

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
جامعة امحمد بوقرة بومرداس  
Université M'hamed Bougara de Boumerdès



Faculté des Sciences  
Département de Biologie

Mémoire  
présenté pour l'obtention du diplôme  
de Magister en Biologie  
Option : Biochimie-Microbiologie Appliquées

Par

**KESKAS Sabiha**

Sujet :

**Exploration moléculaire des dystrophies musculaires en Algérie**

Soutenu le :21 Février 2012, devant le Jury composé de :

M<sup>r</sup> RIBA Amar

M<sup>me</sup> BENHASSINE Traki

M<sup>r</sup> HAMADOUCHE Tarik

M<sup>me</sup> FAZOUANE Fethia

M<sup>elle</sup> MESSAI Yamina

Maitre de conférences A (FS, UMBB)

Maître de conférences A (FSB, USTHB)

Maitre de conférences B (FS, UMBB)

Professeur (FS, UMBB)

Maitre de conférences A (FSB, USTHB)

Président

Encadreur

Co-encadreur

Examinatrice

Examinatrice

## Résumé

Face à des outils moléculaires de plus en plus puissants et pointus, l'exploration des maladies héréditaires chez l'homme suscite un intérêt sans cesse croissant. Malheureusement, les moyens disponibles actuellement dans notre pays ne sont pas à la hauteur des aspirations des biologistes, médecins et patients pour pouvoir mener de front cette bataille contre ces maladies invalidantes, voire pour certaines létales.

Les dystrophies musculaires en sont une parfaite illustration puisque déjà poignent à l'horizon des approches thérapeutiques variées visant à stopper ou faire régresser la maladie chez des patients atteints des dystrophies musculaires de Duchenne/Becker (DMD/BMD).

Dans notre contexte, nous nous sommes ainsi intéressés à explorer au plan moléculaire un peu plus d'une centaine de patients Algériens présentant l'une ou l'autre de ces deux affections, et ce par criblage du gène *DMD*, localisé en Xp21.2 et codant la protéine dystrophine, en utilisant une approche de deux PCRs multiplexes visant à mettre en évidence de larges délétions intragéniques dans ce gène.

Nous avons ainsi pu poser une étiquette moléculaire de dystrophinopathie pour près de 70% des malades, avec caractérisation fine de l'altération génétique en cause dans leur maladie, soulignant toute la pertinence de notre approche d'investigation et suggérant la forte prévalence de ces deux affections neuromusculaires dans notre population.

D'autre part, l'analyse des données générées expérimentalement nous a permis de connaître précisément dans le gène *DMD* les régions exoniques altérées par les mutations chez ces patients, autant que l'étendue de ces anomalies et la mise en évidence de l'implication préférentielle d'un site mutationnel "hot-spot", le site P20, en position distale par rapport au gène.

Egalement, l'utilisation combinée d'analyses bioinformatiques nous a ouvert l'opportunité de caractériser avec exactitude l'effet délétère potentiel que ne manquaient pas de créer les délétions intergéniques identifiées chez les malades, esquissant d'intéressantes corrélations phénotype/génotype en vue d'un diagnostic différentiel entre les deux formes alléliques DMD et BMD.

Le présent travail que nous avons réalisé souligne la faisabilité et la puissance de l'approche diagnostique que nous avons suivie, une démarche assez simple à mettre en place dans un laboratoire de biologie moléculaire, reproductible, précise et d'un coût relativement modéré, arguments qui en font une méthode de choix pour explorer les dystrophinopathies dans notre pays, pour contribuer à une meilleure connaissance de sa composante génétique et qui laissent entrevoir son utilisation dans le cadre d'une meilleure prise en charge des malades et dans la mise en œuvre d'un conseil génétique éclairé à l'attention des familles qui en sont demandeuses.

**Mots-clés:** Dystrophies musculaires progressives, dystrophies musculaires de Duchenne/Becker, gène *DMD*, protéine dystrophine, délétions intragéniques, corrélations phénotype/génotype.

## Abstract

Towards more and more precise and powerful molecular tools, studies of hereditary diseases in human generate a great interest. Unfortunately, the actual available means in our country are not enough sufficient to win the war of the biologists, the clinicians and the patients against these invalidating diseases, and for some of them lethal.

Muscular dystrophies constitute a perfect illustration of this view since various therapeutic approaches begins to appear, in order to stop or regress the disease in patients affected with Duchenne/Becker muscular dystrophies (DMD/BMD).

In our context, we have been interested to explore at a molecular level more than hundred Algerian patients affected with one of the two affections, therefore screening the *DMD* gene, localized in Xp21.2 and coding the dystrophin protein, by the use a two multiplex PCR approach to bring in light large intragenic deletions in this gene.

So, we have been able to establish at a molecular level a diagnosis of dystrophinopathy for about 70% of our patients, with a fine characterization of the genetic defect responsible of their disease, thereby reinforcing the relevance of our approach of investigation and suggesting the high prevalence of these two neuromuscular diseases in our population.

On the other hand, analysis of the data generated by our experimental procedures allowed us to know precisely in the *DMD* gene which exonic regions were altered in our patients, as well as the extent of these abnormalities and the preferential involvement of a mutational hot-spot region, P20, localized distal to the gene.

Also, combined use of bioinformatic analysis allowed us to characterize exactly the potential deleterious effect that could be created by the intragenic deletions identified in the patients, lightening interesting phenotype/genotype correlations for a differential diagnosis between the two allelic forms DMD and BMD.

The present work we have realized underlines the feasibility and the power of the diagnosis approach we have used, an approach rather simple to set up in a laboratory of molecular biology reproducible, precise and of a relatively moderated cost, a set of arguments which make it a method of choice to explore dystrophinopathies in our country, in order to contribute to a better knowledge of its genetic constitution and that raises the opportunity to use it for a better care of the patients and in the implementation of a genetic council towards families.

**Key-words:** Progressive muscular dystrophies, Duchenne/Becker muscular dystrophies, *DMD* gene, dystrophin protein, intragenic deletions, phenotype/genotype correlations.

## ملخص

أضحت دراسة و استكشاف الامراض الوراثية لدى الا نسان تشكل ميدانا خصبا لبحوث جد متطورة وذلك بفضل توفر التقنيات الجزيئية الدقيقة و الجد حديثة, الا ان الموارد المتاحة حاليا في البلاد لا ترقى لتطلعات الأطباء و علماء البيولوجيا وكذا المرضى من أجل مكافحة هاته الأمراض الفتاكة وفي بعض الأحيان مميتة.

وما الشلل العضلي لدوشان و بيكر الا خير مثال حول تطبيق هذه التقنيات بهدف دحر المرض و ايجاد الحلول الطبية اللازمة للتخفيف من حدته, و عليه قمنا بتحليل جزيئي ل *DNA* ما يزيد عن مائة مريض جزائري كلهم يعانون أحد هدين المرضين (الشلل العضلي دوشان او بيكر) و ذلك باستعمال سلسلتين من ال *PCR* المتعدد الذي يكشف لنا عن المناطق الدالة المحذوفة في مورثة الديستروفين الواقعة في المنطقة *p21.2* من الكروموزوم *X*. ولقد سمحت لنا هذه الدراسة بتشخيص جزيئي دقيق لحوالي 70% من الحالات المرضية وتحديد الخلل الجيني المسؤول عن هذا المرض مع التأكيد على حدة انتشاره في مجتمعنا.

وعند دراسة البيانات التجريبية , تم تحديد المناطق الدالة التي يحدث فيها حذف في مورثة الديستروفين واستنتاج "البقعة الساخنة" *P20* كمنطقة مفضلة لهذه الحذوف الجينية.

وباستخدام البيو معلوماتية (تحليل المعلومات البيولوجية) تسنى لنا تحديد الآثار الضارة المحتملة التي يمكن ان تنشأ أثر حدوث حذوف في مورثة الديستروفين و تسهيل تشخيص المرضين الأليلين (دوشان - بيكر) و ذلك باستخلاص الارتباطات الظاهرية و الوراثية.

أن العمل الذي قمنا به يسلط الضوء على جدوى كفاءة التشخيص الجزيئي الذي انتهجناه و يبين مدى سهولة تطبيقه واعتماده في مختبرات البيولوجيا الجزيئية كونه يركز على تقنيات دقيقة , نافعة و غير مكلفة نسبيا, مما يجعله الوسيلة المثلى و الأنجع لاستكشاف أمراض الشلل العضلي (دوشان - بيكر) في بلادنا, زيادة على ذلك فان التشخيص الجزيئي يساهم بشكل فعال في توضيح المعطيات الوراثية و تسهيل التكفل بالمرضى و تقديم النصائح الوراثية اللازمة للعائلات الحاملة للمرض.

### كلمات المفتاح:

الشلل العضلي المتطور, الشلل العضلي دوشان-بيكر , مورثة الديستروفين, بروتين الديستروفين , الارتباطات الظاهرية والوراثية

# Remerciements

Les travaux qui ont fait l'objet de ce mémoire ont été effectués au sein du Laboratoire de Biologie Moléculaire du Département de Biologie de la Faculté des Sciences de l'Université M'HAMED BOUGARA de Boumerdès (UMBB).

Je remercie vivement Mr le Dr Tarik HAMADOUCHE, responsable du Laboratoire de Biologie Moléculaire du Département de Biologie de la Faculté des Sciences et Maître de Conférence à l'UMBB, de m'avoir accueillie avec gentillesse dans son laboratoire, pour la mise en œuvre des expériences de mon travail et pour m'avoir offert son aide avec simplicité et ouverture d'esprit ; qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance et mon profond respect.

Je tiens à exprimer ma profonde et respectueuse reconnaissance, ainsi que mes sincères remerciements, à Mme le Dr Traki BENHASSINE, Maître de Conférence à la Faculté des Sciences Biologiques de l'USTHB, pour l'intérêt marqué avec lequel elle a dirigé et suivi le déroulement de ce travail.

J'adresse tous mes remerciements à Mr le Dr Amar RIBA, Maître de Conférence au Département de Biologie de la Faculté des Sciences de l'UMBB pour avoir accepté de présider mon jury de soutenance, ainsi qu'à Mesdames le Pr. Fethia FAZOUANE, Professeur au Département de Biologie de la Faculté des Sciences de l'UMBB, et le Dr Yamina MESSAI, Maître de Conférence à la Faculté des Sciences Biologiques de l'USTHB, pour tout l'intérêt qu'elles ont porté à mon travail et pour avoir accepté de le juger.

Une mention spéciale pour Mademoiselle Faiza BOULDJENET, ingénieur de laboratoire au Laboratoire de Biologie Moléculaire du Département de Biologie de la Faculté des Sciences de l'UMBB; je te remercie pour ta gentillesse, ton écoute et toutes tes qualités humaines. Reçois l'expression de mon profond respect.

# **SOMMAIRE**

<b>INTRODUCTION</b>	<b>01</b>
<b>RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>03</b>
<b>Chapitre I : Tissu musculaire</b>	<b>03</b>
<b>I.</b> Introduction	03
<b>II.</b> Organisation et physiologie générale des différents types musculaires	03
<b>II.1.</b> Muscle squelettique	03
<b>II.1.1.</b> Histologie du muscle squelettique	03
<b>II.1.2.</b> Cellules satellites	05
<b>II.1.3.</b> Régénération du muscle squelettique	07
<b>II.2.</b> Tissus musculaires cardiaque et lisse	09
<b>II.3.</b> Muscle dystrophique	09
<b>Chapitre II : Dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker</b>	<b>12</b>
<b>I.</b> Introduction	12
<b>II.</b> Dystrophies musculaires progressives	12
<b>III.</b> Classification des dystrophies musculaires progressives	15
<b>IV.</b> Dystrophinopathies	17
<b>IV.1.</b> Dystrophie musculaire de Duchenne	19
<b>IV.1.1.</b> Historique	19
<b>IV.1.2.</b> Caractéristiques et évolution de la maladie	19
<b>IV.1.3.</b> Etiologie : Mutation du gène DMD et absence de dystrophine	20
<b>IV.2.</b> Dystrophie musculaire de Becker	21
<b>Chapitre III : Dystrophine</b>	<b>22</b>
<b>I.</b> Localisation, identification et clonage du gène <i>DMD</i>	22
<b>II.</b> Structure et localisation de la dystrophine	23
<b>III.</b> Isoformes de la dystrophine	26
<b>III.1.</b> Isoformes longues de 427 kDa	26
<b>III.2.</b> Isoformes de plus faible poids moléculaire	28
<b>III.2.1.</b> Dp260	28
<b>III.2.2.</b> Dp140	29
<b>III.2.3.</b> Dp116	31
<b>III.2.4.</b> Dp71	31
<b>III.2.5.</b> Dp45	31
<b>IV.</b> Complexe glycoprotéique associé à la dystrophine (CGD)	31
<b>V.</b> Rôle de la dystrophine et du complexe protéique qui lui est associé	34
<b>VI.</b> Protéines homologues de la dystrophine	35
<b>VI.1.</b> Utrophine	36
<b>VI.2.</b> Protéine DRP2	36
<b>VI.3.</b> Dystrobrevines	36
<b>VII.</b> Principaux types de mutation	37
<b>VII.1.</b> Grandes délétions intragéniques	37
<b>VII.2.</b> Duplications partielles	40
<b>VII.3.</b> Mutations ponctuelles	40
<b>VII.4.</b> Mosaïcismes gonadique et somatique	42
<b>VIII.</b> Corrélations entre phénotype et génotype dans les dystrophinopathies	42

<b>Chapitre IV : Modèles animaux et approches thérapeutiques</b>	<b>45</b>
<b>I. Modèles animaux</b>	<b>45</b>
<b>I.1. DMD murine</b>	<b>45</b>
<b>I.2. DMD canine</b>	<b>46</b>
<b>I.3. DMD féline</b>	<b>46</b>
<b>II. Approches thérapeutiques</b>	<b>47</b>
<b>II.1. Traitement pharmacologique</b>	<b>47</b>
<b>II.1.1. Glucocorticoïdes</b>	<b>48</b>
<b>II.1.2. Aminoglycosides</b>	<b>48</b>
<b>II.1.3. Agonistes des adrénorécepteurs de type <math>\beta</math>2</b>	<b>49</b>
<b>II.1.4. Myostatine</b>	<b>49</b>
<b>II.1.5. Utrophine</b>	<b>49</b>
<b>II.2. Thérapies géniques</b>	<b>50</b>
<b>II.2.1. Approches virales</b>	<b>50</b>
<b>II.2.2. Oligonucléotides</b>	<b>53</b>
<b>II.2.3. Approche plasmidique</b>	<b>54</b>
<b>II.2.4. Transfection d'ADN nu</b>	<b>56</b>
<b>II.3. Thérapie cellulaire</b>	<b>56</b>
<b>Chapitre V : Diagnostic des dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker</b>	<b>57</b>
<b>I. Analyses cliniques et para-cliniques</b>	<b>57</b>
<b>II. Analyses histologiques, immunohistochimiques et western blotting</b>	<b>57</b>
<b>III. Analyses moléculaires</b>	<b>58</b>
<b>MATERIELS ET METHODES</b>	<b>61</b>
<b>I. Données cliniques</b>	<b>61</b>
<b>II. Méthodes</b>	<b>61</b>
<b>II.1. Extraction d'ADN génomique total</b>	<b>61</b>
<b>II.1.1. Extraction d'ADN génomique total à partir de sang périphérique par la méthode au phénol:chloroforme</b>	<b>61</b>
<b>II.1.2. Extraction d'ADN génomique total à partir de sang périphérique par la méthode de relarguage salin ("salting out")</b>	<b>63</b>
<b>II.1.3. Extraction d'ADN génomique total à l'aide du kit QIAmp DNA Mini Kit<sup>®</sup> (Qiagen<sup>®</sup>)</b>	<b>64</b>
<b>II.2. Estimation de la concentration et de la qualité de l'ADN</b>	<b>65</b>
<b>II.3. Recherche par PCRs multiplexes de délétions intragéniques dans le gène <i>DMD</i></b>	<b>67</b>
<b>II.3.1. PCRs multiplexes ciblant le gène <i>DMD</i></b>	<b>67</b>
<b>II.3.2. Mise en évidence des profils d'amplification</b>	<b>68</b>
<b>II.4. Estimation de la taille et du poids moléculaire des protéines produites</b>	<b>69</b>
<b>RESULTATS</b>	<b>70</b>
<b>I. Analyse des données cliniques et généalogiques</b>	<b>70</b>
<b>II. Extraction d'ADN génomique total à partir de sang périphérique</b>	<b>73</b>
<b>III. Amplifications géniques par PCRs multiplexes de régions ciblées dans le gène <i>DMD</i></b>	<b>77</b>

---

<b>IV.</b>	Mise en évidence de délétions intragéniques dans le gène <i>DMD</i> dans notre panel de malades	78
<b>V.</b>	Analyse moléculaire de l'étendue des délétions intragéniques identifiées dans le gène <i>DMD</i> chez nos patients	90
<b>VI.</b>	Analyse moléculaire des sites de délétions intragéniques identifiées dans le gène <i>DMD</i> chez nos patients	92
<b>VII.</b>	Analyse moléculaire de l'effet des délétions intragéniques identifiées dans le gène <i>DMD</i> chez nos patients	95
<b>DISCUSSION</b>		100
<b>CONCLUSION</b>		108
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>		110
<b>ANNEXE</b>		

## LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableaux</i>	<i>Titre</i>	<i>Page</i>
<b>I.</b>	Classification des dystrophies musculaires progressives en fonction des données moléculaires.	16
<b>II.</b>	Isoformes de la dystrophine.	27
<b>III.</b>	Corrélation entre quantité résiduelle de dystrophine et phénotype clinique.	43
<b>IV.</b>	Données cliniques sur les patients DMD/BMD explorés.	62
<b>V.</b>	Tableau récapitulatif des délétions intragéniques mises en évidence chez nos patients DMD/BMD et étendue de la délétion observée.	88
<b>VI.</b>	Taille des délétions intragéniques identifiées chez l'ensemble de nos patients et selon le phénotype de dystrophinopathie.	91
<b>VII.</b>	Récapitulatif du pourcentage de délétion de chacune des 19 régions testées par les deux PCRs multiplexes chez nos patients DMD/BMD.	94
<b>VIII.</b>	Tableau récapitulant l'effet sur le cadre de lecture du gène <i>DMD</i> des délétions intragéniques caractérisées chez nos patients.	96

## LISTE DES FIGURES

<i>Figures</i>	<i>Titre</i>	<i>Page</i>
1.	Histologie du tissu musculaire.	06
2.	Cellules satellites dans le muscle adulte.	08
3.	Dégénérescence musculaire chez les patients atteints de dystrophie musculaire de Duchenne.	10
4.	Classification des dystrophies musculaires selon la distribution de l'atteinte musculaire.	14
5.	Exemples d'études immunocytochimiques dans un muscle normal et chez des patients DMD/BMD.	18
6.	Représentation du locus DMD/BMD et des régions flanquantes.	24
7.	Représentation structurale des quatre régions principales de la dystrophine.	25
8.	Localisation du gène <i>DMD</i> dans la région Xp21, et structure de la dystrophine pleine longueur et de ses isoformes courtes.	29
9.	Comparaison de la structure des différentes protéines constituant la superfamille des dystrophines.	30
10.	Complexe dystrophine-glycoprotéines associées.	32
11.	Distribution des délétions dans le gène de la dystrophine chez des patients DMD et BMD.	39
12.	Distribution des duplications dans le gène de la dystrophine chez des patients DMD et BMD.	41
13.	Effet des délétions sur le gène <i>DMD</i> .	44
14.	Mécanisme moléculaire de la correction génomique médiée par les oligodésoxynucleotides.	55
15.	Mise en évidence d'altérations et déficits affectant la protéine dystrophine par immunohistochimie et par western blot.	60
16.	Arbre généalogique de la famille d'un patient DMD/BMD.	71
17.	Estimation de la concentration et de la qualité des ADNs génomiques totaux.	76
18.	Profils d'amplification obtenus à partir de contrôles normaux.	80
19.	Profils d'amplification obtenus à partir des patients P1 à P15.	81
20.	Profils d'amplification obtenus à partir des patients P16 à P30.	82

<b>21.</b>	Profils d'amplification obtenus à partir des patients P31 à P45.	83
<b>22.</b>	Profils d'amplification obtenus à partir des patients P46 à P60.	84
<b>23.</b>	Profils d'amplification obtenus à partir des patients P61 à P75.	85
<b>24.</b>	Profils d'amplification obtenus à partir des patients P76 à P90.	86
<b>25.</b>	Profils d'amplification obtenus à partir des patients P91 à P103.	87

# Liste des abréviations

**AAV:** Adeno-Associated Virus

**ABS :** actin binding site

**Ach:** acetylcholine

**ADN:** acide désoxyribonucléique

**AON :** oligonucléotides anti-sens

**ATP:** adénosine triphosphate

**BMD :** dystrophie musculaire de Becker

**CD 34:** Antigène de différenciation 34 (cluster of differentiation 34)

**cDNA:** ADN complémentaire

**CGD :** Complexe glycoprotéique associé à la dystrophine

**CGH:** array Comparative Genomic Hybridization

**CK:** créatines kinases

**c-met:** récepteur tyrosine kinase à la méthionine

**CPK:** Créatine PhosphoKinase

**DAP :** Dystrophin Associated Proteins

**DCG:** Complexe dystrophine-glycoprotéine

**d-HPLC :** denaturing High Performance Liquid Chromatography

**DMD :** dystrophie musculaire de Duchenne

**Dp :** Dystrophin product

**DRP:** Dystrophin-Related Protein

**FGF:** Facteur de croissance de base des fibroblastes

**Grb2:** Growth factor receptor-bound protein 2

**GRMD:** Golden Retriever Muscular Dystrophy

**HGF:** Hepatocyte growth factor

**HSV:** Herpes simplex virus

**IGF-1:** Insulin-like Growth Factor-1

**IL-6:** interleukine 6

**JNM:** jonction neuromusculaire

**Kb:** Kilo bases

**kDa:** Kilo Daltons

**LGMD:** limb girdle muscular dystrophy

**MAST 205:** microtubule-associated serine/threonine kinase 205 kDa

**mdx:** X-linked muscular dystrophy

**MEC:** matrice extracellulaire

**MIM :** Mendelian Inheritance in Man

**MLPA:** Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

**MRF4:** Myogenic regulator factor 4

**Myf5:** myogenic factor 5

**MyoD:** myogenic determination

**Nos :** nitric oxyde synthase

**PCR:** Polymerase Chain Reaction

**PDZ:** PSD95/SAP90 DLG ZO1

**Pm:** Promoteur musculaire

**PTT :** Protein Truncation Test

**RFLP :** Restriction Fragment Length Polymorphism

**RT-PCR :** Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

**SDS:** Sodium Dodecyl Sulfate

**SH:** Src homology domains

**SSCP:** Single Strand Conformation Polymorphism

**TGF- $\beta$ :** transforming growth factor  $\beta$

**VIH:** virus de l'immunodéficience humaine

# **INTRODUCTION**

Depuis près de 30 ans, des progrès considérables ont été accomplis dans la connaissance des maladies neuromusculaires. Pendant plus d'un siècle, depuis les travaux de Duchenne de Boulogne en 1868, jusqu'au milieu des années 1980s, les travaux publiés concernaient surtout la description sémiologique des différentes maladies musculaires, avec d'ailleurs une analyse souvent extrêmement complète, détaillée et encore valide de nos jours. Parallèlement, les techniques d'exploration se sont considérablement développées, particulièrement dans le domaine de l'immunohistochimie et de la biologie moléculaire, rendant l'étude de ces maladies encore plus pluridisciplinaire qu'auparavant. Anatomopathologie, physiologie, biochimie, génétique, biologie moléculaire, ... sont désormais concernées au premier rang, bien que l'analyse sémiologique initiale garde toute sa place et demeure indispensable pour aboutir à un diagnostic précis [Emery, 2002; Petiot et Urtizbera, 2004].

