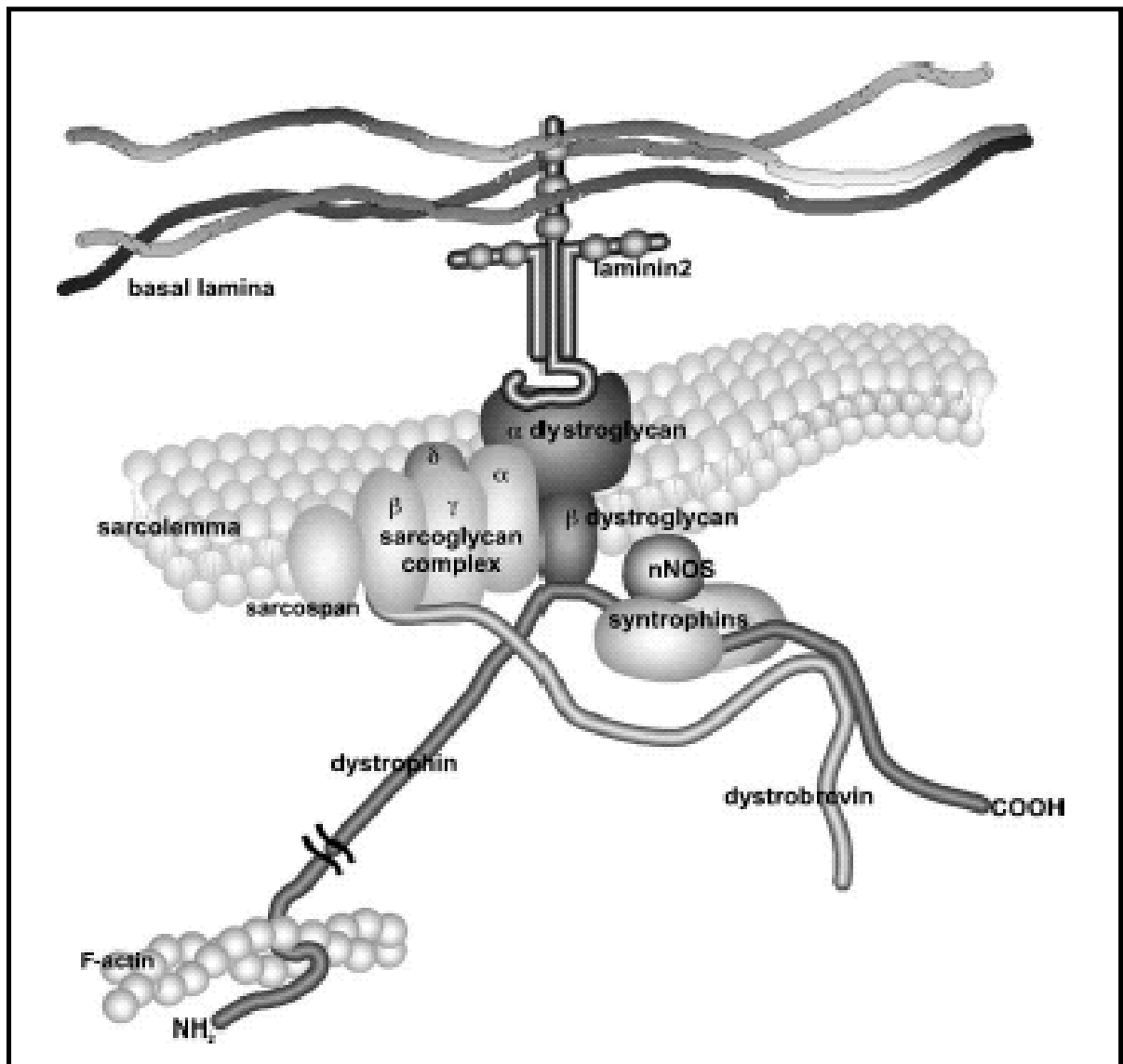
L'absence de cette protéine est la conséquence de mutations nulles dans le gène de la dystrophine dont la taille est de 2.3 Mb. Celles-ci sont le plus souvent des délétions de taille variable entraînant un décalage du cadre de lecture. Les mutations ponctuelles, de type non-sens ou perturbant l'épissage sont beaucoup plus rares.

Les formes moins sévères sont dues à une diminution plus au moins importante de la dystrophine, souvent associées à une troncation par la délétion d'un ou plusieurs exons avec maintien du cadre de lecture, ces formes sont regroupées sous la dénomination de myopathie de Becker (DMB).

La dystrophine est une protéine de 427 kDa exprimée dans le muscle strié à la face interne du sarcolemme, dans le muscle lisse et cardiaque et le cerveau.

Elle est constituée de 4 domaines qui sont à partir de l'extrémité N terminale :

- Domaine A composé de 240 acides aminés à l'extrémité N- Terminale et se lie à l'actine. Il permet l'interaction avec le  $\gamma$ -actine cytosquelettique qui à son tour joue un rôle dans l'ancrage de la dystrophine à la région sous-sarcolemmale.
- Domaine de 2400 acides aminés formé de motifs peptidiques répétés de type spectrine.
- Domaine riche en cystéine de 280 acides aminés entre les résidus 3080 et 3360, évoquant des motifs peptidiques fixant le calcium.
- Domaine C terminal formé des 320 derniers acides aminés, riche en cystéines, il contient le site de liaison à la dystrobrevine et aux syntrophines, protéines cytoplasmiques sous sarcolemmales. Ce domaine interagit avec la membrane plasmique par l'intermédiaire d'une des glycoprotéines associées à la dystrophine : la  $\beta$  dystroglycane.[13]



**Figure 1:** Représentation schématique du complexe dystrophine-protéines associées dans le muscle strié. D'après Chambers et coll.

## II.2. Les protéines associées à la dystrophine

La dystrophine est associée à un complexe de protéines membranaires ou sous membranaires dans le muscle.

Les composants de ce complexe ont été par la suite identifiés grâce aux travaux concurrents de deux équipes : le groupe de Kevin Campbell aux USA et le groupe d'E.Ozawa à Tokyo.

Il est appelé tantôt DAG (Dystrophin Associated Glycoproteins), tantôt DAP (Dystrophin Associated Proteins), il est constitué de glycoprotéines transmembranaires.[13]

### II.2.1 Les complexes des glycoprotéines

#### A. Le complexe des dystroglycanes (DG)

Le complexe des dystroglycanes (DG) est constitué de l'Alpha-dystroglycane et de la Beta-dystroglycane, c'est le complexe des glycoprotéines ubiquitaires associées à la dystrophine. Elles traversent la membrane et unissent le cytosquelette à la lame basale. On les trouve dans de nombreux tissus où ils seraient capables de lier d'autres partenaires avec des liaisons différentes selon les tissus.[10]

Les deux peptides sont codés par un seul gène DAG1 situé sur le chromosome 3p21, il contient deux exons (0.3 kb et 2.4kb) séparés par un large intron. Le cDNA dystroglycane code pour une protéine de 97 kDa. L' $\alpha$ - dystroglycane et la  $\beta$ - dystroglycane sont toutes deux issues de cette protéine précurseur par modifications post-traductionnelles.

- **Alpha- dystroglycane ( $\alpha$ -DG)**

C'est une protéine périphérique de la membrane externe, sa masse moléculaire est de 156kDa. Elle est issue de la protéine précurseur de 97 kDa par clivage protéolytique de la région aminoterminal. Elle n'a pas de segment transmembranaire et présente plusieurs sites de glycosylation.[13.10]

L' $\alpha$ - dystroglycane est liée à la matrice extracellulaire via la mérosine (chaîne  $\alpha$ 2 de la laminine) au niveau du sarcolemme.

- **Béta- dystroglycane ( $\beta$ -DG)**

C'est une masse moléculaire de 43kDa, issue par clivage protéolytique et modification post traductionnelle du domaine carboxy-terminal de la protéine précurseur 97kDa.

Elle est constituée d'un court domaine intracellulaire dit « dystroglycan binding domain » qui lie le domaine riche en cystéine et la première moitié du domaine C-terminal de la dystrophine, et d'un domaine extracellulaire qui interagit étroitement avec l' $\alpha$ -dystroglycane. Elle est le cœur du lien transmembranaire entre la dystrophine et l' $\alpha$ -dystroglycane.

Elle se trouve le plus souvent sous forme d'un doublet A3a et A3b, constitué de protéines apparemment distinctes La 43-DAG correspond à la protéine A3a qui lie la dystrophine contrairement à A3b qui ne la lie pas.

Aucune maladie n'a pu être établie avec des mutations dans le gène des DG cela est expliqué par son expression précoce et ubiquitaire qui rend toute altération incompatible avec la vie.

Les complexes sont répartis comme suit :

**Tableau2 : Répartition des protéines associées à la dystrophine.[10]**

<b>Nom du complexe</b>	<b>Nom de la protéine</b>	<b>Poids moléculaire</b>	<b>Gène responsable</b>	<b>Localisation</b>
Complexe dystroglycane	$\alpha$ - dystroglycane	156 kDa	3q21	Extracellulaire
	$\beta$ - dystroglycane	43 kDa	3q21	Transmembranaire
Complexe sarcoglycane	$\alpha$ - sarcoglycane	50 kDa	17q21	Transmembranaire
	$\beta$ - sarcoglycane	43 kDa	4q12	Transmembranaire
	$\gamma$ - sarcoglycane	35 kDa	13q12	Transmembranaire
	$\delta$ - sarcoglycane	35 kDa	5q33-34	Transmembranaire
	$\epsilon$ - sarcoglycane	47 kDa	7q21.22	Transmembranaire
	$\zeta$ -sarcoglycane	40 kDa	8p22	Transmembranaire
Groupe des syntrophines	$\alpha$ - syntrophine	59 kDa	20q12	Intracellulaire
	$\beta$ 1- syntrophine	59 kDa	8q23-24	Intracellulaire
	$\beta$ 2- syntrophine	59 kDa	16q23	Intracellulaire
	$\gamma$ 1-syntrophine	-	8q11	
	$\gamma$ 2-syntrophine	-	2p25	
Autres	sarcospane	25 kDa	12p11.2	Transmembranaire
	$\alpha$ -dystrobrevine	87 et plus	18q12.1-q12.2	Intracellulaire
	$\beta$ - dystrobrevine	87 et plus	2p22-23	Intracellulaire

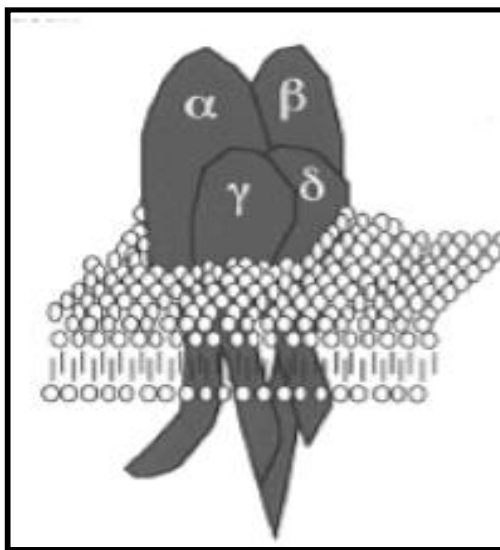
## B. Le complexe des sarcoglycanes

Le complexe sarcoglycane est composé de glycoprotéines transmembranaires spécifiques du muscle squelettique et cardiaque.

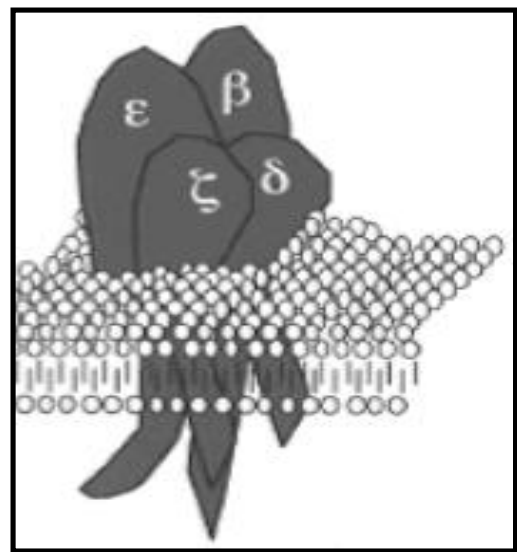
Il est constitué de cinq protéines appelées alpha, beta, gamma, delta et epsilon-sarcoglycane d'un poids moléculaire respectif de 50kDa, 43kDa, 35kDa, 35 kDa et 47 kDa.

Il se fixe à la dystrophine par une liaison latérale au complexe des dystroglycane, qui semble être l' $\alpha$ -dystroglycane. [13]

A



B



**Figure2:** Représentation des complexes sarcoglycanes à la membrane de la fibre musculaire. [10]

(A) Complexe sarcoglycane dans le muscle squelettique et cardiaque.

(B) Complexe sarcoglycane dans le muscle lisse.

- **Alpha- Sarcoglycane ( $\alpha$ -SG)**

L'alpha-sarcoglycane est une glycoprotéine transmembranaire de 50kDa, elle est appelée 50 DAG ; A2 ou adhaline du mot signifiant muscle en arabe du fait que la maladie fut initialement retrouvée chez des patients d'origine maghrébine ou libanaise.

La protéine est d'orientation N-terminale vers le domaine extracellulaire, elle est composée de 387 acides aminés comportant un domaine intracellulaire (C-terminal) qui porte deux sites consensus de phosphorylation, et une région transmembranaire s'étalant de l'acide aminé Leucine-291 à la Valine-311 et un domaine extracellulaire (N-terminale) qui possède deux sites consensus de glycosylation (Asparagine-174 et Asparagine-24) et cinq résidus Cystéines.

Le gène de l' $\alpha$ - sarcoglycane est situé sur le bras long du chromosome 17 en 17q21. Il comporte dix exons s'étendant sur plus de 12kb. [14.15]

- **Beta-Sarcoglycane ( $\beta$ -SG)**

La Beta-sarcoglycane est une glycoprotéine transmembranaire de 43 kDa, elle est constituée de 318 acides aminés, elle possède un domaine N-terminal hydrophobe intracellulaire de 63 acides aminés ; et un domaine transmembranaire de la Leucine-64 à l'Isolucine-90 et enfin un domaine C-terminal extracellulaire avec 4 résidus cystéines qui semblent pouvoir former des ponts disulfures.

Le gène de la  $\beta$ -SG est localisé sur le bras long du chromosome 4 en 4q12, il se compose de six exons dispersés sur une région génomique d'environ 13 kb. [14.15]

- **Gamma- Sarcoglycane ( $\gamma$ -SG)**

La gamma-sarcoglycane est une protéine de 35 kDa, composée de 291 acides aminés, elle possède un segment transmembranaire (leu-36 à val-60), un domaine C-terminal extracellulaire et un petit domaine intracellulaire.

Le gène de la gamma sarcoglycane est localisé sur le bras long du chromosome 13 en 13q12 dès 1992 par liaison génétique dans des familles tunisiennes par Benothmane et al.

Il est constitué de huit exons et sept introns qui occupent une longueur d'environ 100 kb. [16.13]

- **Delta- Sarcoglycane ( $\delta$ -SG)**

La delta- sarcoglycane est une glycoprotéine d'un poids moléculaire de 35 kDa, elle est composée de 290 acides aminés, elle est constituée d'un court domaine transmembranaire (L35-V59) et une large partie extracellulaire de 231 acides aminés où se trouve cinq cystéines, dont quatre à l'extrémité C-terminale.

Le gène de delta- sarcoglycane est localisé sur le bras long du chromosome 5 en 5q33-q34, il occupe 100 kb et se compose de huit exons. [13]

- **Epsilon- Sarcoglycane (e-SG)**

Epsilon- sarcoglycane est une protéine transmembranaire de 47kDa, elle se compose de 413 acides aminés, elle possède un domaine extracellulaire contenant quatre résidus cystéines et un site de glycosylation, un domaine transmembranaire et un court domaine cytoplasmique.

Le gène d'épsilon- sarcoglycane SGCE est située sur le chromosome 7 en 7q21.22, sa taille est estimée entre 50 et 100 kb et se compose de douze exons.[13]

- **Le  $\zeta$ -sarcoglycane**

Le  $\zeta$ -sarcoglycane est le dernier élément de la famille à avoir été identifié. Il présente une masse moléculaire apparente d'environ 40 kDa et est issu d'un gène localisé sur le chromosome 8 (position 8p22) chez l'homme. Ce sarcoglycane présente 57% et 55.7% d'acides aminés similaires avec la  $\delta$ -sarcoglycane et la  $\gamma$ -sarcoglycane respectivement. [16]



### **C. Le complexe des Syntrophines**

Les syntrophines sont des éléments cytoplasmiques du complexe dystrophine-DAP dont elles constituent un sous ensemble qui se fixe sur la seconde moitié du domaine C-terminal de la dystrophine.

Il est constitué de triplets, une  $\alpha$ -syntrophine relativement spécifique du muscle, une  $\beta$ 1- syntrophine qui a une distribution ubiquitaire et dont le gène est localisé sur le chromosome 8q23-24, et de la  $\beta$ 2- syntrophine dont le gène se situe sur le chromosome 16q23.

Le complexe des syntrophines se lie directement à la dernière partie du domaine C-terminal de la dystrophine.

Ces fonctions ainsi que toute pathologie associée à son éventuelle modification restent inconnues.[13.14]

- **L' $\alpha$ 1-syntrophine**

L' $\alpha$ 1-syntrophine est le produit d'un transcrit de 2,1 kb issu d'un gène localisé en 20q11. L' $\alpha$ -syntrophine est présente dans le sarcolemme des fibres des muscles squelettiques et strié mais aussi dans le muscle cardiaque et le rein.

- **La  $\beta$ 1-syntrophine**

La  $\beta$ 1-syntrophine est exprimée de façon ubiquitaire (cerveau, muscles striés, foie, rein, pancréas ...).

Le gène de la  $\beta$ 1-syntrophine est localisé en 8q23 et produit deux messagers de 5.8 ou 1.5 kb. Ce dernier est exprimé surtout dans le foie, à des taux plus modéré dans le muscle squelettique et les reins, et très faiblement dans le muscle cardiaque.

- **La  $\beta$ 2-syntrophine**

La  $\beta$ 2-syntrophine est le produit d'un gène localisé en 16q23 dont les messagers (10.5 ou 2 kb) sont exprimés dans de nombreux tissus.

Les  $\beta$ 1- et  $\beta$ 2-syntrophines ont été identifiées dans de nombreux tissus dont le muscle squelettique où leur localisation semble différer : la  $\beta$ 1-syntrophine est concentrée au niveau du sarcolemme avec l' $\alpha$ 1-syntrophine alors que l'expression de la  $\beta$ 2-syntrophine semble restreinte à la jonction neuromusculaire. L' $\alpha$ 1-syntrophine est également localisée dans le système nerveux central, dans le cerveau et dans les cellules gliales de Müller de la rétine.

- **Les  $\gamma$ 1- et  $\gamma$ 2-syntrophines**

Plus récemment, les  $\gamma$ 1- et  $\gamma$ 2-syntrophines ont été mises en évidence. Elles sont issues de gènes différents localisés respectivement sur les chromosomes humains 8 (8q11) et 2 (2p25). L'expression de la  $\gamma$ 1-syntrophine semble restreinte au système nerveux central alors que la  $\gamma$ 2-syntrophine est identifiée dans divers tissus (muscles, foie, rein). Des épissages alternatifs seraient à l'origine de plusieurs isoformes de ces protéines.

## D. Autres protéines non classées

- **Sarcope** : une protéine transmembranaire de 25kDa détectée par immunofluorescence avec le complexe des glycoprotéines associées à la dystrophine. Elle possède quatre domaines transmembranaires, elle est associée au complexe dystroglycane-DAP et localisée dans la membrane du muscle tout particulièrement au niveau de la jonction neuromusculaire.

Elle est impliquée dans l'assemblage préalable du complexe des sarcoglycane avec lequel elle interagit et qu'elle stabiliserait, par ailleurs le sous complexe sarcoglycane-sarcope stabiliserait le complexe des dystroglycane.

Cette protéine est issue d'un transcrit de 6,5 kb, spécifique des muscles striés squelettiques et cardiaques dont le gène est localisé sur le chromosome 12 en position 12p11.2. Un deuxième transcrit de 4.5 kb s'exprime notamment au niveau des muscles striés, du thymus et des intestins, mais pas au niveau du cerveau.

- **$\alpha$ -Dystrobrevine** : une protéine intracellulaire de 87 kDa et plus, son gène est localisé sur le chromosome 18 en 18q12.1-q12.2, et la  $\beta$ - Dystrobrevine de 87 kDa et plus, son gène est localisé sur le chromosome 2 en 2p22-23. [17]

### **III. Retentissement protéique :**

Un défaut primaire dans l'une des quatre protéines du complexe des sarcoglycanes entraîne en général un déficit très marqué de la protéine correspondante, lequel retentit secondairement sur la quantité des trois autres protéines du complexe, sans diminution ni des dystroglycanes ni de la dystrophine.

Il s'agit d'un complexe typique d'une pathologie des dominos : l'absence de l'une des pièces perturbe l'ensemble du groupe, soit en compromettant sa stabilité, soit en empêchant sa formation. [12.13.14]

La pathologie génétique confirme ainsi la réalité biologique du complexe des sarcoglycanopathies.

Un effondrement plus ou moins important de tous les éléments du complexe SG est observé par une analyse immuno-histochimique, dont le pouvoir de discrimination quantitative est moindre. Cependant cette technique permet une analyse précise de la régularité du marquage sarcolemmale. [17]

Mais si l'analyse est effectuée par Westernblot. Cette méthode, confrontée à la caractérisation du défaut génétique primaire, montre en général un défaut quantitatif plus marqué pour le produit du gène muté que pour les autres partenaires du complexe SG.

Le déterminisme moléculaire de la perturbation du complexe reste à être élucidé.

### **IV. Rôle des sarcoglycanes**

Les mécanismes par lesquels les sarcoglycanes assurent un maintien de l'intégrité du sarcolemme sont encore mal connus, l'altération d'une des sarcoglycanes retentit sur le complexe entier et entraîne une dystrophie musculaire autosomique récessive. [10.13.14.15]

Frederica Pecido en 1997 a proposé deux hypothèses d'après ses travaux de recherche portant sur la pathologie moléculaire des sarcoglycanes

- un rôle structural en renforçant les points d'encrage pour l'étirement de la membrane musculaire, les protéines du complexe SG forment une structure compacte pour l'appui mécanique de la beta-dystroglycane.
- Un rôle fonctionnel des sarcoglycane  $\beta$ -  $\gamma$ - et  $\delta$ -SG dans un processus métabolique où la calpaine 3 interviendrait dans une étape ultérieure. [10.18.34]

## V. Spectre des mutations

Le spectre des mutations est très grand et mieux connu pour le gène  $\alpha$ -SG, c'est le premier gène identifié.

Il contient une trentaine de mutations identifiées à ce jour. [19.18]

Ces mutations sont le plus souvent des mutations ponctuelles, touchant préférentiellement des doublets hypermutables CG et les exons 3 et 5. Elles sont de type nul (codon stop, décalage du cadre de lecture par insertion/délétion) soit de type faux sens qui siège en général dans la partie extracellulaire de la protéine.

Les mutations nulles empêchent toute production de la protéine, tandis que les mutations faux-sens ont un effet quantitatif très prononcé mais des traces de protéine  $\alpha$ -SG sont visible par Western-blot.

Pour les autres gènes du complexe sarcoglycane, on retrouve une douzaine de mutations différentes dans le gène  $\beta$ -SG, six dans le gène  $\gamma$ -SG et deux dans le gène  $\delta$ -SG. [10.14.15.16]

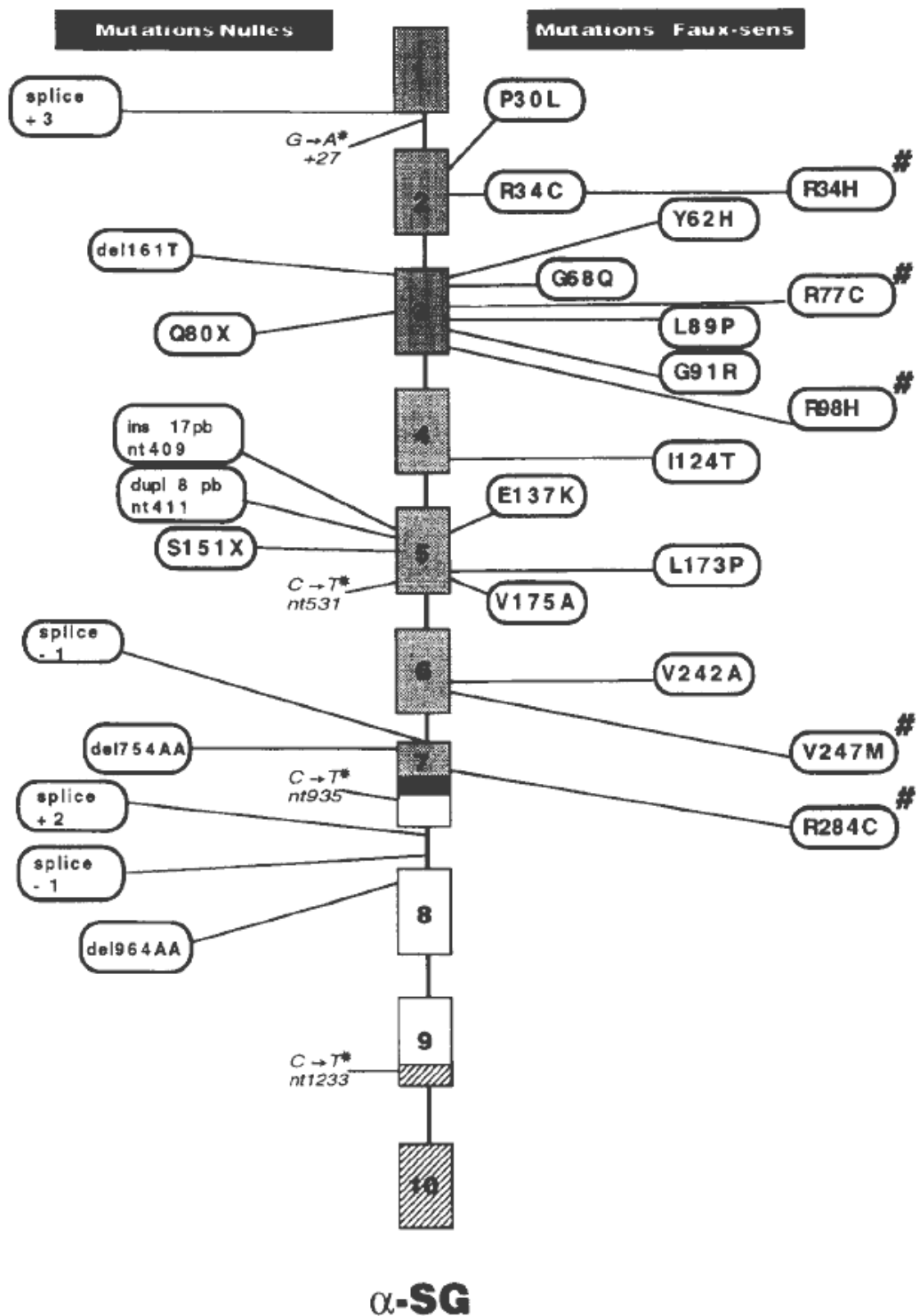
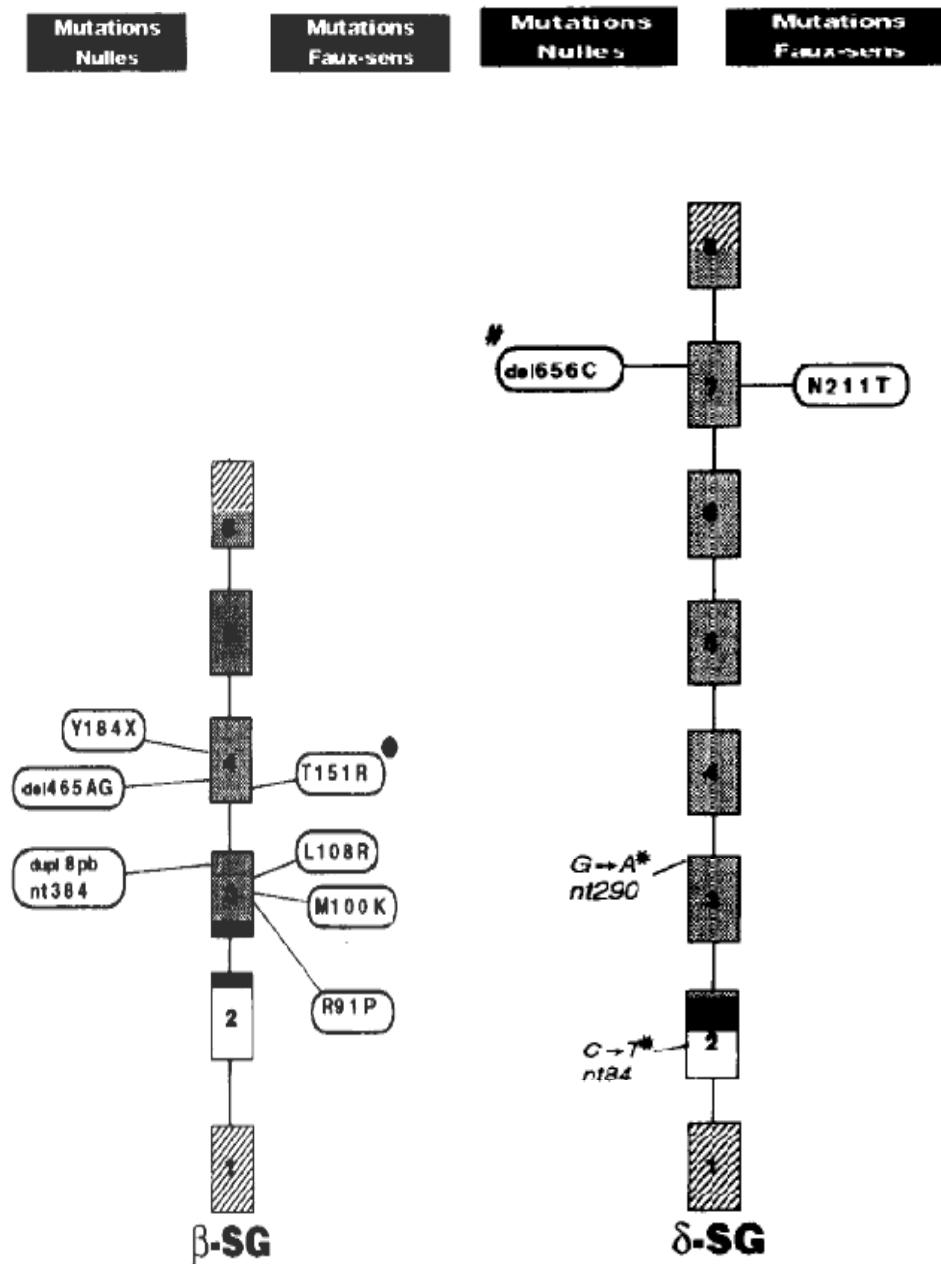


Figure 3 : Mutations du gène alpha-sarcoglycane [10]

Le symbole \* désigne les polymorphismes observés. Le symbole # désigne les mutations récurrentes



**Figure 4 : Mutations du gène beta-sarcoglycane et du gène delta-sarcoglycane [10]**

Le symbole \* désigne les polymorphismes observés. Le symbole # désigne les mutations récurrentes.

Le symbole ● désigne les mutations avec effet fondateur.