Les myopathies se répartissent en deux grands groupes: *les myopathies d'origine génétique*, qui comprennent les dystrophies musculaires où, du fait d'une altération primaire des fibres musculaires, celles-ci se détruisent progressivement, les myopathies congénitales dues à une anomalie du développement et de la maturation des fibres pendant la période fœtale, et les myopathies métaboliques secondaires à un dysfonctionnement de la voie de dégradation des sucres (glycogénoses), du métabolisme des graisses (lipidoses) ou de la chaîne respiratoire mitochondriale; *les myopathies acquises*, survenant sur un muscle antérieurement sain et qui regroupent les myopathies inflammatoires, les myopathies toxiques et médicamenteuses et les myopathies endocriniennes [Emery, 2002; Petiot et Urtizbera, 2004].

Les dystrophies musculaires progressives (DMP) constituent un groupe très hétérogène d'affections héréditaires, liées à une dégénérescence primitive du tissu musculaire et se manifestant par une faiblesse musculaire et une atrophie des masses musculaires, manifestations progressives consécutives à des déficits qualitatifs ou quantitatifs de certaines protéines, conduisant enfin à la nécrose du tissu musculaire [Petiot et Urtizbera, 2004; Bougeon, 2008].

Bien que les dystrophies musculaires aient une distribution et une sévérité variables, l'analyse du muscle dystrophique par anatomopathologie peut parfois montrer des lésions caractéristiques affectant le diamètre des fibres musculaires, des altérations de type nécrose-régénération, une centralisation nucléaire et une augmentation du tissu conjonctivo-adipeux qui vient combler les zones musculaires détruites [Skuk *et al.*, 2004].

Les dystrophies musculaires se manifestent le plus souvent durant l'enfance ou l'adolescence, montrant toutefois une grande hétérogénéité dans l'âge de début, la sévérité et l'évolutivité de la maladie, permettant ainsi d'individualiser cliniquement des formes précoces, débutant très tôt dans l'enfance, des formes très tardives et tout le continuum lié à la variabilité phénotypique qui subsiste entre ces deux tableaux [Emery, 2002; Petiot et Urtizbera, 2004; Laforêt *et al.*, 2008; Guis *et al.*, 2010].

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD, MIM 310200) est une maladie neuromusculaire caractérisée par une atrophie et une faiblesse musculaires progressives dues à une dégénérescence des muscles squelettiques, lisses et cardiaques. Cette affection affecte les individus du sexe masculin avec une incidence à la naissance d'environ 1/3.500 garçons. Elle débute précocement durant la petite enfance, se manifestant par un retard de développement moteur et musculaire dont la symptomatologie aboutit à une perte de la marche, une insuffisance respiratoire et une cardiomyopathie, avec, malheureusement, une issue fatale durant l'adolescence [Emery, 2002; Petiot et Urtizbera, 2004; Lovering *et al.*, 2005].

La dystrophie musculaire de Becker (BMD, MIM 300376) affecte environ 1 garçon sur 30.000, est d'apparition plus tardive, généralement vers les 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> décades, et d'évolution lente, l'espérance de vie étant surtout tributaire des atteintes cardiaque et/ou respiratoire, qui ne sont d'ailleurs pas systématiquement rencontrées [de Recondo et de Recondo, 2001; Lovering *et al.*, 2005].

Les dystrophies musculaires de Duchenne et Becker, qui comptent parmi les dystrophies musculaires progressives les plus fréquentes, se transmettent selon un mode récessif lié au chromosome X et constituent deux variantes alléliques d'une atteinte musculaire causée par des mutations dans un même gène, *DMD*, localisé en Xp21.2 et codant une protéine, la dystrophine, associée à la membrane cytoplasmique des cellules musculaires où elle assure un rôle extrêmement important dans l'architecture et la fonction des fibres musculaires en servant de point d'ancrage et de cohésion à un ensemble d'autres protéines musculaires qui s'y complexent et qui sont d'ailleurs responsables d'autres formes de dystrophies musculaires progressives [Dalkilic et Kunkel, 2003; Leturcq et Kaplan, 2005; Lovering *et al.*, 2005; Bougeon, 2008; Guis *et al.*, 2010].

Le gène *DMD*, très grande entité de 2,5 millions de paires de bases, peut être le siège de plusieurs types d'altérations mutationnelles : mutations ponctuelles, duplications partielles et, surtout, larges délétions intragéniques représentant près de 70% des anomalies chez les patients DMD/BMD [Dalkilic et Kunkel, 2003; Leturcq et Kaplan, 2005].

Au cours de notre travail, nous avons eu à explorer au plan moléculaire 103 patients avec une étiquette clinique de dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) ou de Becker (BMD), en vue de poser d'abord un diagnostic moléculaire fin et précis, et ce en criblant le gène *DMD* par PCRs multiplexes à la recherche de délétions intragéniques dans ce gène.

Notre objectif était d'apprécier si nos analyses moléculaires pouvaient apporter une réponse fiable, permettant de valider notre approche, et offrir un diagnostic différentiel dont l'intérêt évident pour la prise en charge, le traitement et le conseil génétique est capital, d'autant que se profilent déjà à l'horizon des approches thérapeutiques fort encourageantes dont ne pourront pourtant bénéficier que les patients pour lesquels l'altération moléculaire responsable de leur maladie aura été précisément caractérisée.

**RECHERCHE  
BIBLIOGRAPHIQUE**

# Chapitre I : Tissu musculaire

## I. Introduction

Le corps humain est composé de trois différents types de muscles qui, à eux seuls, forment 40 à 50% de la masse totale corporelle. Leurs contractions permettent d'accomplir trois grandes tâches :

- Le mouvement
- Le maintien de la posture
- La production de chaleur

Le tissu musculaire possède plusieurs caractéristiques qui lui sont propres et qui sont essentielles à son fonctionnement : il peut se contracter en réponse à des stimuli électriques afin de générer une certaine force; il est extensible et élastique, c'est-à-dire que le muscle peut s'étirer sans être endommagé et reprendre sa forme initiale suite à une contraction.

Parmi les différents types musculaires qui nous composent, on retrouve : le muscle cardiaque, les muscles squelettiques et les muscles lisses.

Le muscle cardiaque, formé de cellules striées, est capable de contractions rythmées et continues qui permettent un pompage régulier du sang dans tout l'organisme.

Le muscle lisse est formé de cellules non striées et fusiformes, rentrant dans la composition des structures viscérales (tube digestif, trachée respiratoire, cavité abdominale).

Le muscle squelettique, quant à lui, se nomme ainsi car il est attaché aux os et sert aux mouvements du squelette; tout comme le muscle cardiaque, le muscle squelettique est strié. Les muscles squelettiques sont capables de générer des forces sur les structures osseuses et jouent donc un rôle central dans la fonction de locomotion et permettent également aux êtres vivants de contrôler et de modifier leur environnement en saisissant et en déplaçant des objets. Les dystrophinopathies, qui constitueront l'objet de nos recherches, touchent principalement le tissu musculaire squelettique, mais aussi les muscles lisses et cardiaques des patients atteints [Sanes, 1994; Sciote et Morris, 2000].

## II. Organisation et physiologie générale des différents types musculaires

### II.1. Muscle squelettique

#### II.1.1. Histologie du muscle squelettique

Le tissu musculaire squelettique doit sa nomenclature au fait qu'il est relié au squelette et impose ainsi un mouvement à l'ensemble de la structure osseuse. Toutefois, certains

muscles squelettiques peuvent être attachés à la peau, à d'autres muscles ou encore à des structures fibreuses (fascias).

Le muscle humain est bien structuré, chaque muscle étant formé de plusieurs faisceaux de fibres musculaires qui regroupent jusqu'à une centaine de fibres. Plusieurs couches de tissu conjonctif entourent le muscle. Le fascia profond tapisse les parois du corps et aide au maintien des différents muscles. Sous le fascia, trois autres couches de tissu conjonctif viennent protéger et renforcer les différents muscles. L'*épimysium* entoure tout le muscle tandis que le *périmysium* sépare chaque faisceau de fibres. L'*endomysium*, quant à lui, occupe l'espace entre chaque fibre. Il se divise en deux couches : la lame réticulaire et la lame basale. L'ensemble de ces tissus forme la matrice extracellulaire (MEC) musculaire qui contient principalement divers types de collagènes, de la fibronectine, de la vitronectine, des protéoglycannes et des laminines (**Figure 1**) [Sanes, 1994].

Au niveau microscopique, les fibres musculaires sont entourées par une membrane plasmique appelée sarcolemme. Elle entoure le sarcoplasme où baignent de nombreuses organelles. La fibre musculaire provient de la fusion de plusieurs cellules dont les multiples noyaux (syncytium) se situent en bordure du sarcolemme. Les fibres musculaires squelettiques se distinguent aussi par la présence de myofibrilles. Ces petits filaments clairs et sombres font apparaître les rayures ou stries dans le muscle (**Figure 1**). Les myofibrilles renferment des myofilaments épais (myosine) et fins (actine) qui produisent la contraction musculaire.

La contraction musculaire se déclenche au niveau de l'unité motrice qui se compose d'un neurone moteur et de fibres musculaires (en moyenne 150) qui lui sont associées. Il existe donc plusieurs unités motrices dans chaque muscle. À la jonction neuromusculaire (JNM), les fibres sont stimulées par le neurone grâce à un neurotransmetteur, l'acétylcholine (Ach). Cette molécule est relâchée par le neurone et captée par les fibres grâce à des récepteurs spécifiques. La liaison de l'Ach à son récepteur ouvre un canal qui fait passer de petits cations, comme le sodium ( $\text{Na}^+$ ), dans la fibre musculaire. Ce changement génère un potentiel d'action qui se propage le long de la membrane de la cellule musculaire pour initier la contraction musculaire. Habituellement, il existe une jonction neuromusculaire par fibre musculaire squelettique, avec pour rôle de relier l'information nerveuse au système musculaire.

Le potentiel d'action induit par l'Ach entraîne une augmentation de la concentration de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) dans le sarcoplasme. Les ions  $\text{Ca}^{2+}$  se combinent avec la troponine pour modifier sa forme. Cette modification fait glisser la troponine-tropomyosine hors des sites de liaisons de la myosine sur l'actine pour ainsi permettre la contraction. Le processus de contraction musculaire nécessite aussi de l'énergie. En effet, l'hydrolyse de l'ATP (adénosine triphosphate) permet aux têtes de myosine de glisser le long de filaments d'actine. Lorsque le  $\text{Ca}^{2+}$ , l'ATP et l'Ach à la JNM diminuent, le muscle se relâche et la force motrice cesse.

Il existe plusieurs types de fibres musculaires squelettiques qui possèdent des capacités contractiles et des caractéristiques différentes :

- *Fibres musculaires de type I* : ces fibres sont surtout retrouvées dans les muscles de postures. Elles se contractent lentement, sont résistantes à la fatigue et contiennent beaucoup de myoglobine et de mitochondries.

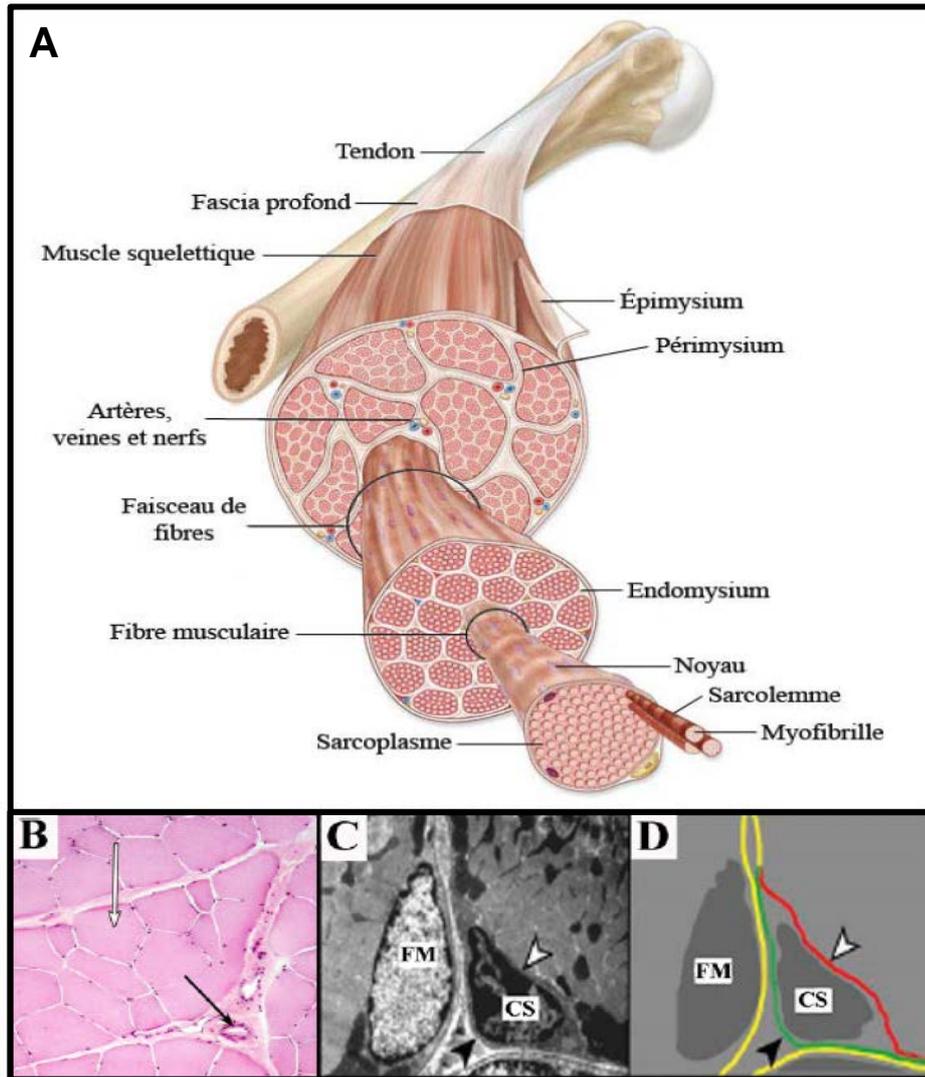
- *Fibres musculaires de type II-A* : ces fibres sont à contraction lente et sont résistantes à la fatigue. Elles contiennent également beaucoup de myoglobine et de mitochondries.

- *Fibres de type II-B* : elles se contractent rapidement et ne sont pas résistantes à la fatigue. Ceci s'expliquerait par leur faible teneur en mitochondries et en myoglobine [Sciote et Morris, 2000].

### II.1.2. Cellules satellites

Décrites pour la première fois chez la grenouille, les cellules satellites sont des cellules mononuclées qui se trouvent sous la membrane basale dans un état quiescent, leur rôle étant d'assurer la régénération des fibres musculaires. Une fois qu'un dommage musculaire survient, les cellules satellites entrent dans le cycle cellulaire et commencent à se multiplier. On arrive à reconnaître les cellules satellites grâce à leur état de quiescence : elles ont peu d'organelles cellulaires et un noyau hétérochromatique; elles expriment également différents marqueurs cellulaires comme le récepteur c-met et les syndécans 3 et 4 qui sont essentiels au bon fonctionnement du muscle [Bladt *et al.*, 1995; Cornelison et Wold, 1997; Cornelison *et al.*, 2001; Cornelison *et al.*, 2004], la M-cadhérine et le CD34 n'étant exprimés que dans certaines populations de cellules satellites en quiescence [Cornelison et Wold, 1997; Beauchamp *et al.*, 2000]. Par ailleurs, plusieurs marqueurs ont été identifiés comme étant propres aux cellules satellites : le facteur de transcription Pax7 a été identifié comme étant un marqueur important des cellules satellites quiescentes *in vivo* [Seale *et al.*, 2000], ainsi que le facteur de transcription Pax-3 [Relaix *et al.*, 2005]. L'identification et le rôle des facteurs exprimés par les cellules satellites sont encore à l'heure actuelle des domaines qui sont en voie d'exploration.

Les cellules satellites possèdent la capacité de s'activer pour contribuer à la régénérescence musculaire tout en conservant une population de cellules en quiescence relativement stable (**Figure 2**) [Schultz et McCormick, 1994]. Les cellules peuvent donc se renouveler afin d'assurer une réserve qui ne s'épuise habituellement pas [Zammit *et al.*, 2004].



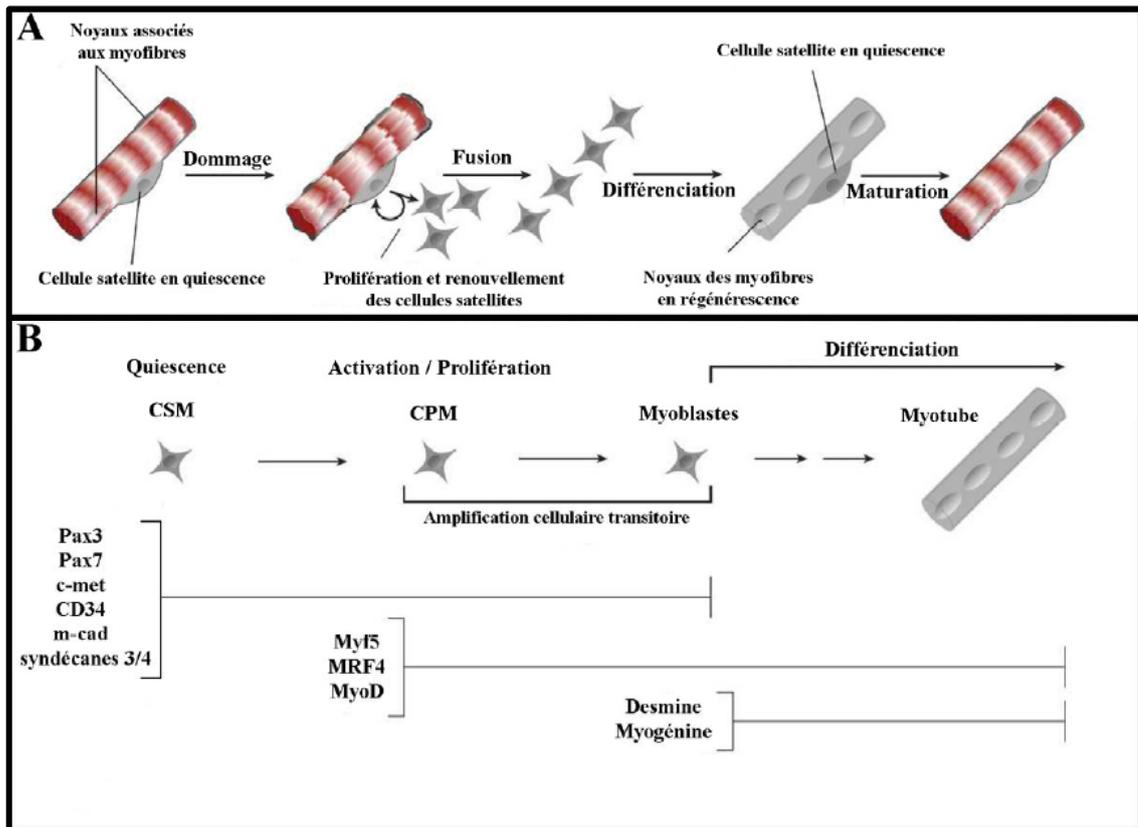
**Figure 1.** Histologie du tissu musculaire. (A) Le muscle squelettique attaché à l'os par un tendon est ceint par deux membranes. Plus à l'extérieur, on retrouve le fascia profond et, plus en profondeur, l'épimysium. Le muscle squelettique est formé de plusieurs faisceaux de fibres. Ces faisceaux sont entourés d'une membrane appelée périmysium et sont irrigués dans la matrice extracellulaire par des artères et des veines. Les fibres musculaires à l'intérieur des faisceaux sont entourées d'un tissu conjonctif appelé endomysium. À l'intérieur de chaque fibre musculaire, on retrouve des myofibrilles. Des cellules mononuclées situées près des fibres musculaires, appelées cellules satellites, demeurent disponibles pour la régénération musculaire. (B) Représentation en coupe transverse histologique du tissu musculaire humain. Une fibre musculaire (flèche blanche) et un capillaire sanguin (flèche noire) y sont illustrés. (C) Micrographie électronique du tissu musculaire montrant le noyau d'une fibre musculaire (FM) et d'une cellule satellite (CS). La cellule satellite en quiescence possède un gros noyau constitué principalement d'hétérochromatine. (D) Schématisation de C, où la cellule satellite repose entre la lame basale (tête de flèche noire ou ligne verte) et le sarcolemme de la fibre (tête de flèche blanche ou ligne rouge) [Tortora et Grabowski, 1994].

### II.1.3. Régénération du muscle squelettique

Le muscle squelettique a la capacité intrinsèque de se régénérer au cours de l'existence. Il faut environ 2 semaines à un muscle pour retrouver sa cyto-architecture normale suite à un dommage. Plusieurs modèles de régénération musculaire ont été testés (écrasement, froid, agents chimiques). Néanmoins, la méthode la plus reproductible reste l'utilisation d'agents chimiques comme la cardiotoxine, la bupivacaine et la notexine [d'Albis *et al.*, 1988; Martin et Ontell, 1988]. L'ajout de ces agents induit une réponse cellulaire et moléculaire bien orchestrée. D'abord, les fibres musculaires entrent en nécrose, puis deviennent perméables et libèrent de la créatine kinase tout en permettant l'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$ . Certaines protéases intracellulaires dépendantes du calcium, comme les calpaïnes, participent alors à la dégradation et la réorganisation des protéines des myofibrilles et du cytosquelette [Kwak *et al.*, 1993; Alderton et Steinhardt, 2000].

Les fibres musculaires forment des vacuoles et se lysent de façon complète ou partielle, selon le dommage [Goetsch *et al.*, 2003]. Conséquemment, un œdème se forme et des neutrophiles envahissent rapidement (en 2 heures) le tissu endommagé, où ils sécrètent des facteurs trophiques, comme le HGF et l'IGF-1, afin d'activer les cellules satellites [Mourkioti et Rosenthal, 2005; Tatsumi *et al.*, 1998]. Les cellules satellites expriment alors fortement les facteurs MyoD et MRF4, et sortent de leur état de quiescence. La réaction inflammatoire se poursuit par l'infiltration de macrophages et, quelques fois, de lymphocytes. Les macrophages phagocytent alors les fibres musculaires nécrotiques. Entre 2 et 3 jours après le dommage, les cellules satellites prolifèrent et expriment les facteurs Myf5, puis myogénine et desmine [Goetsch *et al.*, 2003] (**Figure 2**).

Éventuellement, les myoblastes se différencient et forment des myotubes centro-nucléés, signe caractéristique de tissu musculaire en régénérescence. Enfin, les myotubes deviennent des fibres matures possédant des noyaux périphériques. Des fibroblastes envahissent la zone pour remodeler la matrice extracellulaire, intervenir dans le processus d'angiogenèse et produire du tissu conjonctif [Prisk et Huard, 2003]. Une multitude de facteurs de croissance sont impliqués dans les dernières étapes du processus de régénération musculaire (HGF, FGF, TGF- $\beta$ , IL-6, IGF-1, ...).



**Figure 2.** Cellules satellites dans le muscle adulte. (A) Représentation schématique de la régénération musculaire. Suite à un dommage, les cellules satellites en quiescence s'activent, prolifèrent et deviennent successivement des cellules précurseurs du muscle (CPMs) et des myoblastes. Au cours de cette amplification cellulaire, la population de cellules satellites est renouvelée. Enfin, les myoblastes fusionnent et se différencient pour former des fibres musculaires centronucléées. (B) Les gènes exprimés dans les cellules satellites lors de la différenciation terminale. Les cellules satellites musculaires (CSMs) en quiescence expriment plusieurs marqueurs. Les principaux sont Pax3, Pax7, m-cadhérine (m-cad), le récepteur du HGF (c-met) et les syndécans 3 et 4. Après l'activation des cellules satellites, les CPMs expriment Myf5, MRF4 et MyoD. Les myoblastes, quant à eux, activent les gènes de la myogénine et de la desmine avant leur fusion [Shi et Garry, 2006].

## II.2. Tissus musculaires cardiaque et lisse

Le cœur, ainsi que les muscles lisses, sont des types de muscle qui sont également atteints dans le cas des dystrophinopathies. Cependant, ils sont affectés moins rapidement par la maladie.

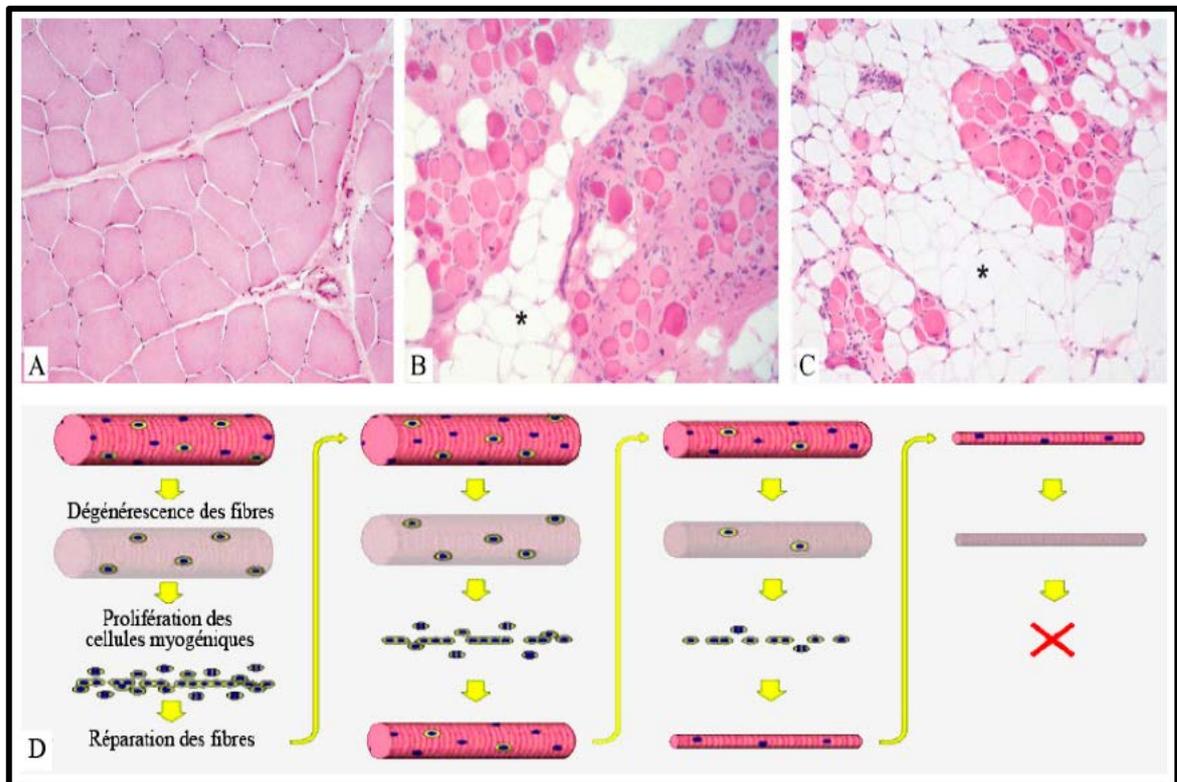
Le muscle cardiaque est un muscle strié involontaire, tout comme la plupart des muscles lisses. Les fibres musculaires cardiaques forment un réseau qui se contracte uniformément à raison d'environ 75 fois par minute au repos. Pour fonctionner, le tissu cardiaque a besoin d'une forte quantité d'ATP, source d'énergie qu'il génère de façon aérobie. Sa contraction ne dépend pas de la libération d'acétylcholine. Certaines fibres cardiaques spécialisées se chargent et se déchargent sous l'influence d'une stimulation nerveuse pour déclencher la contraction.

De son côté, le muscle lisse possède des fibres plus petites que le muscle squelettique. Les fibres du muscle lisse se contractent en un bloc en prenant appui sur les corps denses et les filaments intermédiaires présents dans leurs sarcoplasmes. Des muscles lisses sont présents dans les vaisseaux, les organes internes (estomac, intestins, utérus, vessie) et l'appareil respiratoire (bronchioles). Le muscle lisse se contracte de façon involontaire grâce au potentiel d'action du système nerveux autonome et à certains facteurs locaux (température, oxygène, gaz carbonique, adrénaline, etc.).

Les muscles cardiaques et lisses ne se régénèrent pas comme le tissu squelettique. Du tissu cicatriciel envahit la zone endommagée et entraîne une perte fonctionnelle. Des greffes cellulaires ont été tentées dans le tissu cardiaque afin de réparer le dommage, et les résultats sont plus ou moins concluants, dépendant des groupes et des cellules utilisées [Hagège *et al.*, 2006; Srivastava et Ivey, 2006].

## II.3. Muscle dystrophique

Dans le cas d'un muscle dystrophique, la dégénérescence musculaire causée par la fragilité des fibres suscite une demande constante en cellules satellites. Cette forte sollicitation fait en sorte que des cellules myogéniques du patient vieillissent prématurément [Schafer *et al.*, 2006]. Chez un enfant de cinq ans, il semble que la capacité de division de ses cellules satellites soit restreinte à environ 56 divisions [Blau *et al.*, 1990]. Avec l'épuisement de la réserve de cellules satellites, les muscles dystrophiques perdent graduellement leur faculté de régénérescence et on observe un déclin constant de l'état du patient. Les fibres musculaires endommagées ne pouvant plus être réparées, elles sont progressivement remplacées par une croissance des tissus conjonctifs (fibrose) et adipeux (**Figure 3**). Cette prolifération anormale des fibroblastes et adipocytes est stimulée par la libération constante de facteurs de croissance suite aux dommages musculaires [Gorospe et Hoffman, 1992].



**Figure 3.** Dégénérescence musculaire chez les patients atteints de dystrophie musculaire de Duchenne. (A) Histologie d'un muscle squelettique normal présentant des fibres bien accolées séparées les unes aux autres par une fine couche d'endomysium. (B) et (C) illustrent des histologies musculaires à un stade avancé de la maladie. Non seulement les fibres sont plus petites, mais leur nombre est fortement diminué. Les fibres endommagées sont remplacées par de la fibrose (épaississement de l'endomysium en B) ainsi que du tissu adipeux (particulièrement prédominant en C). (D) Représentation schématique de l'épuisement des cellules satellites ainsi que de la disparition des fibres musculaires suite aux cycles de dégénérescence et régénérescence [Skuk *et al.*, 2004].

Bien que l'augmentation graduelle de la fibrose, en réponse aux cycles répétés de dégénérescence/régénérescence, puisse nuire au déplacement intramusculaire des cellules myogéniques requises pour la réparation des fibres et la formation de myotubes [Irintchev *et al.*, 1997; Bockhold *et al.*, 1998], l'épuisement de la réserve de cellules réparatrices demeure le principal responsable de la diminution du potentiel régénératif observé dans les muscles du patient dystrophique [Luz *et al.*, 2002].

## Chapitre II : Dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker

### I. Introduction

Les myopathies sont des maladies qui touchent les muscles. Elles se caractérisent par une atrophie des tissus musculaires, subséquente à une dégénération progressive de ces mêmes tissus. Elles se répartissent en deux grands groupes [Petiot et Urtizbera, 2004; Bougeon, 2008] :

**Myopathies d'origine génétique :** Elles comprennent :

- les *dystrophies musculaires progressives* où, du fait d'une altération primaire des fibres musculaires, ces dernières se détruisent progressivement;
- les *myopathies congénitales* dues à une anomalie du développement et de la maturation des fibres pendant la période fœtale;
- les *myopathies métaboliques*, secondaires à un dysfonctionnement de la voie de dégradation des sucres (glycogénoses), du métabolisme des graisses (lipidoses) ou de la chaîne respiratoire (maladies mitochondriales).

**Myopathies acquises :** Celles-ci surviennent sur un muscle antérieurement sain et regroupent :

- les *myopathies toxiques et médicamenteuses*;
- les *myopathies inflammatoires*;
- les *myopathies endocriniennes*.

### II. Dystrophies musculaires progressives

Les dystrophies musculaires progressives représentent un groupe de maladies héréditaires responsables d'une faiblesse musculaire progressive avec amyotrophie et altérations morphologiques du muscle squelettique à type de nécrose, de dégénérescence grasseuse, de prolifération fibreuse et de régénération. A l'intérieur de ce groupe, s'individualisent plusieurs maladies, d'abord identifiées selon leurs caractères phénotypiques, le mode de transmission héréditaire et leurs caractéristiques anatomopathologiques.

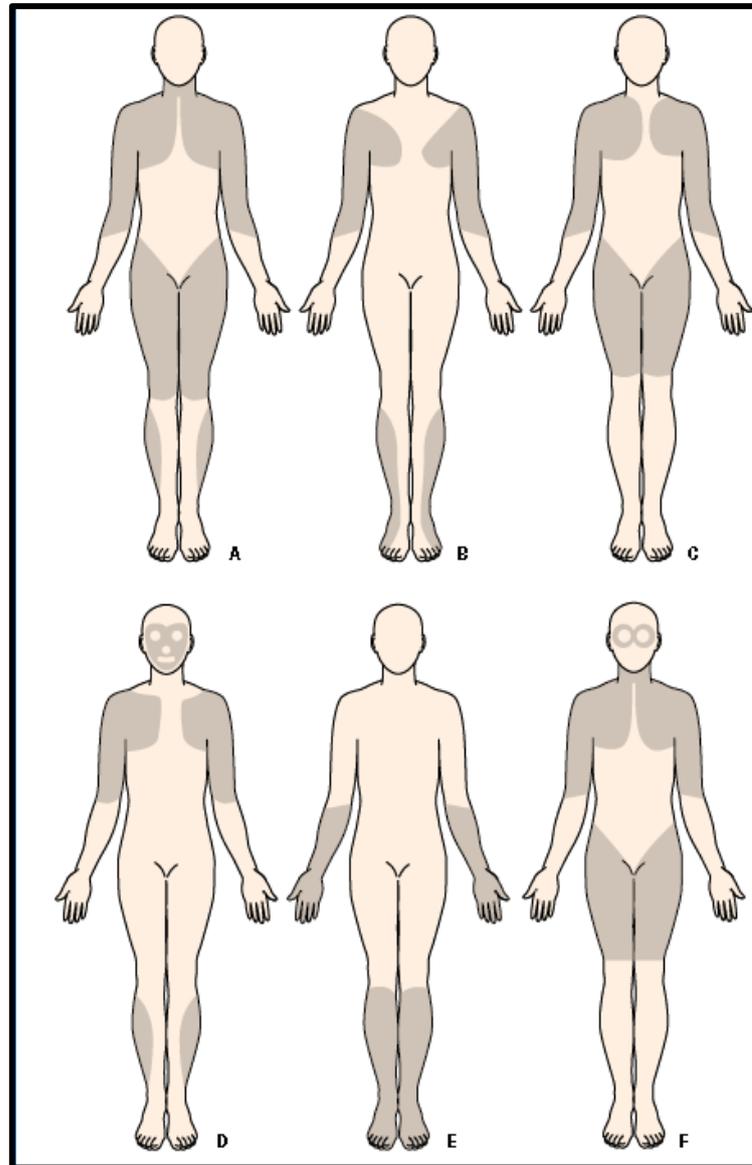
Le cadre des dystrophies musculaires progressives a en fait connu un véritable remaniement grâce aux progrès extraordinaires de la génétique moléculaire, les études

immunohistochimiques et biochimiques, tel que le Western Blot qui utilise des anticorps spécifiques des protéines musculaires, permettant en outre de distinguer les différentes formes de dystrophies musculaires et ce en décelant la protéine déficiente [Dalkilic et Kunkel, 2003; Lovering *et al.*, 2005; Laforêt *et al.*, 2008].

Plusieurs affections sont regroupées sous le vocable de dystrophies musculaires progressives :

- Myopathie de Duchenne, liée au chromosome X;
- Myopathie de Becker, liée au chromosome X;
- Myopathie d'Emery-Dreyfus, liée au chromosome X ou autosomique dominante;
- Myopathie facio-scapulo-humérale, autosomique dominante;
- Dystrophies musculaires des ceintures, autosomiques dominantes ou récessives;
- Dystrophies musculaires congénitales, autosomiques dominantes ou récessives;
- Dystrophie myotonique de Steinert, autosomique dominant;
- Myopathies oculo-pharyngées, autosomique dominant; et
- Myopathies distales, autosomiques dominantes ou récessives.

Les différentes formes de dystrophies musculaires se différencient par l'âge d'apparition du déficit musculaire, et la répartition de la faiblesse et de l'atrophie musculaires: atteinte de la face et des épaules débutant dans la deuxième décennie pour la dystrophie facio-scapulo-humérale ou maladie de Landouzy-Déjerine, début par la racine des membres dans la petite enfance pour la dystrophie musculaire de Duchenne et la dystrophie musculaire des ceintures de type LGMD2C, dans l'adolescence ou à l'âge adulte pour la dystrophie musculaire de Becker et les myopathies des ceintures, atteinte des muscles releveurs des paupières et de la déglutition débutant vers l'âge de 50-60 ans pour la dystrophie oculo-pharyngée, déficit des muscles distaux (jambes, pieds, avant-bras, mains) débutant à l'âge adulte pour les myopathies distales (**Figure 4**), bien que ces critères ne constituent pas une règle absolue [Emery, 2002; Lovering *et al.*, 2005; Laforêt *et al.*, 2008].



**Figure 4.** Classification des dystrophies musculaires selon la distribution de l'atteinte musculaire (les régions ombrées représentent les endroits affectés par la maladie). A, Dystrophie musculaire de Duchenne et Becker (DMD et BMD); B, Myopathie d'Emery-Dreyfus; C, Dystrophies musculaires des ceintures; D, Dystrophie musculaire facio-scapulo-humérale; E, Myopathie distale; F, Myopathie oculo-pharyngée [Emery, 2002].

### III. Classification des dystrophies musculaires progressives

La nosologie des dystrophies musculaires a largement évolué au cours du XX<sup>ème</sup> siècle, alors que son histoire commence en 1868 avec la description par Duchenne de Boulogne d'une "paralysie musculaire pseudo-hypertrophique". Depuis le début du siècle les noms de Landouzy et Déjerine, d'Erb, de Taylor, de Gowers, de Batten, restent attachés à l'individualisation de concepts cliniques qui gardent encore toutes leurs valeurs de dystrophie facio-scapulo-humérale, de dystrophies musculaires des ceintures, de dystrophie musculaire oculo-pharyngée, de myopathies distales, ou de dystrophies musculaires congénitales, auxquelles s'ajouteront quelques années plus tard les noms de Becker ou d'Emery et Dreyfus pour des formes cliniques de dystrophies progressives d'évolution lente ou de topographie scapulo-péronière avec atteinte cardiaque. C'est au milieu du XX<sup>ème</sup> siècle que la notion d'hérédité, et donc de génétique, fut introduite avec la classification de Walton et Natrass, distinguant les dystrophies musculaires liées au chromosome X, les dystrophies à transmission autosomique dominante regroupant les maladies décrites par Landouzy et Déjerine et les dystrophies à transmission autosomique récessive avec un groupe hétérogène de myopathies des ceintures décrites par Erb [Gilman, 2007; Laforêt *et al.*, 2008; Bushby *et al.*, 2009; Guis *et al.*, 2010] (**Tableau I**).

La généralisation des études anatomopathologiques a ensuite permis de distinguer que si la notion de nécrose-régénération pouvait être caractéristique de certaines myopathies comme les dystrophies liées à l'X, les dystrophies musculaires congénitales et les dystrophies progressives autosomiques récessives de l'enfant présenteraient des désorganisations morphologiques moins typiques. Bien que les données cliniques, d'hérédité et anatomopathologiques restent des éléments majeurs pour l'établissement diagnostique, les connaissances moléculaires pourraient maintenant évoluer vers une classification basée sur l'anomalie protéique causale. Ainsi, un groupe de dystrophies musculaires pourrait s'individualiser autour de la notion d'anomalies intéressant le complexe fonctionnel multiprotéique "dystrophine-glycoprotéines de membrane-laminine", mettant en relation, à travers le sarcolemme, le cytosquelette contractile actino-myosinique et la matrice extracellulaire entourant la cellule musculaire avec une corrélation anatomopathologique puisque c'est dans ce groupe que les altérations morphologiques sont typiquement dystrophiques. Pour les autres types, dystrophies musculaires des ceintures, facio-scapulo-humérale et oculopharyngée, l'altération trophique histologique n'est pas aussi caractéristique, voire même pseudo-neurogène, comme dans la dystrophie musculaire d'Emery-Dreyfus. Lorsque la protéine en cause est connue, on peut même savoir, bien que son rôle ne soit pas encore parfaitement compris, que la pathogénie s'intègre dans un contexte fonctionnel différent [Petiot et Urtizbera, 2004; Serratrice, 2006; Laforêt *et al.*, 2008].

D'année en année, la classification des dystrophies musculaires n'a cessé d'évoluer et ce en tenant compte de trois approches différentes : clinique, anatomopathologique et génétique.

**Tableau I.** Classification des dystrophies musculaires progressives en fonction des données moléculaires. LGMD, dystrophie musculaire des ceintures; DMC, dystrophie musculaire congénitale; WWS, dystroglycanopathie; XR, lié à X récessif; AD, autosomique dominant; AR, autosomique récessif [Bushby *et al.*, 2009].

Dystrophie musculaire	Mode de transmission	Localisation cytogénétique	Gène (protéine)
Duchenne/Becker	XR	Xp21.2	<i>DMD</i> (dystrophine)
Emery-Dreyfus type 1	XR	Xq28	<i>EMD</i> (émerine)
Emery-Dreyfus type 2	XR	Xq26.3	
Emery-Dreyfus/LGMD1B	AD/AR	1q21.2	<i>LMNA</i> (lamines A/C)
Facio-scapulo-humérale	AD	4q35	-
LGMD1A	AD	5q31	<i>MYOT</i> (myotiline)
LGMD1C	AD	3p25	<i>CAV3</i> (cavéoline-3)
LGMD1D	AD	7q	-
LGMD1E	AD	6q23	-
LGMD1F	AD	7q32	-
LGMD1G	AD	4q21	-
LGMD2A	AR	15q15	<i>CAPN3</i> (calpaïne-3)
LGMD2B	AR	2p13	<i>DYSF</i> (dysferline)
LGMD2C	AR	13q12	<i>SGCG</i> ( $\gamma$ -sarcoglycane)
LGMD2D	AR	17q21	<i>SGCA</i> ( $\alpha$ -sarcoglycane)
LGMD2E	AR	4q12	<i>SGCB</i> ( $\beta$ -sarcoglycane)
LGMD2F	AR	5q23	<i>SGCD</i> ( $\delta$ -sarcoglycane)
LGMD2G	AR	17q12	<i>TCAP</i> (téléthonine)
LGMD2H	AR	9q33.3	<i>TRIM32</i> (tripartite motif-containing 32)
LGMD2I/DMC1C/WWS	AR	19q13.3	<i>FKRP</i> (fukutin-related protein)
LGMD2J	AR	2q31	<i>TTN</i> (titine)
LGMD2K/WWS	AR	9q34.1	<i>POMT1</i> (protein-O-mannosyl-transferase-1)
LGMD2L	AR	11p14	<i>ANOS5</i> (anoctamine-5)
LGMD2M/DMC Fukuyama/WWS	AR	9q31	<i>FKTN</i> (fukutine)
LGMD2N/WWS	AR	14q24	<i>POMT2</i> (Protein-O-mannosyl-transferase-2)
LGMD2O/WWS	AR	1p34.1	<i>POMGNT1</i> (Protein-O-mannose- $\beta$ 1,2-N-acetylglucosaminyltransferase-1)
DMC1A	AR	6q22	<i>LAMA2</i> (chaîne laminine $\alpha$ 2)
DMC1B	AR	1q42	-
DMC1D	AR	22q12.3	<i>LARGE</i> (like-glycosyltransferase)
DMC avec rigid spine	AR	1p36	<i>SEPN2</i> (sélénoprotéine N1)
DMC Ullrich/Myopathie Bethlem	AR, AD	21q22.3, 2q37	<i>COL6A1, A2, A3</i> (chaînes $\alpha$ collagène VI)
DMC avec déficit en intégrine	AR	12q13	<i>ITGA7</i> (intégrine $\alpha$ 7)
DMC avec déficit en dynamine-2	AD	19p13.2	<i>DNM2</i> (dynamine-2)
Epidermolysis bullosa	AR	8q24-qter	<i>PLEC1</i> (plectine)
Oculo-pharyngée	AR, AD	14q11.2-q13	<i>PABPN1</i> (poly(a) binding protein nuclear 1)
Dystrophie myotonique 1	AD	19q13.3	<i>DMPK</i> (myotonic dystrophy protein kinase)
Dystrophie myotonique 2	AD	3q21	<i>ZNF9</i> (zinc finger protein 9)

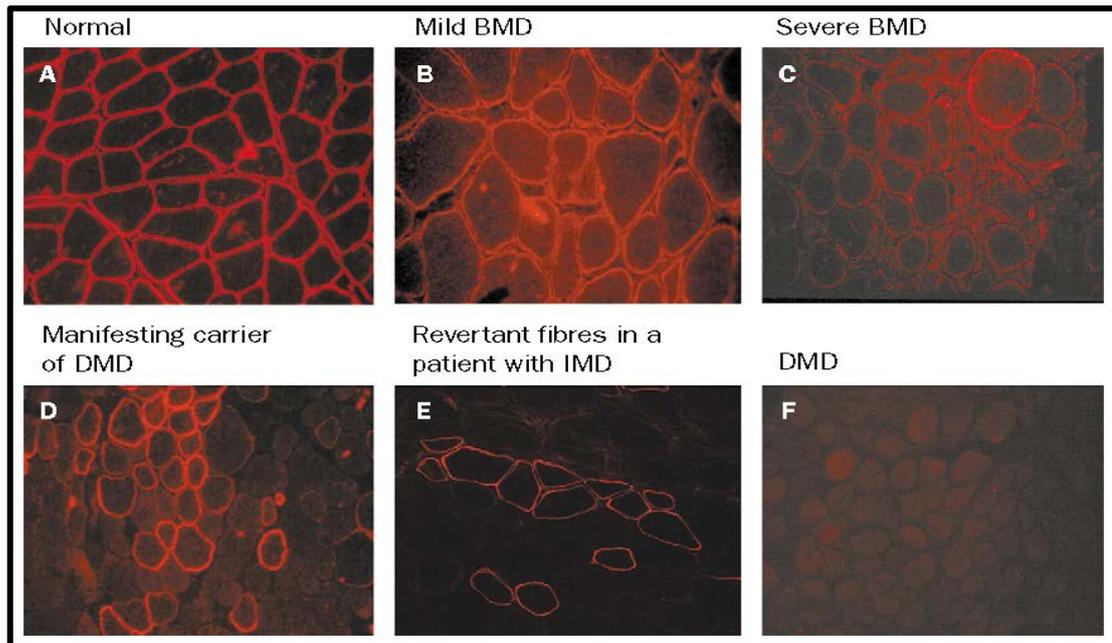
L'**aspect clinique** tient compte de l'âge de début, du mode d'installation aigu ou chronique, de la topographie de l'atteinte musculaire et de son mode d'évolution, ainsi que de l'existence de signes associés, qu'il s'agisse de rétractions tendineuses ou d'atteinte encéphalique, cardiaque ou oculaire.