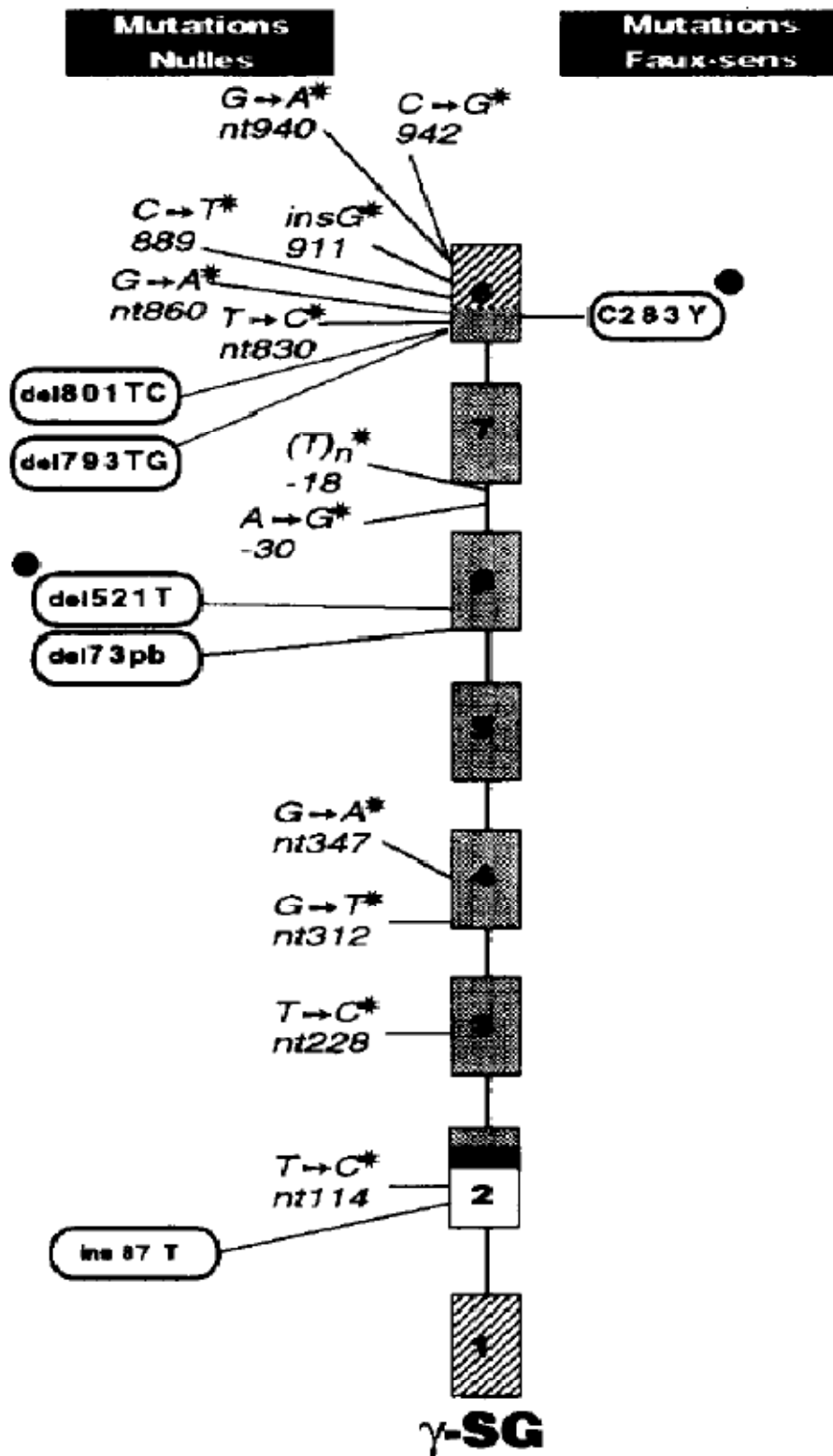


Figure 5: Mutations du gène gamma-sarcoglycane [10]

Le symbole \* désigne les polymorphismes observés. Le symbole # désigne les mutations récurrentes. Le symbole ● désigne les mutations avec effet fondateur.



## VI. Distribution géographique-mutations récurrentes et effets fondateurs

Les sarcoglycanopathies existent dans les populations d'Afrique du Nord, Liban, Japon, Brésil et les Etats-Unis avec une différence dans la distribution géographique des mutations dans les différents gènes. [10.13.14]

La mutation la plus fréquente dans les sarcoglycanopathies est la mutation Faux-sens R77C dans le gène  $\alpha$ -SG, elle a été retrouvée sur des haplotypes différentes et dans des populations différentes, ce qui indique qu'il s'agit d'une mutation récurrente.

Deux autres mutations à effet fondateur ont été mises en évidence dans le gène  $\gamma$ -SG dans deux populations fortement consanguines.

La première mutation est la  $\Delta$  521 T dans le gène  $\gamma$ -SG prévalente en Afrique du Nord et retrouvée aussi au Brésil, en association avec un allèle rare du marqueur intragénique  $\Delta$ 135232.

La deuxième mutation est la C283Y associée à un autre allèle du marqueur  $\Delta$ 135232 qui semble être propre aux Tsiganes d'Europe occidentale. [20]

Dans ce dernier cas, la reconstitution d'un haplotype ancestral a permis de dater la mutation à plus de 60 générations, c'est-à-dire avant la date présumée de la migration historique des ancêtres des Gitans hors de l'Inde. En plus de l'intérêt physiopathologique, cette mutation offre la possibilité de vérifier les hypothèses des historiens.

**Tableau3 : Gènes des dystrophies musculaires progressives à transmission autosomique récessive. [12]**

Gène locus	Taille gène	Nombre exons	Protéine (nombre aa)	localisation	Fonction/ relation	Population où la pathologie été retrouvée
<b><math>\alpha</math>-sarcoglycane</b> LGMD2D/17q	Env 12kb	10	50kDa 387 aa	Sarcolemme transmembranaire	« dystrophin-connection »	-Europe -Afrique du Nord -Liban -Turquie -Brésil, Argentine -Etats-Unis -Japon
<b><math>\beta</math>- sarcoglycane</b> LGMD2E/4q	13.5 kb	6	43 kDa 318 aa	Sarcolemme transmembranaire	« dystrophin-connection »	-Amish du Sud -Brésil -Etats-Unis
<b><math>\gamma</math>- sarcoglycane</b> LGMD2C/13q	>100 kb	8	35 kDa 291 aa	Sarcolemme transmembranaire	« dystrophin-connection »	-Afrique du nord -Liban -Tsiganes d'Europe -Turquie -Pakistan -Japon -Brésil
<b><math>\delta</math>- sarcoglycane</b> LGMD2F/5q	Env100kb	8	35 kDa 290 aa	Sarcolemme transmembranaire	« dystrophin-connection »	-Brésil
<b>Clapaïne-3</b> LGMD2A/15q	>40 kb	24	95 kDa 821 aa	intracellulaire	Protéase cystéine à	-Ile de la Réunion -Basques -Amish du Nord -Brésil -Europe -Turquie -Japon

## VII. Corrélation génotype/phénotype

Les sarcoglycanopathies présentent un tableau clinique similaire à celui des dystrophinopathies, comme l'hypertrophie des mollets, l'atteinte musculaire proximale est peu sélective, l'élévation du taux de la créatine Kinase. En revanche, l'atteinte respiratoire et cardiaque y est moins prédominante et les facultés mentales sont normales ou non corrélées.

Il semble que les  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$  sarcoglycanopathies sont sévères en règle générale, avec un début dans l'enfance et un tableau clinique similaire à celui d'une myopathie de Duchenne. Mais il reste que l'échantillon de patients analysés jusqu'à présent est encore restreint, avec un biais de recrutement en faveur des cas les plus sévères. [10.15]

L'hétérogénéité phénotypique des sarcoglycanes est aujourd'hui admise par l'ensemble des auteurs. L'analyse extensive d'un certain nombre de famille a permis d'identifier plusieurs mutations responsables de sarcoglycanopathies allant d'une atteinte légère, lentement progressive, à la plus sévère des incapacités dont l'évolution est rapide.

Des patients homozygotes atteints de  $\alpha$ - sarcoglycanopathie LGMD2D, liée à la mutation R77C du gène  $\alpha$ -SG peuvent avoir une atteinte sévère ou au contraire discrète. Des patients hétérozygotes portant des mutations nulles /R77C ou R77C/A287C peuvent avoir un tableau clinique différent les uns des autres. [13]

Il a été trouvé aussi : deux frères homozygotes, dont l'un est asymptomatique et l'autre présente une forme discrète de sarcoglycanopathies, alors qu'ils avaient tous les deux la même mutation A284C du gène  $\alpha$ -SG.

Donc, il est difficile d'établir une corrélation précise entre génotype et phénotype, d'autant que les causes de la variabilité des phénotypes ne sont pas encore bien établies.

Ainsi en dépit des similitudes cliniques et morphologiques, dystrophinopathies et sarcoglycanopathies n'ont pas encore reçu d'explication physiopathologique unificatrice. [20.21]

## VIII. L'hétérogénéité génétique des myopathies autosomiques récessives

De nombreuses familles recensées dans le monde avec diverses formes de myopathies autosomiques ont subi des analyses biochimiques qui devaient mettre sur la voie des gènes candidats, ainsi que des analyses de liaison qui visaient à mettre en évidence une localisation chromosomique. [10.21]

Dans un premier temps, ces analyses de liaison génétiques ont été réalisées sur des familles maghrébines SCARMD, ils ont montré une liaison de la maladie au locus 13q12 définissant ainsi un premier locus appelé LGM2C dans la nouvelle classification.

Cependant des analyses de liaison génétique réalisées chez des familles au Brésil et en France a révélé une liaison de la maladie au locus 17q21 indiquant que le déficit en adhaline des SCARMD liées au chromosome 13 (locus LGM2C) était nécessairement un phénomène secondaire.

La mise en évidence d'une famille française où la myopathie était liée aux marqueurs de la région 17q21, où le gène de l'adhaline était muté devait démontrer l'existence de vraies adhalinopathies primaires (au locus LGM2D qui est donc celui de l'adhaline). [15]

Depuis l'identification du complexe des protéines associées à la dystrophine, particulièrement les sarcoglycanes, le terme adhaline est désormais définitivement remplacé par celui d' $\alpha$ -sarcoglycane.

L'hétérogénéité génétique des sarcoglycanopathies est expliquée par l'existence de mutations siégeant dans l'un des quatre gènes du complexe de sarcoglycanes, siégeant sur d'autres chromosomes différents. [21.10.13]

D'autres gènes de LGMD2 furent ensuite mis en évidence en suivant la même filière des DAG.

- **La LGMD2E** : cette forme a été localisée chez une famille Amish du Nord de l'Indiana, elle est localisée sur le chromosome 4 en 4q12.

Ce gène code pour la  $\beta$ -sarcoglycane. Il comporte 6 exons de 13.5 kb

- **LGMD2F** : elle est localisée sur le chromosome 5 en 5q33-34, le gène est d'ordre 100 kb, composé de 8 exons séparés par des introns très long, et code pour la  $\delta$ -sarcoglycane.
- **LGMD2A** : la recherche de liaison génétique a été entreprise sur une famille de l'Ile de la Réunion, puis confirmé chez la population Amish de l'Indiana du Nord (USA) puis chez les brésiliens.  
Le gène de cette forme de dystrophie a été lié à la région 15q15.1-q15.3  
Le gène code pour la calpaine-3, il s'agit d'une protéase 3 neural spécifique des muscles appartenant à la famille des calpaines calcium dépendant intracellulaire et non lysosomales.  
Il s'agit du premier gène impliqué dans une dystrophie musculaire ne faisant pas intervenir une protéine de structure. Plus de cinquante mutations différentes conségrégeant avec la maladie ont été identifiées par l'ensemble des familles.
- **LGMD2B** : son gène est localisé sur le chromosome 2 en 2p13-14, il code pour la dysferline qui est une protéine de 230 kDa à localisation sarcolemmique, elle a été démontré chez des familles atteintes de LGMD originaires de Palestine et de Sicile, est confirmée chez des patients brésiliens.
- **LGMD2G** : une étude de liaison génétique a été réalisée sur une famille non consanguine d'origine caucasienne ayant un ancêtre italien avait établi un lien avec le chromosome 17. Le gène est localisé alors en 17q11-q12.
- **LGMD2H** : l'analyse génétique de quatre familles apparentées d'Huttérites de Manitoba (Canada) comprenant 40 membres dont certains atteints d'une forme de dystrophie musculaire des ceintures (LGMD) a permis de localiser un gène sur le chromosome 9 en 9q31.34
- **LGMD2I** : est localisée en 19q13.3 dans la même région que le gène DMC1 responsable d'une forme sévère de dystrophie musculaire congénitale (DMC).

## **IX. Pathologie moléculaire des sarcoglycanopathies**

Le déficit d'une des quatre sous-unités sarcoglycanes ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  et  $\gamma$ ) conduit à une importante réduction ou à l'absence de la totalité du complexe sarcoglycane à la membrane des cellules du muscle strié.

Il est maintenant clairement établi que des mutations touchant chacun des gènes codant les sarcoglycanes (hormis l' $\epsilon$ -sarcoglycane) sont à l'origine des dystrophies musculaires des ceintures de type 2, chaque maladie (LMGD type 2C à 2F) correspond à une mutation sur un gène codant un sarcoglycane en particulier.[10.13]

On citera que les  $\alpha$ -sarcoglycanopathies et  $\gamma$ -sarcoglycanopathies qui sont les sièges de la majorité des mutations décrites et qui sont les plus répandus dans les populations du Nord d'Afrique.

### **IX.1. L'alpha-sarcoglycanopathies**

La  $\alpha$ -sarcoglycane est une glycoprotéine de 50 kDa(387aa), dont le gène ( $\alpha$ -SG) de 12 kb est localisé en 17q21 donnant un transcrit de 1.5 kb, et comporte 10 exons il est exprimé exclusivement dans les muscles squelettiques et cardiaques.[22.23]

Sa mutation est responsable d'une dystrophie musculaire de type LGMD2D qui se transmet selon le mode autosomique récessif.

L'étude moléculaire de l' $\alpha$ -sarcoglycanopathie a commencé par la recherche des mutations chez les malades par séquençage direct des dix exons du gène. Ces recherches ont démontré que le gène était sujet à de nombreuses mutations faux sens, et que les mutations étaient très souvent en situation d'hétérozygotie et par conséquent plus difficile à détecter par séquençage direct. [10.15.23]

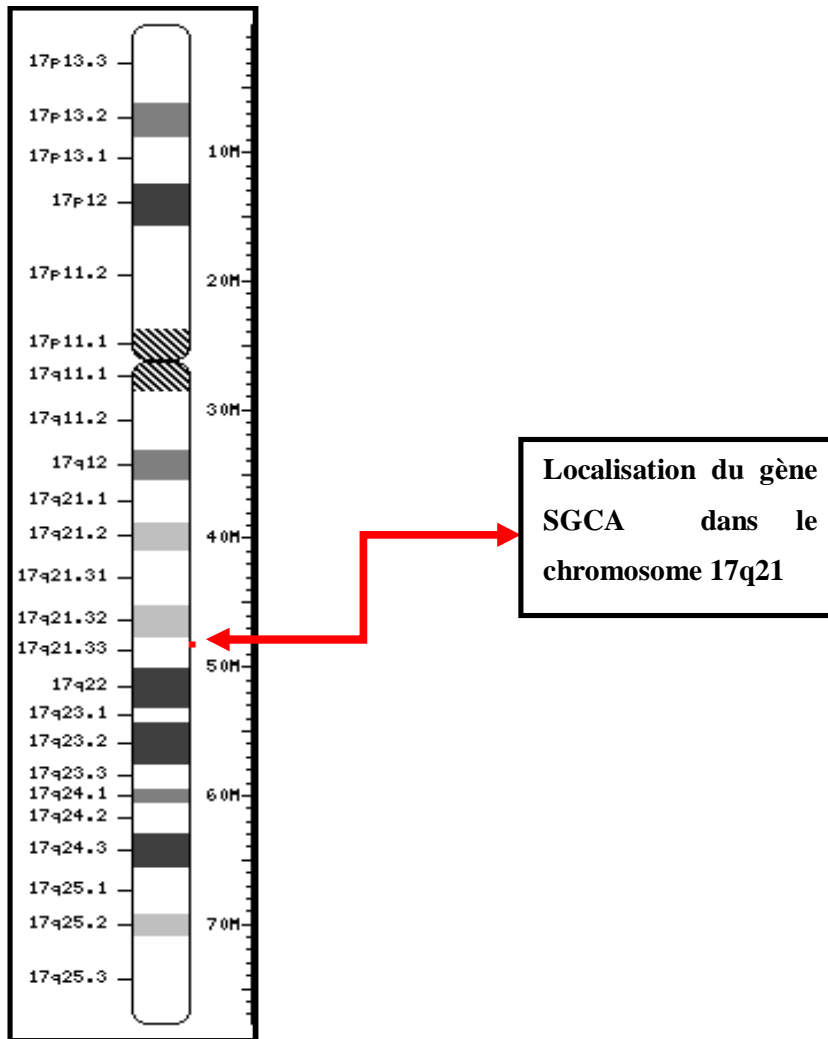
La nouvelle stratégie adaptée à la détection des mutations ponctuelles hétérozygotes est la méthode de DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) qui permet d'explorer les huit premiers exons du gène, suivie par le séquençage direct des fragments génomiques qui présentent un profil anormal. [24.25]

Le spectre des mutations du gène de l' $\alpha$ -SG est le mieux connu du fait qu'il a été le premier identifié, celui-ci est très varié et consiste le plus souvent en des mutations ponctuelles.

L'intégrité du 3<sup>ème</sup> exon paraît critique, étant donné le nombre de mutations pathogènes trouvées dans cette région. Il pourrait correspondre à un point chaud de mutations.

Certaines mutations, comme la mutation  $\alpha$ -R77C ou  $\alpha$ -R284C sont particulièrement fréquentes, elles ont été retrouvées sur des haplotypes différentes et dans différentes populations ; il s'agit de mutations récurrentes, elles représentent 70% des mutations totales (R77C en représente 50% à l'exception de la Finlande où elle est retrouvée chez 100% des patients la plupart du temps sur les deux allèles), 30% des cas semblent donc avoir des mutations uniques .c'est une substitution de l'arginine par la cystéine (229CGC> TGC (R77C)) dans l'exon 3 du SGCA.

Cette hétérogénéité des défauts moléculaires du gène de l' $\alpha$ -SG est retrouvée dans tous les pays où l'étude a été menée à ce jour : France, Brésil, Espagne, Allemagne, Italie, Japon, Maroc, Etats-Unis, Portugal. [27.26]



**Figure 6 : Localisation du gène SGCA sur le chromosome 17**

[www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps)

## **IX.2. Gamma- sarcoglycanopathies**

La  $\gamma$ -sarcoglycane est une glycoprotéine de 35 kDa (291aa) qui fait partie du complexe des sarcoglycanes associé à la dystrophine, est issue d'un transcrit de 1,7 kb. Le gène codant  $\gamma$ -SG est localisé en 13q12 et sa mutation est à l'origine d'une dystrophine des ceintures fréquente en Afrique du Nord de type LGMD2C, appelé aussi myopathie Maghrébine. [28.29.30]



De nombreuses mutations du gène  $\gamma$ -SG ont été mises en évidence, les principales sont :

- Une délétion d'une thymine  $\Delta 521T$  (appelée aussi mutation tunisienne ou méditerranéenne du fait de sa grande fréquence dans les pays maghrébines) qui est retrouvé la plus part du temps chez les malades d'origine maghrébine. [31.32.30]
- Une mutation faux sens C284Y appelée mutation Tsigane retrouvée par RT PCR chez des familles Tsiganes [33.34]. Ces deux mutations sont des mutations fondatrices de la  $\gamma$ -SG.

Ces mutations altérant le cadre de lecture, elles affectent la  $\gamma$ - sarcoglycane et perturbent tout le complexe des sarcoglycanes et la seule perte du  $\gamma$ -sarcoglycane peut provoquer l'apoptose [35], même en présence de dystrophine car la  $\gamma$ - sarcoglycane et son absence suffit à provoquer l'apparition d'une dystrophie musculaire. [36.10.14]

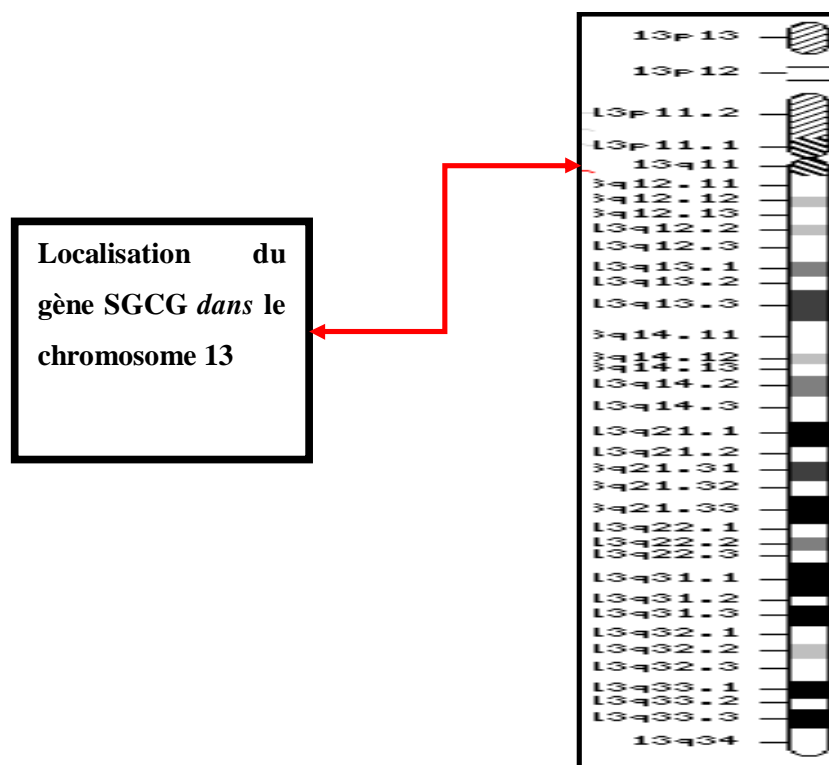


Figure 7: Localisation du gène SGCG sur le chromosome 13

[www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps).

## **X. Le conseil génétique et le diagnostic prénatal**

Le conseil génétique a pour but d'évaluer le risque de survenue ou de récurrence d'une maladie ou d'une malformation dans la descendance d'un couple, de proposer à celui-ci les différentes solutions de prévention qui s'offre à lui et de l'aider dans sa décision.

Un diagnostic est établi pour les sarcoglycanopathies d'après les aspects cliniques et les résultats d'études moléculaires. Le résultat est communiqué aux familles ayant un risque d'avoir un enfant atteint d'une affection héréditaire ou voulant avoir d'autres enfants.

Ceci se fait dans une consultation spécialisée de médecine préventive.

La consultation peut toucher plusieurs aspects :

- Avant une grossesse dans le cas d'unions consanguines (même avant le mariage).
- Dans une famille qui a déjà un enfant atteint, et qui veut avoir d'autres enfants.

Deux difficultés sont à prendre en considération :

- L'hétérogénéité génétique.
- La consanguinité.

## **XI. Démarches thérapeutiques**

En mars 2003, une étude réalisée chez la souris mutante déficiente en gamma-sarcoglycane (gsg<sup>-/-</sup>) a montré que l'hypertrophie des muscles serait due à une augmentation du nombre des fibres musculaires avec probable ramification de ces fibres, et non à la formation d'un tissu fibro-graisseux de remplacement souvent rencontrée en cas de dystrophie musculaire.

Un transfert de gène de l'alpha-SG a été réussi chez une souris modélisant la LGMD 2D (la souris Sgca). Chez l'un des modèles animaux de la LGMD2 F, le hamster syrien Bio 14.6, déficient en delta-SG, un transfert de gène de la delta-SG a été tenté par voie intra-artérielle.

Plusieurs essais thérapeutiques, consistant en l'administration de corticostéroïdes, ont donné des résultats prometteurs chez l'homme. Un essai de thérapie génique de phase I dans les sarcoglycanopathies est en cours d'étude entre Généthon et Harvard Medical School.

Une équipe américaine a publié une étude portant sur l'assemblage des sarcoglycanes dans des myotubes en culture. Le bêta sarcoglycane sert d'initiateur à la formation du complexe. Son association avec le delta sarcoglycane positionne le complexe dans la membrane. Enfin, l'incorporation de l'alpha sarcoglycane et son interaction avec le gamma sarcoglycane achève l'assemblage. Des mutations dans le bêta sarcoglycane et son absence de glycosylation empêche le complexe de se former. [37.38.39]

Une étude italienne a confirmé, dans des cellules musculaires en culture, que l'alpha sarcoglycane qui fixe l'ATP, est capable de l'hydrolyser en présence de Calcium et de magnésium lors de la différenciation de ces cellules en myotubes. La perte de cette activité d'hydrolyse pourrait jouer un rôle dans les mécanismes d'apparition de la LGMD 2D. [38.39.40.41]

La régulation des interactions entre la filamine C et les sarcoglycanes pourrait intervenir dans la capacité de la calpaïne 3 à moduler les interactions entre le cytosquelette et la membrane.

Le gène de l'alpha Sarcoglycane a été transféré dans des cellules souches provenant des vaisseaux de souris dystrophiques. Ces cellules ont ensuite été injectées dans l'artère fémorale de souris n'exprimant pas l'alpha sarcoglycane (null-alphaSC). Cette étude montre une reconstitution musculaire, sans doute due à la distribution des cellules souches dans le système capillaire. [42]

L'injection du gène du delta Sarcoglycane humain inséré dans un vecteur adénoviral (AAV2) dans la cavité cardiaque d'Hamsters syrien Bio 14.6 (modèle pour la LGMD2F), via le système artériel coronaire donne de bons résultats. Le transfert positif dans une majorité de cardiomyocytes induit une expression du gène conservée 4 mois sans réaction immunitaire apparente.

En février 2008, une équipe de chercheurs dirigée par le Dr Isabelle Richard (CNRS-FRE3087) du laboratoire Généthon, financé par l'AFM, a démontré, chez la souris, l'efficacité d'une nouvelle stratégie thérapeutique, pharmacologique, pour certaines mutations de l'alpha-sarcoglycanopathie ou LGMD2D, une myopathie des ceintures récessive. Cette stratégie pharmacologique pourrait s'appliquer à d'autres dystrophies musculaires des ceintures caractérisées par le même type de mutation génétique. [42.43]

*Partie pratique*

# *Méthodologie*

## I. Patients

Notre étude a porté sur 51 malades appartenant à 35 familles de l'est algérien reçu dans la consultation de neuromusculaire et suivis au niveau du service de Neurologie du CHU de Constantine, elle a visé les deux sexes. Tous adressé au laboratoire de Biologie et Génétique Moléculaire du CHU de Constantine pour la confirmation du diagnostic.

Trente et un malades présentent un tableau de myopathie des ceintures avec un déficit musculaire proximal prédominant au niveau de la ceinture pelvienne.

Vingt patients ont un diagnostic de DMD ou BMD et qu'une analyse moléculaire par PCR multiplex [ne présentent pas de délétion] les a discriminé.

Les malades faisant l'objet de cette étude sont des cas familiaux ou sporadiques.

L'âge des patients varie entre 4 et 54 ans.

Deux catégories de malades ont été distinguées :

- Les cas familiaux : lorsque au moins deux individus sont atteints dans la famille.
- Les cas sporadiques : lorsque l'enquête familiale ne retrouve qu'un seul patient atteint dans la famille.

Nous avons réalisé une analyse systématique sur l'ADN de 51 patients en deux étapes :

- La première étape : Analyse de l'ADN des 51 patients par PCR /digestion par l'enzyme NLA IV pour la recherche de la mutation ponctuelle R77C.
- La deuxième étape : Analyse de l'ADN par PCR/SSCP pour la recherche de la délétion  $\Delta 521T$ .

Les patients sont répartis comme suit suivant le diagnostic clinique :

**Tableau 4 : Répartition des malades selon le diagnostic clinique**

Diagnostic clinique	Nombre de patients	Sexe	Age du début	Age actuelle
LGMD2	31	F : 13	2 mois à 40ans	4 à 54 ans
		H : 18		
DMD/BMD	20	F : 2	3 à 25 ans	4 à 40 ans
		H : 18		

F :Femme

H :Homme

## **II. Méthodes**

### **II.1. L'enquête familiale**

L'interrogatoire des parents du patient est obligatoire afin de récapituler les antécédents familiaux par une recherche de consanguinité parentale, recherche des cas similaires dans la fratrie et les ascendants, d'enquêter sur les causes de décès et les cas d'avortement ou de maladie survenu chez la fratrie et les ascendants et enfin de dresser un arbre généalogique et établir le mode de transmission (Annexe 6 et 7).

### **II.2. les examens complémentaires**

- Le dosage de la CPK a été réalisé chez tous les patients.
- L'électromyogramme (EMG) : un tracé myogène est caractéristique chez tous les patients.
- La biopsie musculaire : la biopsie musculaire n'est pas pratiquée au CHU de Constantine, un seul malade a pu avoir un résultat. Elle permet de visualiser le déficit de la protéine.
- L'électrocardiogramme (ECG) : demandé chaque année pour les patients myopathes pour un suivi et une recherche d'éventuelle atteinte du muscle cardiaque.



## **II.3.Analyse Moléculaire**

### **II.3.1. Extraction ADN**

#### **Principe**

Les leucocytes sont séparés du sang total par lyse hypotonique et thermique ensuite par un détergent (SDS) et une protéinase K.

L'ADN nucléaire est libéré dans le milieu et les protéines qui lui sont associées sont digérées et éliminées par précipitation au NaCl, la pelote d'ADN est formée dans le surnageant par précipitation avec l'éthanol.

L'ADN est solubilisé en phase aqueuse après avoir calculé le rapport de DO à 260nm sur la DO à 280nm qui doit être compris entre 1.6 et 2.

## **Extraction de l'ADN**

Prélèvement d'au moins 10ml de sang sur tube EDTA.

### **1. Obtention des culots de globules blancs**

Faire deux étapes de lyse de globules rouges

#### **1.1. Première lyse : des globules rouges**

- Remplir les tubes Falcon à 50ml avec TE 20 : 5 à 4°C.
- Agiter puis placer les tubes dans la glace 10 minutes.
- Centrifuger 15 minutes à 3000 tour/min.

#### **1.2. Deuxième lyse : des globules rouges**

- Jeter le surnageant
  - Ajouter 5ml de TE20 : 5 au culot et agiter vigoureusement pour casser le culot de globules blancs
  - Compléter à 25ml avec TE20 : 5 et laisser 10 minutes dans la glace.
  - Centrifuger 15 minutes à 3000tours/min
  - Jeter le surnageant
  - Si le culot des leucocytes n'est pas blanc, refaire un autre lavage avec TE 20 : 5
- Il est possible de congeler le culot de globules blancs et le conserver dans TE10 : 1 ou sec, et poursuivre la technique un autre jour.

## **2. Digestion par Protéinase K**

- Transvaser le culot des eucaryotes dans un tube Falcon de 15ml.
- Ajouter :
  - 3 ml de tampon de lyse (NaCl, EDTA, Tris)
  - 0.2 ml de SDS à 10%
  - 0.1 ml de PK
- Agiter le tube sur une roue à 37°C une nuit, ou 02 heures à 56°C dans un bain marie.

## **3. Précipitation à l'alcool absolu**

- Le lendemain, refroidir dans la glace.
- Ajouter 1ml de NaCl 4M et agiter vigoureusement.
- Laisser dans la glace 5 minutes pour la précipitation des protéines.
- Ensuite centrifuger 10 minutes à 2500 tours/min.
- Transvaser le surnageant dans un tube Falcon de 50 ml et ajouter deux fois son volume de l'éthanol absolu à 20°C.
- Mélanger doucement par retournement.
- La pelote d'ADN se forme.

## **4. Récupération et lavages de l'ADN**

- Mettre 0.5 ml d'éthanol à 70% dans chaque tube NUNC de 1.5 ml identifié au préalable avec le numéro de l'ADN et le nom et le prénom du malade.
- Transvaser la méduse de chaque prélèvement dans le tube NUNC correspondant à l'aide d'une pipette.
- Laver l'ADN dans l'éthanol à 70% et jeter le surnageant.
- Rincer une deuxième fois et jeter le surnageant.
- Laisser évaporer l'alcool dans l'étuve à 37°C pendant 30 minutes ou à température ambiante plus longtemps.

## Cas particuliers

- Si la méduse d'ADN n'apparaît pas, laisser dans la glace 30 minutes ensuite centrifuger 10 minutes à 3000 tours/min.
- Si l'ADN apparaît sous forme de multiples filaments, centrifuger le tube Falcon pendant 10 minutes à 3000 tours/min, vider le surnageant et récupérer le culot d'ADN dans un tube NUNC puis rincer une à deux fois avec l'éthanol à 70%.

## 5. Resuspension de l'ADN

- Ajouter entre 0.300 à 1 ml de TE10 :1 en fonction de la taille du culot d'ADN, ou ajouter de l'eau distillé en ampoule.
- Laisser tourner toute une journée ou plus sur la roue rotative à 37°C jusqu'à dissolution complète (un jour ou deux).