L'**aspect anatomopathologique** amène à différencier les dystrophies avec nécrose-régénération et dégénérescence fibro-adipeuse comme la forme LGMD2C, appelée aussi SCARMMD (pour "*severe childhood autosomic recessive muscular dystrophy*"), et les CMD (pour "*congenital muscular dystrophy*"), des dystrophies sans caractères histologiques spécifiques autres qu'une désorganisation architecturale, des modifications de la répartition des différents types de fibres ou des centralisations nucléaires. En revanche, lorsque le défaut protéique est connu et qu'il s'agit d'une protéine de structure, l'utilisation d'anticorps spécifiques permet à l'immuno-histochimie d'apporter un caractère de reconnaissance indiscutable et une classification idéale en terme de déficit protéique [Muntoni *et al.*, 2003] (**Figure 5**).

L'**aspect génétique** permet une différenciation selon le mode d'hérédité : lié au chromosome X pour l'EDMD (pour "*Emery-Dreifuss muscular dystrophy*"), la DMD (pour "*Duchenne muscular dystrophy*") et la BMD (pour "*Becker muscular dystrophy*"), autosomique récessif pour les CMD (pour "*congenital muscular dystrophy*"), autosomique dominant pour la FSHD (pour "*facio-scapulo-humeral dystrophy*") et l'OPMD (pour "*oculo-pharyngeal muscular dystrophy*"), autosomique dominant ou récessif pour les LGMD (pour "*limb girdle muscular dystrophies*"). Actuellement les localisations chromosomiques sont définies pour un grand nombre de dystrophies musculaires comme le résume le **Tableau I**. Les études moléculaires, quand à elles, ont permis à ce jour de déterminer le gène en cause puis la protéine, ou la protéine puis le gène en cause, définissant des groupes homogènes dans lesquels des variations alléliques peuvent être présentes, avec pour conséquence des modifications de l'expression phénotypique autorisant toutefois une individualisation définitive comme pour les adhalinopathies primaires (SCARMMD1), les CMD mérosine-négatives, les LGMD2 avec déficit en calpaïne ou les DMD et BMD à transmission liée au chromosome X [Kaplan *et al.*, 1996; Emery, 2002; Petiot et Urtizbera, 2004].

#### IV. Dystrophinopathies

On désigne sous cette dénomination les dystrophies musculaires d'hérédité récessive liée au chromosome X en rapport avec une mutation dans le gène DMD codant pour la protéine dystrophine, protéine jouant un rôle primordial dans l'établissement d'un lien mécanique entre l'actine et l' $\alpha$ -dystroglycane et formant un pont entre la membrane basale et le cytosquelette interne, protégeant de ce fait les fibres musculaires contre les dommages entraînés par la contraction musculaire [Reitter et Goebel, 1996; Bougeon, 2008; Guis *et al.*, 2010]. Les formes classiques qui sont regroupés sous cette appellation sont les dystrophies musculaires de Duchenne (DMD) et de Becker (BMD), d'autres phénotypes étant plus rares.



**Figure 5.** Exemples d'études immunocytochimiques : dans un muscle normal (A), chez des patients BMD (B et C), chez une femme porteuse DMD (D), chez un individu de phénotype DMD/BMD intermédiaire (IMD) (E) et un malade DMD (F). Dans un muscle sain, la dystrophine est présente à la périphérie de chaque fibre musculaire; chez les patients BMD, elle est exprimée en faible quantité; chez une femme porteuse de la mutation, la dystrophine est présente en mosaïque; chez un patient atteint de DMD, le muscle ne présente aucune dystrophine [Muntoni *et al.*, 2003].

## IV.1. Dystrophie musculaire de Duchenne

### IV.1.1. Historique

La dystrophie musculaire de Duchenne a d'abord été caractérisée par William John Little et Edward Meyron, puis en 1861 par Guillaume Benjamin Amand Duchenne de Boulogne, d'où son appellation de maladie de Duchenne. Ce dernier attribua initialement à la maladie un désordre cérébral, en la nommant "paraplégie hypertrophique de l'enfance", pour se rendre compte en 1868 qu'elle était reliée aux muscles [Emery, 2002].

Plus tard en 1886, William Richard Gowers décrivit la manière avec laquelle les enfants atteints de la maladie se relevaient de la position couchée à la position debout, remarquant que pour se lever du sol, les enfants malades se servaient de leurs membres antérieurs car leurs membres postérieurs étaient trop faibles pour supporter leur corps. On attribua ensuite son nom à cette manœuvre [Jay et Vajsar, 2001].

Depuis, les découvertes se sont enchaînées : en 1982, le locus responsable de la maladie a été localisé sur le bras court du chromosome X, en Xp21 [Davies *et al.*, 1983; Murray *et al.*, 1982], puis en 1986, le gène responsable, *DMD*, a été identifié [Monaco *et al.*, 1986] et enfin, en 1987, la protéine codée par ce gène, la dystrophine, a été caractérisée [Hoffman *et al.*, 1987].

### IV.1.2. Caractéristiques et évolution de la maladie

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une dystrophie héréditaire très sévère qui se transmet selon un mode récessif lié au chromosome X, ce qui veut dire qu'elle touche majoritairement les garçons et que les mères de ces enfants atteints sont porteuses du gène de la maladie. L'incidence de la dystrophie musculaire de Duchenne est de 1/3.500 naissances vivantes, tandis qu'elle est de 1/30.000 pour celle de Becker. Ces incidences globales semblent identiques quelles que soient les populations étudiées [Emery, 1991; Emery, 1993; Emery, 2002; Blake *et al.*, 2002; Dalkilic et Kunkel, 2003; Leturcq et Kaplan, 2005; Bennett *et al.*, 2009; Romitti *et al.*, 2009].

La maladie a une évolution lente et se caractérise par une faiblesse progressive des muscles squelettiques et cardiaque. Les signes de la maladie apparaissent vers l'âge de 2 à 3 ans par des difficultés à se relever et à monter les marches. Une pseudo-hypertrophie est remarquée chez les malades, due à l'inflammation et à l'infiltration des muscles. Vers l'adolescence, la majorité des malades se trouvent obligés d'utiliser une chaise roulante pour se déplacer vu la grande perte de force au niveau des muscles du corps [Hoffman *et al.*, 1988; Reitter et Goebel, 1996; Tyler, 2003; Chakkalakal *et al.*, 2005].

La destruction musculaire progressive conduit par la suite à un affaiblissement des muscles respiratoires qui se complique par une insuffisance respiratoire et des infections

respiratoires à répétition. Le muscle cardiaque est également atteint dès l'âge de 7 ans. L'insuffisance cardiaque, avec les complications respiratoires constituent alors les principales causes de décès, issue qui survient généralement durant la deuxième décennie [Lankester *et al.*, 2007].

Les symptômes de la maladie de Duchenne sont dus à une augmentation de la fragilité des fibres musculaires et à leur faible capacité de régénération. En effet, chez les malades atteints de DMD, les myoblastes sont anormaux, moins nombreux et ont une capacité limitée de fusion [Biggar *et al.*, 2002]. Dans les cas avancés de la maladie, les muscles des malades contiennent très peu de fibres musculaires.

D'autres signes moins communs peuvent être observés, telle que l'atteinte des muscles lisses qui se traduit par un dysfonctionnement des appareils digestif et urinaire [Barohn *et al.*, 1988; Tubbs et Oakes, 2004].

Les malades atteints de DMD peuvent également présenter des retards mentaux (30% des patients comparativement à 9% dans la population générale). L'absence de dystrophine dans le cerveau semblerait alors être incriminée [Mehler, 2000].

La dystrophie musculaire de Duchenne a été rarement décrite chez les femmes, quoique des patientes atteintes du syndrome de Turner (XO) ou de Turner mosaïque (X/XX ou X/XX/XXX), ou possédant un chromosome X ayant une structure anormale ou une translocation autosomique affectant le chromosome X, puissent présenter la maladie [Boyd *et al.*, 1986; Zatz *et al.*, 1981]. L'inactivation du chromosome X normal survient également, ce qui peut entraîner l'expression de la dystrophine mutée codée par l'autre chromosome X [Ferrier *et al.*, 1965; Gomez *et al.*, 1977; Lesca *et al.*, 2003; Lescaut *et al.*, 2004].

#### **IV.1.3.Étiologie : Mutation du gène *DMD* et absence de dystrophine**

En 1886, Sir William Richard Gowers remarqua qu'il y avait des cas isolés de DMD, sans antécédent familial, la fréquence de ces cas étant toutefois moins élevée que les cas avec antécédents. De plus, il constata que pour les familles touchées, les cas déclarés l'étaient toujours du côté maternel.

Au début des années 1980, deux équipes de recherche démontrèrent que les patients affectés par la DMD avaient des altérations (translocations ou délétions) dans le chromosome X. À chaque fois, les erreurs chromosomiques survenaient dans la bande 1 de la région 2 du bras court (noté Xp21) [Francke *et al.*, 1985; Verellen-Dumoulin *et al.*, 1984]. Parallèlement, un autre groupe de recherche remarqua qu'il y avait des polymorphismes de séquence d'ADN dans la région Xp21 au sein des familles où la maladie survenait. Ainsi, des patients ne présentant aucune délétion ou translocation chromosomique pouvaient être touchés par la DMD [Davies *et al.*, 1983]. Les groupes de Kunkel et de Monaco isolèrent un ARN messager correspondant à un gène de la région Xp21 chez les patients atteints de DMD, où des délétions étaient fréquemment rencontrées [Kunkel *et al.*, 1985; Monaco *et al.*, 1986].

L'ARNm ainsi isolé avait une taille de 14 kilobases (kb) dont la séquence nucléotidique correspondante amena à la découverte de la dystrophine, protéine qui était jusqu'alors inconnue [Hoffman *et al.*, 1988]. Ainsi, la dystrophie musculaire de Duchenne se définit comme étant une maladie génétique héréditaire récessive consécutive à des altérations affectant le chromosome X dans la région Xp21. Ces altérations engendrent une absence d'expression de dystrophine au sein du tissu musculaire [Hoffman *et al.*, 1987].

#### **IV.2. Dystrophie musculaire de Becker**

La dystrophie musculaire de Becker (ou BMD pour "Becker Muscular Dystrophy")(MIM 300376) est, tout comme la dystrophie musculaire de Duchenne (ou DMD pour "Duchenne Muscular Dystrophy")(MIM 310200), une dystrophinopathie au sens protéique du terme. En effet, même si les manifestations cliniques de ces deux formes de dystrophie sont différentes, elles sont pourtant toutes les deux dues à des altérations moléculaires affectant un même gène, *DMD*, codant la même protéine dystrophine, une composante importante de la force musculaire. La dystrophie musculaire de Becker, contrairement à la dystrophie musculaire de Duchenne, est d'apparition plus tardive puisqu'elle débute après l'âge de 5 ans ou vers l'adolescence, voire à l'âge adulte, quoiqu'on considère généralement que la maladie survient durant les deuxièmes et troisièmes décades.

La dystrophie musculaire de Becker a en fait été décrite en 1955 par le neurologue allemand Peter Emile Becker qui avait alors attiré toute l'attention sur cette entité clinique qu'il rapportait comme une forme moins sévère de dystrophie musculaire. Tout comme la dystrophie musculaire de Duchenne, la dystrophie musculaire de Becker est transmise selon un mode de transmission récessif lié au chromosome X, qui fait que les femmes ne sont pas atteintes mais peuvent transmettre la maladie à leurs garçons, affectant ainsi en moyenne 1 sur 30.000 naissances vivantes parmi les garçons. La dystrophie musculaire de Becker, d'apparition plus tardive que celle de Duchenne, se manifeste par une perte progressive de la force des muscles des membres et du tronc. Au début, seuls les muscles des jambes sont atteints, puis ensuite les muscles des bras sont touchés. L'évolution de la maladie est lente et très variable, l'espérance de vie étant surtout tributaire des atteintes cardiaque et/ou respiratoire. Il faut tout de même noter que l'atteinte du myocarde dans la dystrophie musculaire de Becker est assez peu rencontrée et, lorsqu'elle se présente, ne se développe pas avant l'âge de 20 ans, contrairement à la dystrophie musculaire de Duchenne où l'atteinte du muscle cardiaque est quasi-systématiquement retrouvée dès un âge précoce (souvent dès 5-6 ans) [Moser, 1984; Mostacciuolo *et al.*, 1987; Emery, 1993; Lovering *et al.*, 2005].

## Chapitre III : Dystrophine

### I. Localisation, identification et clonage du gène *DMD*

Les principes de la génétique classique ont permis d'incriminer le chromosome X comme support de transmission de la dystrophie musculaire de Duchenne. Les progrès de la biologie moléculaire, notamment l'avènement de la génétique inverse ont alors facilité l'identification, la localisation et la caractérisation du gène responsable de cette myopathie.

La quête du gène responsable de la dystrophie musculaire de Duchenne a débuté véritablement dans les années 1970 [Greenstein *et al.*, 1977; Verellen-Dumoulin *et al.*, 1984]. Ainsi, l'observation exceptionnelle de filles atteintes avait facilité le positionnement du gène dans la bande 1 de la région 2 du bras court du chromosome X (région Xp21). Chez ces patientes, il y avait transfert d'un petit fragment d'autosome sur un chromosome X : le point de cassure à l'origine de cette translocation se retrouvait toujours dans la région Xp21 (**Figure 6**), laissant suggérer aux auteurs que le gène en cause se situait dans cette zone [Boyd et Buckle, 1986; Boyd *et al.*, 1986; Greenstein *et al.*, 1977; Verellen-Dumoulin *et al.*, 1984].

Plusieurs autres études ont alors confirmé la localisation du gène responsable de la dystrophie musculaire de Duchenne dans la région Xp21 [Murray *et al.*, 1982; Davies *et al.*, 1983; Boyd et Buckle, 1986]. L'analyse de fragments d'ADN isolés de la région Xp21 de malades dystrophiques a donc ensuite permis aussi l'identification des polymorphismes de séquence (RFLP pour "restriction fragment length polymorphism"). Les sondes génétiques polymorphes générées ont permis enfin de localiser dans la région Xp21 des mutations associées à la dystrophie musculaire de Duchenne. Ces sondes sont d'ailleurs utilisées pour le diagnostic prénatal de cette affection [Bakker *et al.*, 1985].

Dans les années quatre-vingt, furent isolés des segments d'ADN à l'intérieur du gène responsable de la dystrophie musculaire de Duchenne. La stratégie utilisée consistait à cloner les fragments d'un patient ayant une translocation à la région Xp21, fragments qui se situaient au niveau des points de cassures présents dans le gène ribosomal 28S du chromosome 21. Le clone de jonction XJ apparaissait alors comme étant génétiquement lié à la dystrophie musculaire de Duchenne et a servi à l'identification de délétions chez certains patients myopathes [Worton *et al.*, 1984; Ray *et al.*, 1985].

D'autre part, l'absence d'hybridation de sondes d'ADN complémentaires provenant de la région Xp21 d'un individu normal avec les segments d'ADN isolés d'un patient ayant une délétion de cette région facilita le clonage des séquences manquantes et détermina ainsi l'emplacement exact du gène muté chez les patients atteints de DMD [Kunkel *et al.*, 1985; Monaco *et al.*, 1986].

L'hybridation soustractive et le clonage positionnel ont ainsi permis l'identification d'un ARN messager de 14 kb dans les muscles squelettiques. La séquence nucléotidique de

cet ARNm correspondait à une protéine de 3685 acides aminés [Koenig *et al.*, 1988], protéine appelée dystrophine par Hoffman et Kunkel en 1987 [Hoffman *et al.*, 1987]. Cette protéine d'environ 427 kiloDaltons (Dp 427, Dp pour "Dystrophin product") était présente dans le muscle normal mais absente dans les muscles de patients souffrant de dystrophie musculaire de Duchenne et était présente en quantités anormales chez les malades atteints de dystrophie musculaire de Becker.

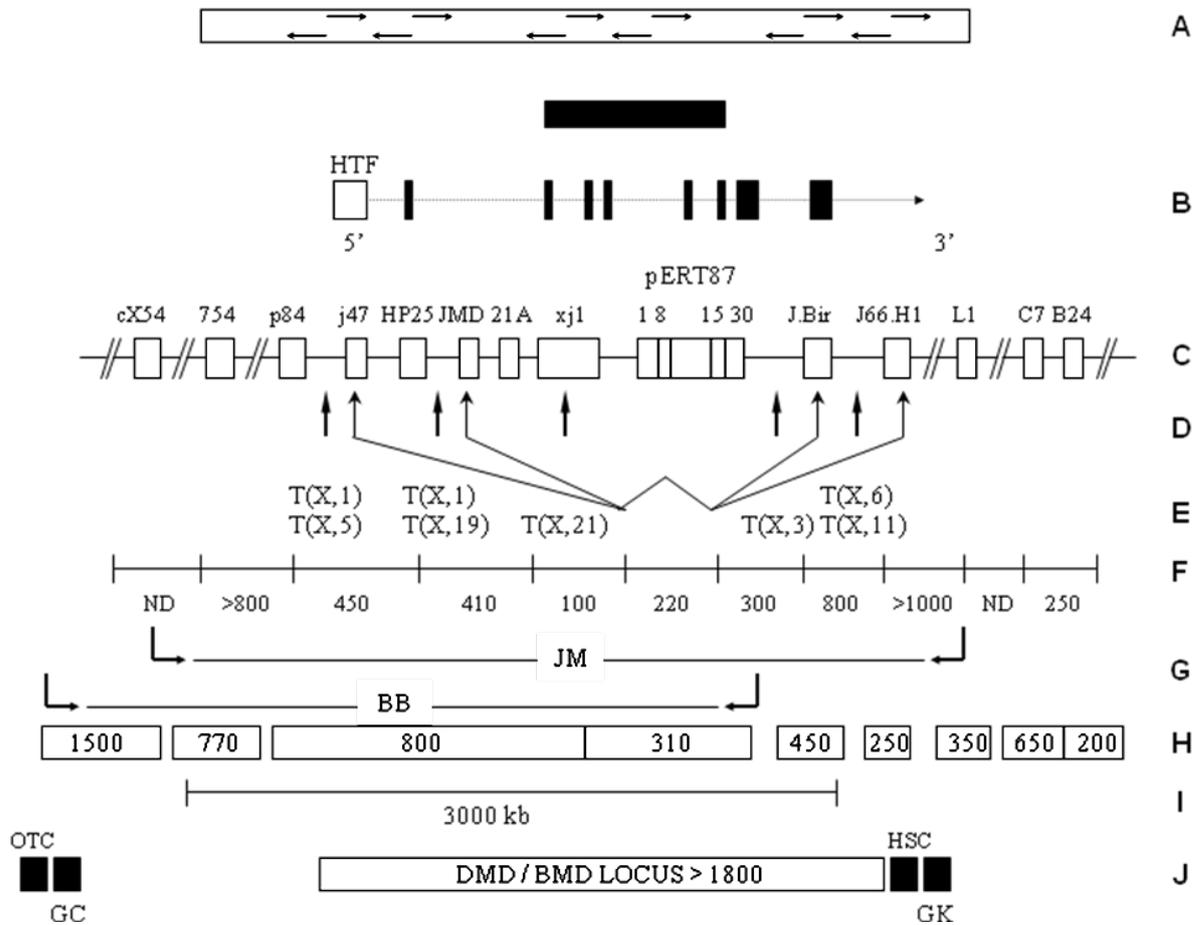
Le gène responsable de la dystrophie musculaire de Duchenne est le plus grand connu à ce jour, s'étendant sur une longueur de 2,4 Mégabases d'ADN, ce qui représente environ 1 % de la longueur totale du chromosome X. Il contient 79 exons séparés par de très longs introns qui couvrent 99% du gène, alors que 7 promoteurs différents ont pu être caractérisés. Ainsi, seulement 0,6 % du gène code pour un transcrit qui se retrouve dans le muscle cardiaque et dans les tissus musculaires squelettiques adultes et fœtaux [Chelly *et al.*, 1988]. Différentes isoformes de la dystrophine se retrouvent également dans certains neurones et plusieurs organes [Lidov *et al.*, 1995].

## II. Structure et localisation de la dystrophine

Le mot "dystrophine" doit son nom au fait que l'absence de cette protéine est spécifique de la dystrophie musculaire de Duchenne ou de Becker. Le terme de "dystrophie" issu du grec *dus*, *difficulté/manque* et de *trophe*, *nourriture*, introduit l'idée que cette forme de myopathie est due à un trouble de la nutrition des myofibrilles musculaires, idée pourtant erronée, quoique les appellations "dystrophie" et "dystrophine" n'aient jamais été remises en cause.

La dystrophine musculaire est une protéine sub-sarcolemmique localisée en dessous des membranes cellulaires et exprimée de manière constitutive dans les cellules musculaires lisses, striées et cardiaques, dans les cellules de Purkinje et de la rétine, ainsi que dans certains neurones. Sa structure et sa localisation ont été déduites de la séquence nucléotidique de l'ARNm de 14 kb qui est transcrit à partir du gène DMD [Leger *et al.*, 1991].

La dystrophine est une grosse protéine formée de l'enchaînement de 3685 acides aminés et a un poids moléculaire de 427 kDa, ce qui en fait l'une des plus grandes protéines connues. La dystrophine est hydrophile sur toute sa longueur, environ un tiers des acides aminés qui la composent étant chargés (soit Arg, Asp, Glu, His ou Lys) [Nguyen, 2001]. Elle a une longueur d'environ 175 nm [Pawlowicz, 2000] et a une forme allongée et articulée [Sadoulet-Puccio et Kunkel, 1996]. Elle est normalement présente dans le tissu musculaire strié squelettique, en position sous-sarcolemmale [Nguyen, 2001], dans les fibres musculaires striées cardiaques, les fibres musculaires lisses et dans certains neurones [Hoffman and Kunkel, 1991; Nguyen, 2001]. La dystrophine permet d'ancrer l'actine du cytosquelette à la laminine extra-cellulaire.

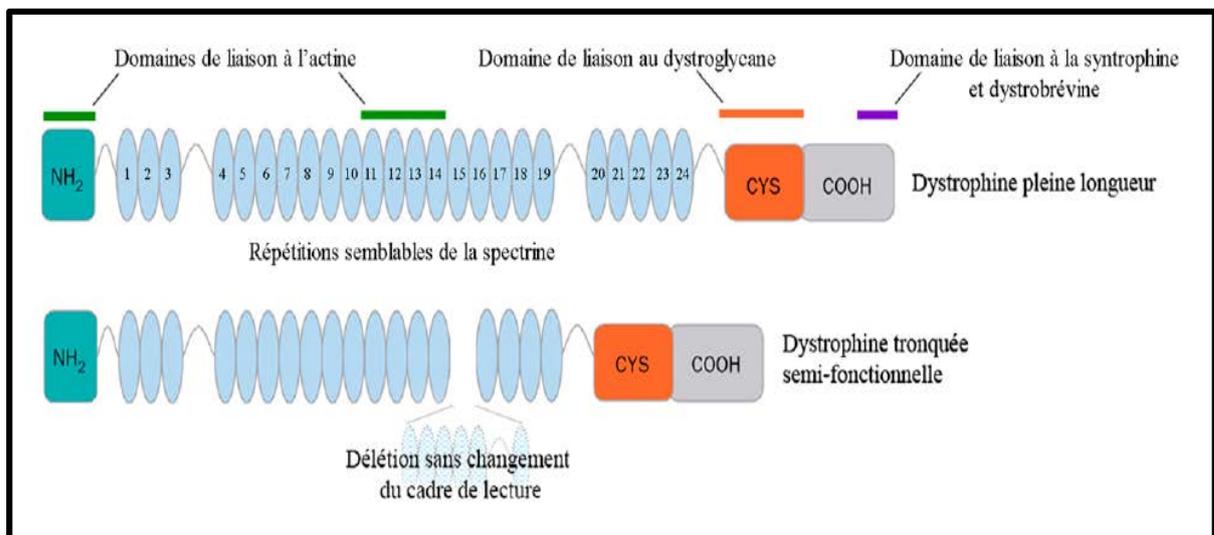


**Figure 6.** Représentation du locus DMD/BMD et des régions flanquantes. (A) Le rectangle indique la région touchée par les délétions observées dans les différents cas de DMD. Les flèches indiquent l'orientation centromérique ou telomérique des délétions, l'absence de séquence commune délétée et l'hétérogénéité des points de cassure des délétions. (B) Représentation de quelques séquences (exons) qui ont hybridé avec des clones d'ADNc obtenus à partir du transcrit de 16 kb repéré dans le muscle squelettique. La boîte HTF, riche en CGD (chronic granulomatous disease), non méthylés, a été localisée entre les sondes pERT87 et j.47. Les séquences HTF ont été retrouvées dans la région 5' de plusieurs gènes domestiques. L'extrémité 5' du gène *DMD* serait à proximité de cette région HTF. (C) Position des loci de la région Xp21 et des sondes correspondantes à chaque domaine. L'ordre des loci représenté par les sondes L1, C7 et B24 a été établi par l'analyse de délétions chez des patients atteints d'associations morbides. (D) Les loci j.47, j.MD, J.Bir et J66.H1 ont été clonés à partir de l'ADN de malades atteints de DMD avec délétions moléculaires. (E) Hétérogénéité et répartition des points de cassure. (F) Distances en kb. (G) Représentation des délétions identifiées chez JM (patient DMD+retard mental, avec délétion d'environ 4000 kb) et BB (patient DMD+granulomatose chronique+rétinite pigmentaire). (H) Ordre et taille des fragments de restriction *Sfi*I, répartis sur environ 5.000 kb de la bande Xp21. (I) Fragments de restriction *Not*I (3.000 kb). (J) Carte morbide de la région Xp21 et position relative des différents loci par rapport aux différentes sondes de la région [Gaschen *et al.*, 1992].

En dépit de son importance, la dystrophine ne représente que 0.002 % des protéines musculaires, soit 20 mg par kg de muscle où elle constitue toutefois plus de 5% du cytosquelette associé à la membrane [Wells, 2006].

La séquence de la dystrophine est relativement bien conservée entre les espèces (homme, rongeurs et poulets), particulièrement dans sa partie 3' [Franzini-Armsrong, 1994].

D'un point de vue structural, la dystrophine peut être décrite comme un arrangement de quatre modules différents (**Figure 7**) : un domaine N-terminal, un large domaine central en hélice comportant 24 répétitions semblables à la spectrine, un domaine riche en résidus cystéines et un domaine C-terminal [Leger *et al.*, 1991; Pasternak *et al.*, 1995].



**Figure 7.** Représentation structurale des quatre régions principales de la dystrophine : le domaine N-terminal (turquoise), le domaine central (bleu), le domaine riche en résidus cystéines (orange) et le domaine C-terminal (gris). Une mutation causant un phénotype Duchenne cause généralement une absence de protéine. Dans le cas d'une mutation causant un phénotype Becker, il y a production d'une dystrophine tronquée moins fonctionnelle [Muntoni *et al.*, 2003].

**Le domaine N-terminal** est composé de 336 acides aminés. Il possède une analogie de séquence et de fonction avec des protéines du cytosquelette : la  $\beta$ -spectrine et l' $\alpha$ -actinine. Ce domaine permet de lier la dystrophine avec l'actine, elle-même reliée au cytosquelette sous-jacent [Ahn et Kunkel, 1993; Desnuelle, 1994; Nguyen, 2001].

**Le domaine central** est composé de 2704 acides aminés, répartis en 24 séquences d'environ 109 acides aminés chacune. Il contient les quatre zones charnières non répétées, riches en résidus proline, conférant à la dystrophine sa flexibilité. En forme de bâtonnet d'une longueur de 125 à 175 nm, il possède des propriétés d'auto-association permettant à deux molécules de dystrophine de s'associer anti-parallèlement ou autorisant l'association de la dystrophine avec ses protéines homologues. Comme le domaine N-terminal, mais avec plus d'affinité, le domaine central lie la F-actine. Au sein de la quatrième zone charnière du domaine central, à cheval entre le domaine central et le domaine riche en cystéines, est présent un domaine nommé WW [Ahn et Kunkel, 1993; Desnuelle, 1994; Nguyen, 2001].

**Le troisième domaine**, riche en cystéines, est composé de plus de 325 acides aminés. Il possède deux sites potentiels de fixation au calcium (EF1 et EF2) et un site de fixation potentiel au zinc (le domaine ZZ) [Ahn et Kunkel, 1993; Nguyen, 2001]. Les domaines WW, ZZ, EF1 et EF2 constituent une région de la dystrophine liant le  $\beta$ -dystroglycane, une protéine transmembranaire de 43 kDa appartenant au complexe protéique associé à la dystrophine [Sadoulet-Puccio et Kunkel, 1996; Nguyen, 2001].

**Le domaine C-terminal** est composé de 320 acides aminés et contient le site de liaison à la dystrobrevine et aux syntrophines, protéines cytoplasmiques sous-sarcolemmales. Cette partie de la molécule interagit avec la membrane plasmique par l'intermédiaire d'une des "glycoprotéines associées à la dystrophine", le  $\beta$ -dystroglycane. Il contient également un site CC de fixation à l' $\alpha$  dystrobrevine [Sadoulet-Puccio et Kunkel, 1996; Nguyen, 2001].

### III. Isoformes de la dystrophine

Il existe deux types d'isoformes de la dystrophine : des isoformes longues de 427 kDa et des isoformes dites courtes, de tailles inférieures à 427 kDa.

#### III.1. Isoformes longues de 427 kDa

Quatre promoteurs tissus-spécifiques, situés à l'extrémité 5' du gène *DMD*, produisent un ARNm pleine longueur (14 kb) à l'origine de quatre isoformes de 427 kDa, dont la dystrophine musculaire (**Tableau II**) :

- Isoforme musculaire ou M-dystrophine (Dp427-M), issue du promoteur P<sub>M</sub> (M pour "muscle"), active principalement dans le muscle et faiblement dans les cellules gliales [Culligan *et al.*, 1998]. Le promoteur musculaire induit un haut niveau d'expression de la dystrophine dans les muscles squelettique, cardiaque et strié et plus faiblement dans les cellules gliales du cerveau.

**Tableau II.** Isoformes de la dystrophine [Blake *et al.*, 1999].

<i>Isoforme</i>	<i>Poids moléculaire (kDa)</i>	<i>Taille du transcrit (kb)</i>	<i>Exons du gène DMD</i>	<i>Promoteurs</i>	<i>Distribution tissulaire chez l'adulte</i>
<i>Isoformes longues</i>					
<i>M-dystrophine</i>	427	14	1-79	P <sub>M</sub>	Muscles (squelettique, cardiaque et lisse)
<i>B-dystrophine</i>				P <sub>B</sub>	Encéphale
<i>P-dystrophine</i>				P <sub>P</sub>	Cervelet
<i>L-dystrophine</i>				P <sub>L</sub>	Lymphocytes
<i>Isoformes courtes</i>					
<i>Dp 260</i>	260	10,5	30-79	Intron 29	Rétine
<i>Dp 140</i>	140	7,5	45-79	Dans intron 44 du gène <i>DMD</i>	Encéphale
<i>Dp 116</i>	116	5,2	56-79	Entre exons 55 et 56 du gène <i>DMD</i>	Système nerveux périphérique et cellules de Schwann
<i>Dp 71</i>	71	4,5	62-79	Entre exons 62 et 63 du gène <i>DMD</i>	Système nerveux central, foie, cœur, reins, poumons, pancréas, testicules et estomac
<i>Dp 45</i>	45	2,2		Entre exons 62 et 63 du gène <i>DMD</i>	Muscle, cerveau, foie et poumons

- Isoforme cérébrale ou C-dystrophine ou B-dystrophine (Dp427-B), issue du promoteur P<sub>B</sub> (B pour "brain"), active dans le cortex et les aires CA de l'hippocampe [Culligan *et al.*, 1998].

- Isoforme des cellules de Purkinje cérébelleuses ou P-dystrophine (Dp427-P), issue du promoteur P<sub>P</sub> (P pour "Purkinje cell") [Towbin, 1998]. Le promoteur P<sub>P</sub> s'exprime dans les cellules de Purkinje, mais également dans le muscle squelettique [Holder *et al.*, 1996].

- Isoforme lymphocytaire ou L-dystrophine (Dp427-L) [Culligan *et al.*, 1998].

Les séquences primaire de chacune des dystrophines présentent peu de différences, car le cadre de lecture n'est pas modifié lors de la transcription de ces différents ARNm. De ce fait, ces quatre formes longues de la dystrophine possèdent des extensions N-terminales uniques et diffèrent par leurs premiers exons [Gorecki *et al.*, 1992].

### III.2. Isoformes de plus faible poids moléculaire

L'expression du transcrite de la dystrophine Dp427, nommée ainsi en raison de sa masse moléculaire apparente de 427 kDa, est contrôlée par trois promoteurs indépendants tissus-spécifiques. De plus, l'activation de promoteurs internes, également tissus-spécifiques, en 3' du gène *DMD* entraîne la production de produits plus courts nommés Dp260, Dp140, Dp116, Dp71 et Dp45 (*Tableau II, Figures 8 et 9*).

Ces dystrophines, issues d'un même gène par activation d'un promoteur spécifique, ont une structure primaire identique [Ahn et Kunkel, 1993; Sadoulet-Puccio et Kunkel, 1996].

Ces différents produits ont d'abord été identifiés dans des types cellulaires ou des tissus particuliers, puis des travaux ultérieurs ont montré que leur expression était plus complexe, les différents transcrits du gène *DMD* s'exprimant à différents taux dans une large gamme de tissus (cerveau, muscles, intestin, foie, poumon, estomac, ...) [Tokarz *et al.*, 1998].

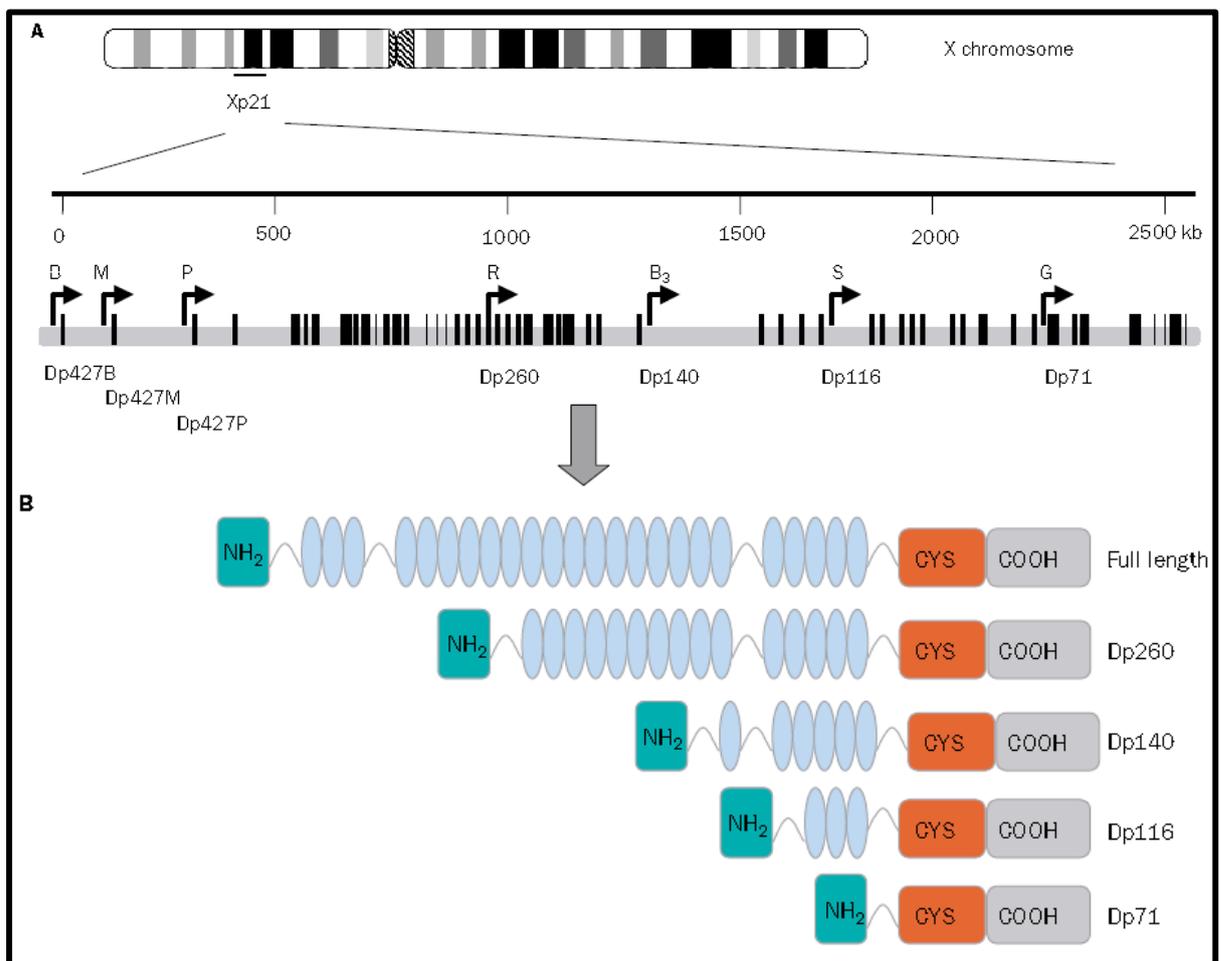
#### III.2.1.Dp260

Cette protéine de 260 kDa a été identifiée pour la première fois dans la rétine de souris où elle semble être impliquée dans la neurotransmission [D'Souza *et al.*, 1995]. Elle est issue d'un transcrite de 10.5 kb contenant un premier exon original épissé en phase avec l'exon 30 de la dystrophine [D'Souza *et al.*, 1995]. La séquence de la protéine Dp260 diffère de celle de la dystrophine par 13 nouveaux acides aminés N-terminaux hydrophiles spécifiques. Elle possède une grande partie du domaine central de la dystrophine (15 séquences répétées) et toute la partie C-terminale. Elle possède donc le site ABS4 et est capable de lier l'actine. L'ARNm de Dp260 est très fortement exprimé dans le cerveau, la rétine et les intestins, alors

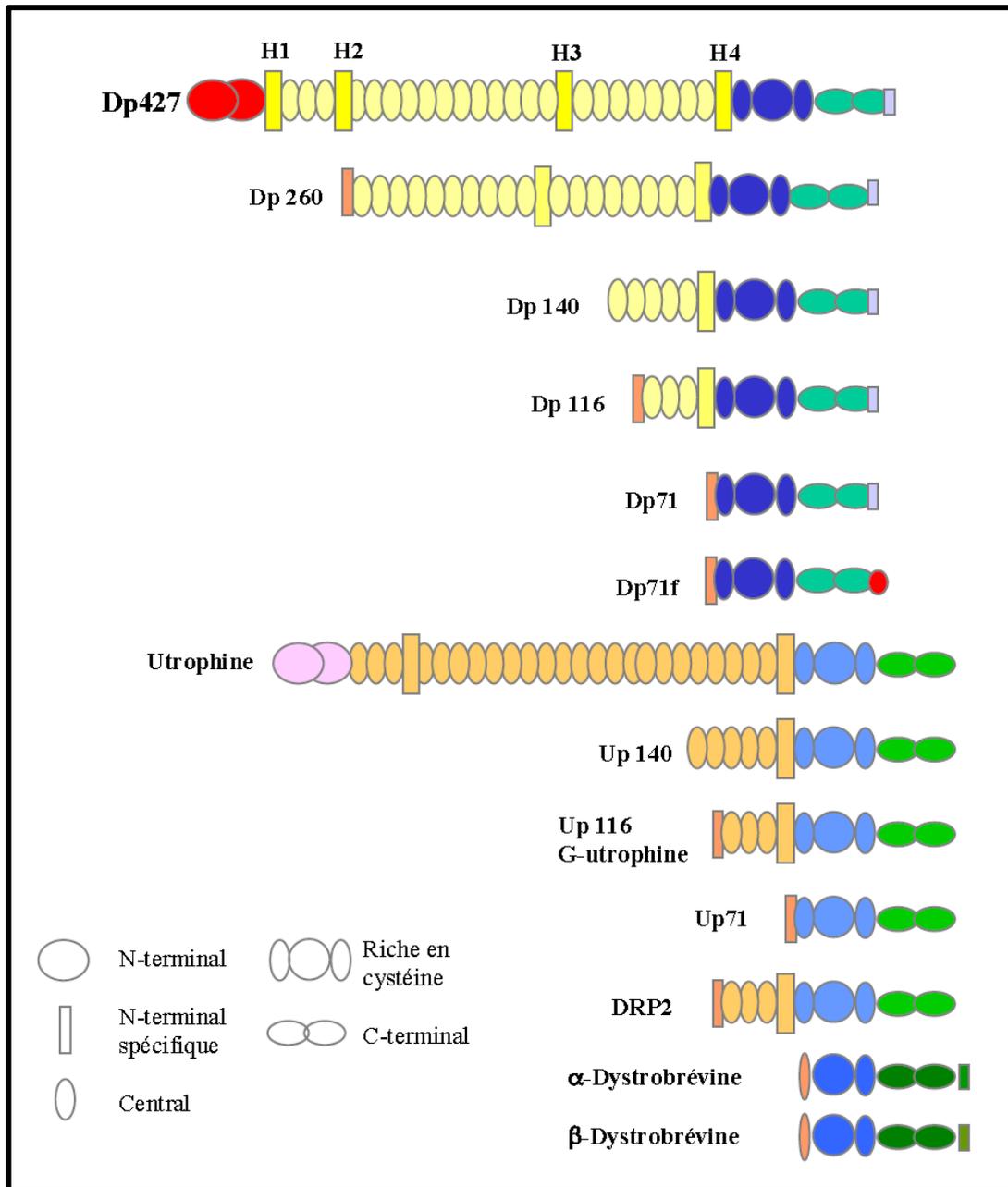
qu'il l'est nettement moins dans le foie, le muscle squelettique et le rein [D'Souza *et al.*, 1995; Tokarz *et al.*, 1998].

### III.2.2.Dp140

Cette protéine de 140 kDa est issue d'un transcrit de 7,5 kb généré par un promoteur situé en amont de l'exon 45 et exprimé à des taux variables dans différents tissus et suivant le développement [Durbeej *et al.*, 1997]. Le promoteur de ce transcrit est localisé dans l'intron 44 du gène *DMD* [Lidov *et al.*, 1995]. De plus, le site d'initiation de la traduction est localisé dans l'exon 51, correspondant à la troisième région charnière (H3) du domaine central, entre les répétitions 19 et 20. La protéine Dp140 possède ainsi une séquence identique à celle de la dystrophine (à partir de l'exon 51) et comprend les cinq derniers motifs répétés du domaine central de la dystrophine et la totalité de sa partie C-terminale.



**Figure 8.** (A) Localisation du gène *DMD* dans la région Xp21. Les lignes noires verticales représentent les 79 exons du gène. Les flèches noires indiquent les promoteurs : B, cerveau, M, muscle et P, Purkinje. R, B<sub>3</sub>, S et G sont les promoteurs de la Dp260, Dp140, Dp116 et Dp71, respectivement. (B) Structure de la dystrophine pleine longueur et de ses isoformes courtes [Muntoni *et al.*, 2003].