## 6. Dosage de l'ADN

- Dans des tubes secs destinés au dosage de l'ADN, ajouter :
  - 10  $\mu$ l d'ADN
  - 990  $\mu$ l d'eau distillée
- Lire la DO dans une cuve quartz contre de l'eau distillé à 260nm et 280nm sur le spectrophotomètre

$$1 \text{ unité de DO} = 50 \mu\text{g/ml d'ADN}$$

$$DO \times 50 \times 20 = \mu\text{g d'ADN / ml de suspension}$$

$$\Rightarrow [C] \text{ en } \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}} = DO \times 260 \times 50$$

### **II.3.2. Mise au point de la PCR/digestion pour le diagnostic génotypique direct des $\alpha$ -sarcoglycanopathies pour la mutation R77C.**

#### **Principe de la PCR (Polymerase Chain Reaction)**

Cette technique décrite en 1985 par K.Mullis et al, a permis d'amplifier des séquences d'ADN de manière spécifique et d'augmenter de manière considérable la quantité d'ADN dont on dispose initialement, elle nécessite de connaître la séquence des régions qui délimitent l'ADN à amplifier. Ces séquences serviront à synthétiser des amorces oligonucléotides complémentaires, ces oligonucléotides serviront à délimiter la portion d'ADN à amplifier. L'ADN polymérase les utilisera comme amorces. [44]

La PCR est constituée des cycles successifs, chaque cycle comprend une succession de trois phases :

- Une phase de dénaturation par la chaleur.
- Une phase d'hybridation avec deux amorces spécifiques.
- Une phase d'extension par l'ADN polymérase à partir des amorces.

Le nombre de cycles est généralement compris entre 30 et 40, et grâce à la Taq polymérase extraite d'une bactérie thermophile (*Thermus Aquaticus*), cette technique est automatisée (dans des appareils appelés thermocyclers).

Les résultats doivent être optimisés en fonction d'un certain nombre de paramètres : concentration en  $MgCl_2$  , concentration en amorces, spécificité des amorces....etc

Nous allons amplifier l'exon 3 du gène de l'alpha-sarcoglycane qui est un point chaud de mutations, et nous allons rechercher la mutation R77C qui représente 50% des mutations dans le gène  $\alpha$ -SG. La PCR digestion va nous permettre de détecter une mutation ponctuelle R77C.

#### **Analyse de restriction :**

Le produit PCR est soumis à une digestion enzymatique de restriction. Si une mutation ponctuelle modifie le site de restriction initialement présent, la taille des fragments d'ADN obtenus après digestion sera modifiée et décelable après électrophorèse des fragments d'ADN.

• **Réalisation :**

En pratique, le thermocycler réalise toutes les étapes de façon automatique :

- Dénaturation à 96°C pendant 5 minutes.
  - Hybridation à 54°C pendant 30 secondes.
  - Extension à 72°C pendant 30 secondes.
  - Dénaturation à 94°C pendant une minute.
  - Extension finale à 72°C pendant 7 minutes.
- } 40 cycles

Chacun des paramètres de la PCR peut être modifié, particulièrement la durée des étapes, la température d'hybridation et le nombre de cycles.

• **Préparation de la PCR :**

- 1- Préparer le Mix de la PCR de l'exon 3 du gène de l' $\alpha$ -sarcoglycane, en ajoutant les réactifs suivants dans un tube Eppendorf de 1.5 ml : (annexe 4)

Réactif	Mix ( $\mu$ l)	Concentration
Tampon (10 $\times$ )	5	10mM
Mgcl <sub>2</sub>	4	25mM
dNTP	1	25mM
3F	1	20pg/ml
3R	1	20pg/ml
Taq polymérase	0.3	5 $\mu$ /ml
H <sub>2</sub> O stérile	37.7	

- 2- Vortexer le mélange Mix.
- 3- Pipeter 49 $\mu$ l du Mix dans chaque tube Eppendorf de 0.2 ml.

- 4- Ajouter 2µl d'ADN du malade.
- 5- Placer les tubes dans le thermocycler.

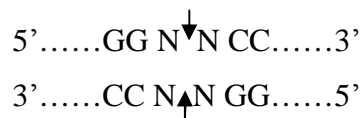
6- Contrôle du produit d'amplification :

- On prépare un gel de contrôle de la PCR, gel d'agarose 1.5%.
- On mélange 7 à 10µl du produit d'amplification avec 3µl de solution de bleu de Bromophenol BBP.
- On dépose notre mélange dans les puits du gel d'agarose 1.5%.
- On réalise une électrophorèse dans un tampon TBE 1x pendant 45 minutes à environ 80 ou 100 Volt.
- On visualise la séquence amplifiée directement en lumière ultraviolette grâce à la présence dans le gel d'une solution de bromure d'ethidium (BET).
- On vérifie si l'ADN a amplifié et si notre PCR est contaminée ou non.

• **Digestion enzymatique par NLA IV :**

Les produits de PCR vont être digérés par l'enzyme de restriction NLA IV.

Elle est extraite de la bactérie Bacillus species, elle coupe :



- Préparation de l'échantillon :

Réactifs	Volume µl
NLA IV	2
Tampon NLA IV	3
BSA	0.3
H <sub>2</sub> O stérile	9.7

- Ajouter à ce mélange, 30µl de produit de PCR dans un tube Eppendorf de 1.5ml.
- Mettre le tube dans un bain marie sec à 37°C pendant 02 heures.
- Mettre le tube dans une étuve à 56°C pendant 03 heures et ensuite 15 minutes dans un speedvac pour concentrer le produit PCR digérés.

- **Electrophorèse sur gel d'Agarose-Nusieve**

Les produits de digestion sont ensuite séparés sur gel d'agarose/nusieve.

- Préparation du gel Agarose-Nusieve 2.1, (annexe4), on peut utiliser aussi un gel d'agarose à 3%.
- Déposer 15 µl du produit de la digestion mélangé avec du bleu de bromophenol BBP dans le gel en présence d'un marqueur de taille qui sert à déterminer la taille des fragments, et un témoin hétérozygote, l'électrophorèse est réalisé dans du tampon 1X. (annexe4)
- Laisser migrer pendant 30 minutes à 60V puis à 100V pendant 02 heures et 30 minutes.
- Visualiser le gel par transi lamination sous UV.



### **II.3.3. Mise au point de la SSCP pour le diagnostic des Gamma-sarcoglycanopathie**

- **Principe de la technique SSCP « Single Strand Conformation Polymorphism »**

La technique SSCP est basée sur l'analyse électrophorétique des produits PCR sous forme de fragments simple brin. On amplifie par PCR une région que l'on désire étudier et on compare la mobilité de l'ADN dénaturé portant une mutation par rapport à celle d'un fragment de référence comportant une séquence normale, la méthode est à la fois simple et sensible car la présence d'une lésion minime comme une mutation ponctuelle altère suffisamment la conformation spatiale de la molécule pour qu'il en résulte des changements de migration électrophorétique en gel non dénaturant.

L'ADN en conformation simple brin présente une certaine mobilité dans un gel de polyacrylamide non dénaturant, cette mobilité spécifique est due à la conformation spatiale d'ADN simple brin qui résulte de la formation de liaison hydrogène et électrostatique essentiellement au sein des structures primaires qui aboutissent à la formation des structures secondaires-tertiaires d'ADN.

Après dénaturation les produits SSCP vont migrer, sous forme simple brin, dans un gel non dénaturant de polyacrylamide. La différence de mobilité entre l'ADN muté et normal sera objectivé sur gel. La détection sur gel de polyacrylamide peut se faire, soit après marquage radioactif des amorces, soit après révélation du gel par coloration. La migration peut se faire aussi sur un séquenceur automatisé (utilise une amorce ou un désoxynucléotide marqué avec un fluorochrome).

La SSCP est utilisée pour la recherche d'une mutation (des mutations ponctuelles, des délétions ou des insertions courtes).

Nous allons utiliser la SSCP dans notre travail à la recherche de la mutation  $\Delta 521T$  dans le gène de l' $\gamma$ -sarcoglycane dans l'exon 6. Cette mutation  $\Delta 521T$  est une mutation récurrente à effet fondateur, et elle est retrouvée dans les populations du Nord d'Afrique. Les résultats de la migration électrophorétique sont en fait représentés par des bandes visibles sur le gel, quatre bandes dont deux pour l'ADN servant de témoin, l'un est le brin sens (+) et l'autre brin anti-sens (-). Les deux autres bandes représentent l'ADN muté où l'un est le brin sens muté et l'autre le brin anti-sens muté.

La migration du brin (+) et (-) est relative : on ne peut pas prédire quelles bandes correspondront respectivement au brin (+) et au brin (-), cela dépend de la conformation de chaque simple brin. L'intensité de la bande observée n'est pas le reflet de la quantité de chaque allèle.

On peut aussi observer d'autres bandes moins intenses et correspondantes à différentes conformations possible d'ADN simple brin.

Des fragments de 300 à 400 pb peuvent être étudiés par SSCP, globalement on estime que cette technique permet la détection d'environ 90% des mutations pour des fragments de 300pb son rendement diminue avec la taille du fragment à analyser. [44]

- **Amplification de l'exon 6 du gène de la  $\gamma$ -sarcoglycane**

Dans un tube Eppendorf de 1.5 ml, ajouter successivement pour chaque individu à étudier les réactifs suivants (annexe 4) :

Réactifs	Volume du Mix ( $\mu$ l)	Concentration
Tampon 10X	5	10mM
DMSO	5	
Mgcl <sub>2</sub>	10	25mM
dNTp	2	25mM
oligo 6F+6R	1.7	10pmol
Taq	0.8	5 $\mu$ / $\mu$ l

H <sub>2</sub> O stérile	14.8	
--------------------------	------	--

1- Le programme de la PCR de l'exon 6 est le suivant :

- Dénaturation à 95°C pendant 05 minutes.
  - Hybridation à 55°C pendant 50 secondes.
  - Elongation à 72°C pendant 45 secondes.
  - Dénaturation à 94°C pendant 45 secondes.
- } 31 cycles
- Extension finale à 72°C pendant 07 minutes.

2- Vortexer le mélange Mix.

3- Pipetter 39.3 µl du Mix dans un tube Eppendorf de 0.2 ml et ajouter 10 µl d'H<sub>2</sub>O et 1 µl d'ADN du malade.

4- Placer les tubes dans le thermocycler.

5- Contrôle du produit de PCR :

- On prépare un gel de 1.5% d'agarose.
- On mélange 7 à 10 µl du produit de PCR à 3 µl de solution BBP.
- On dépose notre mélange dans le gel d'agarose 1.5%.
- On réalise une électrophorèse dans un tampon TBE 1% pendant 45 minutes à environ 80 ou 100 Volt.

On visualise la séquence amplifiée directement en lumière ultraviolette grâce à la présence dans le gel de 10µl de BET.

On vérifie si l'ADN a amplifié et si notre PCR est contaminé ou non.

• **Préparation des échantillons pour la SSCP :**

- 1- Dans un tube Eppendorf 0.2 ml, mettre 2 µl de la solution tampon (annexe4) et rajouter 4 µl du produit de PCR.
- 2- Ajouter 6 µl de solution de dénaturation (annexe4) au mélange.

- 3- Dénaturation des produits de PCR à 95°C pendant 5 minutes.
- 4- Mettre les échantillons dans la glace pour que les deux brins ne puissent pas se rehybrider.

- **Electrophorèse**

1. Préparation du gel :

- Sortir le gel « gene gel Exel 12.5/24 » de l'emballage avec précaution.
- Pipetter 20 ml de solution réhydratation.
- Mettre le gel dans la solution de réhydratation pendant 60 minutes sur un agitateur.
- Retirer le gel de la solution et le mettre sur un papier absorbant.
- Le gel est prêt à l'emploi.

2. Allumer l'appareil et afficher une température 15°C deux heures avant le début de la migration.

- Pipetter 0.5 ml de l'huile de kérosène à déposer dans une cuve de Gene Phor.
- Etaler la goutte d'huile sur la surface de la cuve avec du papier Josef.

3. Déposer le gel sur la plaque de la cuve du Gene Phor en respectant la position de la cathode vers l'anode.

4. Rabattre la première plaque.

5. Réhydrater les bandelettes cathode et anode respectivement chacune dans 6 ml de tampon de l'anode.

6. Placer la bandelette de la cathode dans la cathode (-) et la bandelette de l'anode dans l'anode (+), dans la cuve de l'électrophores de Gene Phor.

7. Déposer 6 µl des échantillons et 6 µl du marqueur de taille dans le gel.

8. Faire migrer les échantillons dans les conditions suivantes :

	<b>Température</b>	<b>Voltage</b>	<b>Time</b>
<b>Phase 1</b>	5-25°C	90V	25 min
<b>Phase 2</b>	5-25°C	500V	50 min

Le temps final de la migration est de 240 minutes.

**9.** Après la migration, coloration du gel dans 250 ml d'H<sub>2</sub>O ou TBE1X et 40µl du BBP pendant 10 minutes sous agitation douce.

**10.** Révélation sous UV.

# *Résultats*

Le taux de CPK sanguin est élevé chez tous nos patients ayant un phénotype LGMD2 à 100% et 90% chez nos patients DMD/BMD.

Les malades sont répartis en fonction des caractères sporadiques ou familiaux :

L'enquête familiale et l'établissement des arbres généalogiques nous ont permis de classer les malades en deux catégories sporadique et familiale.

Le diagnostic clinique établi par le clinicien nous a permis de distinguer deux catégories de myopathie des ceintures LGMD2 et DMD/BMD (qui n'ont pas de délétion).

Les malades LGMD2 sont répartis selon le sexe : 13 femmes et 18 hommes, alors que pour les malades DMD/BMD c'est 18 hommes et 02 femmes.

**Tableau 5 : Répartition des patients selon le diagnostic clinique**

<b>Clinique</b>	<b>L'âge du début</b>	<b>Sexe</b>	<b>Familial</b>	<b>Sporadique</b>
LGMD2	3-12ans (1 cas de 40ans)	13 femmes	6	7
	2mois-13ans (1 cas de 27ans)	18 hommes	6	12
DMD/BMD	-	2 femmes	2	-
	4-10ans (1 cas de 25 ans)	18 hommes	14	4

- Chez nos patients LGMD2 femmes, six sont des cas familiaux et sept des cas sporadiques.
- Chez nos patients DMD/BMD femmes, les deux cas sont familiaux.
- Pour les hommes LGMD2, six hommes sont des cas familiaux et douze sporadiques.
- Pour les hommes DMD/BMD, quatorze hommes sont des cas familiaux et quatre sporadiques.
- Selon l'âge du début : Chez nos patients LGMD2 femmes la moyenne de l'âge de début est de 6.25ans et chez les hommes est de 6.8ans, pour les hommes DMD/BMD la moyenne d'âge est de 5.42 ans.

- 4 patients ont perdu la marche : deux LGMD2 (un frère et une sœur) à l'âge de 17 ans et deux patients DMD/BMD à l'âge 9 ans et de 13 ans.
- La notion de consanguinité a été retrouvée chez 22 familles.

**Tableau 6 : Classement des patients selon le diagnostic clinique, le sexe et le caractère sporadique ou familial.**

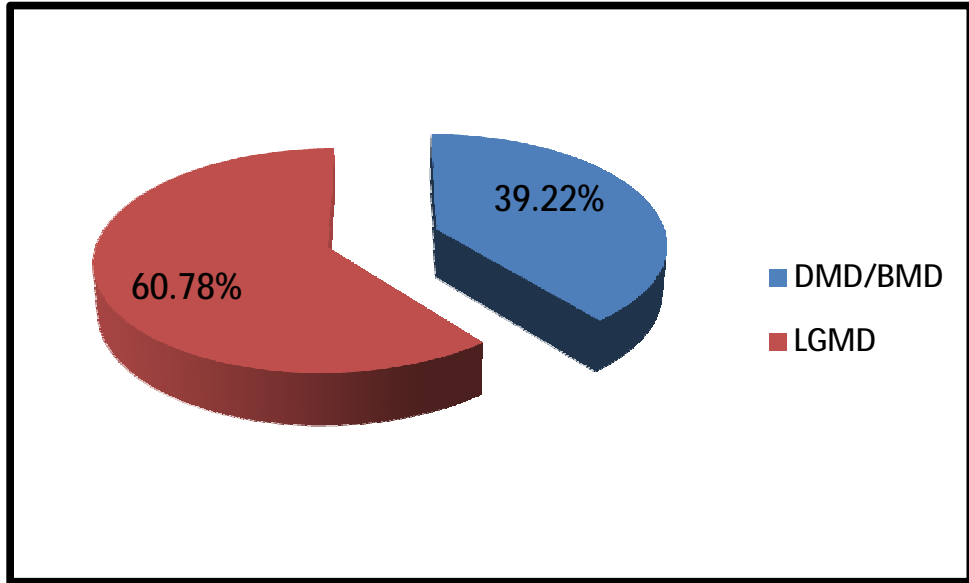
Phénotype	Malades	Sexe	Caractère sporadique ou familial
LGMD2	M1	H	s
	M2	F	s
	M3	H	s
	M4	F	f
	M5	F	f
	M6	H	s
	M7	F	s
	M8	H	s
	M9	H	f
	M10	H	s
	M11	F	f
	M12	F	s
	M13	H	f
	M14	H	f
	M15	F	s
	M16	F	s
	M17	F	f
	M18	F	s
	M19	H	s
	M20	H	f
	M21	H	s
	M22	H	s
	M23	F	s
	M24	H	f
	M25	F	f
	M26	F	f
	M27	H	s
	M28	H	s
	M29	H	f
	M30	H	s
	M31	H	s



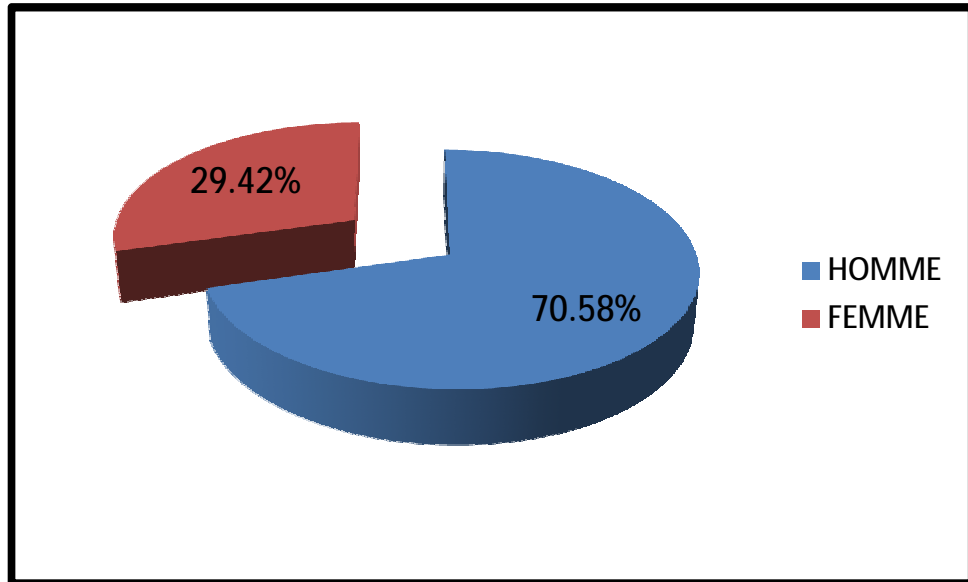
Phénotype	Malades	Sexe	Caractère sporadique ou familial
<b>DMD/BMD</b>	<b>M32</b>	<b>H</b>	<b>f</b>
	<b>M33</b>	<b>H</b>	<b>f</b>
	<b>M34</b>	<b>H</b>	<b>s</b>
	<b>M35</b>	<b>H</b>	<b>f</b>
	<b>M36</b>	<b>H</b>	<b>f</b>
	<b>M37</b>	<b>H</b>	<b>f</b>
	<b>M38</b>	<b>H</b>	<b>f</b>
	<b>M39</b>	<b>H</b>	<b>f</b>
	<b>M40</b>	<b>H</b>	<b>f</b>
	<b>M41</b>	<b>H</b>	<b>f</b>
	<b>M42</b>	<b>H</b>	<b>f</b>
	<b>M43</b>	<b>H</b>	<b>s</b>
	<b>M44</b>	<b>H</b>	<b>s</b>
	<b>M45</b>	<b>H</b>	<b>f</b>
	<b>M46</b>	<b>H</b>	<b>s</b>
	<b>M47</b>	<b>H</b>	<b>f</b>
	<b>M48</b>	<b>F</b>	<b>f</b>
	<b>M49</b>	<b>F</b>	<b>f</b>
	<b>M50</b>	<b>H</b>	<b>f</b>
	<b>M51</b>	<b>H</b>	<b>f</b>

**H** : homme                      **s** : sporadique

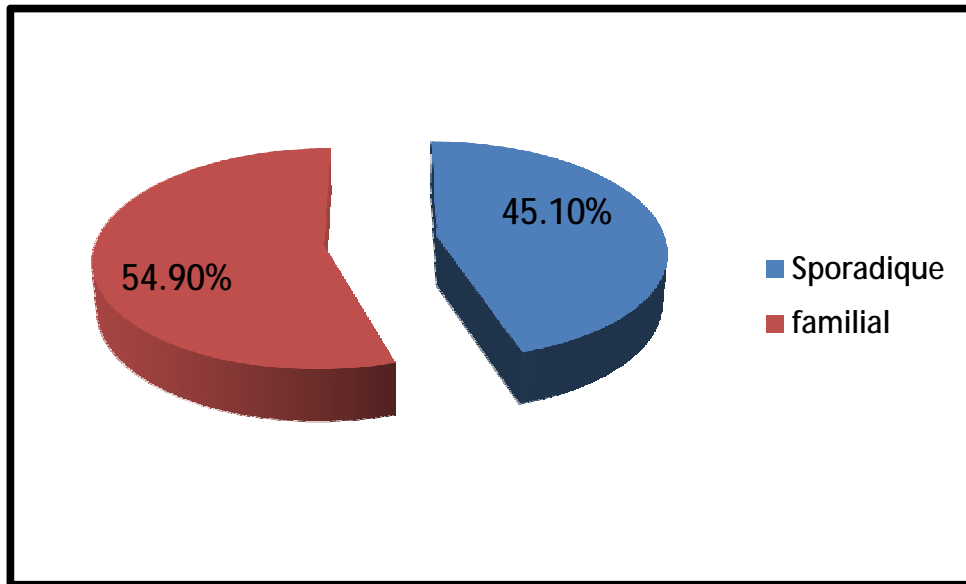
**F** : femme                        **f** : familial



**Répartition des malades selon le phénotype clinique**



**Répartition des malades selon le sexe**



#### Répartition des malades selon le caractère sporadique ou familial

#### Recherche des signes associés :

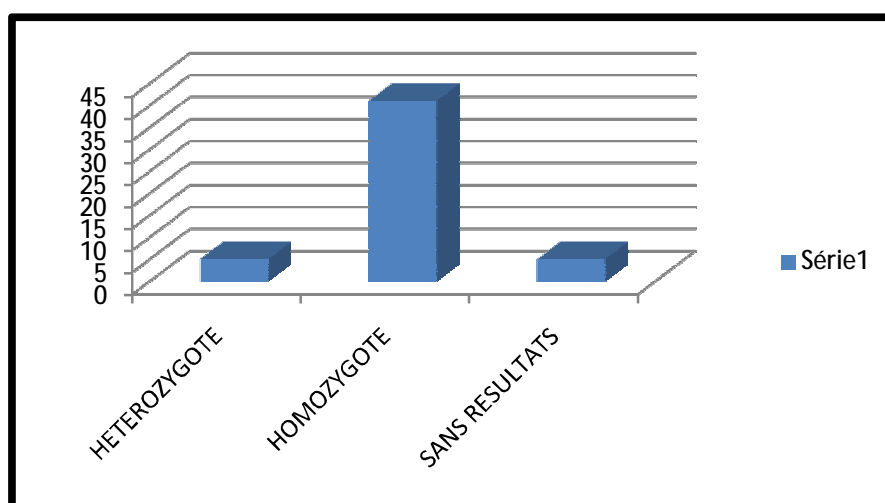
- Hypertrophie des mollets : 44 malades (86.27%).
- Une Macroglossie : 13 malades (25.49%).
- Gowers positif : 15 malades (49.41%).
- Pas d'hypertrophie des mollets : 7 malades (13.73%).

#### Immunohistochimie :

L'étude immunohistochimique du complexe des sarcoglycanes a été faite seulement chez un patient et qui a montré un déficit de la gamma-sarcoglycane.

### **Analyse de l'ADN par PCR digestion :**

La mise au point de la PCR digestion pour l'exon 3 du gène SGCA ( $\alpha$ -SG) par l'enzyme NLA IV, nous a permis de réaliser le diagnostic génotypique direct de nos 51 malades, cette analyse nous a permis de détecter 5 hétérozygotes pour la mutation R77C, quarante et un patients étaient homozygotes normaux pour cette mutation et quatre patients non pas de résultats (l'ADN n'a pas amplifié) .



### **Répartition des malades selon le résultat de la PCR**

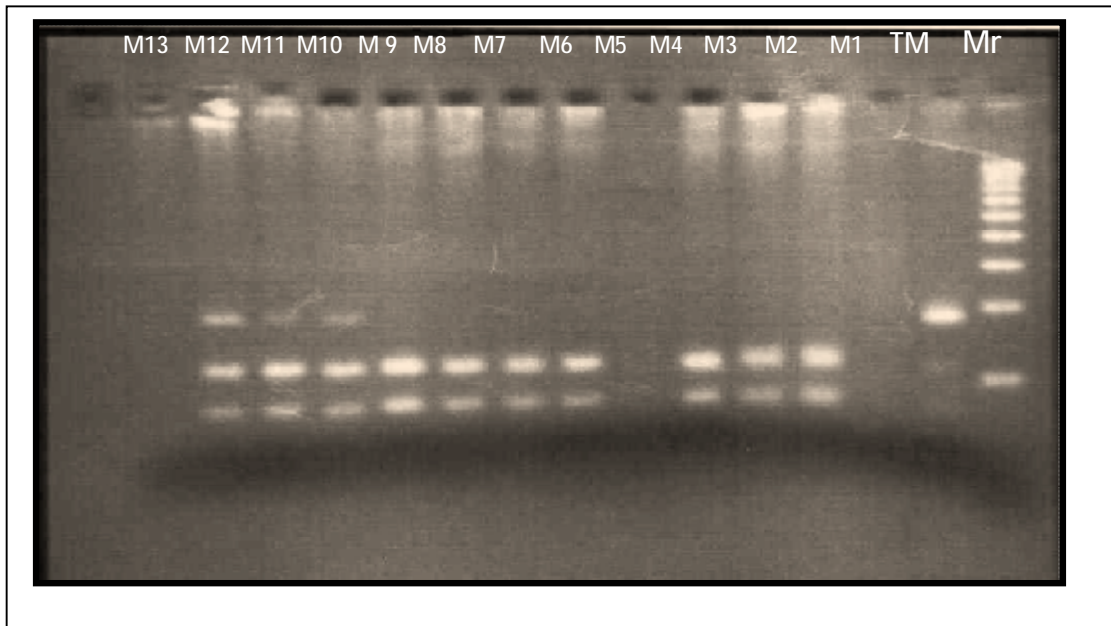
Tous nos échantillons d'ADN ont subi une PCR pour amplifier l'exon 3 du gène  $\alpha$ -SG avec deux couples d'amorces.

Tous les ADN qui n'ont pas amplifiés ont été repris systématiquement, et ceux qui n'ont pas encore amplifiés ont subis une réextraction d'ADN.

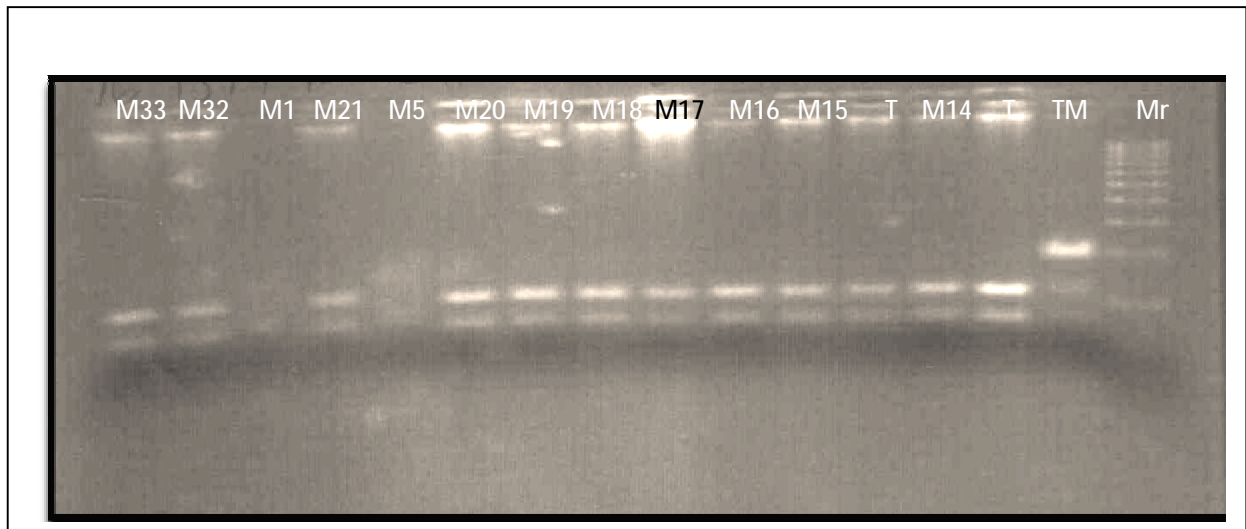
Tous les produits de PCR ont subi un contrôle de PCR sur gel d'agarose.

Une digestion enzymatique a été réalisée sur les produits de PCR par l'enzyme NLA IV en présence d'un témoin hétérozygote.

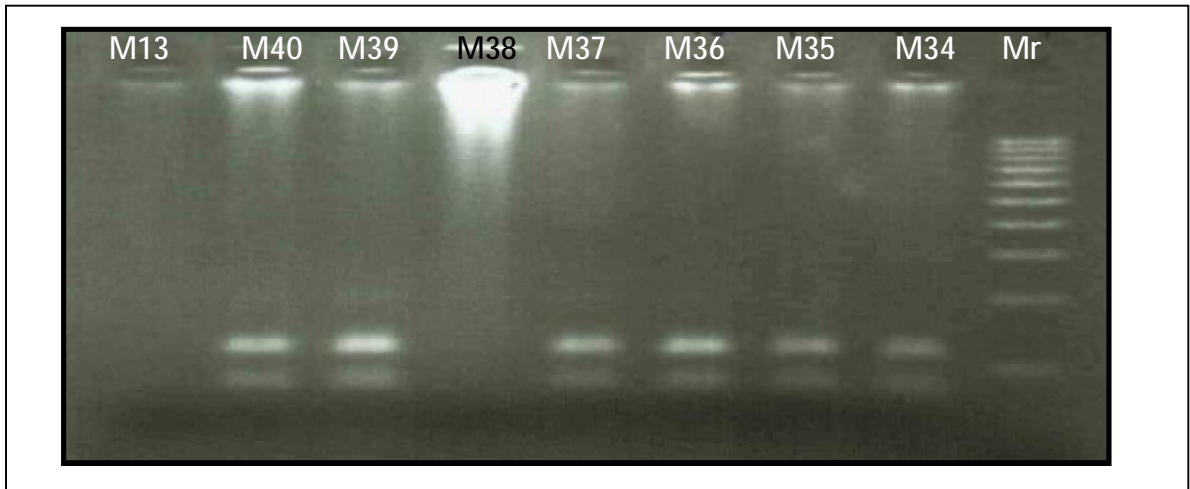
Ensuite les produits de digestions sont analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose 3% ou agarose/Nusieve et visualisés par ultraviolet en présence de Bromure d'Ethidium.