**Figure 9.** Comparaison de la structure des différentes protéines constituant la superfamille des dystrophines : la dystrophine et les produits courts du gène *DMD* (utrophines, DRP2 et dystrobrevines). H<sub>1</sub>-H<sub>4</sub>, zones charnières riches en proline [Muntoni *et al.*, 2003].

### III.2.3.Dp116

Elle est issue d'un ARNm de 5.2 kb, généré par un promoteur localisé environ 850 paires de bases en amont de l'exon 56 du gène *DMD* [Byers *et al.*, 1993]. Cette protéine possède 15 résidus N-terminaux spécifiques. Le cadre de lecture n'étant pas modifié, cette protéine présente, en plus de cette séquence N-terminale, l'ensemble de la partie distale de la dystrophine à partir de la séquence répétée 22 jusqu'au domaine C-terminal. L'expression du transcrite et de la protéine Dp116 a été rapportée dans le système nerveux périphérique et dans les cellules de Schwann en culture [Byers *et al.*, 1993]. Dans le système nerveux périphérique de l'homme et du rat, la protéine Dp116 a été localisée en fine couche autour des fibres nerveuses myélinisées [Matsumura *et al.*, 1993b].

### III.2.4.Dp71

Etant sous la dépendance d'un promoteur de type "housekeeping" situé dans l'intron 62 du gène *DMD*, l'expression de la protéine Dp71 est ubiquitaire [Lederfein *et al.*, 1993]. Cette protéine est codée par un ARNm de 4.5 kb dont le premier exon code pour une séquence protéique spécifique de 7 acides aminés N-terminaux [Lederfein *et al.*, 1992; Lederfein *et al.*, 1993]. Un domaine de liaison à l'actine, spécifique de la Dp71, a été localisé à ce niveau [Howard *et al.*, 1998b] lui conférant, tout comme pour la dystrophine, la capacité d'interagir avec l'actine. La protéine Dp71 est localisée près des filaments d'actine, respectivement dans les cellules musculaires et les cellules gliales rétinienne en culture [Howard *et al.*, 1998a; Claudepierre *et al.*, 2000].

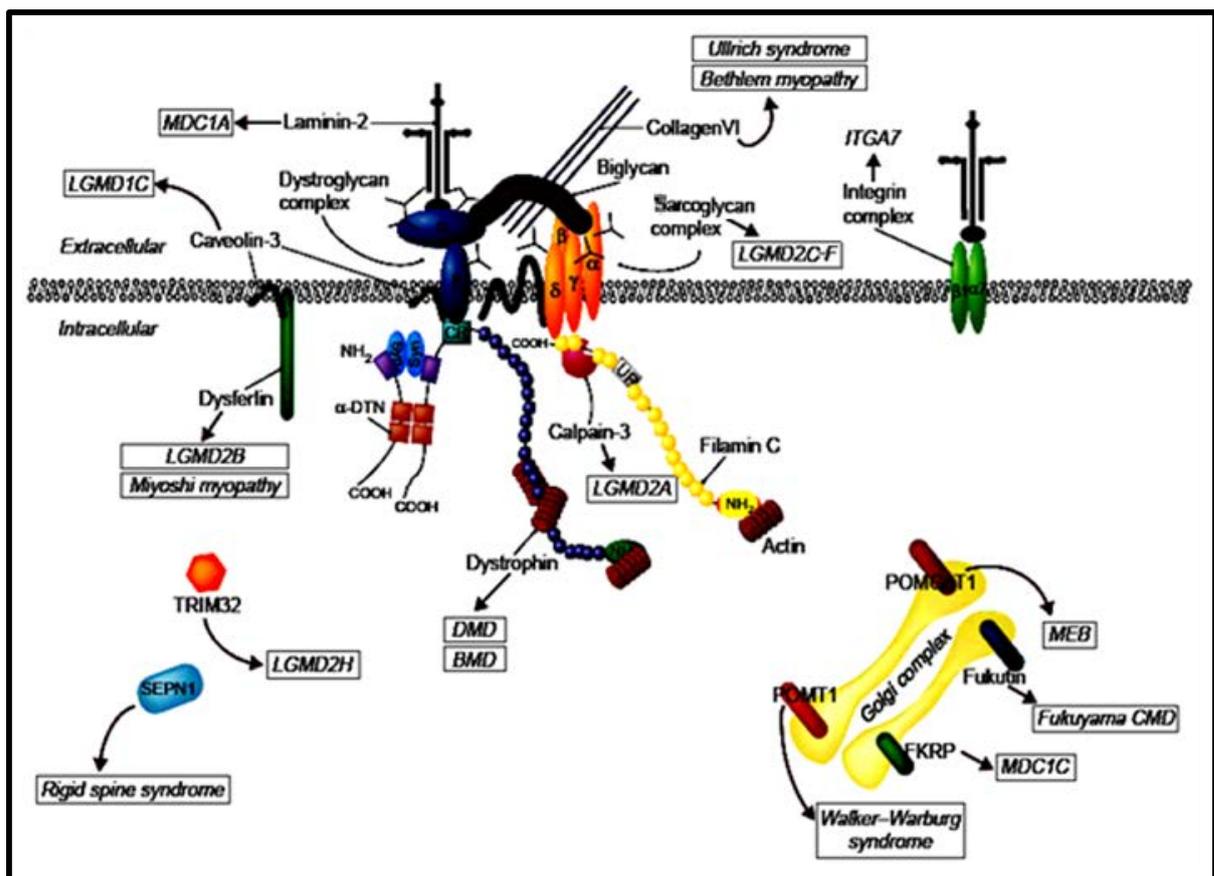
### III.2.5.Dp45

Ce produit a été mis en évidence suite au clonage et au séquençage d'un transcrite de 2.2 kb dont la traduction générerait à une protéine de 45 kDa. Ce transcrite a été identifié dans la plupart des tissus humains incluant le muscle, le cerveau, le foie et les poumons. Sa distribution ressemble à celle du transcrite de la protéine Dp71, à la différence qu'il s'exprime très tôt au cours du développement. En comparant la séquence nucléotidique avec celle de la dystrophine, la séquence protéique de la protéine Dp45, il semblerait qu'elle serait composée de la fin de la répétition 24, de la séquence riche en cystéines et des 48 premiers acides aminés du domaine C-terminal [Tinsley *et al.*, 1993].

## IV. Complexe glycoprotéique associé à la dystrophine (CGD)

Les protéines associées à la dystrophine (DAPs pour "Dystrophin Associated Proteins") interagissent entre elles pour constituer un complexe protéique dit d'échafaudage, qui traverse la membrane et lie le cytosquelette d'actine à la lame basale du muscle. Le complexe associé à la dystrophine compte 18 protéines : laminine- $\alpha 2$  (mérosine), dystroglycanes ( $\alpha$  et  $\beta$ ), sarcoglycanes ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  et  $\gamma$ ), sarcospane, dystrobrevine, syntrophines ( $\alpha 1$ ,  $\beta 1$  et  $\beta 2$ ), "nitric oxyde synthase" (NOs), MAST205 (pour "microtubule-associated serine/threonine kinase 205 kDa"), syncoiline, cavéoline-3 et protéine Grb2 (**Figure 10**).

Le lien serré entre la dystrophine et le complexe protéique qui lui est associé permet de relier les myofibrilles au sarcolemme et la matrice extracellulaire. Dans le cas de la dystrophie musculaire de Duchenne, les protéines du CGD ne se retrouvent ainsi plus localisées au sarcolemme en raison de l'absence de dystrophine [Ervasti *et al.*, 1990; Ohlendieck *et al.*, 1993].



**Figure 10.** Complexe dystrophine-glycoprotéines associées, montrant les différentes interactions entre partenaires protéiques qui le constituent, et les diverses affections qui leur sont associées (encadrées) [Dalkilic et Kunkel, 2003].

Cette délocalisation est également observée chez les souris mdx, le modèle murin de DMD [Ervasti *et al.*, 1990]. De plus, il faut également noter que des altérations affectant les gènes des autres protéines du CGD provoquent d'autres myopathies.

La laminine- $\alpha 2$ , protéine constituée de 3 hétérodimères : les chaînes  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , et reliée aux dystroglycanes, se situe entre le sarcolemme et la matrice extracellulaire. Son absence provoque une dystrophie musculaire congénitale [Ehrig *et al.*, 1990].

Les dystroglycanes comprennent deux protéines, l'une de 156 kDa ( $\alpha$ -dystroglycane) et l'autre de 43 kDa ( $\beta$ -dystroglycane) [Ervasti *et al.*, 1990]. L'unité  $\alpha$  se situe à l'extérieur du sarcolemme et permet la liaison avec la laminine, tandis que l'unité  $\beta$  se lie à la dystrophine en traversant la membrane plasmique [Smalheiser et Kim, 1995]. L'interaction directe entre la dystrophine et ces protéines provient de leur nature hautement glycosylée. En raison de leur expression ubiquitaire, des mutations causant une absence complète des dystroglycanes pourrait être létale [Michele et Campbell, 2003]. Par contre, certaines altérations peuvent causer une dystrophie des ceintures (une dystrophie apparaissant à l'âge adulte et qui affecte seulement les muscles des hanches et des épaules) [Salih *et al.*, 1996].

Six autres protéines se retrouvent au niveau du sarcolemme dont les sarcoglycanes et la sarcospane. Le complexe des sarcoglycanes est composé des sous unités  $\alpha$  (50 kDa),  $\beta$  (43 kDa),  $\delta$  (35 kDa),  $\epsilon$  (50 kDa) et  $\gamma$  (35 kDa). Ce complexe est joint aux dystroglycanes par association latérale, mais les sites de liaisons exacts restent encore à déterminer [Ozawa *et al.*, 1995]. Une déficience en  $\alpha$ -sarcoglycane est associée à une dystrophie musculaire autosomique récessive chez l'enfant [Matsumura *et al.*, 1992], dont les symptômes ressemblent d'ailleurs à ceux de la dystrophie musculaire de Duchenne et aussi à la dystrophie musculaire des ceintures de type 2D [Ben Hamida *et al.*, 1983]. Les autres protéines sarcoglycanes sont reliés à d'autres types de dystrophie musculaire des ceintures : type 2E ( $\beta$ -sarcoglycane), type 2C ( $\gamma$ -sarcoglycane) et type 2F ( $\delta$ -sarcoglycane) [Ozawa *et al.*, 1995]. La sarcospane est une protéine de 25 kDa, qui traverse quatre fois la membrane sarcoplasmique et qui contient une large partie extracellulaire [Crosbie *et al.*, 1997].

Au niveau du cytoplasme, sous la membrane plasmique, on retrouve les syntrophines, l' $\alpha$ -dystrobrevine, la MAST205 et finalement la NO synthase de type neuronal (nNOs). Les syntrophines ( $\alpha$ ,  $\beta 1$  et  $\beta 2$ ) possèdent toutes un poids moléculaire de 58 kDa, mais des points isoélectriques différents [Ahn et Kunkel, 1995]. Les trois formes de syntrophines se lient à la dystrophine *in vitro* et leur expression est diminuée en absence de dystrophine [Tachi *et al.*, 1997]. Par microscopie électronique, il a pu être montré que l' $\alpha$ -syntrophine se co-localisait avec la NOs, ce qui indique une interaction possible entre ces deux protéines [Wakayama *et al.*, 1997]. La nNOs est exprimée dans plusieurs types cellulaires dont les neurones, les muscles squelettiques, les cellules épithéliales et les cellules de la macula densa [Grozdanovic et Baumgarten, 1999], elle produit l'oxyde nitrique, servant de messenger modulant la force contractile [Kobzik *et al.*, 1994]. En absence de dystrophine, la nNOs se localise anormalement dans le cytoplasme et continue de produire de l'oxyde nitrique, ce qui pourrait ainsi contribuer à la pathologie chez les patients DMD.

L' $\alpha$ -dystrobrevine est une protéine homologue à la dystrophine. Elle co-précipite avec le récepteur de l'acétylcholine et avec le complexe associé à la dystrophine [Sadoulet-Puccio *et al.*, 1997]. Cette protéine se lie à la dystrophine par des structures hélicoïdales répétées et aux syntrophines par des sites de liaison aux syntrophines [Peters *et al.*, 1997]. La dystrobrevine est fortement réduite chez les patients DMD et chez des malades atteints de certaines dystrophies musculaires des ceintures liées aux sarcoglycanes [Puca *et al.*, 1998].

La protéine MAST205 a été récemment retrouvée associée au complexe de la dystrophine, démontrant qu'elle permettait le lien du complexe de la dystrophine aux microtubules, et ce via les domaines d'interaction PDZ entre MAST205 et les syntrophines [Lumeng *et al.*, 1999].

La syncoiline a été identifiée initialement par son interaction avec l' $\alpha$ -dystrobrevine [Newey *et al.*, 2001]. Cette protéine est fortement exprimée au niveau du sarcolemme, aux stries Z et aux jonctions neuromusculaires des muscles squelettiques, cardiaques et lisses. Son expression accrue dans certaines formes de dystrophies peut être due à un mécanisme compensatoire, puisqu'elle interagit avec la desmine, ce qui suggérerait un lien entre le CGD et le réseau de filaments intermédiaires [Poon *et al.*, 2002].

Enfin, la cavéoline-3 interagit avec la partie C-terminale du  $\beta$ -dystroglycane, et co-précipite avec la dystrophine et l' $\alpha$ -sarcoglycane. La cavéoline-3 est également surexprimée chez les patients DMD. Cette protéine a pour fonction de créer des invaginations vésiculaires de la membrane plasmique dans la plupart des cellules. Par contre, son rôle au niveau du CGD reste encore à éclaircir [Galbiati *et al.*, 2001].

La protéine Grb2 possède des domaines SH2 et SH3 ("Src homology domains"), interagissant avec des protéines importantes dans la transduction des signaux intracellulaires, domaines dont elle se servirait d'ailleurs pour se lier à ceux riches en proline du  $\beta$ -dystroglycane [Yang *et al.*, 1995].

## V. Rôle de la dystrophine et du complexe protéique qui lui est associé

Les fonctions exactes de la dystrophine ne sont toujours pas à l'heure actuelle totalement élucidées. Néanmoins, l'interaction de la dystrophine avec le complexe protéique qui lui est associé laisse présager de leurs rôle comme support pour la structure musculaire, et ce via la formation d'un pont entre le cytosquelette d'actine sarcoplasmique et la matrice extracellulaire [Ervasti et Campbell, 1991; Ervasti et Campbell, 1993].

L'absence de dystrophine se traduit donc par une disparition du complexe CGD au niveau du sarcolemme chez les patients DMD, résultat également observé dans le cas du modèle de souris dystrophique [Matsumura *et al.*, 1993a]. La rupture du lien entre l'intérieur et l'extérieur des fibres musculaires fragilise ainsi le sarcolemme et facilite la destruction des myotubes lors d'un effort physique. La membrane musculaire, ainsi fragilisée, ne résisterait

plus aux contraintes imposées par une contraction, et la fibre musculaire serait détruite, libérant les enzymes musculaires dans le sang. Il est tout à fait intéressant de noter que des mutations survenant dans les gènes codant pour les protéines du CGD sont en ce sens à l'origine de plusieurs types de dystrophies [Dalkilic et Kunkel, 2003]. En conséquence, il apparaît évident que la dystrophine et le complexe protéique qui lui est associé assurent un rôle crucial dans le maintien de l'intégrité des fibres musculaires en stabilisant le sarcolemme. Il semblerait ainsi que l'extrémité C-terminale de la dystrophine, liée au sarcolemme, y jouerait un rôle critique, comme la région de liaison à l'actine, tandis que la région centrale pourrait être partiellement délétée sans altérer complètement la fonction de la protéine [Koenig and Kunkel, 1990; Yoshida and Ozawa, 1990; Ervasti et Campbell, 1991; Rando, 2001].

En outre, la position de la dystrophine et du CGD au niveau membranaire laisse entrevoir une fonction de ce complexe dans la signalisation intracellulaire. A titre d'exemples, la liaison de l' $\alpha$ -sarcoglycane à la laminine extracellulaire peut induire le recrutement membranaire de molécules de signalisation telles que Rac1 [Oak *et al.*, 2003].

D'autres molécules des glycoprotéines associées à la dystrophine (ou DAP pour "Dystrophin-associated glycoproteins"), telles que Nos ou Grb2, peuvent également acheminer des signaux intracellulaires [Brenman *et al.*, 1995]. De ce fait, il semble que le complexe dystrophine-DAP puisse avoir une fonctionnalité importante autre que celle de soutien. La non-conduction de certains signaux cellulaires pourrait ainsi également contribuer partiellement au développement de la pathologie de la dystrophie musculaire de Duchenne.

Enfin, certaines études laissent suggérer que la dystrophine participerait au maintien de l'homéostasie du calcium. Chez les patients, aussi bien que chez les souris dystrophiques, la concentration de calcium intracellulaire est en effet anormalement élevée [Turner *et al.*, 1991]. Par ailleurs, la culture de myotubes de patients DMD ou de souris dystrophiques a aussi révélé une augmentation de l'activité des canaux calciques affectant la perméabilité du sarcolemme [Vandebrouck *et al.*, 2002].

La perte de l'homéostasie du calcium pourrait donc être une des causes impliquées dans l'augmentation du statut inflammatoire des muscles des patients DMD [Ervasti et Campbell, 1991; Rando, 2001; Porter *et al.*, 2002; Porter *et al.*, 2003]. Cependant, il reste encore beaucoup d'investigations à conduire pour comprendre l'ensemble des mécanismes qui sont effectivement impliqués.

## **VI. Protéines homologues de la dystrophine (ou DRP pour "Dystrophin-Related Proteins")**

Plusieurs protéines codées à partir de gènes distincts du gène DMD présentent des homologies de séquences plus ou moins grandes avec la dystrophine, suggérant l'existence d'un gène ancestral commun.

## VI.1. Utrophine

L'utrophine ou protéine DRP1 (Dystrophin-Related Protein 1) est une protéine de 395 kDa, est constituée de 3433 acides aminés et est traduite à partir d'un transcrit de 13 kb exprimé du UTRN localisé sur le chromosome 6 chez l'homme (10 chez la souris). La structure primaire prédite possède une forte homologie de séquence avec celle de la dystrophine à travers toute sa longueur, et plus spécifiquement à 80% pour les régions N- et C-terminale [Tinsley *et al.*, 1992] (**Figure 9**).

Comme la dystrophine, l'utrophine est capable de lier des membres du complexe des glycoprotéines associées à la dystrophine telles que les dystroglycane, les sarcoglycane, les syntrophines et l' $\alpha$ -dystrobrevine, et ce via ses domaines riches en cystéines et C-terminal. L'utrophine est aussi capable d'interagir directement avec la F-actine et indirectement avec les protéines associées aux synapses comme la rapsyne et l'agrine, par l'intermédiaire du complexe dystroglycane [Bartoli *et al.*, 2001].

Au cours du développement, l'utrophine se trouve localisée dans le sarcolemme, alors que son expression se restreint ensuite aux jonctions neuromusculaires et myotendineuses chez l'adulte. L'utrophine est présente dans de nombreux tissus [Love *et al.*, 1993]. Elle est largement exprimée dans les muscles squelettiques, cardiaques [Pons *et al.*, 1994] et lisses [Nguyen, 2001], mais aussi par exemple dans les cellules endothéliales vasculaires et les cellules gliales de la rétine [Claudepierre *et al.*, 2000], les cellules de Schwann des nerfs périphériques [Matsumura *et al.*, 1993a] et certains types cellulaires du rein [Loh *et al.*, 2001; Raats *et al.*, 2000].

## VI.2. Protéine DRP2

Cette protéine est codée par le gène *DRP2* localisé en Xp22 et a une taille et une composition similaire à la dystrophine Dp116 [Byers *et al.*, 1993]. Elle est exprimée dans le cerveau [Roberts et Sheng, 2000], au niveau de la rétine, des reins, des dents, de l'œsophage ou encore des ovaires [Dixon *et al.*, 1997].

Sa séquence protéique comporte un domaine N-terminal riche en prolines, deux répétitions du domaine central de la dystrophine, et des sites de liaison aux  $\beta$ -dystroglycane, syntrophine et dystrobrevine (**Figure 9**). Il est donc probable que la protéine DRP2 ait des fonctions similaires à celles de la dystrophine.

## VI.3. Dystrobrevines

Cette famille de protéines est codée par deux gènes différents, le gène de l' $\alpha$ -dystrobrevine et celui de la  $\beta$ -dystrobrevine, présentant des homologies de séquences avec le domaine C-terminal de la dystrophine [Wagner *et al.*, 1993] (**Figure 9**).

Le gène *DTNA* codant l' $\alpha$ -dystrobrevine est localisé sur le chromosome 18 chez l'homme et la souris [Sadoulet-Puccio *et al.*, 1997]. La complexité des isoformes de l' $\alpha$ -dystrobrevine se reflète par l'existence de trois promoteurs, révélant de multiples transcrits (six isoformes nommées  $\alpha$ -dystrobrevine 1, 2a, 2b, 3, 4 et 5, issues d'épissages alternatifs tissus-sélectifs) [Ambrose *et al.*, 1997]. Ces ARNm sont exprimés dans le muscle squelettique, le cœur, le cerveau et le foie chez la souris, aussi bien que chez l'homme. L' $\alpha$ -dystrobrevine possède des domaines riches en cystéine (poignées EF) contenant deux motifs capables de lier le calcium, un domaine en doigt de zinc (ZZ) pouvant lier la calmoduline, un domaine de liaison aux syntrophines suivi d'un domaine contenant deux hélices  $\alpha$  (H1 et H2). La partie C-terminale de l' $\alpha$ -dystrobrevine est spécifique et baptisée DUR (pour "Dystrobrevin Unique Region"), et contient quatre sites de phosphorylation [Balasubramanian *et al.*, 1998].

La  $\beta$ -dystrobrevine qui est codée par le gène *DTNB* localisé chez l'homme sur le chromosome 2 (12 chez la souris) présente de nombreux épissages alternatifs en C-terminal [Peters *et al.*, 1997]. D'un poids moléculaire de 69 kDa, la séquence protéique de la  $\beta$ -dystrobrevine comprend une séquence EF, un domaine d'interaction protéine-protéine ZZ avant la région C-terminale qui apparaît tronquée par rapport à l' $\alpha$ -dystrobrevine (90 acides aminés au lieu de 180 chez l' $\alpha$ -dystrobrevine 1 par exemple) [Peters *et al.*, 1997]. La  $\beta$ -dystrobrevine est essentiellement détectée dans le cerveau ainsi que dans les poumons, le foie et les reins, mais est absente des tissus musculaires contrairement à l' $\alpha$ -dystrobrevine. La  $\beta$ -dystrobrevine est capable de s'associer directement à la dystrophine et aux produits courts du gène *DMD*, comme les protéines Dp140 et Dp71, ainsi qu'avec les syntrophines [Ahn et Kunkel, 1995; Sadoulet-Puccio *et al.*, 1997].

## VII. Principaux types de mutation

Les dystrophinopathies de Duchenne et de Becker sont dues à des mutations qui conduisent à des défauts quantitatifs et/ou qualitatifs de l'expression de la dystrophine. La grande taille du gène *DMD* contribue significativement au taux élevé de mutations spontanées ou *de novo* (estimée à 1 pour 10.000 gamètes). Ces mutations consistent en de grandes délétions (60-70%) et duplications d'un ou plusieurs exons (10-20 %) ou de petites altérations de séquence (20-30%, dont environ 40% sont des mutations non-sens) [Koenig *et al.*, 1989; Dalkilic et Kunkel, 2003; Bérout *et al.*, 2005; Leturcq et Kaplan, 2005; Aartsma-Rus *et al.*, 2006; Tuffery-Giraud *et al.*, 2009].

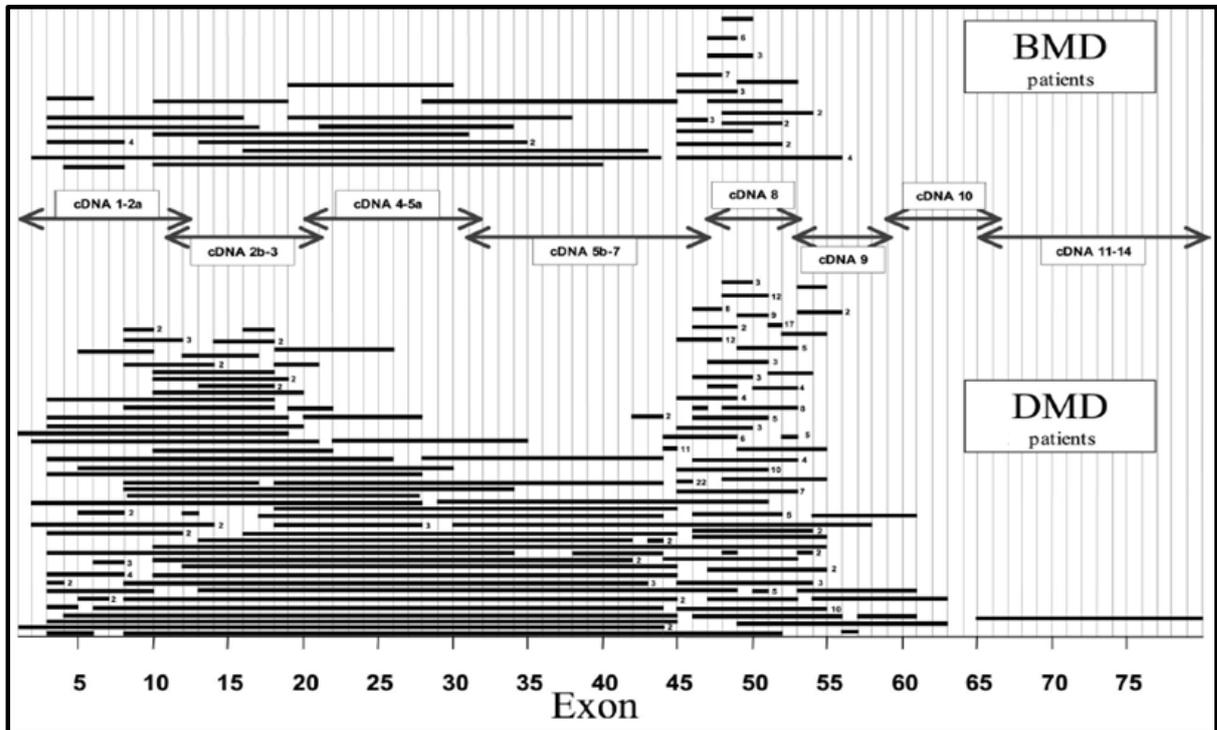
### VII.1. Grandes délétions intragéniques

Les grandes délétions au niveau du gène de la dystrophine sont responsables de la manifestation du phénotype dystrophique chez 65% des patients atteints de dystrophie musculaire de Duchenne et chez 85% des patients atteints de celle de Becker. La taille de ces délétions varie de 6 à 2000 kb [Baumbach *et al.*, 1989], pouvant se situer tout le long du gène, quoiqu'il existe deux points chauds ("hot spots" mutationnels dénommés également HFDRs (pour "high-frequency deletion regions" ou régions délétées à haute fréquence) : un dans la

partie centrale du gène (70%) entre les exons 45 et 55 avec un point de cassure dans l'intron 44 (site P20), et l'autre dans la partie proximale en 5' (30%) entre les exons 2 et 19 avec des points de cassure fréquents dans l'intron 7 (site Xj) (**Figure 11**). L'intron 44, qui a une taille de 160-180 kb, semble être un site de cassure dans environ 30% de toutes les délétions affectant le gène *DMD*, l'intron 43 en amont faisant partie d'un élément "transposon-like" qui pourrait expliquer partiellement cette haute fréquence de recombinaison [Forrest *et al.*, 1987; Liechti-Gallati *et al.*, 1987; Read *et al.*, 1988; Baumbach *et al.*, 1989; Koenig *et al.*, 1989; Pizzuti *et al.*, 1992; Leturcq et Kaplan, 2005; Oshima *et al.*, 2009].

Des études familiales de cas de dystrophie musculaire de Duchenne avec délétions ont révélé que l'événement délétionnel peut se produire aussi bien dans les gamètes maternels que paternels [Chelly et Kaplan, 1988]. La cause des délétions pourrait être un crossing-over inégal entre chromatides homologues, lors de la première division méiotique de la gamétogénèse femelle; Par contre, dans les gamètes mâles, les mutations impliqueraient des mécanismes d'échanges intra- ou inter-chromosomiques non homologues [Oshima *et al.*, 2009].

La fréquence de néo-mutations dans le gène de la dystrophine reste 100 fois plus élevée que celle normalement rencontrée dans la majorité des gènes de l'organisme. Etant donné que la longueur des séquences codantes du gène de la dystrophine n'excède que de 5 à 10 fois celle d'un gène moyen, ce taux de mutation élevé ne peut être expliqué que par la taille exceptionnellement gigantesque du gène. Ce phénomène peut davantage s'expliquer par l'architecture du gène qui présente un morcellement de séquences exoniques et une répétition d'exons dans le domaine central de la dystrophine. Un mauvais épissage des séquences introniques pourrait alors engendrer des transcrits différents qui produiront une protéine non fonctionnelle [Leturcq et Kaplan, 2005; Oshima *et al.*, 2009].



**Figure 11.** Distribution des délétions dans le gène de la dystrophine chez des patients DMD et BMD. Chaque barre représente une délétion observée chez un patient. Le nombre à droite de la barre de délétion indique le nombre de patients indépendants portant des délétions du même exon. L'analyse a été réalisée par Southern blotting et PCR multiplexe. Les flèches indiquent les sondes cDNA utilisées pour le Southern blotting [Prior et Bridgeman, 2005].

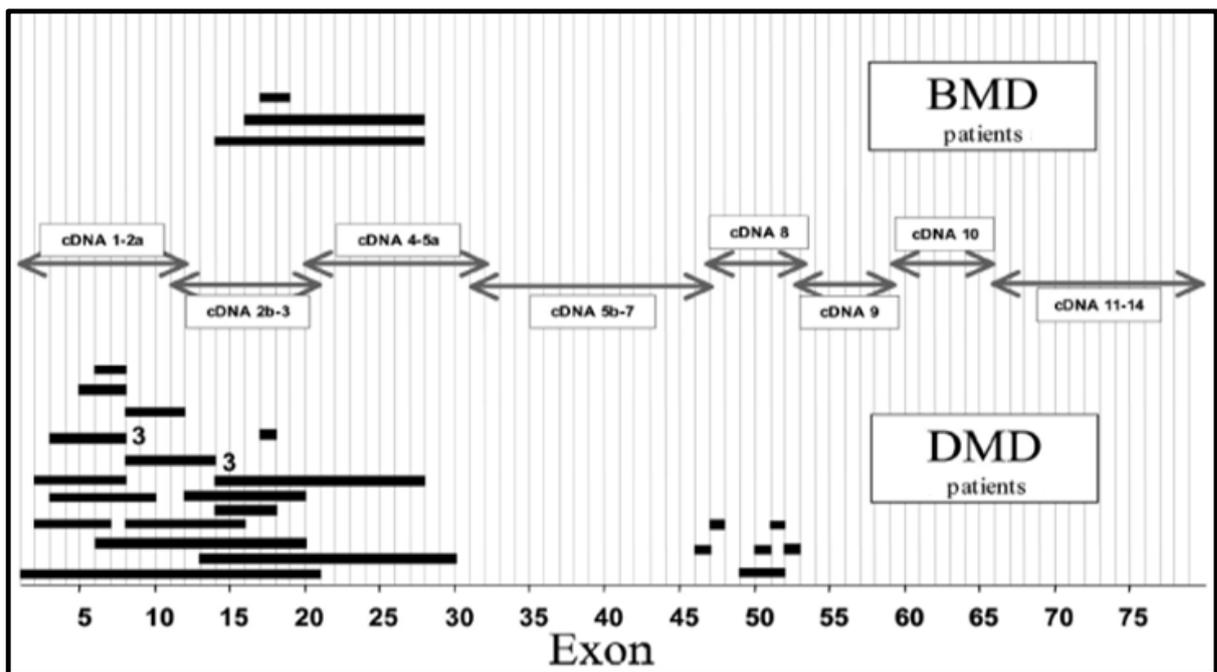
## VII.2. Duplications partielles

Les duplications partielles du gène *DMD* sont responsables de 6-7% des mutations qui provoquent une dystrophie musculaire de Duchenne ou de Becker, plus précisément de 5% à 10% chez les patients DMD et de 5 à 19% pour les patients BMD. Près d'un tiers des mutations affectant le gène *DMD* et se comportant comme des exceptions à la règle du cadre de lecture sont des duplications, quoique la fréquence de duplication soit plus élevée à l'extrémité 5' du gène (80% contre 20% dans la région centrale), notamment la duplication de l'exon 2, altération la plus communément identifiée [Bettecken et Muller, 1989; Hu *et al.*, 1990; Hu et Worton, 1992; Aartsma-Rus *et al.*, 2006; Prior et Bridgeman, 2005; White *et al.*, 2006] (**Figure 12**). L'analyse des sites de jonction dupliqués chez un grand nombre de patients laisse suggérer que ces duplications pourraient être provoquées par des recombinaisons entre séquences *Alu* ou entre des séquences pourtant non parfaitement homologues, et ce en raison de la grande taille du gène *DMD* [Hu *et al.*, 1990; Hu et Worton, 1992].

## VII.3. Mutations ponctuelles

Des mutations ponctuelles de tous types affectent l'ensemble du gène *DMD*, pouvant représenter une grande part des altérations affectant ce gène (de 5 à 20%) et générant aussi bien un arrêt de traduction prématuré de la protéine (mutations non-sens, majoritaires), que des substitutions d'acides aminés (mutations faux-sens, beaucoup plus rares), ou des mutations d'épissage (encore plus rarement décrites). Ces mutations ponctuelles altérant le gène *DMD* causent aussi bien une dystrophie musculaire de Duchenne ou de Becker, toujours selon le même raisonnement lié à la perte ou la maintien du cadre de lecture de la traduction [Hu *et al.*, 1990; Bulman *et al.*, 1991; Matsuo *et al.*, 1991; Kilimann *et al.*, 1992; Roberts *et al.*, 1992; Bushby *et al.*, 1993; Roberts *et al.*, 1994; Leturcq et Kaplan, 2005; Deburgrave *et al.*, 2007].

En raison de la taille très importante du gène, ces mutations restent cependant les plus difficiles à diagnostiquer. En effet, plusieurs raisons font cependant que la recherche directe de mutations chez les patients ne présentant pas de grandes délétions est décourageante: (i) il n'y a apparemment pas de hot-spots mutationnels ou de mutations récurrentes, (ii) l'utilisation d'ADN génomique nécessiterait d'amplifier spécifiquement les 79 exons de la dystrophine chez chaque patient, (iii) l'utilisation de l'ARN réduirait le nombre de réactions PCR nécessaires, mais est plus difficile à manipuler, (iv) les techniques classiques d'identification de mutations (analyses d'hétéroduplex, HA, et single strand conformation polymorphism, SSCP) ont un degré de sensibilité relativement moyen, (v) le gène de la dystrophine possède des centaines de polymorphismes, (vi) le test de troncation protéique (PTT pour "protein truncation test") est sensible mais techniquement lourd à mettre en œuvre [Tubiello *et al.*, 1995].



**Figure 12.** Distribution des duplications dans le gène de la dystrophine chez des patients DMD et BMD. Chaque barre représente une duplication observée chez un patient. Le nombre à droite de la barre de duplication indique le nombre de patients indépendants portant des duplications du même exon. L'analyse a été réalisée par Southern blotting. Les flèches indiquent les sondes cDNA utilisées pour le Southern blotting [Prior et Bridgeman, 2005].

#### VII.4. Mosaïcismes gonadique et somatique

Les mosaïcismes gonadique et somatique, bien que très rares, ont déjà été décrits chez des patients ayant hérité de leur mère plusieurs chromosomes X distincts suite à une délétion post-zygotique, générant ainsi un mosaïcisme germinale, ou chez des filles hétérozygotes porteuses d'une mutation sur l'un de leurs chromosomes X qui, par le fait du phénomène d'inactivation de l'autre chromosome X, l'exprimait, montrant un phénotype de dystrophie musculaire [Bakker *et al.*, 1987; Wood et McGillivray, 1988; Richards *et al.*, 1990].

On considère que les mutations qui touchent le gène de la dystrophine affectent différemment l'expression de la protéine. Une forme tronquée de la dystrophine serait synthétisée chez les patients souffrant de la dystrophie musculaire de Becker, une forme moins sévère de dystrophie musculaire, alors que chez les patients atteints de dystrophie musculaire de Duchenne, aucun transcrite n'est détecté. La gravité des différentes formes de dystrophies musculaires serait donc liée soit à la nature des exons affectés, soit à l'effet des mutations sur la transcription et la maturation de l'ARNm.

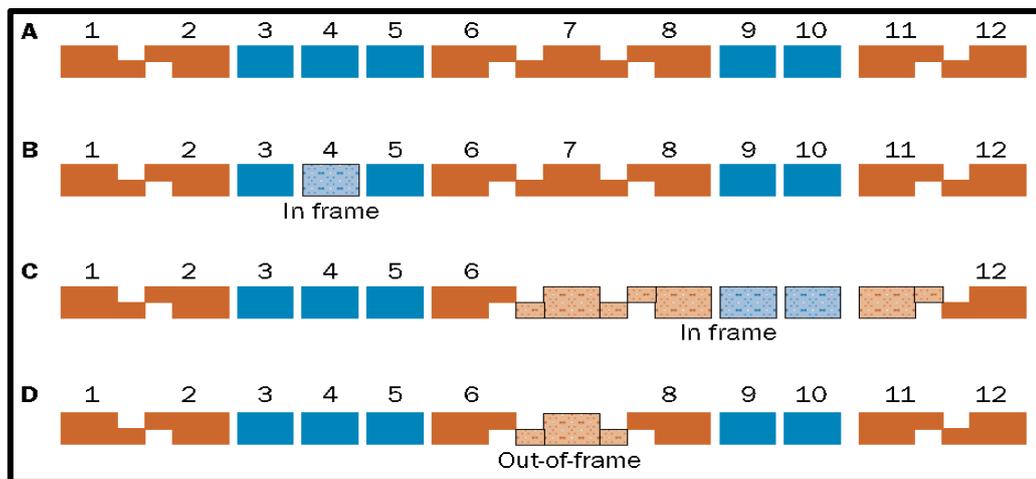
#### VIII. Corrélations entre génotype et phénotype dans les dystrophinopathies

Les premières corrélations génotype/phénotype ont été recherchées dès que les premières délétions ont été identifiées. Mais, à cette époque, la sévérité du phénotype ne pouvait être expliquée ni par la localisation de la délétion, ni par sa taille [Reitter et Goebel, 1996; O'Brien et Kunkle, 2001]. Cet apparent paradoxe a alors pu être expliqué par une analyse détaillée du gène. Une série d'analyses moléculaires et phénotypiques ont été menées chez les sujets atteints de DMD afin d'essayer d'établir une corrélation entre les délétions produites dans le gène *DMD* et leurs conséquences phénotypiques (**Tableau III**). La résultante de ces analyses a permis d'édicter la "règle de Monaco", expliquant la sévérité variable des dystrophinopathies en fonction du siège de la délétion et non de sa taille : soit la délétion respectait le cadre de lecture et la protéine était produite de façon incomplète ou alors en quantité insuffisante; soit la délétion décalait le cadre de lecture, entraînant dans ce cas l'absence de production de dystrophine (**Figure 13**). La règle de Monaco se vérifiait alors dans plus de 95% des cas [Monaco *et al.*, 1988].

L'absence complète de la protéine musculaire conduit ainsi à un phénotype de dystrophie musculaire de Duchenne, alors que la présence de dystrophine en quantité insuffisante ou tronquée produit des formes intermédiaires ou la variante de dystrophie musculaire de Becker.

**Tableau III.** Corrélation entre quantité résiduelle de dystrophine et phénotype clinique. DMD, dystrophie musculaire de Duchenne; BMD, dystrophie musculaire de Becker; IHC, immunohistochimie [Nicholson *et al.*, 1993].

Groupe	Clinique	Quantité et taille de dystrophine (Western blot)	Immunohistochimie (fibres musculaires)	Cadre de lecture (région du gène)
1	DMD sévère	0 < Quantité < 10% Taille normale	0 ou fibres révertantes < 1%	Décalé
2	DMD modérée	0 < Quantité < 20% Taille normale	IHC < 50% Quelques fibres révertantes	Décalé
3	Forme intermédiaire	20 < Quantité < 30% Taille normale ou diminuée	50 < IHC < 90% Fibres regroupées	Décalé ou conservé
4	BMD sévère	30 < Quantité < 65% Taille normale ou diminuée	60 < IHC < 90%	Conservé (N-terminale)
5	BMD classique	65 < Quantité < 80% Taille normale ou diminuée	IHC 100% irrégulière	Conservé (distale)
6	Forme bénigne	70 < Quantité < 100% Taille diminuée	IHC normale	Conservé (proximale)



**Figure 13.** Effet des délétions sur le gène *DMD*. (A) Exons 1 à 12 du gène *DMD*. (B) Conservation du cadre de lecture suite à une délétion de l'exon 4. (C) Délétion des exons 7 à 11 maintenant le cadre de lecture dans le gène *DMD*. (D) Délétion de l'exon 7 décalant le cadre de lecture dans le gène *DMD* [Muntoni *et al.*, 2003].

## Chapitre IV : Modèles animaux et approches thérapeutiques

### I. Modèles animaux

Les cas connus de déficits en dystrophine se limitent seulement à quelques espèces animales. Ainsi, à titre d'exemple, le singe génétiquement proche de l'homme ne développe pas de dystrophies. De plus, il existe une variabilité notable entre les formes de dystrophies qui peuvent survenir chez les différentes espèces touchées. Les cas spontanés de dystrophies sont pour l'instant répertoriés chez seulement quelques espèces autres que l'homme. Ces trois espèces appartiennent aux muridés, aux canidés et aux félidés. Le modèle souris *mdx* est ainsi utilisé dans les études pathogéniques des phénomènes de nécrose-régénération. Le chien GRMD, quant à lui, est un modèle très représentatif de la maladie humaine, faisant qu'il est souvent utilisé dans les expérimentations concernant la pathogénie et pour les essais de thérapies. Malheureusement, aucun modèle ne semble parfaitement adéquat pour répondre aux attentes expérimentales [Slater, 1988; Shelton, 2004; Lovering *et al.*, 2005; Lidov, 2009].

#### I.1. DMD murine

Le modèle murin le plus étudié de la dystrophie musculaire de Duchenne est la souris *mdx*. L'altération qui en est responsable est une mutation en position 3185 de l'exon 23, ce qui convertit le codon glutamine CAA en un codon stop TAA [Sicinski *et al.*, 1989], mutation qui s'est produite spontanément chez une souche C57BL/10ScSn de souris. Ainsi, le produit du gène muté de la dystrophine est tronqué et ne peut s'attacher au sarcolemme. De plus, comme chez les patients DMD, il en résulte une absence marquée du complexe glycoprotéique associé à la dystrophine [Ohlendieck et Campbell, 1991; Brown et Hoffman, 1988].

Cependant, la souris *mdx* contrairement à l'homme, ne présente que peu de phénotypes associés à la maladie. En effet, on observe peu de fibres nécrosées et les fibres endommagées sont réparées et non remplacées par du tissu conjonctif. Par contre, à l'âge de 3 semaines, une phase de dégénération-régénération aiguë se produit dans les muscles de ces souris [Grounds et McGeachie, 1992; Durbeej et Campbell, 2002; Banks et Chamberlain, 2008; Lidov, 2009; Willmann *et al.*, 2009].

D'autres souris, transgéniques, ont été générées par plusieurs équipes, dont le but était d'intégrer dans le génome de la souris *mdx* une isoforme non-musculaire de la dystrophine au sein du muscle squelettique. Cette isoforme contenait ainsi les domaines C-terminal et riche en cystéines de la dystrophine musculaire, mais pas les domaines central et N-terminal liant l'actine, ce qui fait que cette isoforme s'associait à la membrane du sarcolemme où elle restaurait la localisation et l'expression normale de tous les constituants du complexe des

glycoprotéines associées à la dystrophine, mais laissait toujours le muscle squelettique dans un état pathologique [Cox *et al.*, 1994; Greenberg *et al.*, 1994].

## **I.2. DMD canine**

Plusieurs signes cliniques similaires à ceux observés dans la dystrophie musculaire de Duchenne font du modèle canin Golden Retriever dystrophique un bon modèle [Cooper *et al.*, 1990; Valentine *et al.*, 1986; Valentine *et al.*, 1988; Valentine *et al.*, 1992]. Seule la partie amino-terminale de la dystrophine canine peut être détectée à l'aide d'anticorps chez les chiens atteints de la maladie. La mutation est causée par un changement A>G à l'intérieur d'un site d'épissage consensus situé à l'extrémité 3' de l'intron 6, ce qui aboutit à une protéine à laquelle manquent les exons 6 à 8 de la protéine de 390 kDa [Brown et Hoffman, 1988; Gaschen *et al.*, 1992; Sharp *et al.*, 1992]. La maladie a été bien caractérisée chez le chien Golden Retriever, mais n'est pas exclusive à cette race. Les terriers Irlandais, les Rottweilers ainsi que les Samoyèdes peuvent également être affectés. Le taux sérique en CPK des chiens dystrophiques est élevé dès la naissance et augmente encore plus lors d'un effort physique. Entre la huitième et la dixième semaine, les chiens dystrophiques acquièrent une stature rigide, ont une démarche chancelante et éprouvent des difficultés à ouvrir la mâchoire et à se nourrir. Le rétrécissement de la base de leur langue provoque une salivation excessive. La dégénérescence musculaire s'accompagne d'une fibrose. L'atrophie musculaire qui en résulte conduit à la paralysie des membres postérieurs et au développement d'une scoliose [Valentine *et al.*, 1992]. Enfin, les chiens dystrophiques développent des signes de cardiomyopathies [Valentine *et al.*, 1986].