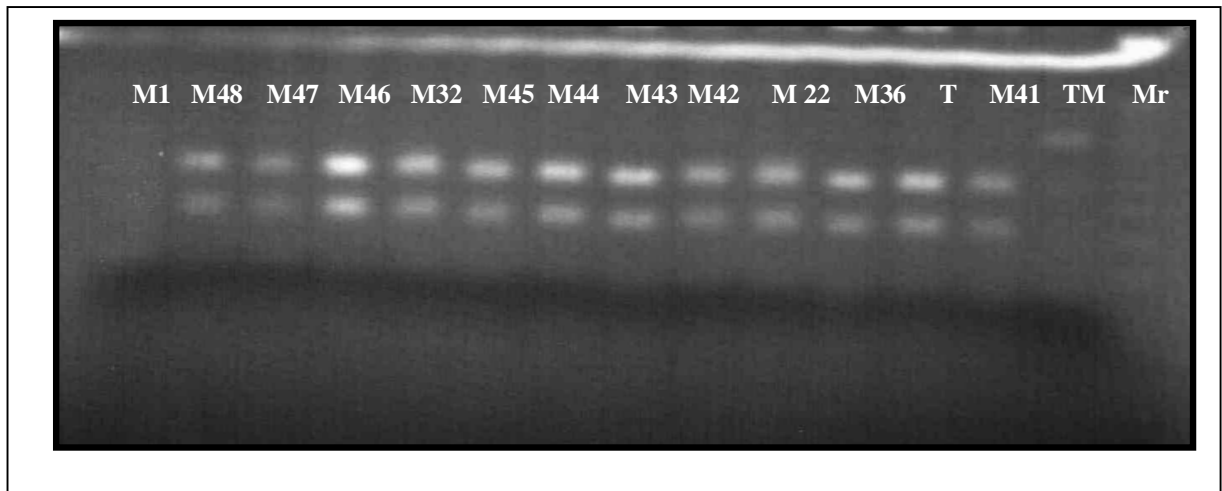
**Résultat de la PCR Digestion pour les malades :M1, M2,M3,M4,M5,M6,M7,M8,M9,M10,M11,M12,M13.**



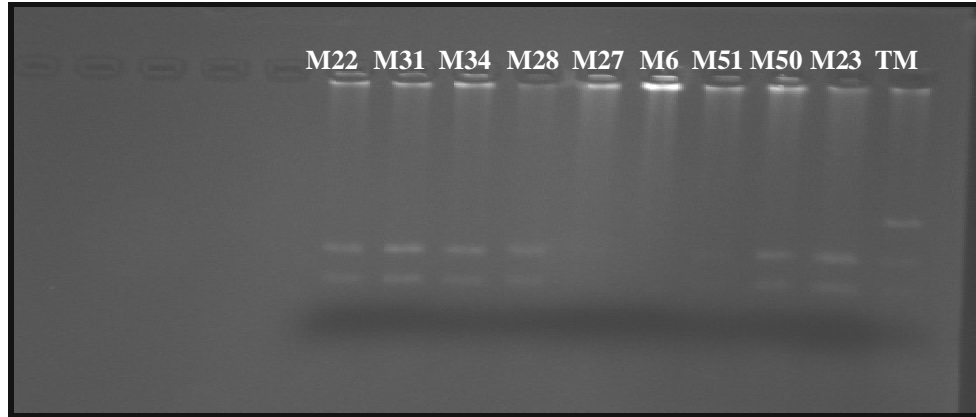
**Résultat de la PCR Digestion pour les malades :M14, M15,M16,M17,M18,M19,M20,M5,M21,M1,M32,M33,M33.**



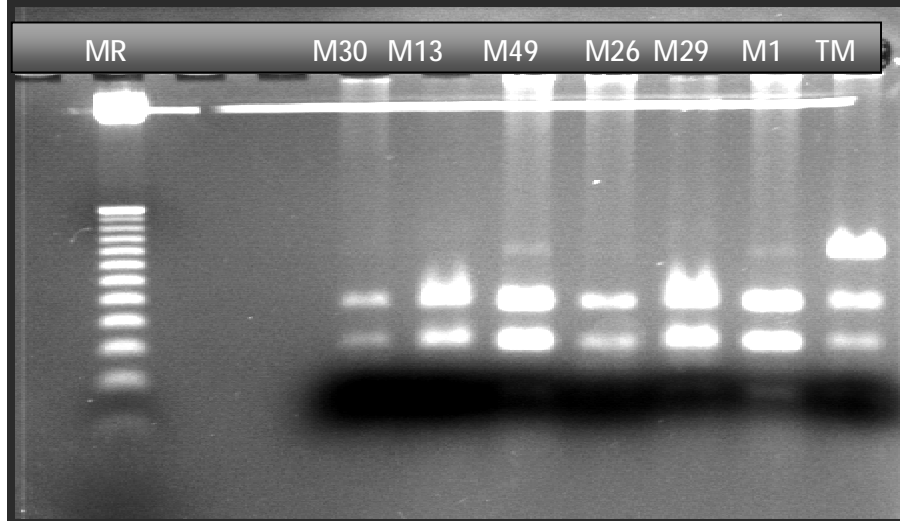
**Résultat de la PCR Digestion pour les malades :M34, M35,M36,M37,M38,M39,M40,M13.**



**Résultat de la PCR Digestion pour les malades :M41,M36,M22,M42,M43,M44,M32,M46,M47,M48,M1.**



**Résultat de la PCR Digestion pour les malades :  
M23, M50, M51, M6, M27, M28, M34, M31, M22.**



**Résultat de la PCR Digestion pour  
les malades : M1, M29, M26, M49, M13, M30.**

### **Analyse de l'ADN par SSCP :**

La mise au point de la PCR pour l'amplification de l'exon 6 du gène SGCG avec un couple d'amorces 6F et 6R a été réalisé.



#### **Gel de control pour la PCR de l'exon 6 du gène SCGG**

La SSCP a été réalisé pour la recherche de la délétion  $\Delta 521T$  dans le gène  $\gamma$ -SG

Les produits de PCR ont été dénaturés dans une solution de dénaturation pendant 5 minutes à 95°C, ensuite mis dans la glace pour empêcher la réhydratation des simples brins.

Les échantillons ont migrés sur gel de polyacrilamide.

Le premier test : la migration a duré 02heures

Le deuxième test : la migration a duré 06 heures.

Le troisième et quatrième test : la migration a duré 10 heures.

Les produits ont été visualisés par le Bromure d'Ethidium :

Aucune bande n'a pût être visualisé.

#### **Problème de la mise au point de la technique SSCP :**

Plusieurs essais ont été réalisés pour la mise au point de la technique de SSCP pour le diagnostic génotypique direct des  $\gamma$ -sarcoglycanopathies, malheureusement aucun essai n'a abouti a cause des gels de polyacrylamide et des solutions d'hydratation qui ont dépassés la date de péremption (2002).





**Gel de polyacrylamide après migration**

*Discussion*

*Conclusion*

## *Conclusion*

Les sarcoglycanes constituent un groupe de glycoprotéines intégrés à la membrane plasmique et participent au complexe associé à la dystrophine. Ce complexe participe à la liaison entre le cytosquelette d'actine et la matrice extracellulaire et par conséquent à la stabilité de la membrane de la fibre musculaire. L'atteinte isolée de chacune de ces quatre glycoprotéines ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -SG) entraîne une déstabilisation de l'ensemble du complexe à l'origine de dystrophies musculaires autosomiques récessives, les sarcoglycanopathies.

Elles sont classées au sein de la nomenclature génétique des myopathies autosomiques récessives (LGMD2) suivant le siège du défaut primaire.

L'alpha-sarcoglycanopathie correspond au locus LGMD2D et la gamma-sarcoglycanopathie correspond au locus LGMD2C.

Leurs symptomologies les apparentent plutôt aux dystrophinopathies de Duchenne et Becker.

Nous avons mis au point deux techniques de diagnostic génotypique direct pour la recherche de la mutation ponctuelle R77C dans le gène alpha-sarcoglycane et la recherche de la mutation  $\Delta$ 521T dans le gène gamma-sarcoglycane.

La mise au point de la PCR digestion par l'enzyme NLA IV dans l'exon 3 du gène alpha-sarcoglycane, a montré l'existence de la mutation R77C à l'état hétérozygote chez 5 patients non apparentés. Aucune mutation ponctuelle n'a été retrouvée à l'état homozygote.

Sur le plan de stratégie diagnostique, l'utilisation de la méthode PCR digestion a permis de mettre un diagnostic moléculaire de routine pour la recherche de la mutation R77C dans le laboratoire de Génétique et Biologie Moléculaire au niveau du CHU de Constantine.

La mise au point de la technique SSCP pour la recherche de la mutation  $\Delta$ 521T dans le gène gamma-sarcoglycane, n'a pas pu être malheureusement accomplis à cause de l'absence de réactifs.

Par ailleurs, l'ensemble des résultats obtenus nous a permis d'affirmer la variété génotypique ainsi que la variété phénotypique des alpha- sarcoglycanopathies, et aussi de confirmer l'inégalité dans la répartition de l'alpha-sarcoglycanes au sein des différentes populations.

Des études complémentaires sont nécessaires pour améliorer notre étude sur le diagnostic des sarcoglycanopathies, notamment la mise au point de la biopsie musculaire et de la technique de DGGE pour l'étude du spectre des mutations dans le gène  $\alpha$ -sarcoglycane, et la SSCP et RT-PCR pour le gène  $\gamma$ -sarcoglycane.



*Référence*  
*bibliographique*

1-**Thierry Kuntzer**. Dystrophies musculaires des ceintures, dossier informatif édition Printemps (2001).

2-**P. Petiot, J.-Andoni Urtizbera**. Diagnostic des maladies musculaires, diagnostic of myopathies.

3-Myopathies maladies neuromusculaires numéro 1, février (2006) revue éditée **association de la suisse romande et italienne contre les myopathies**.

4-**J. Andoni Urtizbera** (m.d., research director european neuromuscular center) Myopathie des Ceintures avec déficit en Sarcoglycanes juin (2006).

5-**Erb.W.(1884)**Ueber Die « Juvenile Form »Der Progressiven Muskelatrophie Ihre Beziehungen Zur Sogenannten Pseudohypertrophie Der Muskeln.Dtsch Archiv Klin Med **34**: 467-519.

6-**Walton.J.N et Natrass.F.J(1954)**.On THE classification.natural history and treatment of the myopathies.Brain **77**: 169-231.

7- **Emery.A.E (1993)** Duchenne dystrophy.2<sup>nd</sup> ed.Oxford University Press.

8-**Ben hamida.Fardeau.M.et Attia.N.(1983)** Severe childhood muscular dystrophy affecting both sexes and frequent in Tunisia.Muscle and Nerve.**6** :469-480.

9- **Picolo,F.; Roberds,S.L.; Jeanpierre,M.; Leturcq,F; Azibi,K.; Beldjord,C.; Carrie,A.; Recan,D.; Chaouch,M.; Reghis,A.; El Kerch,F.; Sefiani,A.; Voit,T.; Merlini,L.; Collin,H.; Eymard,B.; Beckmann,J.S.; Romero,N.B.; Tome,F.M.S.; Fardeau,M.; Campbell,K.P.; Kaplan,J.-C.** Primary adhalinopathy: a common cause of autosomal recessive muscular dystrophy of variable severity.

- 10- **Jean-Claude Kaplan, Marc Jeanpierre, Jon-Andoni Urtizbera , Jacques Beckmann.** Bases Moléculaires des Dystrophies Musculaires Progressives Transmission Autosomique Récessive annales de l'institut pasteur / actualités (1996) 7, 3, 157-171.
- 11-**Sorimachi.h.Imajoh-Ohmi.S.Emori.y.,Kawasaki,H.,Ohno,,Minami.Y.,Suzuki.K,** Molecular cloning of a novel mammalian calcium-dependant protease distinct from both mandu-type. Specific expression of the Mrna IN SKELETAL MUSCLE.j.biol.chem. 264 :20106-20111.
- 12- **Maladies Neuromusculaires, progrès en Pédiatrie 3,** Nouvelle série (1998) Doin éditeurs - Paris.
- 13- **Jean De Recondo, Anne-marie De Recondo.** Pathologie du muscle strié.
- 14-**A.Brice, D.-F Schorderet.** Traité de Neurologie, Neurogénétique Affections héréditaires Dégénératives. Doin (1999).
- 15- **AFM .**Dossier de presse Myologie (2005).
- 16- **Kate Bushby.** The limb-girdle muscular dystrophies.
- 17- **Kate. Bushby.** Towards the classification of the autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies.
- 18- **Carrié A,** Recherche de mutations dans le gène de l'alpha-sarcoglycane impliqué dans une myopathie autosomique récessive(LGMD2D).1997.
- 19- **M. Urtasun, A. Saenz, C. Roudant, J.J. Poza, J.M. Cobo, I. Richard.** Limb –girdle muscular dystrophy in Guipuzcoa (Basque Country, Spain). Brain (1998) 121 : 1735-1747.
- 20-**Carsten G. Bonnemann and Richard S. Finkel.** Sarcolemmal proteins and the spectrum of limb-girdle muscular dystrophies.
- 21-**Francisco Favier Estrada, Dominique Mornet, Haydeé Rosas-Vargas, Alexandra Angulo, Manuel Hernandez, Viola Becker, Alvaro Rendon, Manuel Ramos-Kuri, Ramon M. Coral-Vazquez.** Une nouvelle isoforme de  $\xi$ -sarcoglycan est localisée au niveau du réticulum sarcoplasmique du muscle squelettique de souris.



- 22- **Roberds,S.L.; Leturcq,F; Allamand,V.; Piccolo,F.; Jeanpierre,M ; Anderson,R.D.; Lim,L.E.; Lee,J.C.; Tome,F.M.S.; Romero, N. B.; Fardeau, M.; Beckmann, J. S.; Kaplan, J.-C.; Campbell, K.P.** Missense mutations in the adhalin gene linked to autosomal recessive muscular dystrophy. *Cell* (1994) **78**: 625-633.
- 23-**Anastasi G, Cutroneo G, Rizzo G, Favaloro A.** Sarcoglycan subcomplex in normal and pathological human muscle fibers.*eur j histochem.* (2007).
- 24- **Schara,U.; Gencik; Mortier,J.; Langen,M.; Gencikova,A.; Epplen,J.T.; Mortier,W.** Alpha-sarcoglycanopathy previously misdiagnosed as Duchenne muscular dystrophy: implications for current diagnostics and patient care. *europ. j. pedia* (2001) **160**: 452-453.
- 25- **Roberds,S.L.; Anderson,R.D.; Ibraghimov-Beskrovnaya,O.; Campbell,K.P.** Primary structure and muscle-specific expression on the 50-kDa dystrophin-associated glycoprotein (adhalin). *j. biol. chem.* (1993) **268**: 23739-23742.
- 26 -**A.Vanderkooi.** Maladie : alpha-sarcoglycanopathie. Octobre (2004).
- 27-**Fendri K, Kefi M, Hentati F, Amouri R.** Genetic heterogeneity within a consanguineous family involving the LGMD2D and the LGMD2C genes. *neuromuscul disord.* Juin (2006) **16** (5):316-20. 17 Avril 2006
- 28-**Adriana Lasa, Federica Piccolo, Carles de Diego, Marc Jeanpierre, Jaume Colomer, Maria Jos ´e Rodr´iguez, Jon Andoni Urtizberea, Montserrat Baiget, Jean Claude Kaplan2 and Pia Gallano.** Severe limb girdle muscular dystrophy in Spanish gypsies: further evidence for a founder mutation in the  $\gamma$ -sarcoglycan gene *European Journal of Human Genetics* (1998) **6** :396–399.
- 29-**Sonan-Douyoua, F.Akani, Assi Berthe, Cowpli-Bony Pascale, Aka-Diarra Evelyne, Doumbia Mariane.** Myopathie maghrébine due a une sarcoglycanopathie. *African Journal of Neurological Sciences* (2007). No 1 Vol.26 :82-85.
- 30-**Pascal Laforêt, Bruno Eymard.** Maladies musculaires référence neuromusculaire Paris-Est.

31-**Michael Sinnreich**. md, Ph.d.dystrophies musculaires des ceintures neurologie conférences scientifiques 132-008f av r i l (2004) No 4 Vol 2.

32- Les neurologues du groupe **Pitié-Salpêtrière** Neuro-pathologie (2000) Université Paris-VI.

33- **K. Conrad,a A. Deppe,a S. Neumann,a M. Breen,b P. Quignon,c C. André,c B. Brenig,a and T. Leeba**. Cytogenet Cell Genet (2001) **94**:186–189 Characterization and chromosome assignment of the canine gamma-sarcoglycan gene (SGCG) to CFA 25q21 q23.

34-**Agnès BORDAIS** Organisation moléculaire des synapses photorécepteurs-neurones secondairesRôle des dystrophines.

35-**El Kerch F. ; Sbiti A. ; Azibi K. ; Leturcq F.** La gamma-sarcoglycanopathie par mutation  $\Delta 521T$  au Maroc. à propos de 20 cas.

36-**Kefi M, Amouri R, Driss C, Ben Hamida C, Ben Hamida M, Kunkel LM, Hentati F.** Phenotype and sarcoglycan expression in tunisian LGMD2C patients sharing the same  $\Delta 521T$  mutation. neuromuscul disord. Décembre (2003) **13** (10):779-87.

37-**Patrick Aubourg**. Thérapie génique de la myopathie de Duchenne : le point actuel.

38-**Les cahiers d'orphanet** prévalence des maladies rares : une enquête bibliographique  
Méthode février (2008).

39-**AFM Genethon** communiqué de presse mardi 12 février 2008 maladies neuromusculaires, une approche thérapeutique pharmacologique pour certaines sarcoglycanopathies.

40-**Richard, Isabelle**. Médicaments pour le traitement des sarcoglycanopathies.

41-**AFM (2007)**. Nouveau succès de thérapie génique chez la souris pour une maladie neuromusculaire.

42-**Mcnally,E. M.; Yoshida,M.; Mizuno,Y.; Ozawa,E.; Kunkel,L.M.** Human adhalin is alternatively spliced and the gene is located on chromosome 17q21. *proc. nat. acad. Sci* (1994) **91**: 9690-9694.

- 43-**Ben Hamida M, Ben Hamida C, Zouari M, Belal S, Hentati F.** Limb-girdle muscular dystrophy 2c: clinical aspects. *neuromuscul disord.* Décembre (1996) **6** (6):493-4.
- 44-**Jean-Claude Kaplan, Marc Delpech,** *Biologie Moléculaire et Médecine.* 2<sup>e</sup>Edition. Médecine-Science. Flammarion.
- 45-**Pacak CA, Walter GA, Gaidosh G, Bryant N, Lewis MA, Germain S, Mah CS, Campbell KP, Byrne BJ.** Long-term skeletal muscle protection after gene transfer in a mouse model of LGMD2D. *mol ther.* Octobre (2007) **15** (10):1775-81. epub 24 juillet 2007.
- 46-**White SJ, Uitte De Willige S, Verbove D, Politano L, Ginjaar I, Breuning MH, Den Dunnen JT.** Sarcoglycanopathies and the risk of undetected deletion alleles in diagnosis. *hum mutat.* Juillet (2005) **26** (1):59.
- 47-**Hackman P, Juvonen V, Sarparanta J, Penttinen M, Aärimala T, Uusitalo M, Auranen M, Pihko H, Alén R, Junes M, Lönnqvist T, Kalimo H, Udd B.** Enrichment of the R77C alpha-sarcoglycan gene mutation in finnish LGMD2D patients. *muscle nerve.* Février (2005) **31**(2):199-204.
- 48-**Kefi M, Amouri R, Driss C, Ben Hamida C, Ben Hamida M, Kunkel LM, Hentati F.** Phenotype and sarcoglycan expression in tunisian LGMD2C patients sharing the same  $\Delta$ 521T mutation. *neuromuscul disord.* Décembre (2003) **13** (10):779-87.
- 49-**Fischer D, Aurino S, Nigro V, Schröder R.** On symptomatic heterozygous alpha-sarcoglycan gene mutation carriers. *ann neurol.* Novembre (2003) **54** (5):674-8.
- 50-**Ljunggren,A.; Duggan,D.; McNally,E.; Boylan, K.B.; Gama, C.H.; Kunkel,L. M.; Hoffman,E.P.** Primary adhalin deficiency as a cause of muscular dystrophy in patients with normal dystrophin. *ann. neurol.*( 1995) **38**: 367-372.
- 51-**Carrie,A.; Piccolo,F.; Leturcq, F.; De Toma, T.; Azibi, K.; Beldjord, C.; Vallat, J.-M.; Merlini,I.; Voit,T.; Sewry,C.; Urtizbera,J.A.; Romero,R.; Tome,T.M.S.; Fardeau, M.; Sunada,Y.; Campbell,K.P.; Kaplan,J.-C.; Jeanpierre,M.** Mutational Diversity and hot spots in the alpha-sarcoglycan gene in autosomal recessive muscular dystrophy (lgmd2d). *j. med. genet.* (1997) **34**: 470-475.

52-**Angelini,C.; Fanin,M.; Menegazzo,E.; Freda, M. P.; Duggan, D. J.; Hoffman, E. P.** Homozygous alpha-sarcoglycan mutation in two siblings: one asymptomatic and one steroid-responsive mild limb-girdle muscular dystrophy patient. *muscle nerve*(1998). **21**:769-775. pubmed id.

53-**Driss A, Étude de liaison génétique dans une nouvelle forme de dystrophie musculaire des ceintures autosomique récessive à début tardif.1998.**

54- **F. Hentati.** Les sarcoglycanopathies *Institut National de Neurologie, La Rabta, Tunis, Tunisie.* Neuroméditerranée V.

55-**Passos-Bueno,M.R.; Oliveira,J.R.; Bakker,E.; Anderson,R.D.; Marie,S.K.; Vainzof,M.; Roberds,S.L.; Campbell,K.P.; Zatz,M.** Genetic heterogeneity for duchenne-like muscular dystrophy (dlmd) based on linkage and 50 dag analysis. *hum. molec. Genet* (1993) **2**: 1945-1947.

56- **N. Biroukb 1, A. Amarti 2, B. Kably 1, H. Belaïdi 1, S. Sefiani 2, M. Yahyaoui 1, R.Ouazzani 1, A.Saïdi 2, T.Chkili 1.** Les dystrophies musculaires (DM) des ceintures étude clinique et immunohistochimique (IHC) de 120 familles marocaines Neuroméditerranée V.

57-**Passos-Bueno,M.R.; Moreira,E.S.; Vainzof,M.; Chamberlain,J.; Marie,S.K.; Pereira,L.; Akiyama,J.; Roberds,S.L.; Campbell,K.P.; Zatz,M.** A common missense mutation in the adhalin gene in three unrelated brazilian families with a relatively mild form of autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy. *hum. molec. Genet*(1995) **4**: 1163-1167.

58- **Jean Claude Kaplan<sup>2</sup> and Pia Gallano.** Severe limb girdle muscular dystrophy in Spanish gypsies: further evidence for a founder mutation in the  $\gamma$ -sarcoglycan gene

*European Journal of Human Genetics* (1998) **6** :396–399.

59-**Guglieri M, Magri F, D’Aangelo MG, Prella A, Morandi L, Rodolico C, Cagliani R, Mora M, Fortunato F, Bordoni A, Del Bo R, Ghezzi S, Pagliarani S, Lucchiari S, Salani S, Zecca C, Lamperti C, Ronchi D, Aguenouz M, Ciscato P, Di Blasi C, Ruggieri A, Moroni I, Turconi A, Toscano A, Moggio M, Bresolin N, Comi GP.** Clinical, molecular, and protein correlations in a large sample of genetically diagnosed italian limb girdle muscular dystrophy patients. *hum mutat.* Février (2008); **29** (2):258-66.

60-**Gouveia TL, Paim JF, Pavanello RC, Zatz M, Vainzof M.** Sarcoglycanopathies: a multiplex molecular analysis for the most common mutations. *diagn mol pathol.* Juin (2006) **15** (2):95-100.

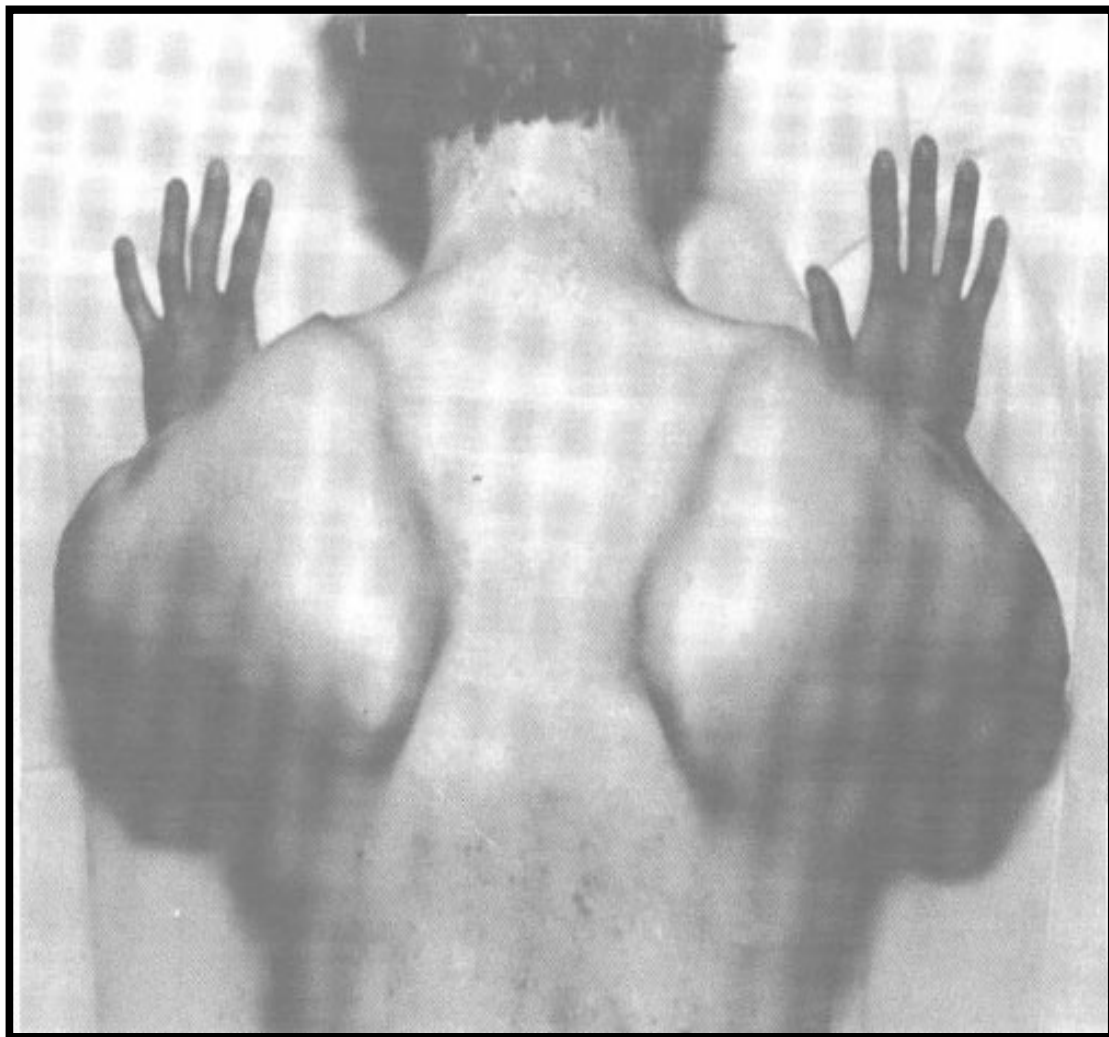
61-**Nouioua S; Slimani S; Terki N; Assami S; Urtizberea A. ; Leturcq F; Grid D.; Tazir M.** Dystrophie musculaire des ceintures à transmission autosomique récessive non liées aux sarcoglycanes: Etude de 13 familles.

62-**Duggan, D. J.; Gorospe, J. R.; Fanin, M.; Hoffman, E. P.; Angelini, C.** Mutations in the sarcoglycan genes in patients with myopathy. *new eng. j. med.* (1997) **336**: 618-624.

63- **Ch. Bonnard.** Myopathies Classification diagnostic et thérapeutiques actuelles

# *Annexes*

## Annexe 1



Aspect de la ceinture scapulaire d'une dystrophie musculaire des ceintures.[63]

## Annexe 2

### Protéine gamma-sarcoglycane (Gamma-SG) (35DAG).

« MVREQYTTATEGICIERPENQYVYKIGIYGWRKRCLYLFVLLLLLIILVVNLALTIWILKV  
 MWFSPAGMGHLCVTKDGLRLEGESEFLFPLYAKEIHSRVDSLLLLQSTQNVTVNARNSEGE  
 VTGRLKVGPKMVEVQNQQFQINSNDGKPLFTVDEKEVVVGTDKLRVTGPEGALFEHSVETP  
 LVRADPFQDLRLESPTLSLMDAPRGVHIQAHAGKIEALSQMDILFHSSDGMVLVDAETVC  
 LPKLVQGTWGPSGSSQSLYEICVCPDGKLYLSVAGVSTTCQEHSHICL »

### La séquence du gène gamma sarcoglycane SCGG :

```

1      gttgctgaag cttcatcctt tgctctcatt ctgtaagtca tagaaaagtt tgaaacattc
61     tgtctgtggt agagctcggg ccagctgtag ttcattcgcc agtgtgcttt tcttaatatc
121    taagatgggt cgtgagcagt acactacagc cacagaaggc atctgcatag agaggccaga
181    gaatcagtat gtctacaaaa ttggcattta tggctggaga aagcgtgctc tctacttggt
241    tgttcttctt ttactcatca tcctcgttgt gaatttagct cttacaattt ggattcttaa
301    agtgatgtgg ttttctccag caggaatggg ccacttgtgt gtaacaaaag atggactgcg
361    cttggaaggg gaatcagaat ttttattccc attgtatgcc aaagaaatac actccagagt
421    ggactcatct ctgctgctac aatcaaccca gaatgtgact gtaaatgcgc gcaactcaga
481    aggggaggtc acaggcaggt taaaagtcgg tcccaaaatg gtagaagtcc agaatcaaca
541    gtttcagatc aactccaacg acggcaagcc actatttact gtagatgaga aggaagttgt
601    ggttggtaca gataaacttc gagtaactgg gcctgaaggg gctctttttg aacattcagt
661    ggagacaccc cttgtcagag ccgaccggtt tcaagacctt agattagaat cccccactcg
721    gagtctaagc atggatgccc caaggggtgt gcatattcaa gctcacgctg ggaaaattga
781    ggcgctttct caaatggata ttctttttca tagtagtgat ggaatgcttg tgcttgatgc
841    tgaactgtg tgcttaccce agctggtgca ggggacgtgg ggtccctctg gcagctcaca
901    gagcctctac gaaatctgtg tgtgtccaga tgggaagctg tacctgtctg tggccggtgt
961    gagcaccacg tgccaggagc acagccacat ctgcctctga gctgcctgcg tcctctcggt
1021   gagctgtgca gtgccggccc cagatcctca cccccaggga gcagctgcac atcgtgaaag
1081   actgaggcag cgtggatggg aagtaaacgc ttccagagga actcagaaaa aattatgtgc
1141   cagtgaaagt gtttgacaaa aaactacatg atctcaaaat gcacgtggat gtgagacaca
1201   aaagttgaca aatggaaaa gcaatgtggt tttccactgg attaattttc accggaacaa
1261   ttgcgaattc tctctgcctc gcctccccct atcttgctcg tgtgggcaca cactgagtg
1321   tgagttgccg tgtggagtta atgtatgacg ctccactgtg gatatactaat gccctgttga
1381   gtagtagcctt gctcagtact aaaatgcccc aaagttctat acagcatttc ctttatagca
1441   ttcaaacctc acatcctccc ttcagtttaa tgcaagtaag tcaggtttca caagaaaatt
1501   ttcaagtttt gaaggaatt tgaggttgat ctggttttca agatgtagtt aaaggaataa
1561   atcactcaaa attaaacttt ctgtatatag tcaataagca ataaaaacct catttttcag
1621   agttaaaaaa
  
```

### Oligonucléotides de l'exon 6 du gène SCGG

Fragment	Séquence des primers	taille	T°d'hybridation
Exon 6	Ex6fw 5'-TGG TGT CAC TTA TTT TAC TTC TGC -3'	254 bp	51°C
	Ex6 rev 5'-CTA ACA TTA TTC CAG CAC ATA CC- 3'		



## Annexe 3

### Protéine Alpha-sarcoglycane (Alpha-SG) (50DAG)

" MAETLEFWTPLLVLVLLAGLGDTEAQQTTLHPLVGRVVFVHTLDHET  
 FLSLPEHVAVPPAVHITYHAHLQGHPLPRWLRYSRSPHHPGFLYGSATPEDRGLQV  
 IEVTAYNRDSFDTRQRLVLEIGDPEGPLLPYQAEFLVRSHDAEEVLPSTPASRFLSA  
 LGGLWEPGELQLLNVTALDRGGRVPLPIEGRKEGVYIKVGSASPFSTCLKMVASPDS  
 HARCAQGQPPLLSCYDTLAPHFRVDWCNVTLVDKSVPEPADEVPTPGDGILEHDPFFC  
 PPTEAPDRDFLVDALVTLVPLLVALLLTLLLAYVMCCRREGRLKRDLATSDIQMVHH  
 CTIHGNTEELRQMAASREVPRLSTLPMFNVHTGERLPPRVDSAQVPLILDQH"

### La séquence du gène Alpha sarcoglycane SCGA :

```

1      gccgggcagc catggctgag acactcttct ggactcctct cctcgtgggt ctctggcag
61     ggctggggga caccgaggcc cagcagacca cgctacaccc acttgtgggc cgtgtctttg
121    tgcacacctt ggaccatgag acgtttctga gccttctga gcatgtcgtc gtcccaccgc
181    ctgtccacat cacctaccac gcccacctcc agggacaccc agacctgcc cggtggtctc
241    gctacacca gcgcagcccc caccaccctg gcttcctcta cggctctgcc accccagaag
301    atcgtgggct ccaggctcatt gaggtcacag cctacaatcg ggacagcttt gataccactc
361    ggcagaggct ggtgctggag attggggacc cagaaggccc cctgctgcca taccaagccg
421    agttcctggt gcgcagccac gatgctggag aggtgctgcc ctcaacacct gccagccgct
481    tcctctcagc cttgggggga ctctgggagc cgggagagct tcagctgctc aacgtcacct
541    ctgccttggg ccgtgggggc cgtgtcccc tccccattga gggccgaaa gaaggggtat
601    acattaaggt gggttctgcc tcacctttt ctacttgct gaagatggtg gcatcccccg
661    atagccacgc ccgctgtgcc cagggccagc ctccacttct gtcttgctac gacacctgg
721    caccacatt ccgcgttgac tgggtcaatg tgaccctggt ggataagtca gtgccggagc
781    ctgcagatga ggtgcccacc ccaggatgat ggatcctgga gcatgacctg ttcttctgcc
841    caccactga ggccccagac cgtgacttct tgggtgatgc tctggtcacc ctctgggtgc
901    ccctgctggt ggccctgctt ctcaccttgc tgctggccta tgctcatgtc tgccggcggg
961    agggaggct gaagagagac ctggctacct ccgacatcca gatggtccac cactgcacca
1021   tccacgggaa cacagaggag ctgcggcaga tggcggccag ccgcgagggt ccccgccac
1081   tctccacctt gcccatgttc aatgtgcaca caggtgagcg gctgcctccc cgcgtggaca
1141   gcgcccaggt gccctcatt ctggaccagc actgacagcc cagccagtgg ttccaggtcc
1201   agcctgact tcactctccc ttctctgtcc acaccacgag tggcacatcc cacctgctga
1261   ttccagctcc tggccctcct ggaaccagg ctctaaacaa gcagggagag ggggtgggt
1321   ggggtgagag tgtgtggagt aaggacattc agaataaata tctgctgctc tgctcaccaa
1381   ttgctgctgg cagcctctcc cgt
  
```

### Oligonucléotides de l'exon 3 du gène SGCA

Fragment	Séquence des primers	taille	T°d'hybridation
Exon 3	Ex3_fw 5'-GGG CTC CTG CTG TGA CTC GA-3'	239 bp	58°C
	Ex3_rev 5'-AAT GGC CCA CCC CTGTGA TTT T - 3'		

## Annexe 4

### PREPARATION DES REACTIFS

- **TE 20 : 5 (Tris 20mM, EDTA 5mM, PH : 7.5)**  
Tris : 2.422 g/l  
EDTA : 1.8g/l  
Ajuster le PH avec HCL 1N  
Autoclavé.
- **TE 10 : 1 (Tris 10mM, EDTA, 10Mm, PH : 7.4)**  
Tris : 0.606g  
EDTA : 0.186g  
Pour 500 ml d'eau distillée  
Ajuster le PH avec HCL 1 N  
Autoclavé.
- **Protéinase K :**  
Protéinase K : 10mg/ml  
H<sub>2</sub>O stérile :50 ml  
Conservation à -20°C.
- **Tampon de lyse :**  
Tris 1M —————> 1ml  
NaCl 5M —————> 8 ml  
EDTA 5M —————> 0.4 ml  
Ajouter du H<sub>2</sub>O distillé quantité suffisante pour 100 ml.

- **Solution des lyses des globules blancs (SLB) :**

Tris 1M —————> 5ml

NaCl 5M —————> 5 ml

EDTA 5M —————> 10 ml

SDS 10% —————> 10 ml

Ajouter du H<sub>2</sub>O quantité suffisante pour 500 ml.

- **SDS 10% :**

100 g de SDS

Ajouter 100 ml d'H<sub>2</sub>O quantité suffisante.

Chauffer pour dissoudre

Vérifier le PH à 7.2.

- **NaCl 5M :**

29.22 g de NaCl

100 µl H<sub>2</sub>O distillé

Autoclaver

- **Tris 1M-PH:7.5 :**

121.14 g de Tris

100 µl H<sub>2</sub>O distillé

Ajuster le PH avec HCL à 7.5

Autoclaver.

- **EDTA 0.5M-PH 8.0 :**

EDTA 18.6g

NaOH 2.0 g

100 µl H<sub>2</sub>O distillé

Ajuster le PH à 8.0.

- **Préparation des oligonucléotides pour l'exon 3 du gène SGCA**

- **Solutions mères :**

Ajouter 100 µl d' H<sub>2</sub>O stérile aux deux oligonucléotides 3F et 3R (pour l'amplification de l'exon 3 du gène SGCA)

Vortexer

Laisser une nuit à (-20°C) avant utilisation.

- **Dilution de solutions mères (solutions filles) :**

- Oligo 3F :**

1.75 µl de la solution mère 3F

98.25 µl d'H<sub>2</sub>O stérile

Vortexer et conserver à (-20°C)

- Oligo 3R :**

1.80 µl de la solution mère 3R

98.20 µl d' H<sub>2</sub>O stérile

Vortexer et conserver à (-20°C).

- **Préparation des oligonucléotides pour l'exon 6 du gène SGCA :**

- **Solutions mères :**

Ajouter 126.43 µl d' H<sub>2</sub>O stérile à l'oligonucléotide 6F

Ajouter 114.51 µl d' H<sub>2</sub>O stérile à l'oligonucléotide 6R

Vortexer

Laisser une nuit à (-20°C).

- **Dilution des solutions mères :**

**Oligo 6F :**

1 µl de la solution mère 6F  
99 µl d' H<sub>2</sub>O stérile  
Vortexer et conserver à (-20°C).

**Oligo 6R :**

1 µl de la solution mère 6R  
99 µl d' H<sub>2</sub>O stérile  
Vortexer et conserver à (-20°C).

• **Préparation du MgCl<sub>2</sub> à 25mM :**

50 µl de MgCl<sub>2</sub> à 25mM  
50 µl d' H<sub>2</sub>O stérile  
Vortexer et conserver à (-20°C).

• **Préparation du dNTP à 25mM :**

100 µl de dTTP à 100mM  
100 µl de dCTp à 100mM  
100 µl de dGTp à 100mM  
100 µl de dATp à 100mM  
Vortexer et conserver à (-20°C).

• **Préparation du Tampon TBE 10X :**

Tris            108g  
Acide borique 55g  
EDTA          9.3g  
Compléter avec l' H<sub>2</sub>O distillée jusqu'à 1l et vortexer.

- **Préparation du Tampon TBE 1X :**

Préparer le TBE 1X à partir d'une dilution 1/10 du TBE 10X

100 ml du TBE 10X

900 ml du H<sub>2</sub>O stérile

Mélanger.

- **Préparation du bleu de Bromophénol BBP :**

20 mg de bleu de Bromophénol

2 ml Tris 0.5M à PH 7.5

5 ml glycérol

Ajouter une quantité suffisante d'eau distillée pour 10ml.

- **Préparation du gel Agarose 1.5% :**

1.5 g d'Agarose

100 ml de Tampon TBE 1X

Faire chauffer dans le micro onde environ 02 minutes

Ajouter 10 µl de BET.

- **Préparation du gel d'Agarose 3% :**

3 g d'Agarose

100 ml de Tampon TBE 1X

Faire chauffer dans le micro-onde environ 02 minutes

Ajouter 10 µl de BET.

- **Préparation du gel Nusieve-Agarose 2 :1 :**

2 g Nusieve

1 g d'Agarose

100 ml de Tampon TBE 1X

Faire chauffer dans le micro-onde environ 02 minutes

Ajouter 10 µl de BET.

- **Tampon SSCP :**

500  $\mu$ l de 0.5mol/l Tris (concentration finale : 10 m mol/l)

1.25  $\mu$ l de 1% de solution xylène cyanole

250  $\mu$ l du 0.1 mol/l EDTA ([c] 1 m mol/l)

10 mg de bromophenol bleu

23 ml d'eau distillée

Mixer minutieusement, ajuster le PH à 7.5 avec acide acétique

Stockage un mois à 4-8°C.

- **Solution de dénaturation :**

23.75ml de Formamide 99%

1.25 ml de solution 1% de xylène cyanole

10 mg de bleu de bromophenol

Stockage 12 mois 4 à 8°C.

## Annexe 5

### La créatine phosphokinase (CPK)

La créatine phosphokinase a pour nom systématique « ATP : créatine N-transférase ». Elle catalyse la réaction réversible :



La créatine phosphokinase existe sous quatre formes monomériques codées par des gènes différents. Deux formes sont cytoplasmiques : B et M, et forme des dimères : MM, BM et BB. Deux formes sont mitochondriales : mi-CPKu ou mi-CPKa, forme ubiquitaire, et mi-CPKs ou mi-CPKb, forme musculaire.

Dans le muscle strié squelettique, l'isoforme CPK-MM représente 95 à 98% de la créatine kinase présente, le reste étant CPK mitochondriale. Dans le muscle strié squelettique, l'isoforme CPK-MM est liée à l'ATPase de la myosine, dont elle favorise l'activité en contrôlant localement le PH. Elle est également présente sur la membrane du réticulum endoplasmique, où elle favorise localement le flux entrant de calcium.

L'augmentation du taux sérique de créatine kinase indique l'existence d'une pathologie musculaire active :

La CPK est libérée dans le sérum à la faveur d'une rupture de l'intégrité et/ou d'un trouble de la perméabilité membranaire des fibres musculaires.

Les taux de CPK-MM sérique sont significativement augmentés dans de nombreuses affections musculaires, au premier rang desquelles la dystrophie musculaire de Duchenne.

L'isoenzyme BB significativement augmenté dans les cardiomyopathies et l'infarctus du myocarde.

L'isoenzyme MB (cardiaque) est détectable dans le sérum des patients atteints de DMD.



## Annexe 6



**CENTRE HOSPITALO-UNIVERSITAIRE  
DR : BENBADIS – CONSTANTINE -**

CLINIQUE DE / / EUROLOGIE  
PROF. A . HAMRI

**\* FICHE D'EXAMEN \***  
**(ETUDE GENETIQUE)**

N° du prélèvement :

Nom :

Prénom :

Date de naissance :

Age :

Adresse :

Motif de consultation :

ATCD :

Age de début :

Signes de début :

Bilan Neurologique clinique (Etat actuel) :

Evolutivité :

Signes associés :

Examens Complémentaires :

- EMG :

- Bilan biologique :

- biopsie musculaire :

- Autres :

Dgc :

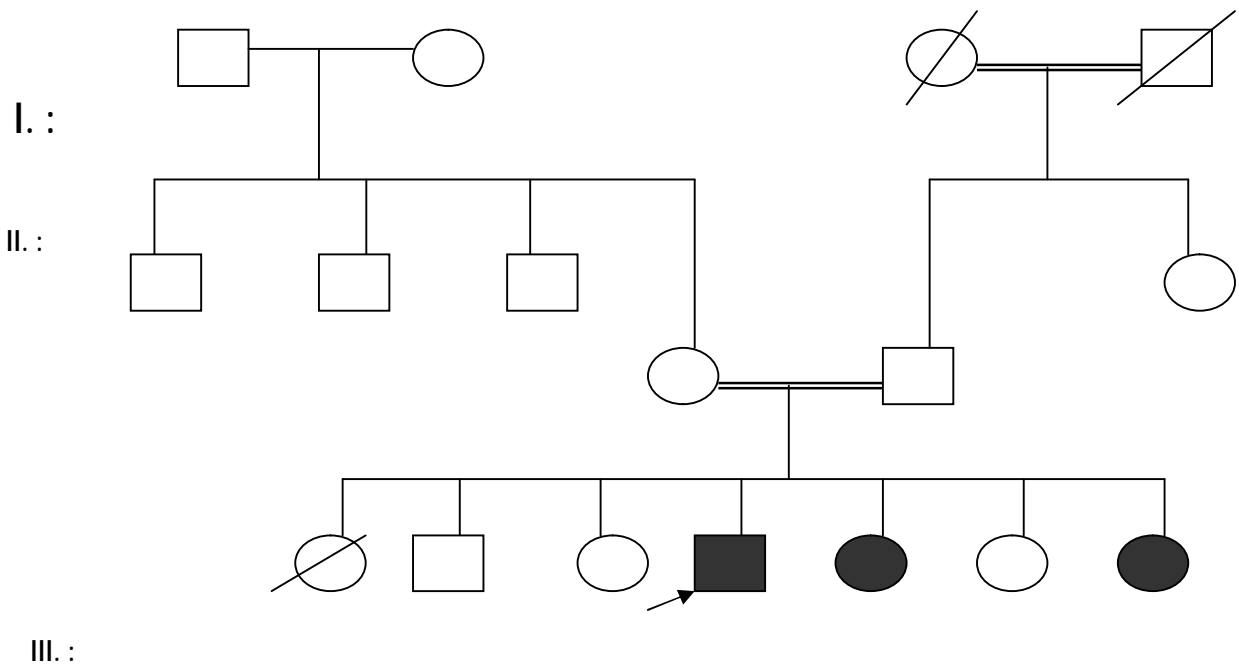


Fig3 : Arbre généalogique des Malades N : 4.5.24.

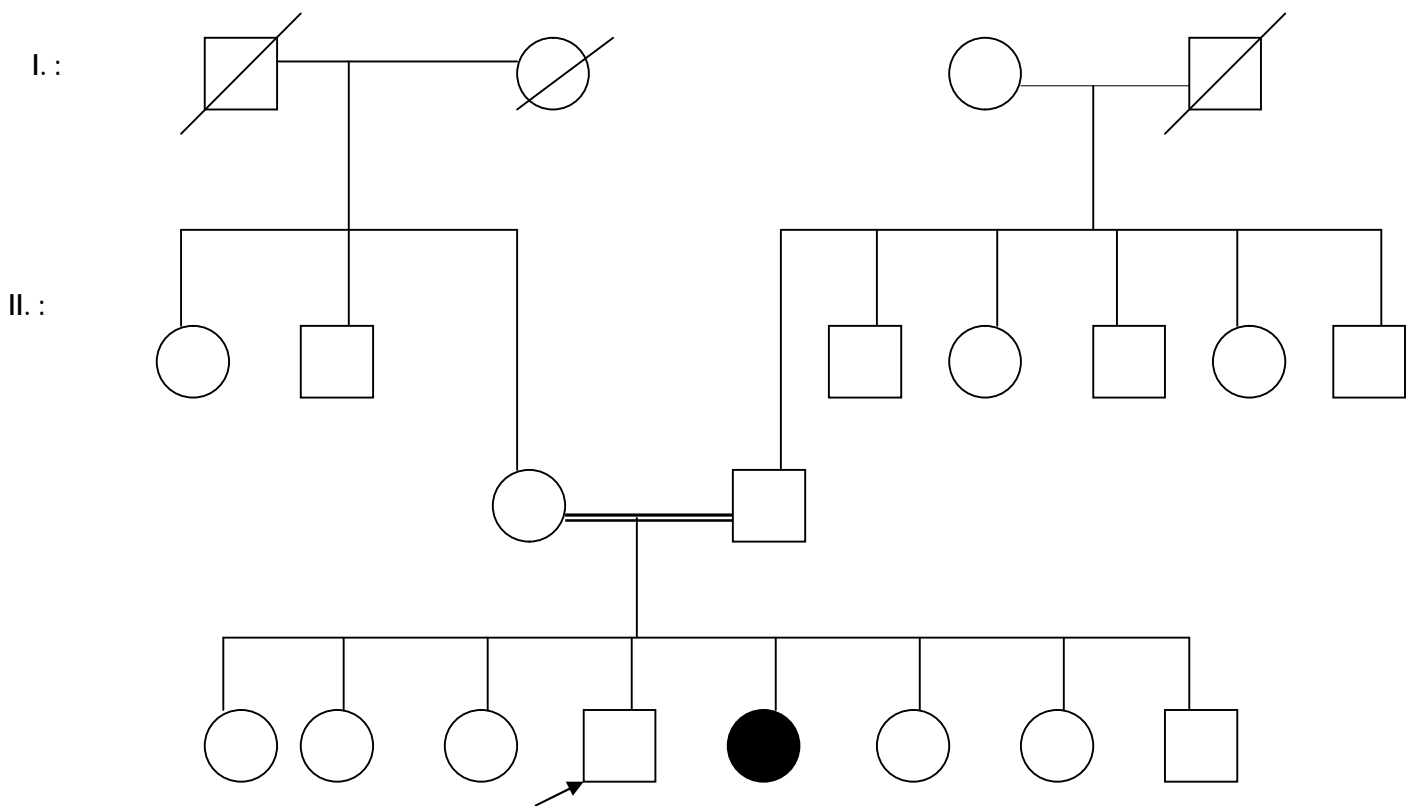


Fig4 : Arbre généalogique du Malade N :2

Annexe 7

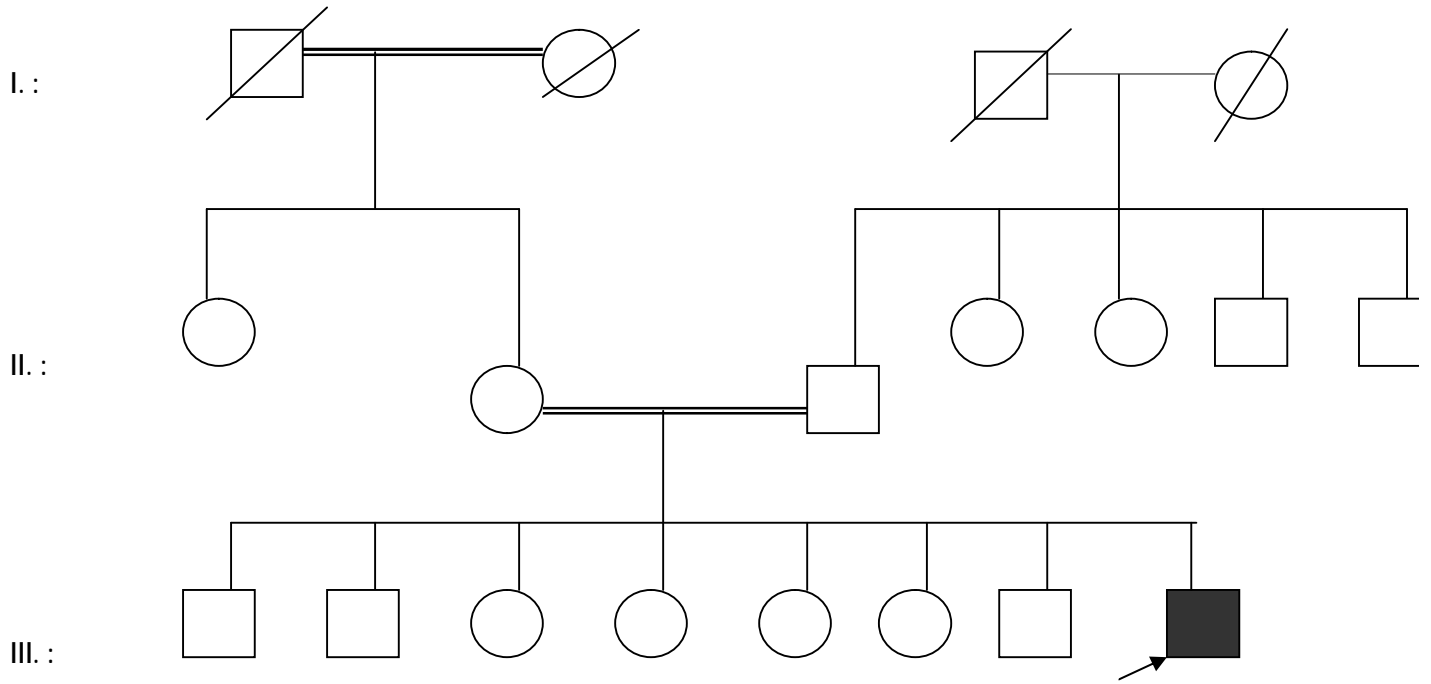


Fig1 : Arbre généalogique du Malade N :1

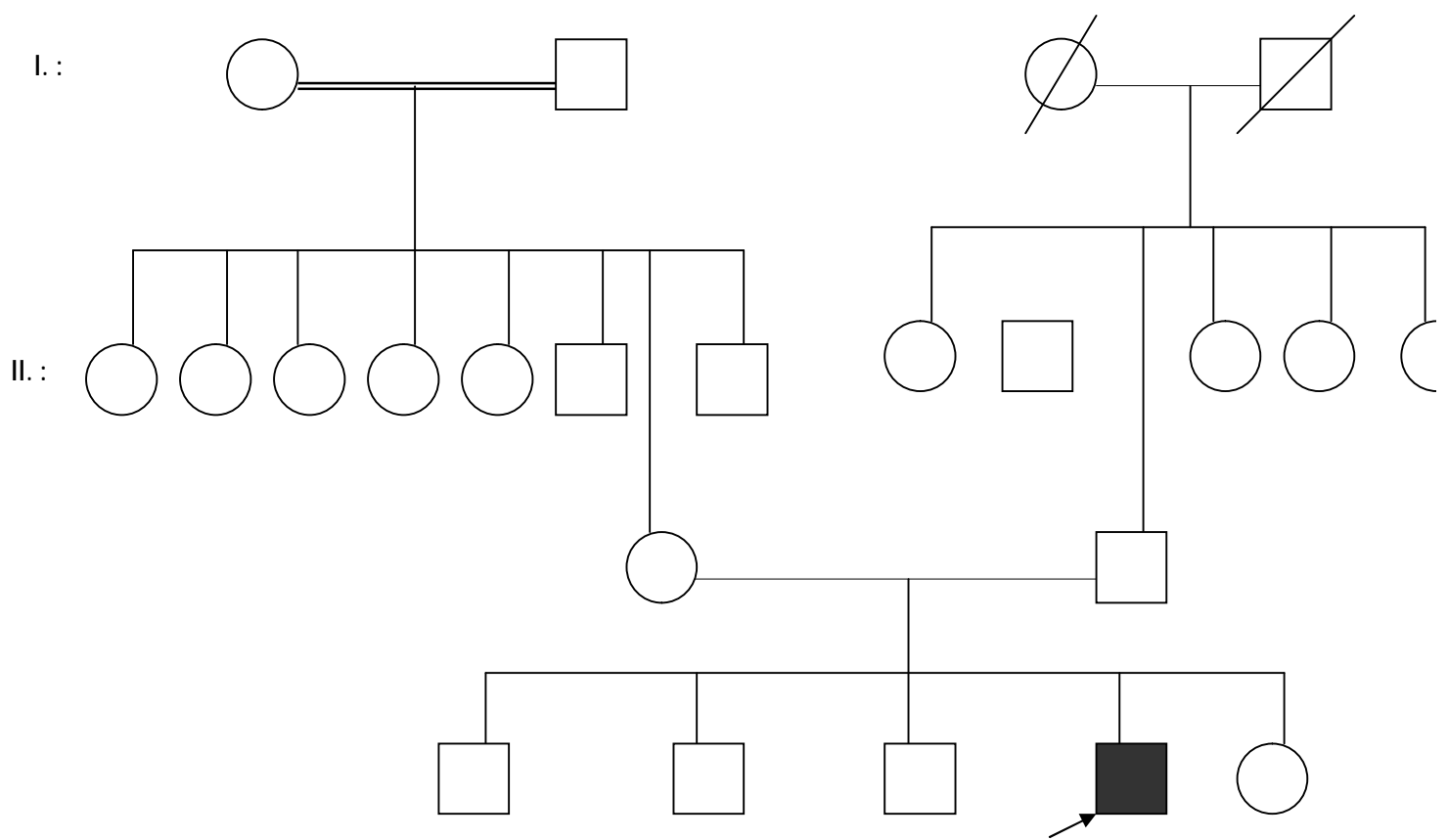


Fig2 : Arbre généalogique du Malade N :3

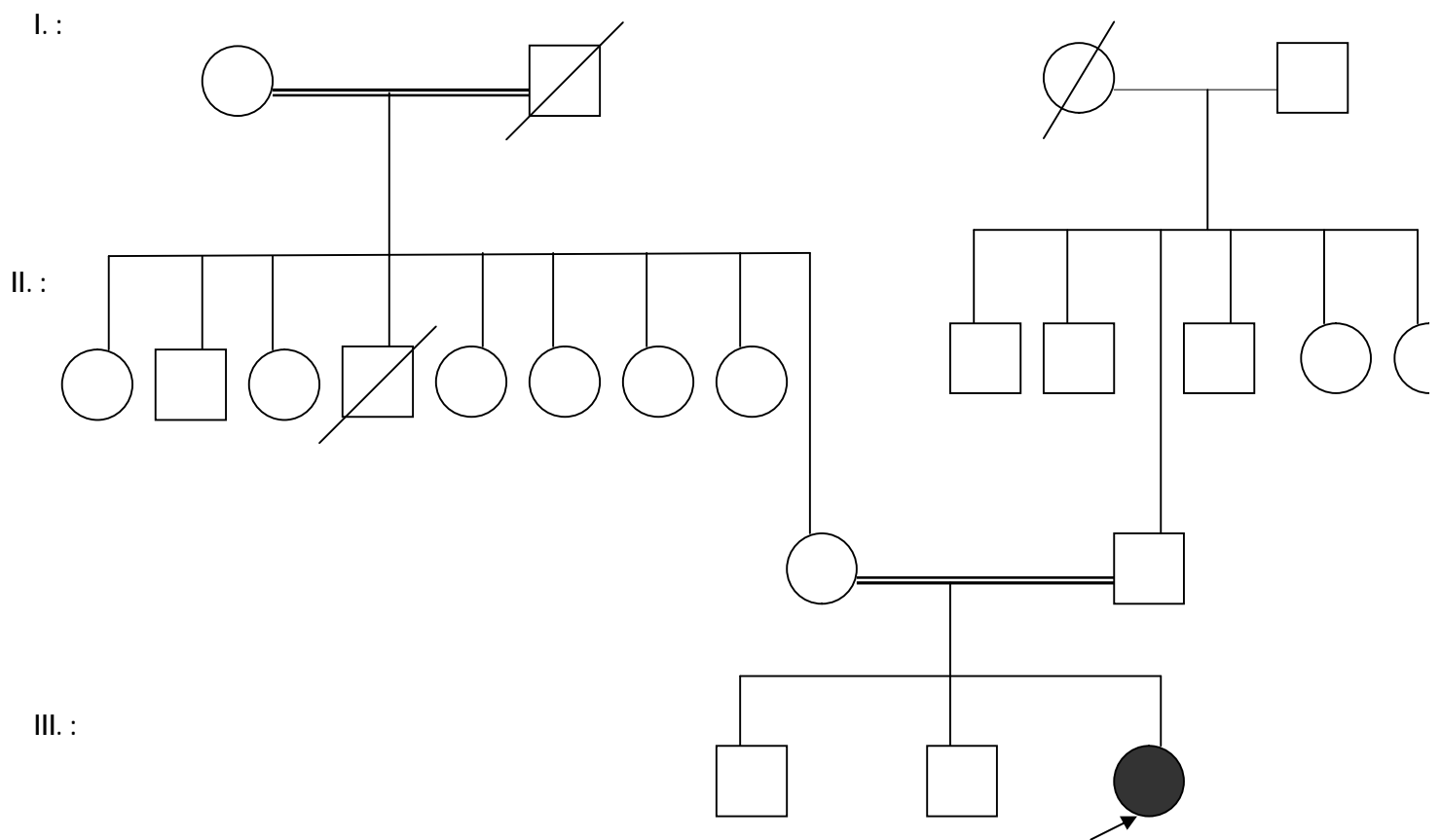


Fig 5 : Arbre généalogique du Malade N :7

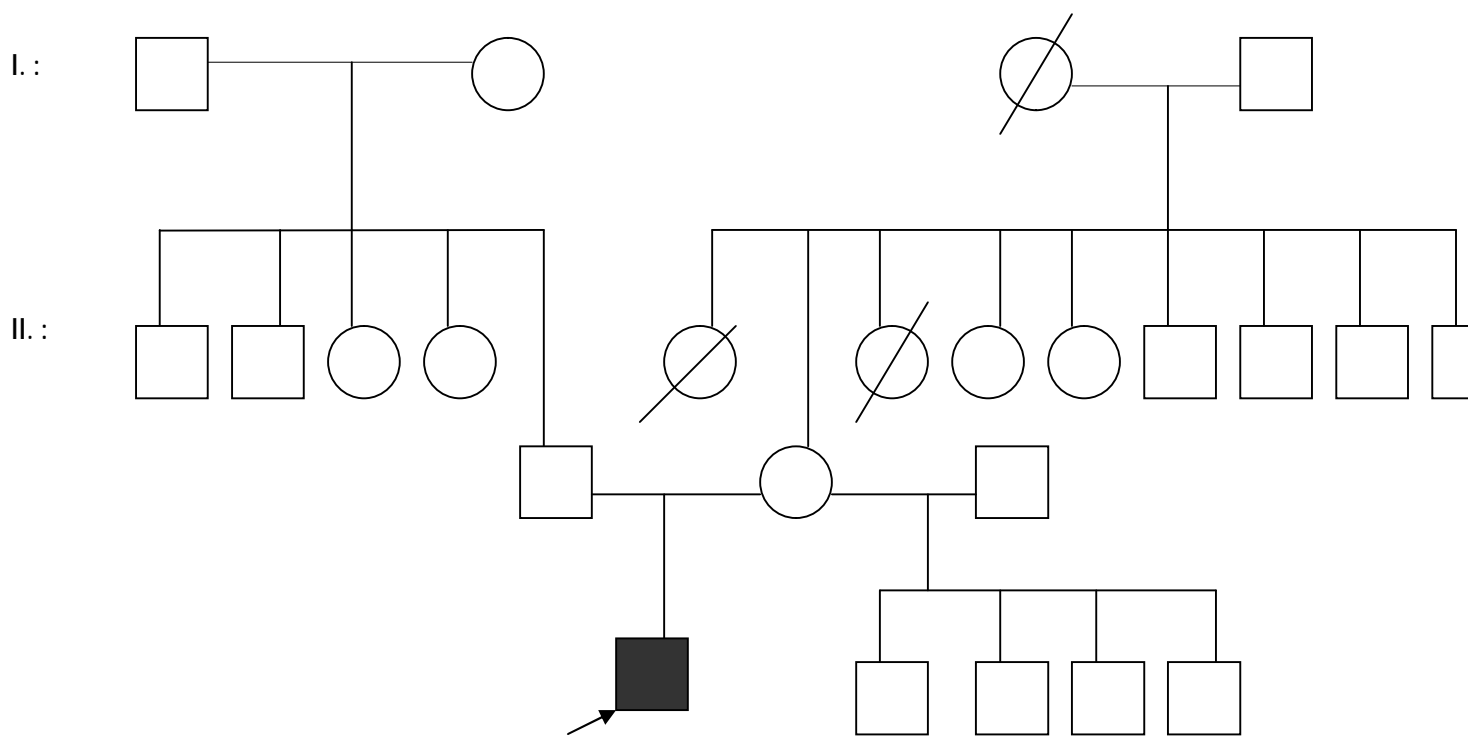


Fig6 : Arbre généalogique du Malade N :8

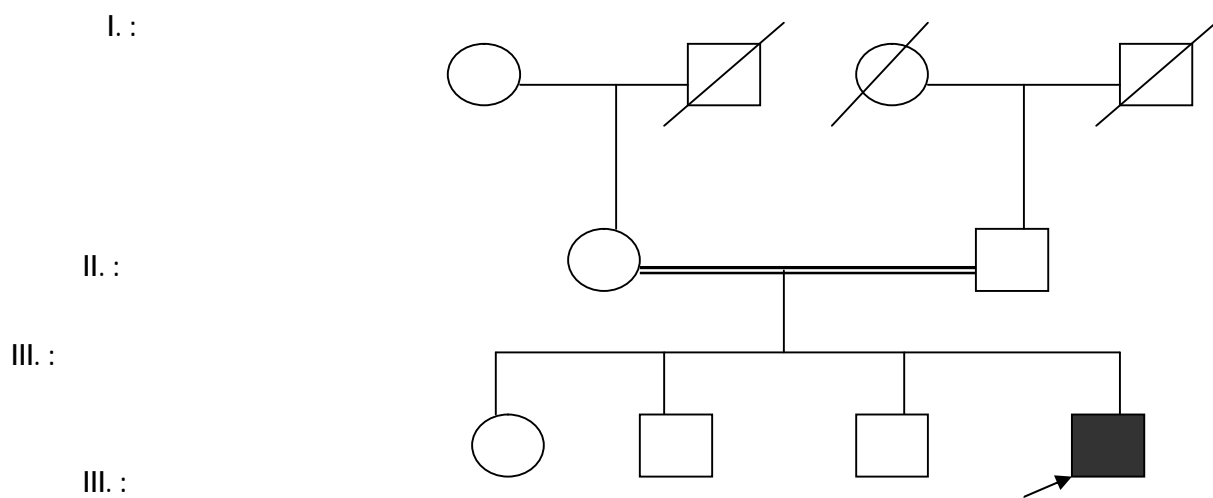


Fig7 : Arbre généalogique du Malade N : 10

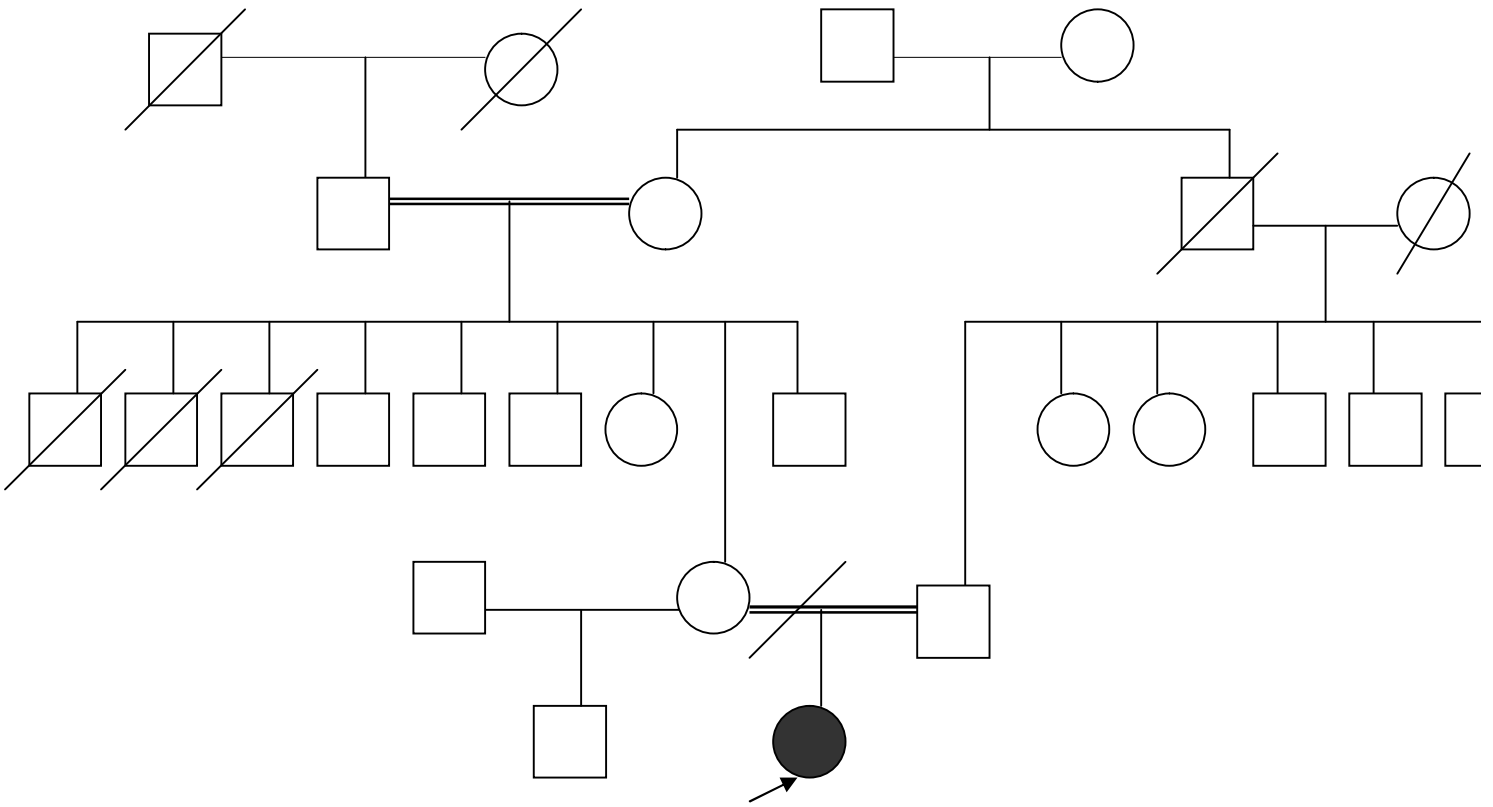
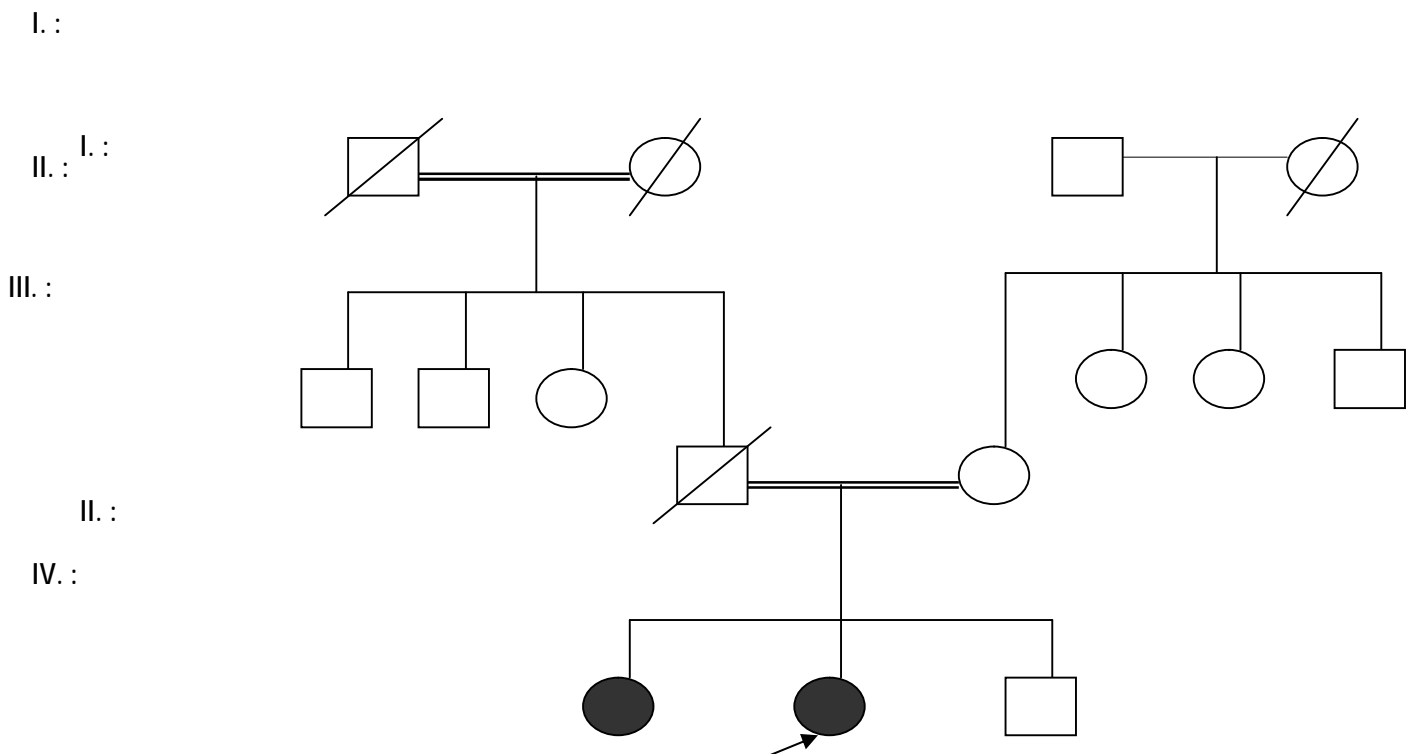


Fig8 : Arbre généalogique du Malade N : 12



III. : Fig9 : Arbre généalogique du Malade N : 11

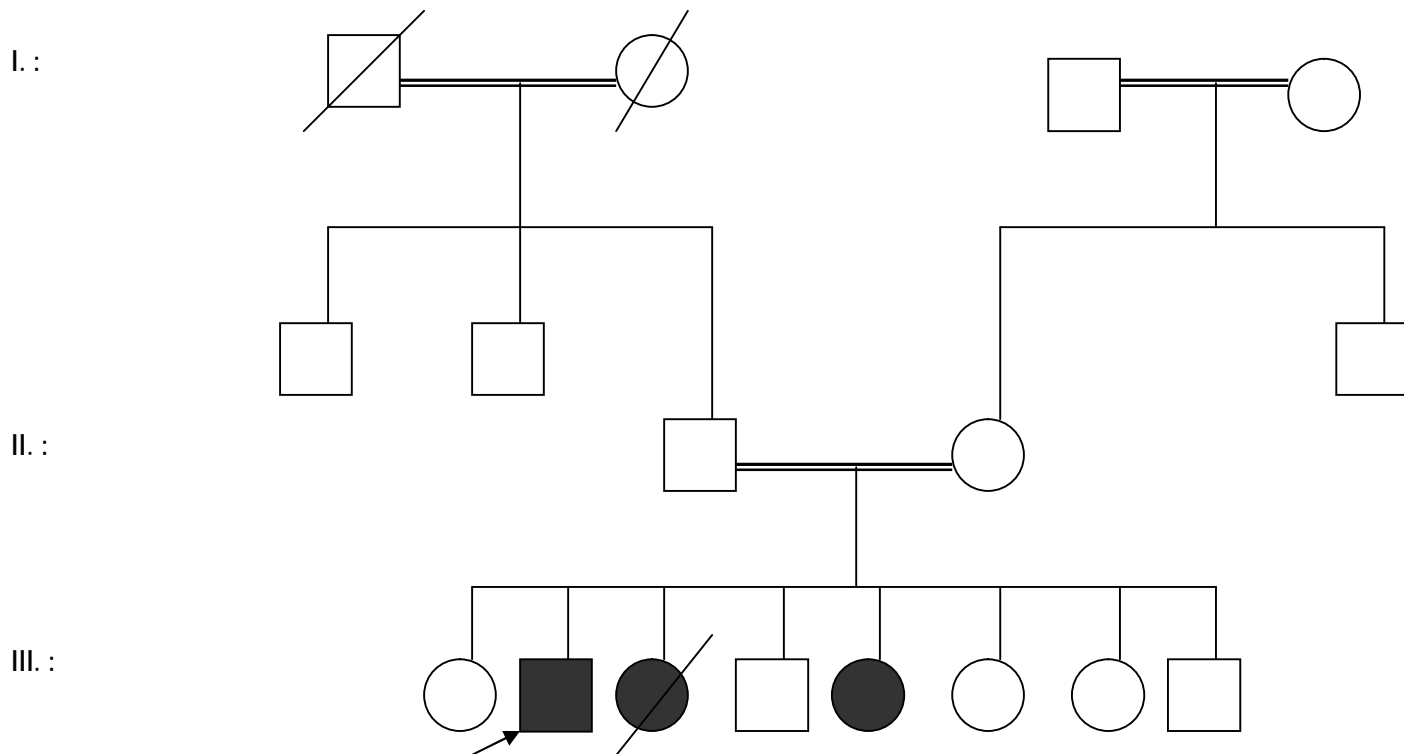


Fig10 : Arbre généalogique du Malade N :13



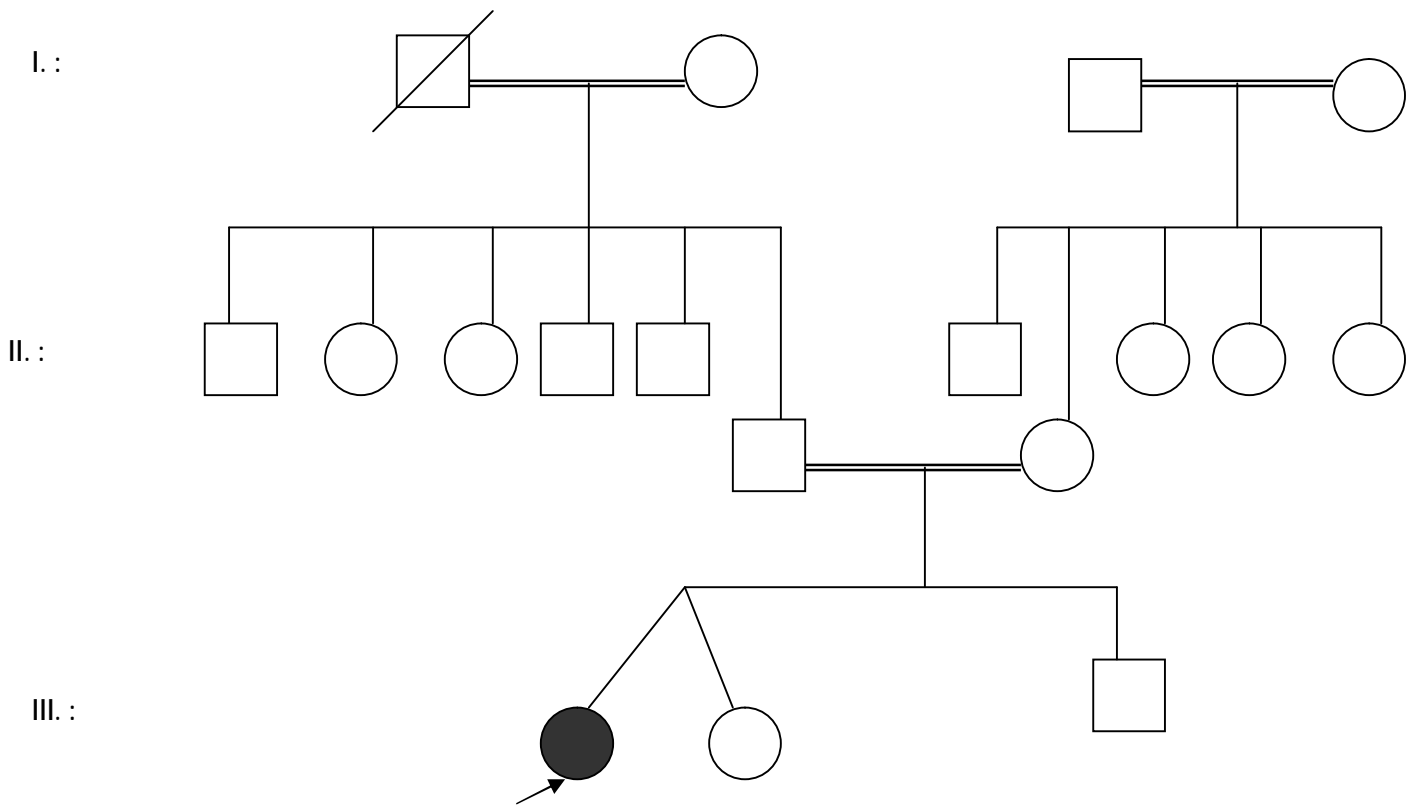


Fig11 : Arbre généalogique du Malade N : 16

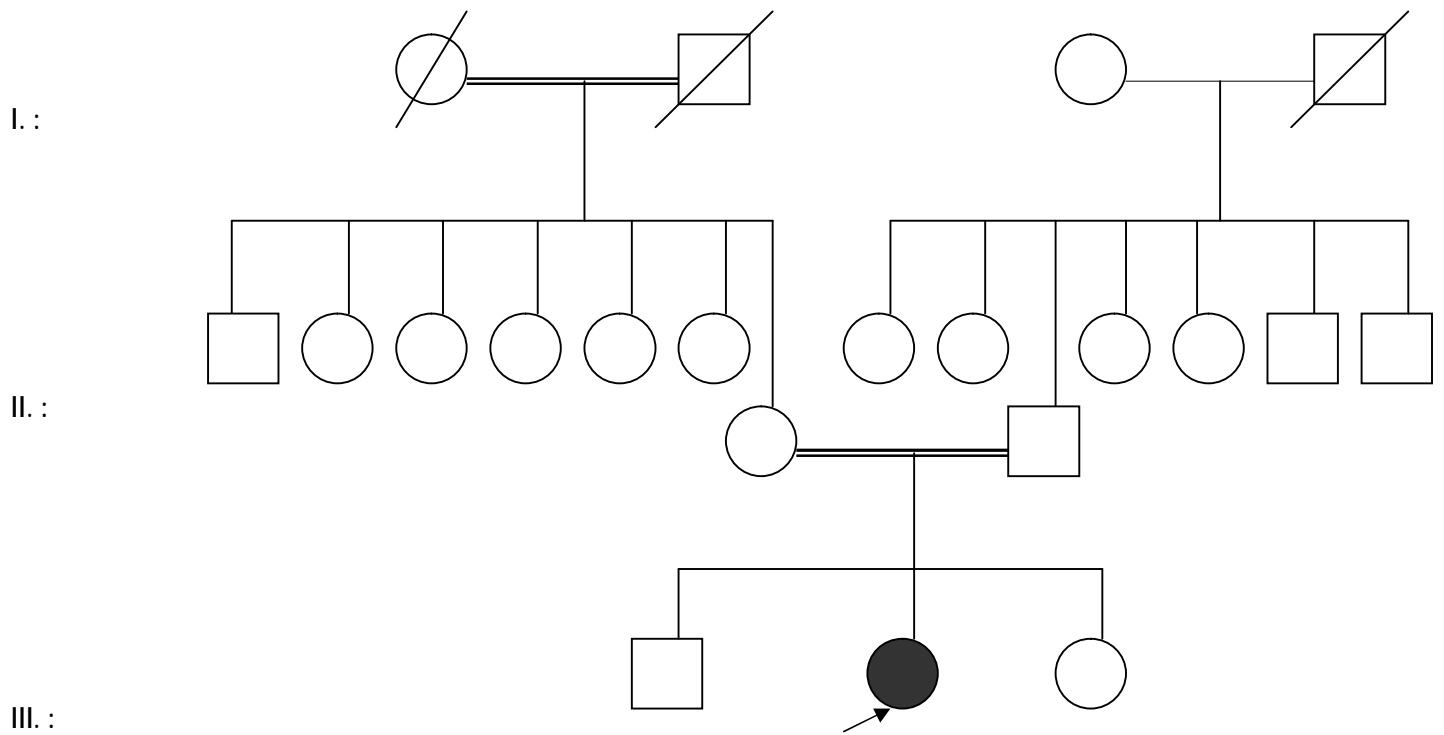
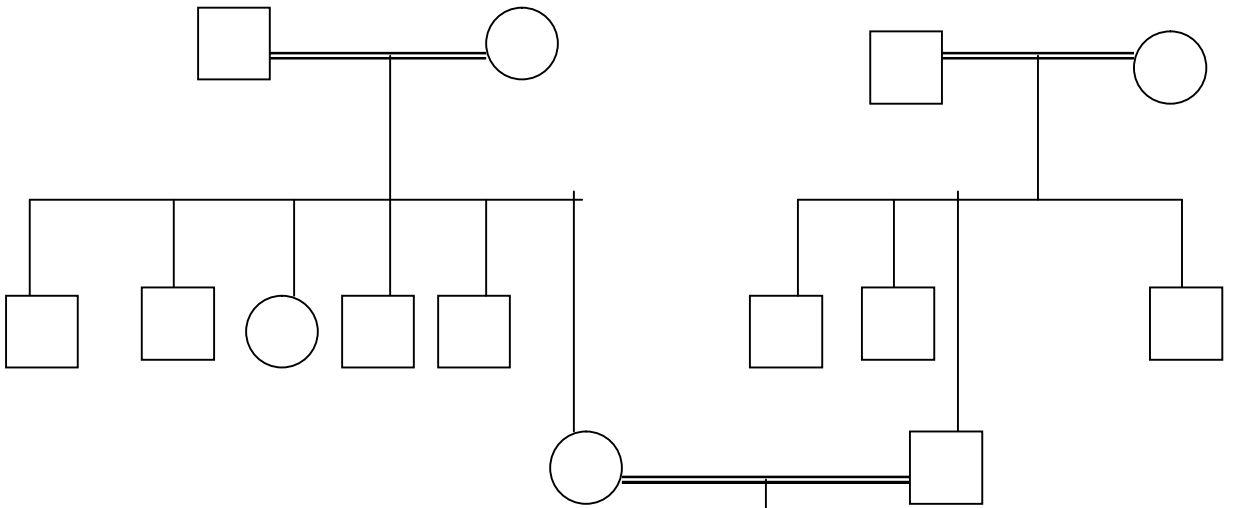


Fig12 : Arbre généalogique du Malade N : 17

I. :



II. :

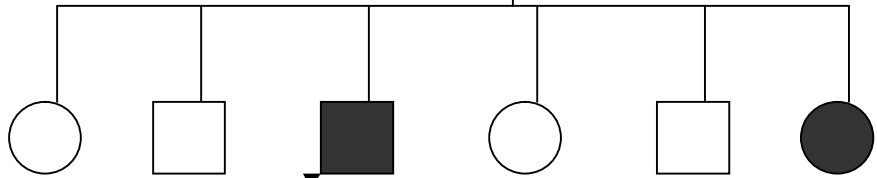


Fig13 : Arbre généalogique du Malade N :18

III. :

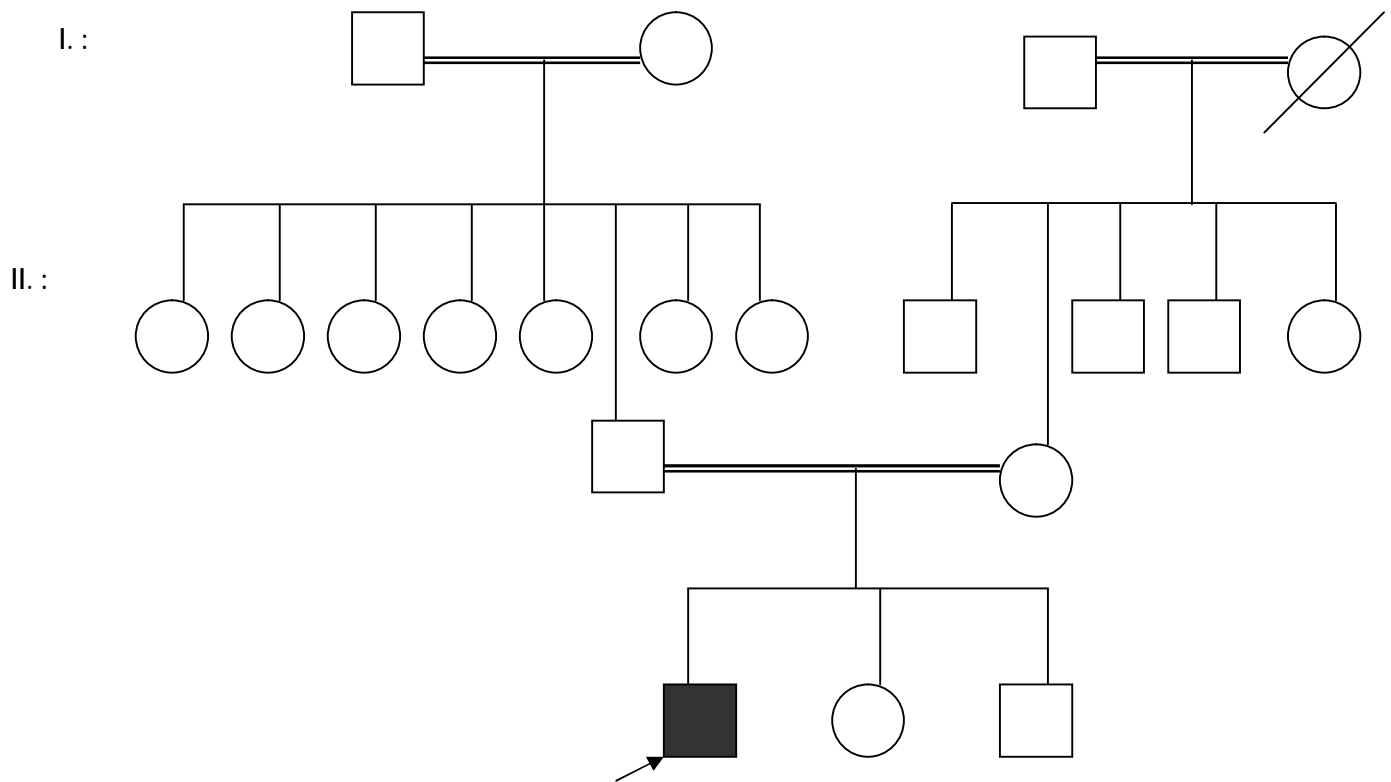


Fig14 : Arbre généalogique du Malade N :20

III. :

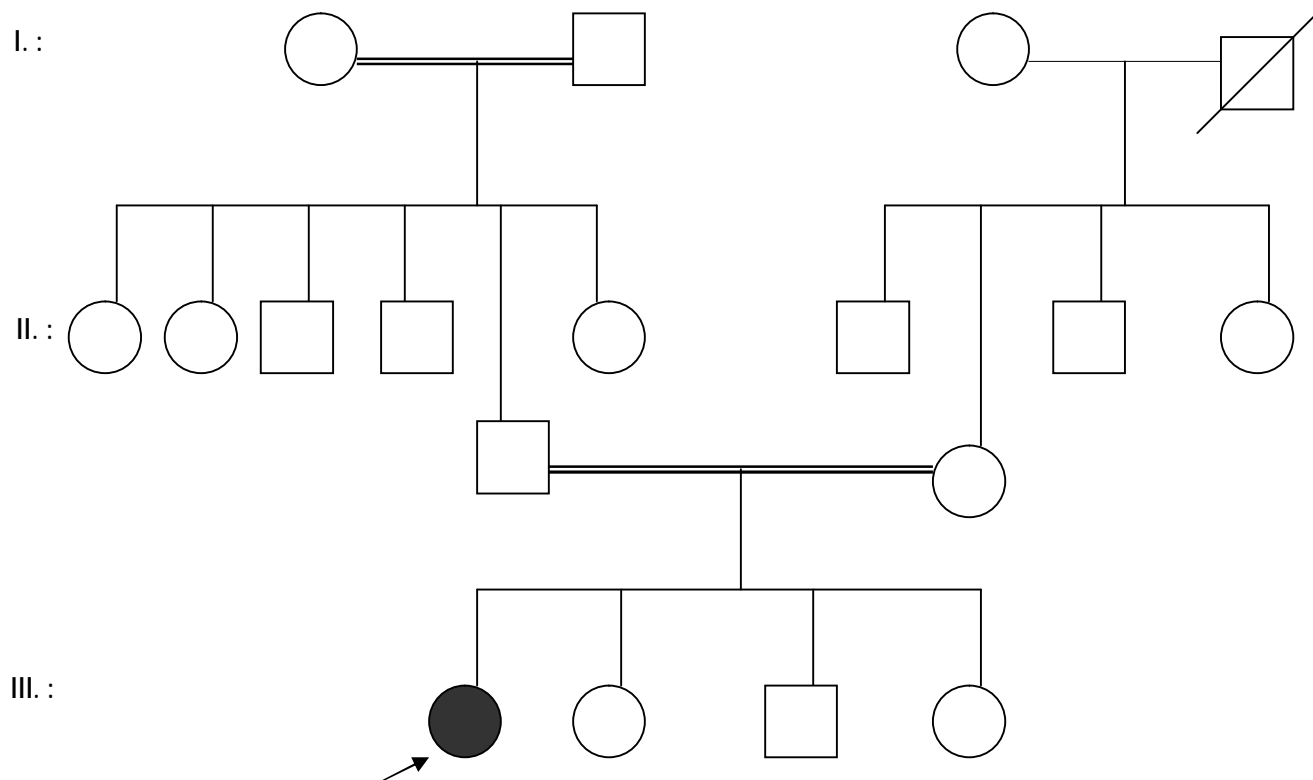


Fig15 : Arbre généalogique du Malade N : 21

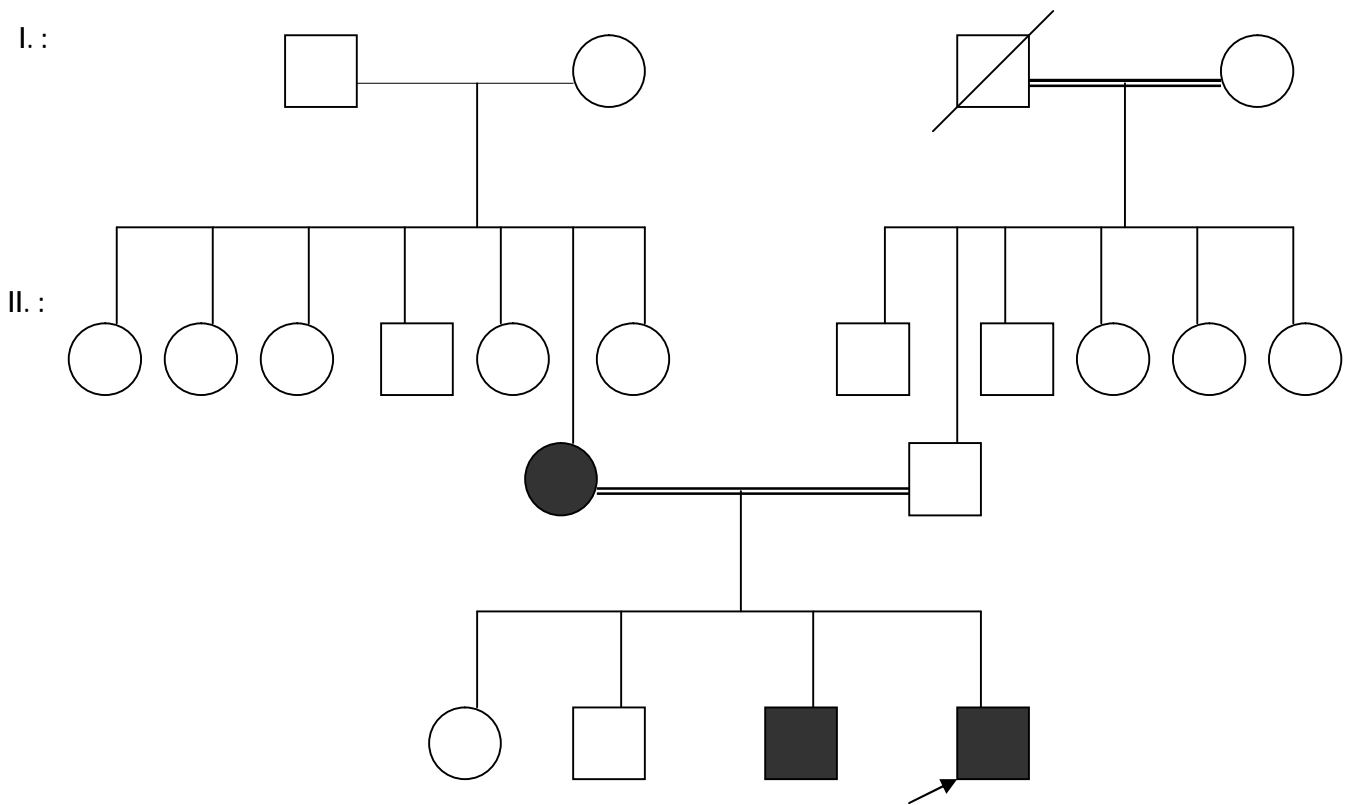


Fig16 : Arbre généalogique des Malades N : 32et33.

III.:

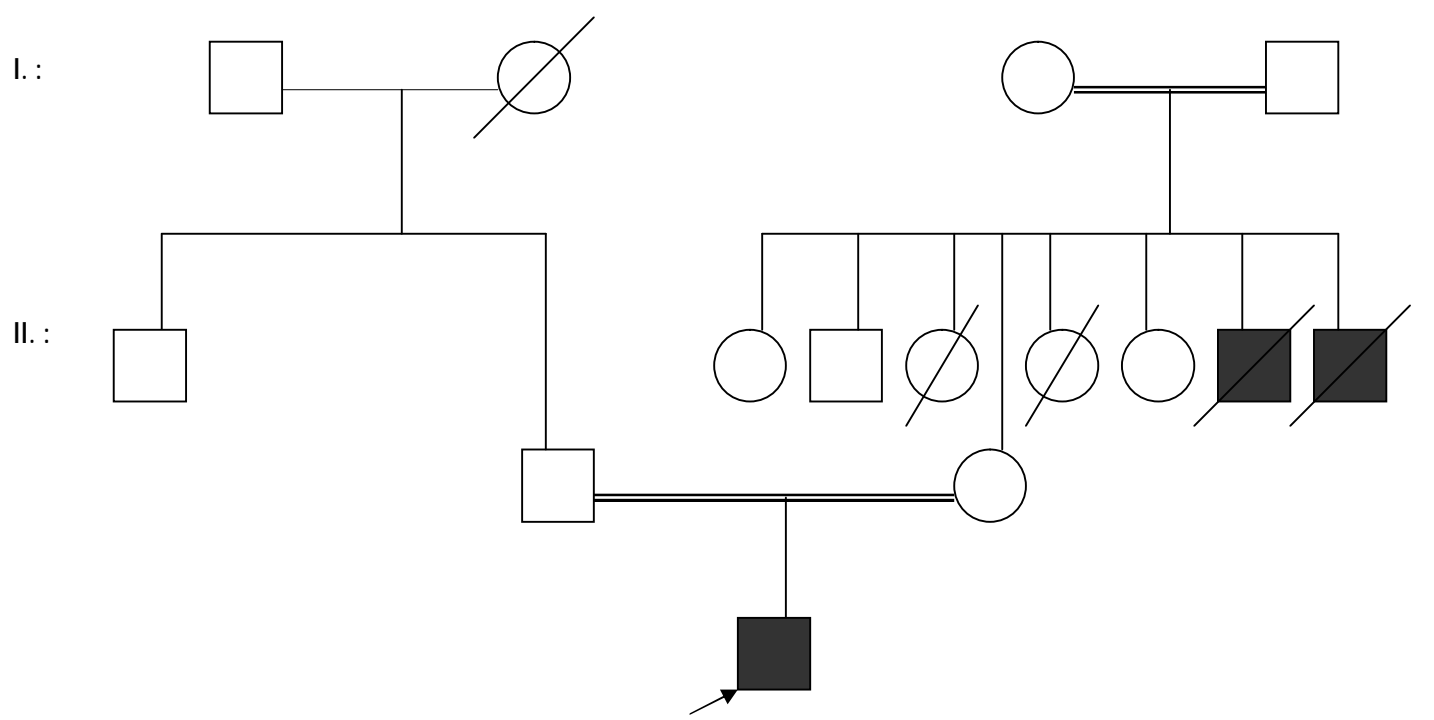
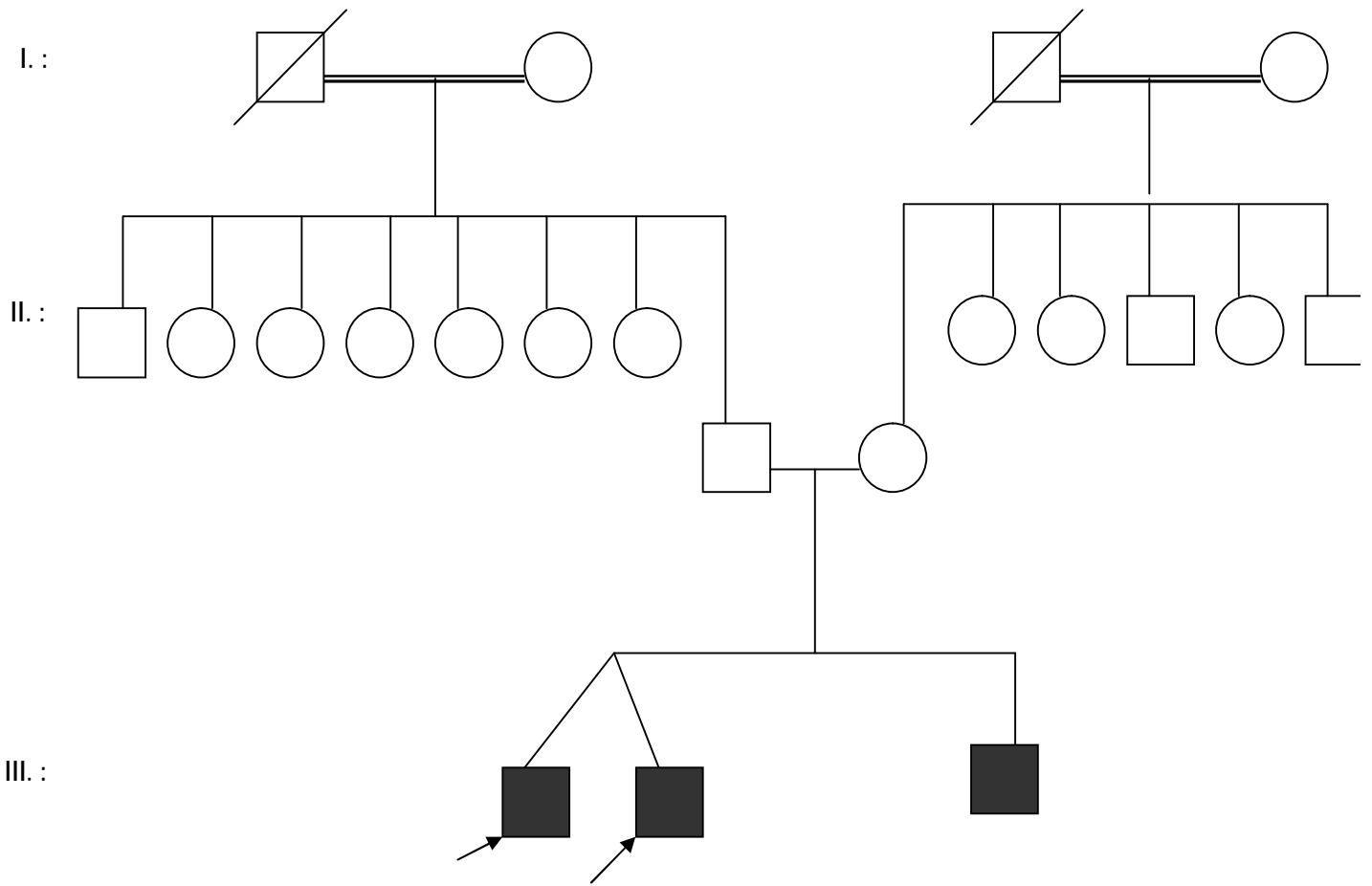


Fig17 : Arbre généalogique des Malades N : 35.36.41.

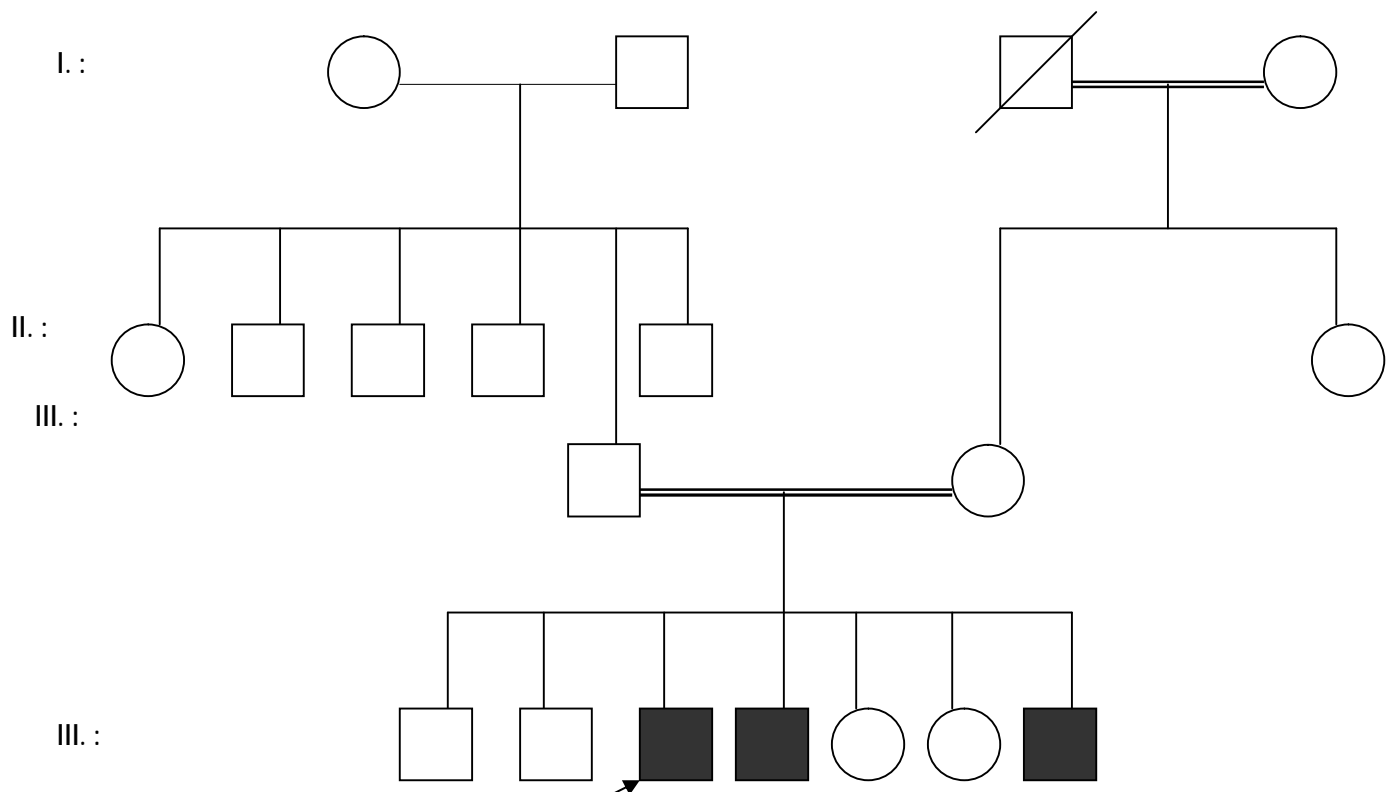


Fig 18 : Arbre généalogique du Malade N : 37

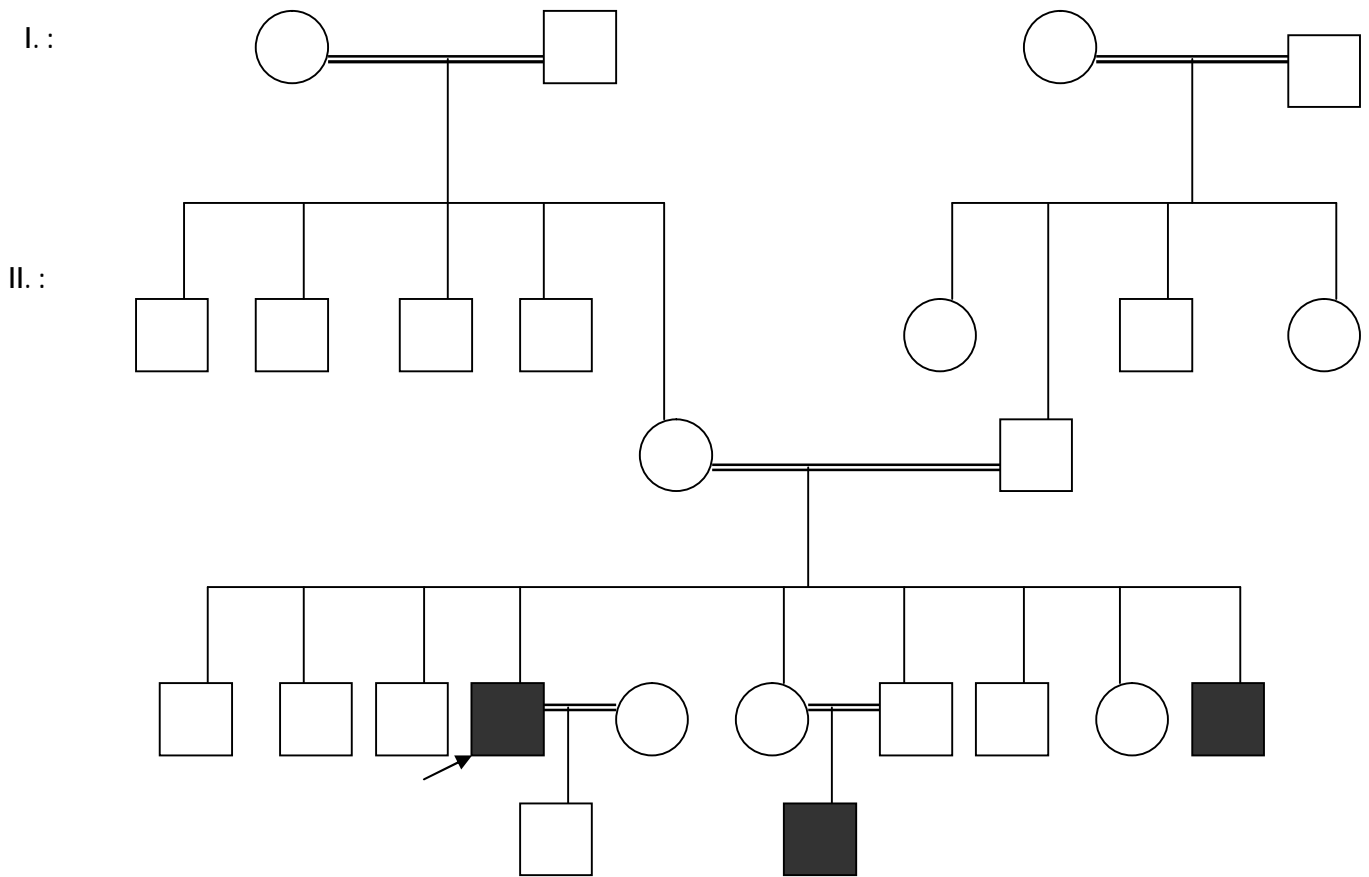


Fig 19 : Arbre généalogique des Malades N : 38.39.40.

Fig 20: Arbre généalogique du Malade N :42

III. :

IV. :



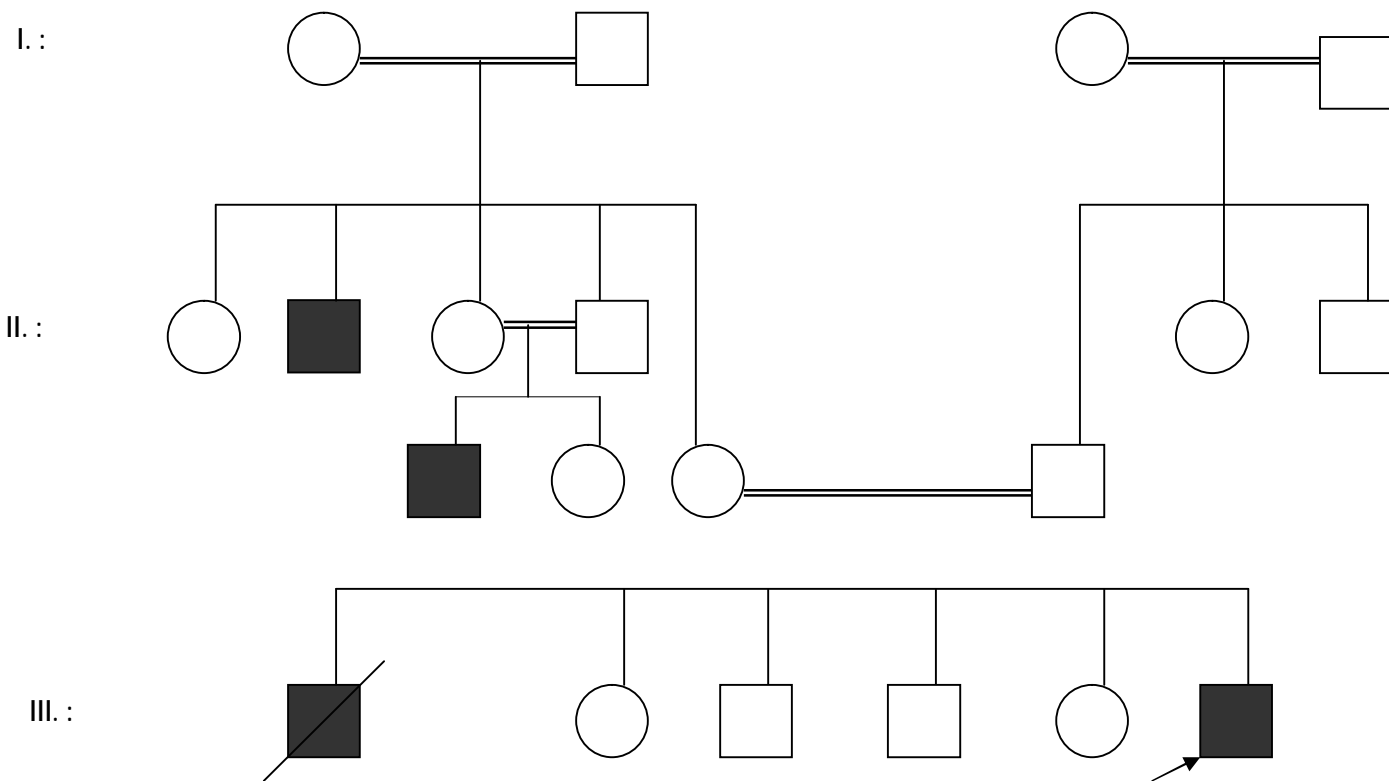


Fig 21 : Arbre généalogique du Malade N :45

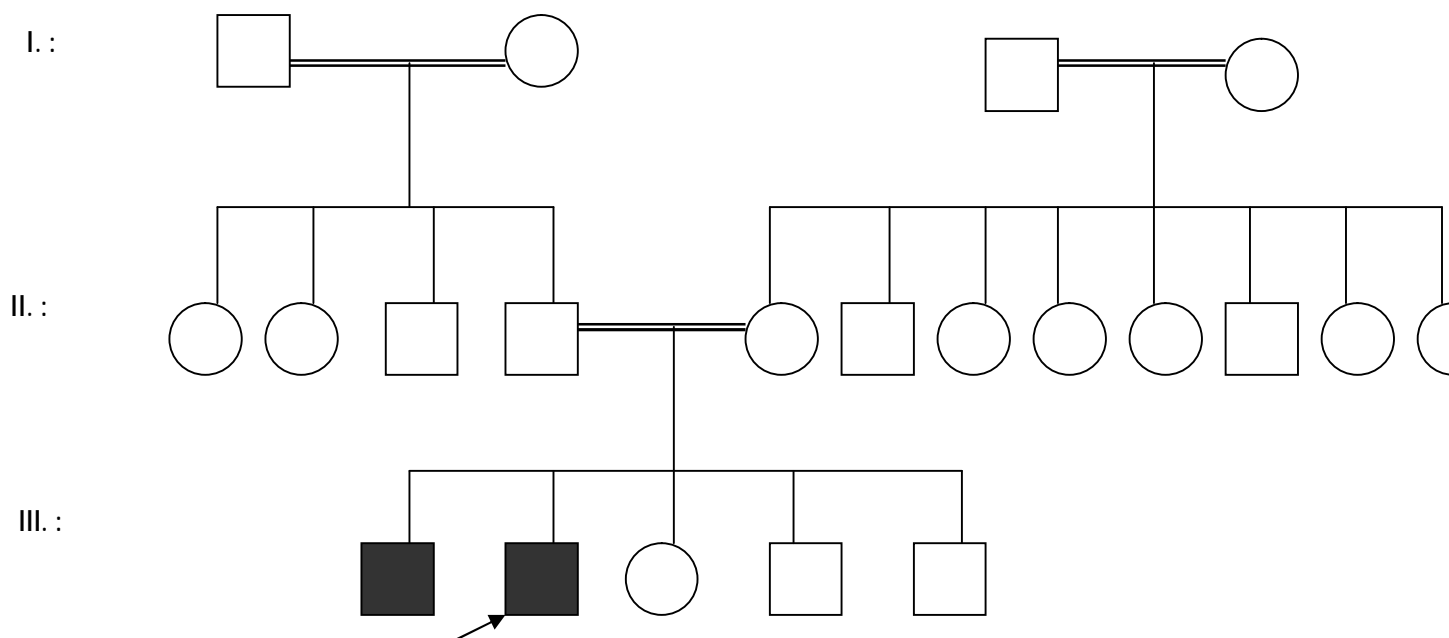


Fig 22 : Arbre généalogique du Malade N :47

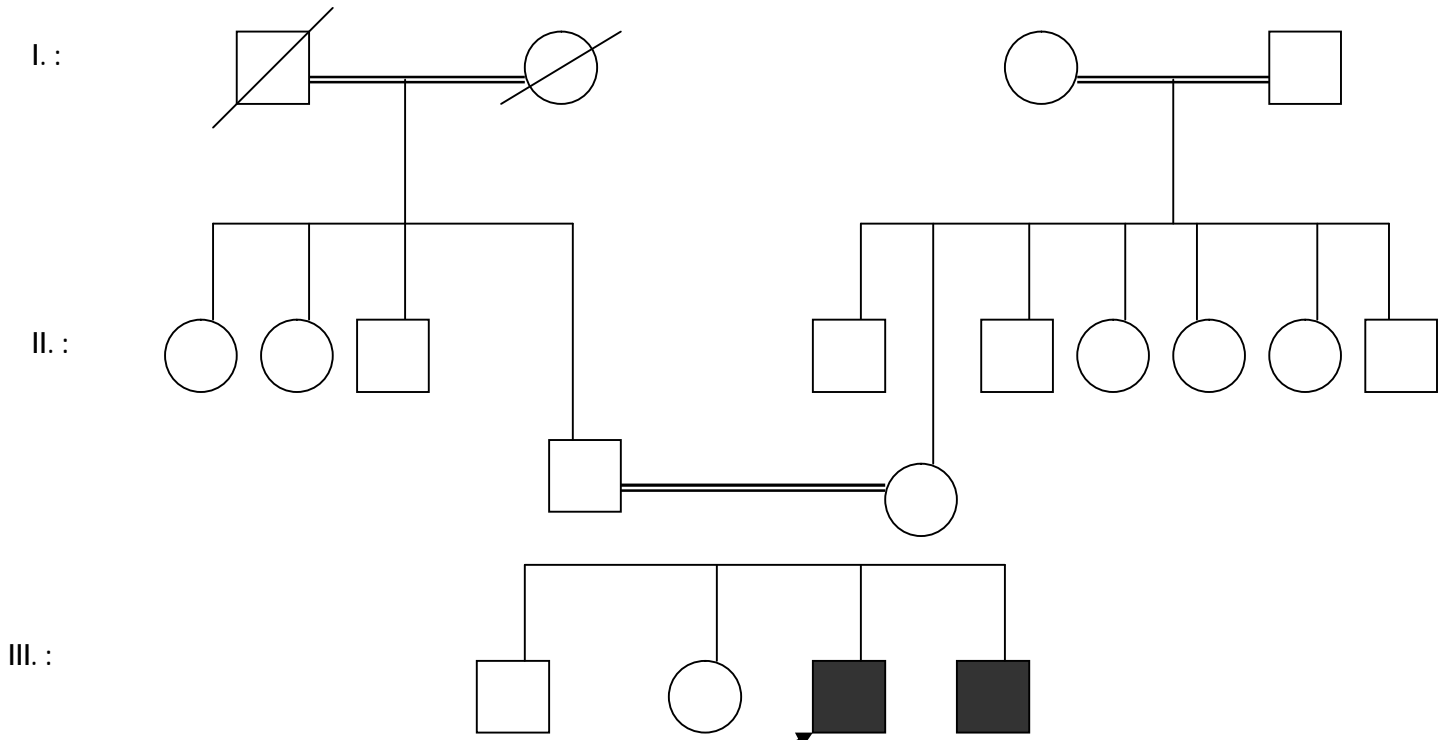
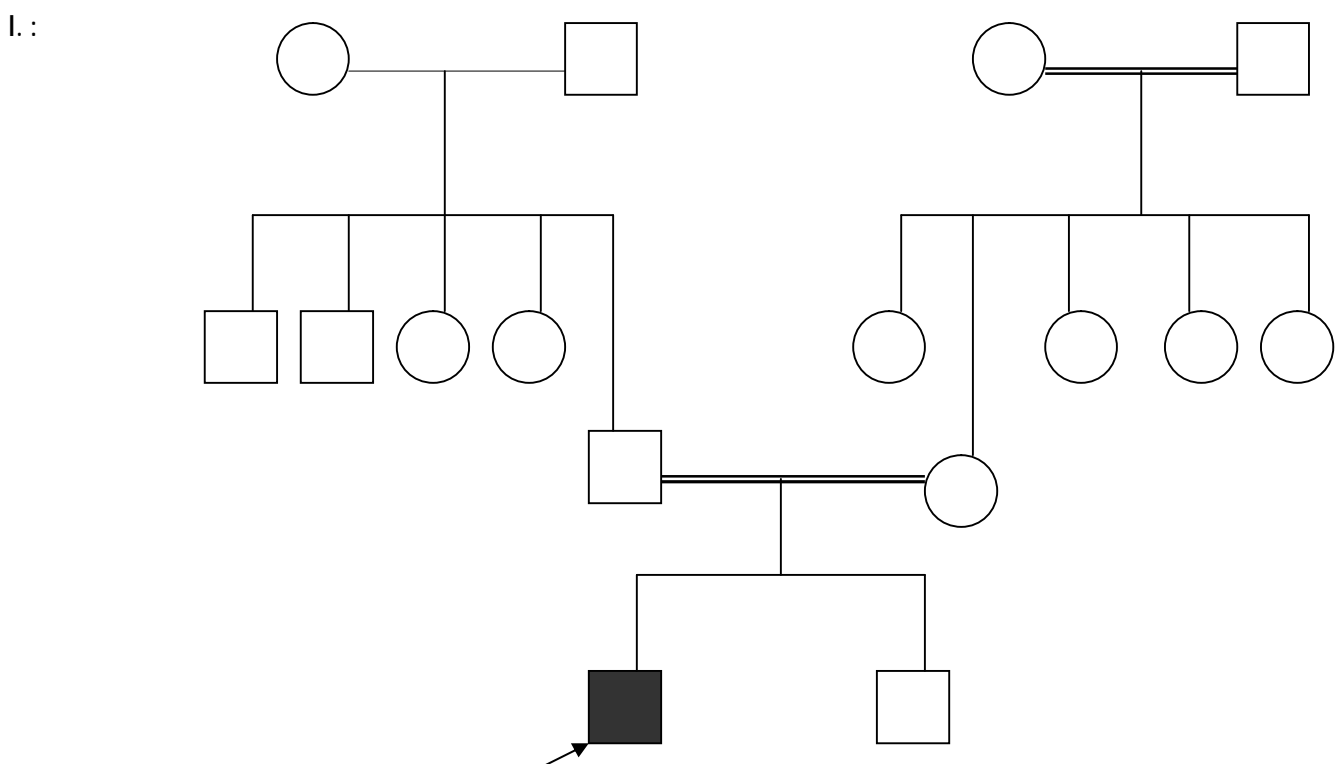
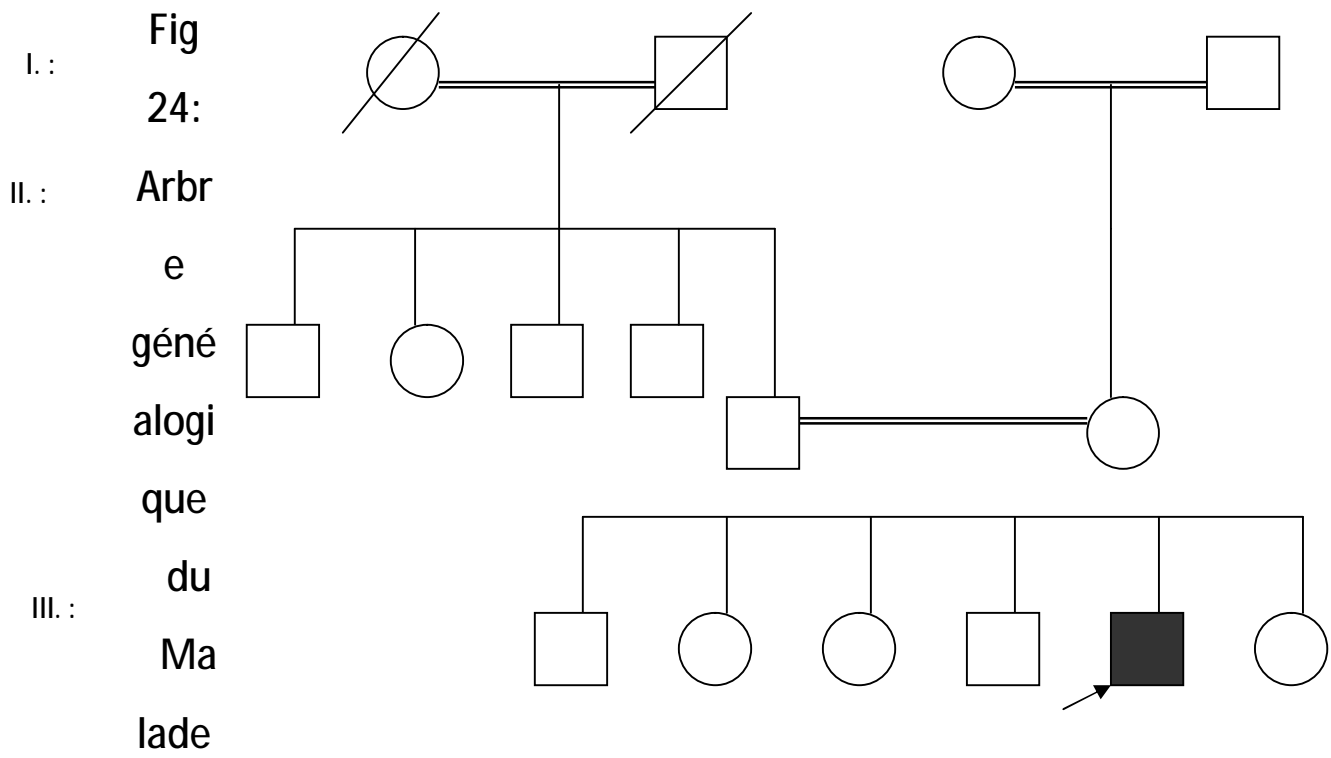


Fig 23: Arbre généalogique du Malade N :48





II. :

III. :

Fig 25: Arbre généalogique du Malade N : 6

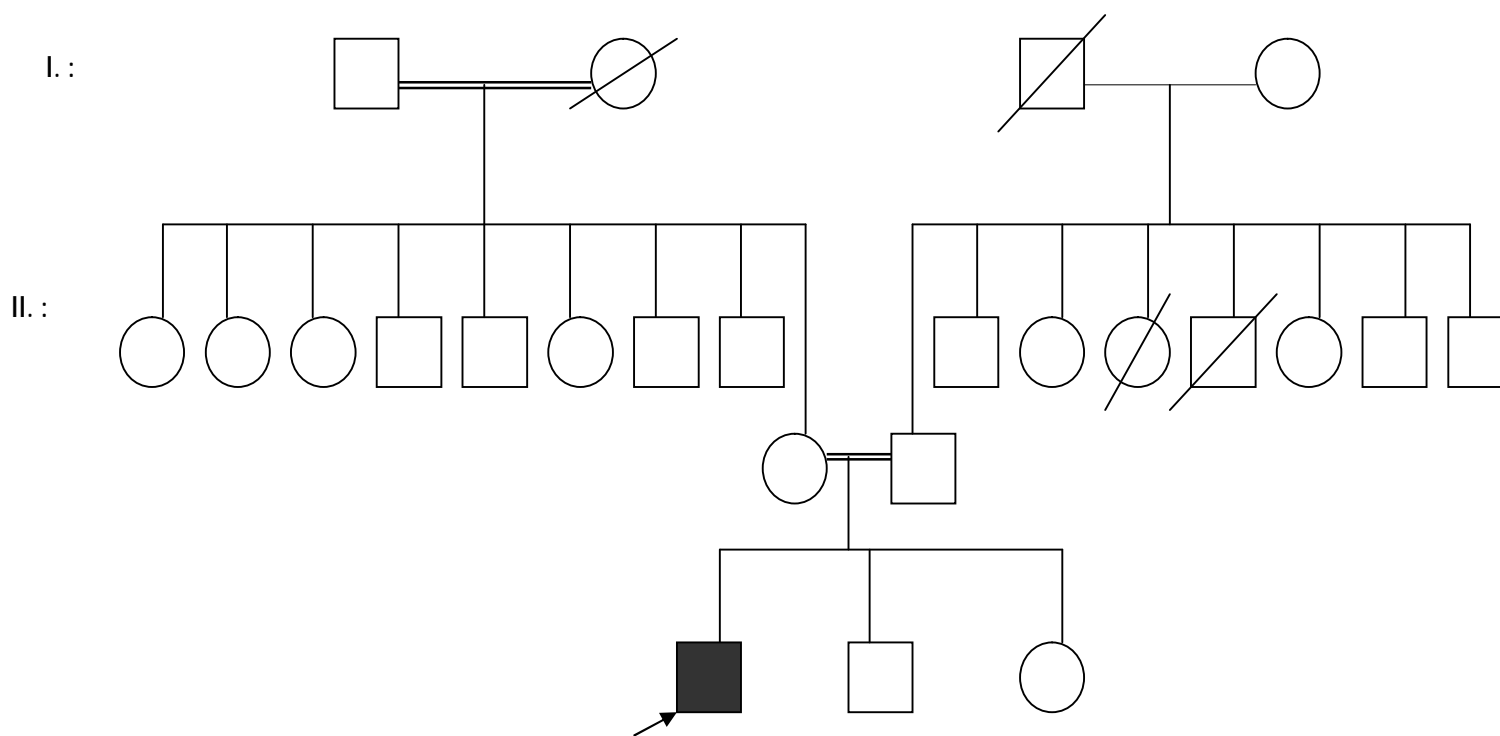


Fig 26: Arbre généalogique du Malade N :22

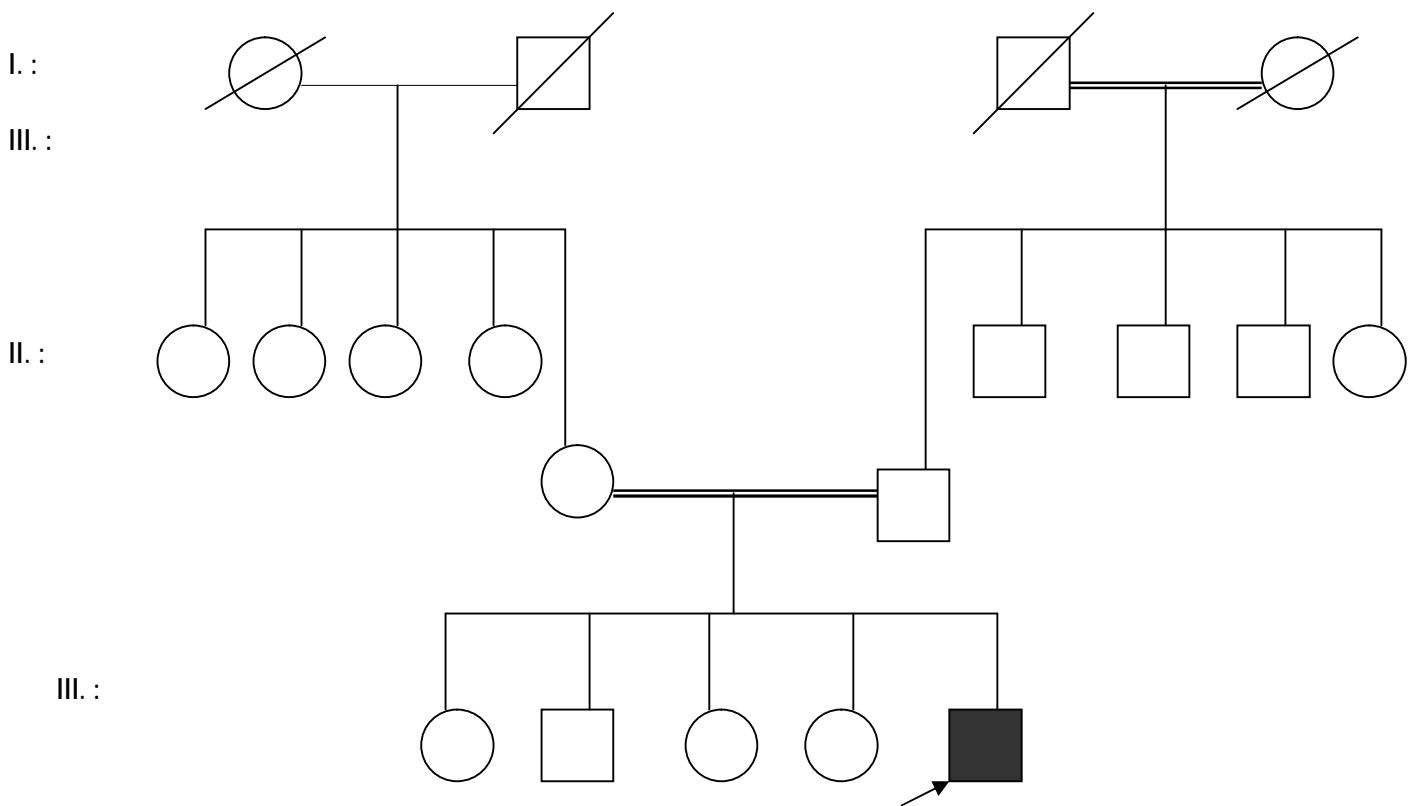


Fig 27: Arbre généalogique du Malade N :28

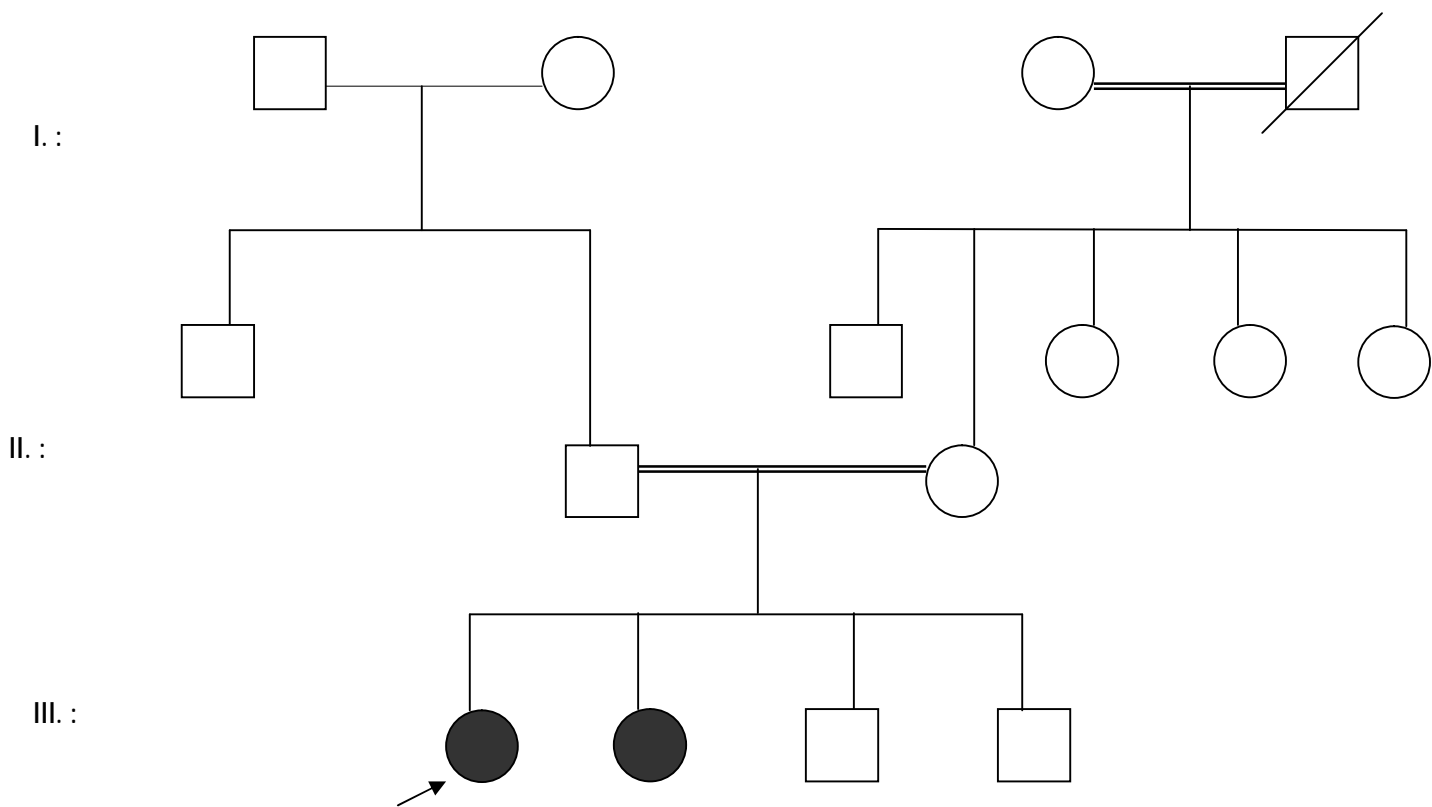


Fig 28: Arbre généalogique des Malades N :25.26.

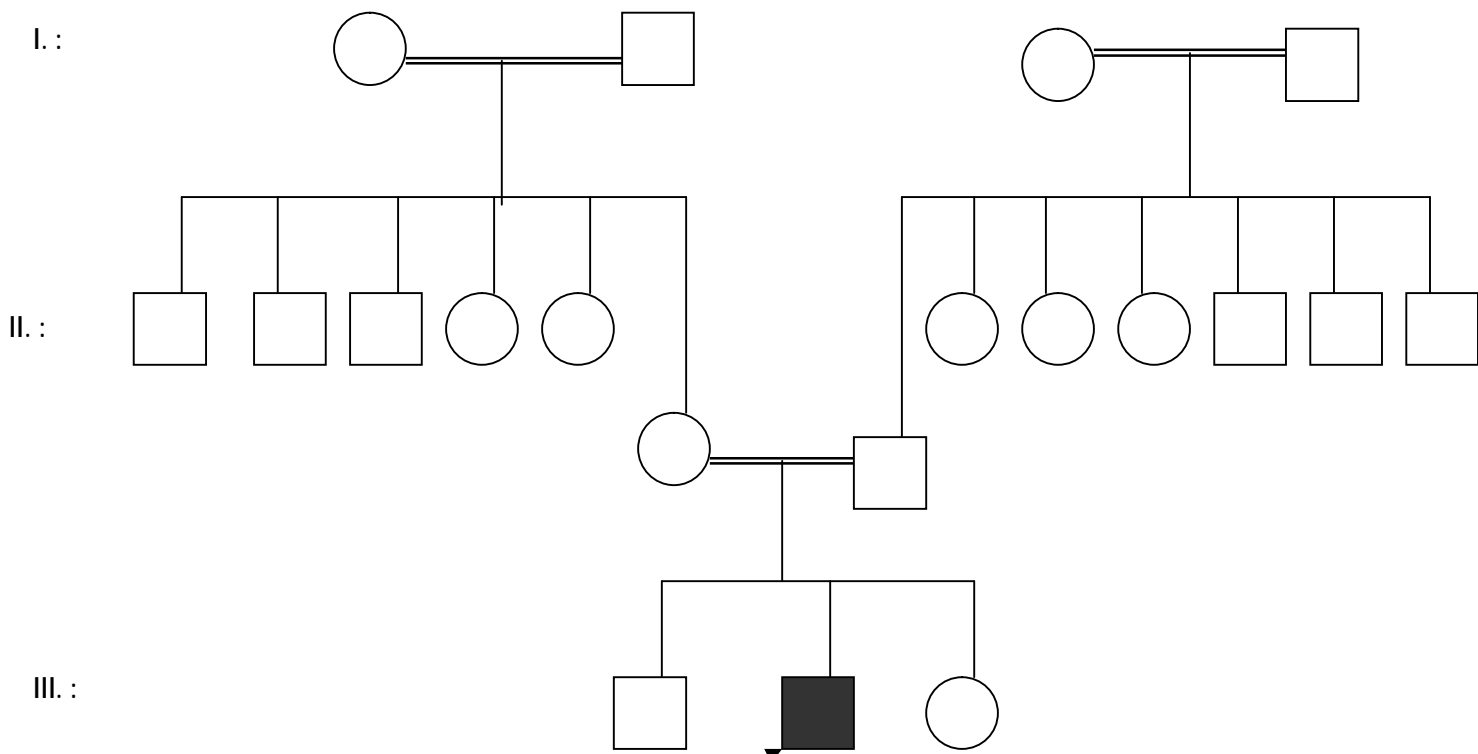


Fig 29: Arbre généalogique du Malade N :14

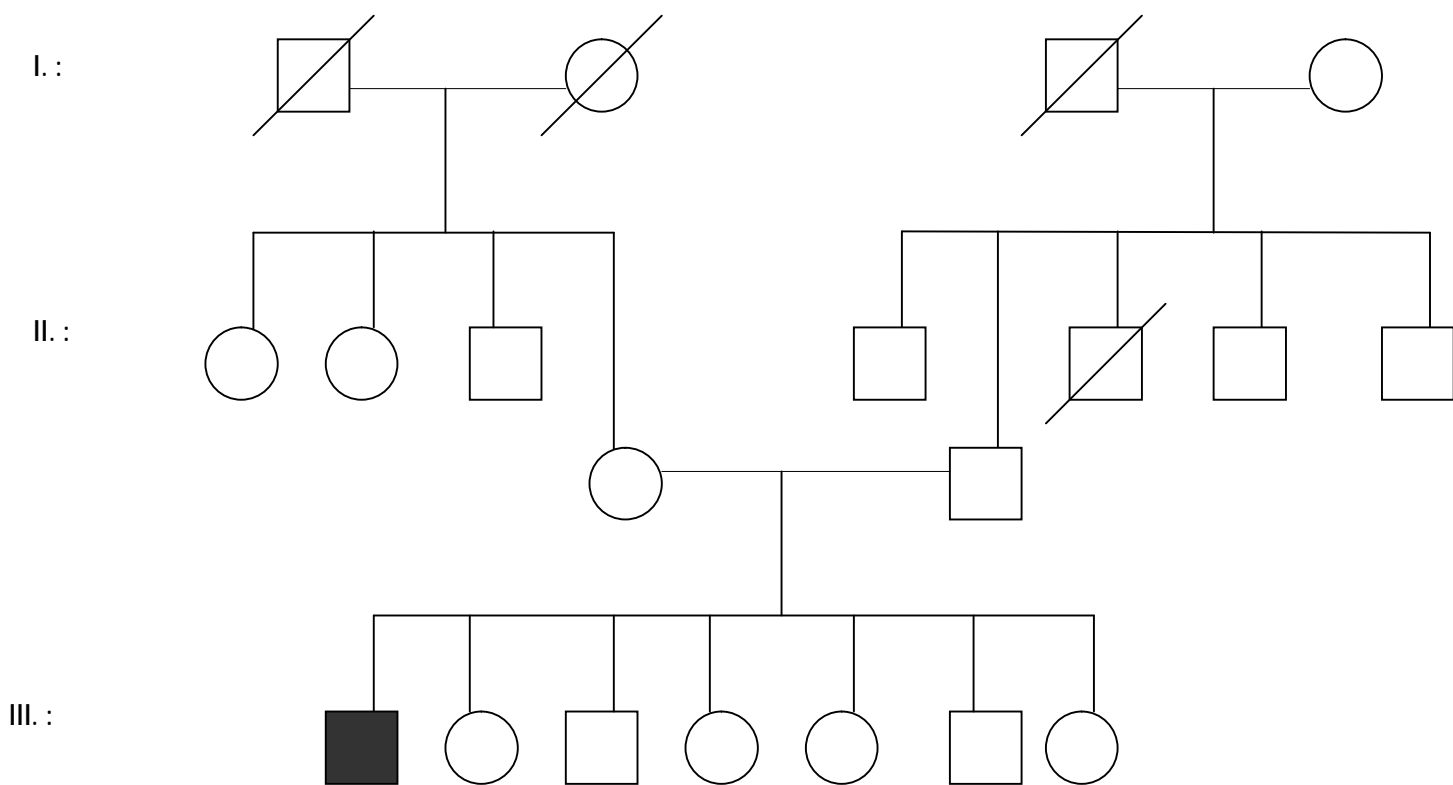


Fig 30: Arbre généalogique du Malade N :9

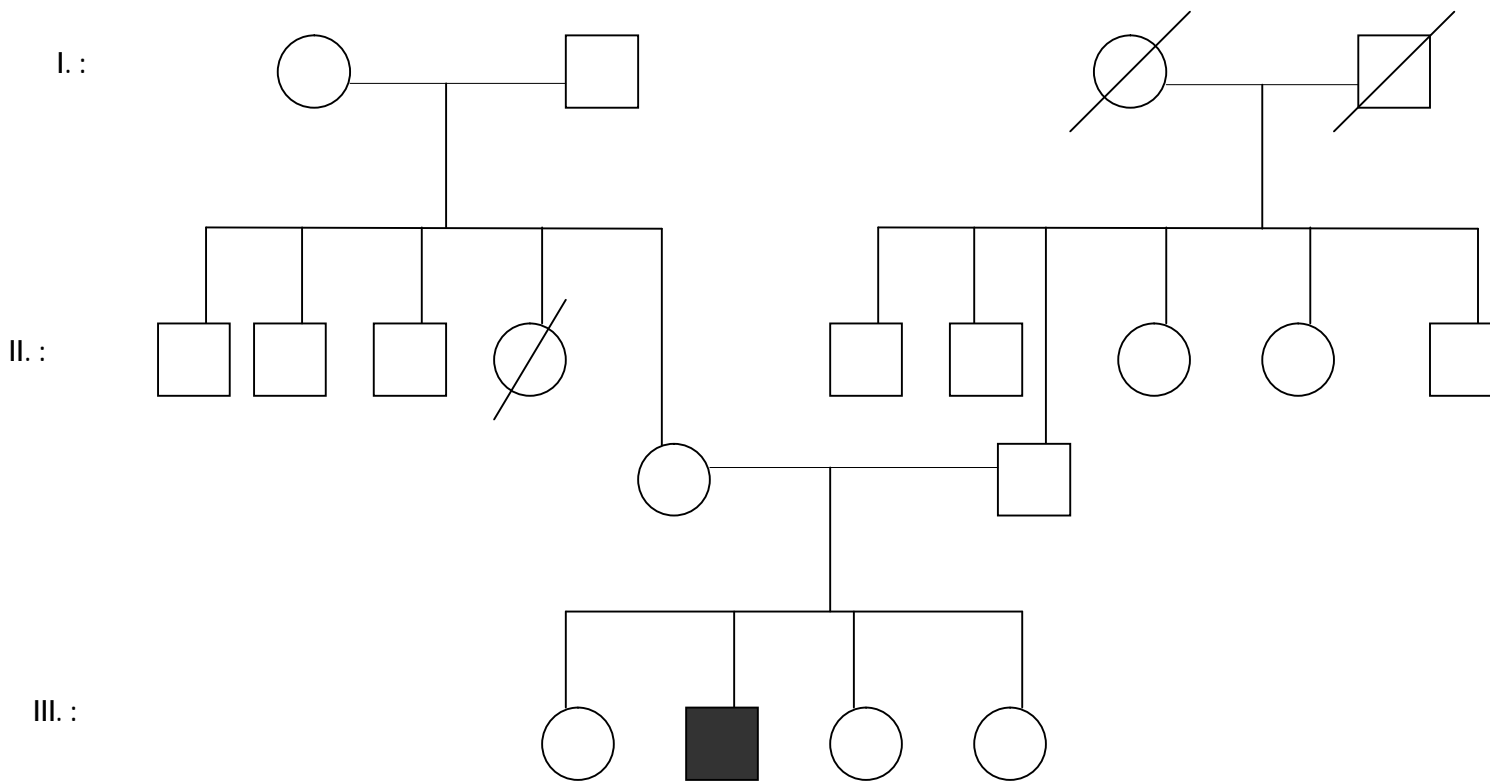
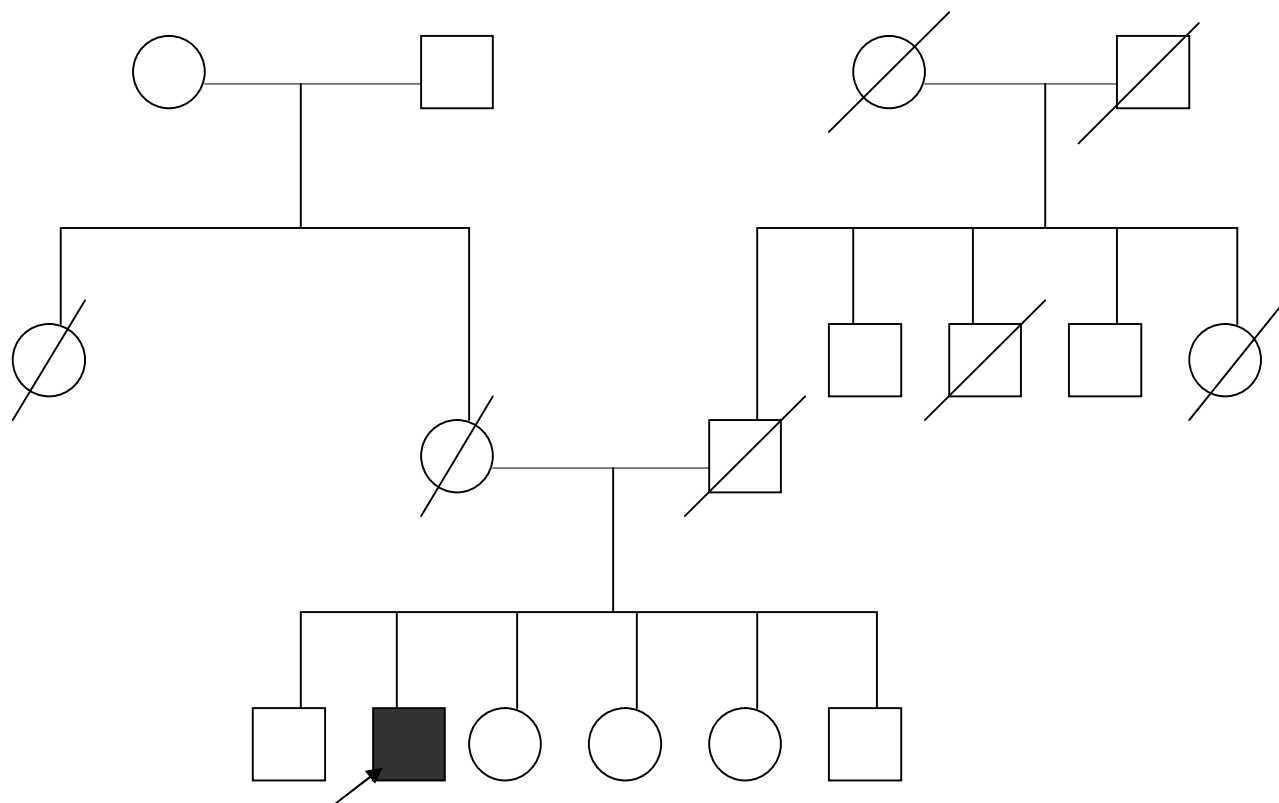


Fig 31: Arbre généalogique du Malade N :19

I.:

II.:





III. :

Fig 32: Arbre généalogique du Malade N :27

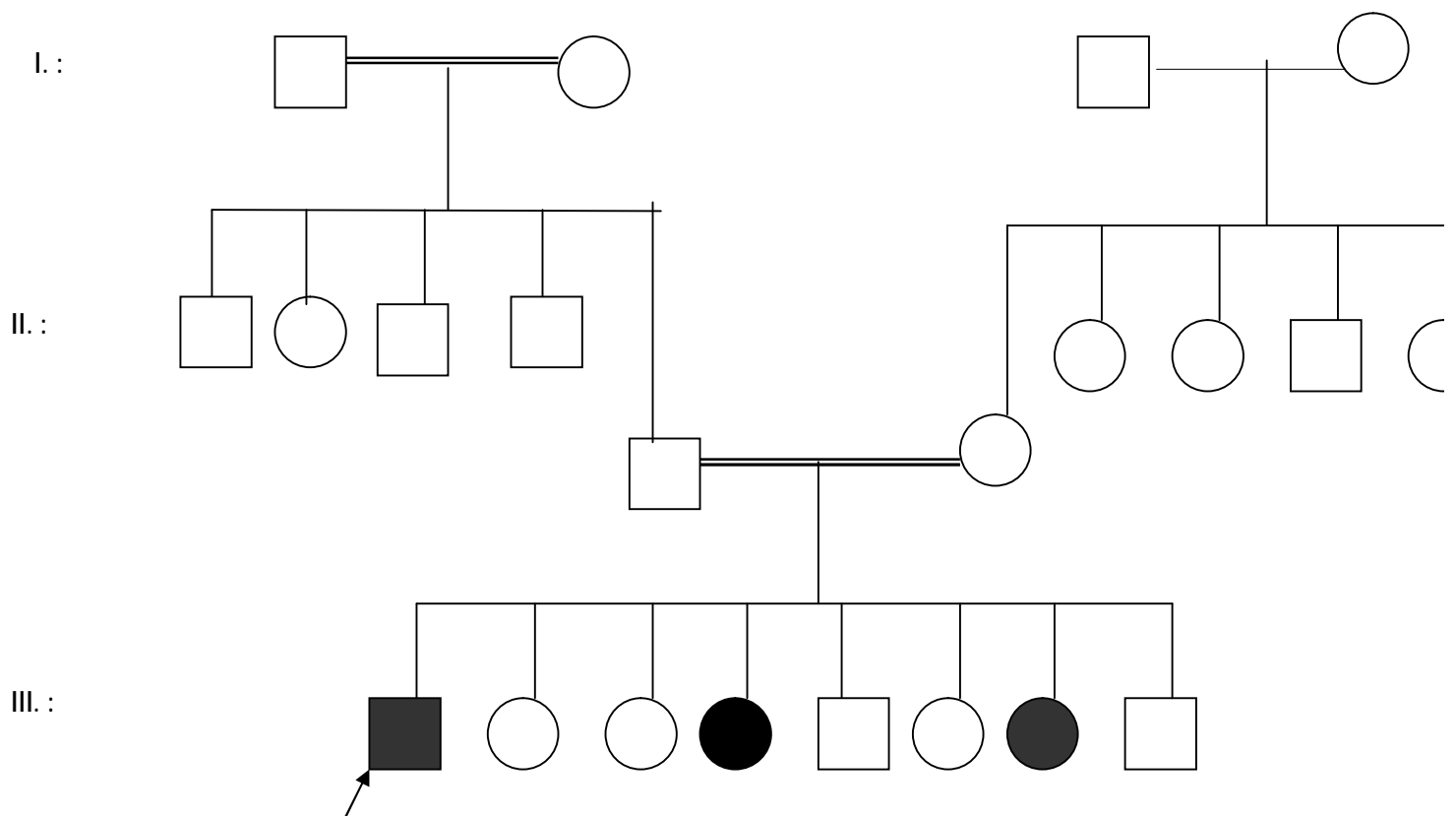
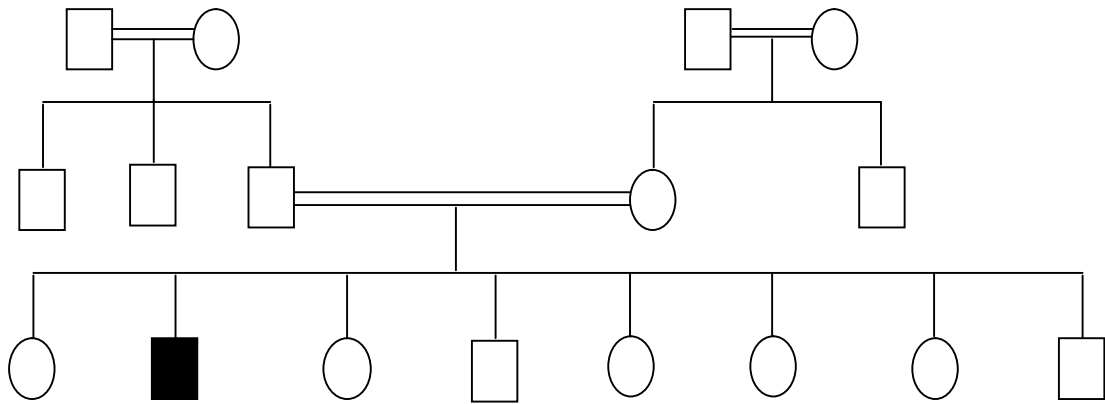
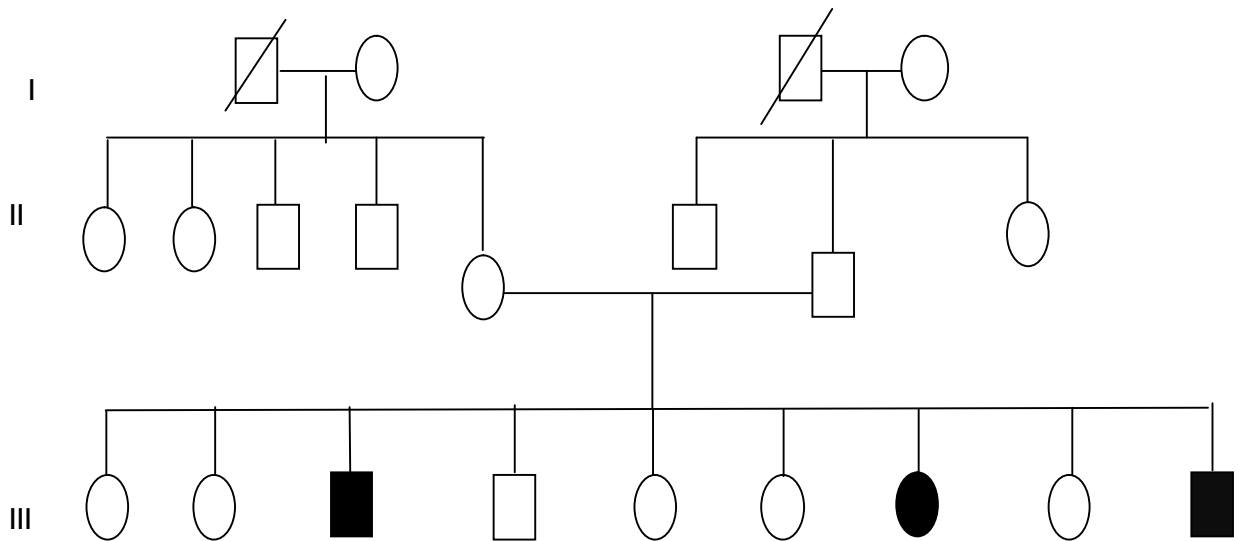


Fig 33: : Arbre généalogique du Malade N : 49.50.51



**Fig 34 : Arbre généalogique de la famille du malade N :34**



**Fig 35 : Arbre généalogique de la famille du malade N : 29.30.31.**

## *Abstract*

The sarcoglycanopathies constitute a group of recessive autosomic dystrophies muscular genetically heterogeneous. A primary change in one of genes coding for proteins of the complex of sarcoglycanes involves a destabilization of the complex.

Alpha sarcoglycanopathie correspond to locus LGMD2D and gamma sarcoglycanopathie correspond to locus LGMD2C.

We carried out the development of the technique of PCR digestion and the SSCP for the analysis of ADN of 51 patients. For the diagnosis of alpha sarcoglycanopathies a PCR digestion by enzyme NLA IV found 5 patients with a change R77C with the state heterozygote. This study made it possible to develop a technique of routine for the diagnosis of the LGMD2.

**Key words:** LGMD2D, LGMAD2C, PCR digestion, SSCP,  $\alpha$ -sarcoglycan,  $\gamma$ -sarcoglycan.

# الملخص

السرڪغليكانوباتي تمثل مجموعة من الشلل العضلي تنتقل وراثيا بصفة صبغية جسدية متحبة (Autosomique Récessive) .

إن التغير الأساسي في إحدى جينات البروتينات المكونة لمركب السرڪغليكان (Sarcoglycane) يؤدي بالضرورة إلى زعزعة الإستقرار في هذا المركب.

ألفا-سرڪغليكانوباتي موجودة في الموقع LGMD2D أما قاما-سرڪغليكانوباتي فتوجد في الموقع LGMD2C.

لقد قمنا بتنفيذ تقنية PCR الهضم الإنزيمي و تقنية SSCP من أجل تحليل الحمض النووي ADN لـ 51 مريض.

من أجل تشخيص ألفا-سرڪغليكانوباتي عن طريق PCR الهضم بإنزيم NLA IV فقد تم العثور على خمس مرضى يحملون طفرة وراثية R77C مختلفة الإقتران (Hétérozygote). هذه الدراسة جعلت من الممكن وضع أسلوب للتشخيص الروتيني للـ LGMD2 .

**كلمات المفتاح:** LGMD2D، LGMD2C، PCR الهضم الإنزيمي، SSCP، ألفا-سرڪغليكانوباتي، قاما-سرڪغليكانوباتي

<b>Nom : RAMI</b> <b>Prénom : Abla</b>	<b>date de soutenance : / 06/2008</b>
<p align="center"><b>Diagnostic génotypique direct des myopathies des ceintures :  <math>\gamma</math>- sarcoglycanopathies et <math>\alpha</math>- sarcoglycanopathies</b></p>	
<p align="center"><i>Résumé</i></p> <p>Les sarcoglycanopathies constituent un groupe de dystrophies musculaires autosomiques récessives génétiquement hétérogène. Une mutation primaire dans un des gènes codant pour les protéines du complexe de sarcoglycanes entraîne une déstabilisation du complexe.</p> <p>L'alpha- sarcoglycanopathie correspond au locus LGMD2D et la gamma-sarcoglycanopathie correspond au locus LGMD2C. Nous avons réalisé la mise au point de la technique de PCR/digestion et la SSCP pour l'analyse d'ADN de 51 malades.</p> <p>Pour le diagnostic des alpha- sarcoglycanopathies une PCR/digestion par l'enzyme NLA IV a retrouvé 5 malades avec une mutation R77C à l'état hétérozygotes. Cette étude a permis de mettre au point une technique de routine pour le diagnostic des LGMD2.</p>	
<p><b>Mots clés :</b> LGMD2D, LGMD2C, PCR digestion, SSCP, <math>\alpha</math>-sarcoglycane, <math>\gamma</math>-sarcoglycane.</p>	
<p align="center"><b>Laboratoire de recherche :</b> Laboratoire de Biologie et Génétique Moléculaire  CHU de Constantine.</p>	