Le modèle de chien dystrophique représente un intérêt certain pour l'établissement de thérapies en faveur de la DMD. Cependant, les coûts exorbitants que peuvent entraîner l'hébergement et l'achat de tels animaux, permettent difficilement d'aborder des approches fondamentales. Il ne peut ainsi être souvent utilisé que dans des protocoles pré-cliniques [Banks et Chamberlain, 2008; Lidov, 2009; Willmann *et al.*, 2009].

## **I.3. DMD féline**

Jusqu'à présent, peu de formes de dystrophies félines ont été étudiées [Carpenter *et al.*, 1989; Gaschen *et al.*, 1992]. Le site de mutation n'a pas encore été identifié, mais la partie amino-terminale de la dystrophine est exprimée normalement, seule, l'expression de la partie carboxy-terminale étant atténuée [Gaschen *et al.*, 1992; Winand *et al.*, 1994]. Les premiers signes de la maladie apparaissent à un ou deux ans. Les chats atteints ont une langue épaissie, développent une pseudo-hypertrophie des muscles postérieurs et éprouvent beaucoup de difficulté à se déplacer. Une échocardiographie permet de révéler des signes de cardiomyopathies. Les biopsies musculaires montrent la présence de fibres nécrotiques. Bien que présentant des signes semblables à ceux observés dans les cas de DMD chez l'homme, la rareté des cas de dystrophies félines ne permettent pas d'utiliser cet animal en recherche pour le développement d'une thérapie [Lidov, 2009; Willmann *et al.*, 2009].

## II. Approches thérapeutiques

Les thérapies développées dans le cadre des myopathies, notamment de la forme sévère de dystrophie musculaire de Duchenne, se doivent d'atteindre au moins un des effets thérapeutiques suivant :

- Ralentir, voire arrêter, la dégénérescence musculaire;
- Estomper les divers signes cliniques en corrigeant l'origine de la pathologie;
- Restaurer la capacité musculaire des patients.

Presque 150 ans se sont écoulés depuis la description des premiers cas de DMD et plus de 20 ans depuis que le gène codant pour la dystrophine fut identifié. Néanmoins, il n'existe pour l'instant aucun traitement curatif pour cette maladie. La difficulté à établir une thérapie efficace est particulièrement due aux obstacles représentés par le remplacement ou la réparation du gène défectueux. Pareillement, la pluralité des pathologies associées à la dégénérescence musculaire permanente oblige les équipes de recherche à travailler sur "un terrain miné".

Pour l'instant, les palliatifs se limitent malheureusement à améliorer le confort et la qualité de vie des patients. Pour ralentir un peu l'atrophie musculaire, des séances de physiothérapies peuvent être prescrites. Pour augmenter la mobilité des patients, cannes puis chaises roulantes électriques ont été mises à leur disposition. Pour augmenter leur capacité respiratoire, les patients sont mis sous assistance respiratoire. Également, des interventions chirurgicales lourdes peuvent être envisagées pour les patients qui développent une lordose pathologique : des barres métalliques sont alors vissées le long de la colonne vertébrale pour éviter son affaissement [Franzini-Armsrong, 1994].

Toutefois, de 1940 à 1979, une multitude de drogues et d'agents ont été administrés aux patients. L'ensemble de ces traitements ne rentrant pas dans le cadre d'études scientifiques rigoureusement contrôlées, aucun des traitements prescrits ne donna de résultats convaincants. Parmi ces produits, nous citerons la vitamine E, des androgènes, des stéroïdes anabolisants avec ou sans digitoxine, de l'adrénaline, des vasodilatateurs, de la glycine, d'autres acides aminés, ... Puis, au début des années 80, les traitements proposés rentrèrent dans des programmes scientifiquement encadrés [Franzini-Armsrong, 1994]. Actuellement, les thérapies pharmaceutiques, géniques et cellulaires constituent ainsi l'ensemble des approches envisagées pour traiter les dystrophinopathies.

### II.1. Traitement pharmacologique

L'avantage majeur de cette approche est qu'elle permet une administration facile de molécules pharmacologiques (voie orale, intraveineuse ou sous-cutanée), molécules dont l'effet pourrait même être interrompue dès l'arrêt du traitement si nécessaire [Pichavant *et al.*, 2011].

Plusieurs stratégies pharmaceutiques ont ainsi été proposées pour répondre aux problèmes liés à la DMD. De nombreux composés tels que la vitamine E [Backman *et al.*, 1988], le sélénium, le mazindol [Zatz *et al.*, 1986; Zatz *et al.*, 1988] se sont avérés inefficaces. Malgré tout, l'approche pharmaceutique demeure une approche thérapeutique d'actualité.

### II.1.1. Glucocorticoïdes

Leurs effets avantageux chez les patients atteints de dystrophie musculaire de Duchenne ont été notés depuis une quarantaine d'années [Drachman *et al.*, 1974], bien que leur mécanisme d'action demeure indéterminé. Les effets anaboliques, la réduction de l'inflammation des tissus et l'immunosuppression des cellules cytotoxiques semblent cependant être des médiateurs probables des stéroïdes, qui pourraient ainsi agir de manières combinées.

De nombreux essais démontrent qu'un traitement à la Prednisone ou d'un de ses composés dérivés (la Prednisolone), permet une amélioration chez les patients DMD par augmentation de la force et aussi de la fonction musculaire des malades traités [Mendell *et al.*, 1989; Sansome *et al.*, 1993].

Un autre composé, le Deflazacort qui est un dérivé de la Prednisolone, a également été utilisé dans le but de réduire les effets secondaires de cette dernière [Biggar *et al.*, 2001].

Pour le moment les deux stéroïdes que sont la Prednisone/Prednisolone et le Deflazacort sont utilisés, leurs effets positifs étant équivalents dans la stabilisation de la force musculaire. Le Deflazacort entraîne cependant moins d'effets secondaires, avec de surcroît un gain de poids moins important [Bonifati *et al.*, 2000]. Toutefois, le mécanisme qui engendre l'effet bénéfique du traitement reste inconnu [Angelini, 2007].

### II.1.2. Aminoglycosides

Ne pouvant s'appliquer qu'à une faible proportion des patients atteints, l'utilisation d'aminoglycosides demeure la seule approche pharmacologique pouvant potentiellement corriger le déficit moléculaire. Les "aminoglycosides" sont des antibiotiques ayant la capacité de permettre aux polymérase de continuer la traduction d'un gène au-delà d'un codon Stop. Grâce à cette propriété, l'administration de ces antibiotiques pourrait restaurer la production de dystrophine chez 10 à 15 % des patients DMD, ceux porteurs d'une mutation non-sens dans le gène de la dystrophine. À titre d'exemple, la gentamicine permet ainsi à la machinerie cellulaire d'outrepasser le codon Stop UAG. Chez la souris *mdx*, l'administration de cet antibiotique a permis d'assurer une protection contre les cassures musculaires grâce à la restauration de la dystrophine pleine longueur sous la membrane des muscles squelettiques [Barton-Davis *et al.*, 1999]. Bien que le premier essai clinique chez l'homme n'ait malheureusement pas eu le succès escompté [Wagner *et al.*, 2001], de nouveaux dérivés de

cette molécule sont ainsi en voie de développement en essayant d'améliorer son efficacité et de minimiser sa toxicité [Barton-Davis *et al.*, 1999; Vinod *et al.*, 2010].

### II.1.3. Agonistes des adrénorécepteurs de type $\beta_2$

Les muscles des patients DMD ont une force nettement réduite, ce qui laissait suggérer l'utilisation de divers agents avec pour but d'augmenter leur force musculaire. L'utilisation du Clenbutérol, un agoniste des adrénorécepteurs  $\beta_2$ , chez la souris *mdx* a ainsi montré un effet positif [Zeman *et al.*, 1994]. En effet, les résultats d'une étude menée en 1995 ont montré que le traitement à long terme au Clenbutérol permettait d'améliorer la croissance et la régénération musculaire, avec toutefois l'inconvénient du développement de malformations et d'une fatigue prématurée [Dupont-Versteegden *et al.*, 1995]. Une étude récente a aussi démontré que l'utilisation du Clenbutérol réduisait le niveau de dégénérescence musculaire chez la souris dystrophique âgée [Zeman *et al.*, 2000].

Un autre agoniste des adrénorécepteurs  $\beta_2$ , le Formotérol, a également été décrit comme étant plus efficace que le Clenbutérol, car il était capable d'induire une amélioration de la fonction musculaire chez la souris *mdx* tout en abaissant l'activité du protéasome, ce qui permettait d'augmenter la masse ainsi que la taille des fibres dans plusieurs muscles dont le diaphragme, le soléus et l'EDL [Harcourt *et al.*, 2007].

### II.1.4. Myostatine

La myostatine étant un régulateur négatif naturel de la croissance musculaire, différentes stratégies ont été tentées pour bloquer son action, tels l'utilisation d'anticorps anti-myostatine, la mutation de son récepteur ou l'introduction d'un récepteur soluble et le saut d'exon de son transcrit. Il a même été tenté une stratégie de saut d'exon qui restaure le cadre de lecture de la dystrophine et détruit l'ARNm de la myostatine simultanément, expériences qui ont donné des résultats encourageants par augmentation de la force musculaire et amélioration histologique sur les souris *mdx* [Wagner *et al.*, 2008; Pichavant *et al.*, 2011].

### II.1.5. Utrophine

Une autre approche en développement consisterait à identifier un agent pharmacologique qui permettrait d'augmenter les quantités normalement faibles d'utrophine en stimulant l'activité du gène qui la code. Normalement restreinte aux jonctions myotendineuses et neuromusculaires (site où la fibre est stimulée par le neurone moteur), l'utrophine est une protéine ayant une fonction analogue à celle de la dystrophine, due à sa forte homologie avec cette protéine (80%). Également capable de restaurer le complexe DCG au niveau de la membrane, une surexpression d'utrophine ne présente aucune toxicité et aide à prévenir la dégénérescence musculaire chez les souris *mdx* [Tinsley *et al.*, 1998; Fisher *et al.*, 2001]. Afin d'améliorer le phénotype dystrophique, un traitement doit pourtant permettre d'augmenter la quantité d'utrophine de 2 à 3 fois pour restaurer le complexe DCG sur toute la

longueur du sarcolemme [Tinsley *et al.*, 1998]. Parmi les agents pharmacologiques prometteurs, l'administration d'une partie de l'héréguline (facteur de croissance dérivé des nerfs) a permis de tripler le niveau d'utrophine chez des souris *mdx* [Krag *et al.*, 2004]. Des études permettant d'évaluer sa toxicité et sa spécificité d'action doivent néanmoins être effectuées avant d'envisager l'utilisation de ce peptide pour le traitement des patients DMD [Miura et Jasmin, 2006].

## **II.2. Thérapies géniques**

La thérapie génique consiste en l'introduction dans les fibres musculaires, via des vecteurs viraux ou non viraux, d'une copie fonctionnelle du gène *DMD*, directement dans les muscles ou dans des cellules en culture. Le transgène est généralement la séquence complète de l'ADNc du gène *DMD*, mais en raison de sa grande taille, d'autres séquences ont été générées en induisant des délétions dans le domaine central (mini-dystrophine) et C-terminal (micro-dystrophine).

### **II.2.1. Approches virales**

Les virus ont la capacité d'infecter des cellules somatiques afin de faire exprimer leur génome et de se répliquer, propriété qui a été utilisée pour introduire le gène de la dystrophine dans les cellules musculaires des patients atteints de DMD. L'efficacité d'un vecteur viral dépend de plusieurs paramètres : l'insertion du transgène, sa capacité d'insertion, sa reconnaissance par les cellules cible (récepteurs membranaires), son insertion chez l'hôte et sa réplication, l'expression du transgène, le fait qu'il n'induit pas de réponses immunitaires, ... Divers vecteurs viraux ont ainsi pu et sont utilisés : les adénovirus, les adénovirus associés et les lentivirus avec des avantages et des limites pour chaque type viral [Wang *et al.*, 2009; Odom *et al.*, 2011; Pichavant *et al.*, 2011].

#### **II.2.1.1. Adénovirus**

Les adénovirus sont des virus non enveloppés à ADN double brin. Une partie des gènes adénoviraux impliqués dans la réplication virale peuvent être supprimés afin de libérer de la place au transgène d'intérêt. En supprimant ainsi les gènes immunogéniques des adénovirus, on évite d'induire une réponse immunologique dirigée contre le produit viral. Il est possible alors d'intégrer au génome adénoviral des transgènes ayant une taille de 28 à 30 kb. Le gène de la dystrophine a été intégré au génome des adénovirus et ces derniers ont été injectés chez la souris *mdx*, ce qui a permis une expression stable de la dystrophine normale à long terme, en restaurant de surcroît la dystrophine dans 25 à 30% des fibres de la souris [Dellorusso *et al.*, 2002].

Malheureusement, quelques inconvénients limitent l'utilisation de cette technique : les protéines de la capsid virale entraîneraient en effet une réaction inflammatoire pouvant s'avérer létale lorsque le virus est injecté par voie systémique [Raper *et al.*, 2003].

### II.2.1.2. Virus adéno-associés (AAV)

Les AAV sont des virus non enveloppés à ADN simple brin. Non pathogènes, ils peuvent infecter des cellules en division ou des cellules quiescentes comme les cellules musculaires, permettant ainsi l'incorporation du gène de façon stable. Cependant, la longueur maximale du gène qui peut y être inséré ne peut être que de 5-6 kb.

L'utilisation de versions de la micro- ou de la mini-dystrophine permet alors l'introduction du gène dans ce vecteur. Des mini-gènes de la dystrophine de moins de 4 kb ont pu être introduits dans ces vecteurs. Après injection intramusculaire du vecteur, les dystrophines tronquées produites sont retrouvées dans la membrane cellulaire des souris *mdx*. Des vecteurs AAVs recombinants injectés en intramusculaire peuvent donner des taux d'infection très élevés et une capacité à améliorer la pathologie jusqu'à 6 mois après l'administration [Wang *et al.*, 2000].

Par ailleurs, l'expression de la dystrophine dans l'ensemble du tissu musculaire et cardiaque a été rendue possible par l'injection systémique d'une solution contenant un haut titre d'AAV6 codant pour la micro-dystrophine [Gregorevic *et al.*, 2004].

Récemment, Liu *et al.* (2005) ont démontré que l'expression de la microdystrophine chez les souris *mdx* en utilisant l'AAV peut résulter d'une protection du muscle contre les contractions excentriques, effet significatif dû à l'expression de la dystrophine dans 30% des fibres.

### II.2.1.3. Rétrovirus

Ces virus possèdent un ARN simple brin. Ils se répliquent en passant par une transcriptase inverse dans des cellules en division. L'efficacité de transfert du gène dépend alors de la capacité de division des cellules, ce qui fait de la cellule musculaire un mauvais modèle pour l'utilisation de ces vecteurs. De plus, le rétrovirus a une capacité limitée en ce qui concerne la longueur du gène qu'on peut y insérer (7-8 kb). L'utilisation de la minidystrophine reste nécessaire pour le traitement de la maladie et donne des résultats peu satisfaisants. En effet, les expériences faites chez les souris dystrophiques en utilisant les rétrovirus montrent que même si le pourcentage d'infection *in vitro* des myoblastes est de 100%, l'injection du virus directement dans le muscle en régénération ne donne que 0,5-1 % de fibres dystrophine positives. Ce résultat est attribué au fait que les souris ont développé des anticorps contre le rétrovirus et que la demi-vie du rétrovirus est courte *in vivo* [Fassati et Bresolin, 2000]. Ces auteurs ont ainsi démontré que les vecteurs rétroviraux sont capables de traduire les cellules satellites musculaires *in vivo* et que ces cellules participent à la restauration de la dystrophine au niveau des fibres de la souris injectée. Le taux d'infection

des cellules satellites par des rétrovirus restant faible, ces vecteurs sont en conséquence peu utilisés *in vivo*, mais pourraient être intéressants pour une thérapie génique *ex vivo*.

#### II.2.1.4. Lentivirus

Le lentivirus est une sous-classe dérivée du virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Ce virus ne peut pas contenir le gène complet de la dystrophine, puisque la longueur du gène qu'on peut y insérer ne doit pas dépasser 9 kb. Cependant, il présente l'avantage de pouvoir infecter des cellules même quiescentes et reste ensuite quiescent dans les tissus en post-mitose sans causer de réaction immunitaire. De plus, ce vecteur intègre le transgène dans le génome des cellules : lorsque ces cellules prolifèrent, elles donc conservent le transgène. Ces propriétés font ainsi de ce vecteur un choix idéal pour la thérapie *ex vivo* par le transfert du gène de la micro-dystrophine dans les cellules souches provenant d'un muscle dystrophique [Scott *et al.*, 2002].

Il a été montré que l'injection intramusculaire de lentivirus codant pour la mini-dystrophine a permis son expression dans le muscle de souris *mdx* pendant 6 mois [Li *et al.*, 2005]. Les lentivirus s'intégrant au hasard dans le génome de l'hôte, ceci risque néanmoins d'activer un oncogène et mener à la formation de tumeurs.

#### II.2.1.5. Herpès Simplex type 1

Le virus herpès simplex de type 1 (HSV-1) est un virus neurotrophique humain, mais il peut être utilisé pour infecter des tissus ou des cellules qui ne sont pas dérivés du système nerveux [Efstathiou et Minson, 1995]. Le génome viral du virus HSV-1 est constitué d'un ADN linéaire double brin d'une longueur de 152 kb. Il est donc doué d'une grande capacité d'encapsulation. Une fois débarrassé de toute séquence virale, les vecteurs basés sur le HSV sont peu toxiques et peuvent être utilisés soit pour infecter directement les muscles ou pour infecter des cellules myogéniques *in vitro*. En effet, l'injection directe de vecteurs HSV recombinants peut générer jusqu'à 50% de fibres positives pour le transgène utilisé [Wang *et al.*, 2002]. Il a d'ailleurs été montré que les vecteurs HSV pouvaient être utilisés dans le contexte de la thérapie génique indirecte basée sur l'infection *in vitro* des myoblastes [Bujold *et al.*, 2002]. Suite à la transplantation de myoblastes infectés avec un amplicon HSV contenant la dystrophine et l'eGFP chez des souris dystrophiques immunosupprimées, jusqu'à 50% de fibres positives pour la dystrophine ont ainsi pu être observées [Bujold *et al.*, 2002]. Les vecteurs HSV demeurent tout de même peu attirants en raison de leur faible capacité d'intégration. Cependant, des travaux sont actuellement en cours pour générer des vecteurs hybrides HSV-AAVs qui exhiberaient la propriété de s'intégrer comme des vecteurs AAVs tout en ayant la grande capacité de stockage du HSV.

## II.2.2. Oligonucléotides

### II.2.2.1. Saut d'exon par utilisation d'oligonucléotides anti-sens (AON)

En dépit des altérations moléculaires qui affectent la dystrophine, il n'est pas rare d'observer chez les souris *mdx* et les jeunes enfants DMD quelques fibres qui expriment pourtant la protéine. Son expression dans ces fibres, dites révertantes, est causée par une restauration du cadre de lecture suite à une seconde mutation ou bien suite à un phénomène d'épissage qui aurait permis d'éliminer la séquence comportant la mutation [Hoffman *et al.*, 1990; Sherratt *et al.*, 1993; Lu *et al.*, 2000].

Normalement, le mécanisme d'épissage sert à éliminer les introns d'un ARN pré-messager. En utilisant des ARN antisens spécifiques à l'ARN pré-messager de la dystrophine, la stratégie de saut d'exon (exon skipping) vise à moduler l'épissage de l'ARN afin d'en éliminer l'exon contenant une mutation non-sens et restaurer ainsi le cadre de lecture. Le principe de cette approche repose ainsi sur l'introduction, dans la cellule, de petites séquences d'ARN nommées "oligoribonucléotides antisens" (AONs) qui sont complémentaires et spécifiques à un site d'épissage présent sur le transcrit de la dystrophine. En neutralisant un site d'épissage, les AONs produisent un nouvel épissage qui permet de sauter un ou plusieurs exons et conduisent à la production d'une dystrophine tronquée [Mann *et al.*, 2001; Bremmer-Bout *et al.*, 2004]. Comme l'a démontré une étude récente en analysant les profils d'expression géniques, ces courtes séquences d'ARN antisens ont une activité très spécifique et ne semblent pas affecter d'autres gènes [t'Hoen *et al.*, 2006].

Chez la souris *mdx*, une simple injection intramusculaire d'AONs a permis d'obtenir une bonne répartition de fibres exprimant la dystrophine, constituant ainsi 23% des fibres totales du muscle [Williams *et al.*, 2006]. L'injection systémique peut également être utilisée et présente l'avantage de pouvoir restaurer l'expression de dystrophine dans des muscles plus difficilement accessibles comme le diaphragme [Lu *et al.*, 2005]. Chez un patient DMD âgé de 10 ans, l'injection intraveineuse d'une petite quantité d'oligonucléotides s'est ainsi révélée être une approche sécurisante qui a permis de corriger 6% des ARNm codant pour la dystrophine [Takeshima *et al.*, 2006]. Bien que la présence de dystrophine puisse perdurer plusieurs semaines suite à l'injection d'AONs, le traitement d'un patient avec cette approche nécessite des soins répétitifs, ce qui permet alors une meilleure efficacité [Bremmer-Bout *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2005]. Afin de diminuer la fréquence des traitements, l'utilisation de vecteurs viraux permettant aux cellules infectées de synthétiser les AONs pourrait cependant être envisagée. Jusqu'à aujourd'hui, l'utilisation de vecteurs AAV chez la souris *mdx* a permis de restaurer la dystrophine à long terme tout en améliorant le phénotype dystrophique [Denti *et al.*, 2006; t'Hoen *et al.*, 2006]. Le saut d'exon est donc une approche prometteuse qui, suite à son optimisation, pourrait alors permettre le traitement d'environ 70% des patients DMD [Aartsma-Rus *et al.*, 2004]. Il faut cependant garder à l'esprit que cette approche ne peut permettre que la restauration d'une dystrophine tronquée. En supposant que des AONs puissent être livrés à l'ensemble des muscles et que leur action puisse perdurer à long terme,

le résultat final serait un phénotype Becker dont la sévérité varierait en fonction des exons sautés.

Des myoblastes provenant d'un patient dystrophique dont la mutation était causée par la délétion des exons 49 et 50 ont par exemple été modifiés avec un lentivirus codant pour un ARN U7 contenant la séquence antisens dirigée contre l'exon 51 : cette stratégie a ainsi permis l'expression de dystrophine humaine chez le singe [Quenneville *et al.*, 2007].

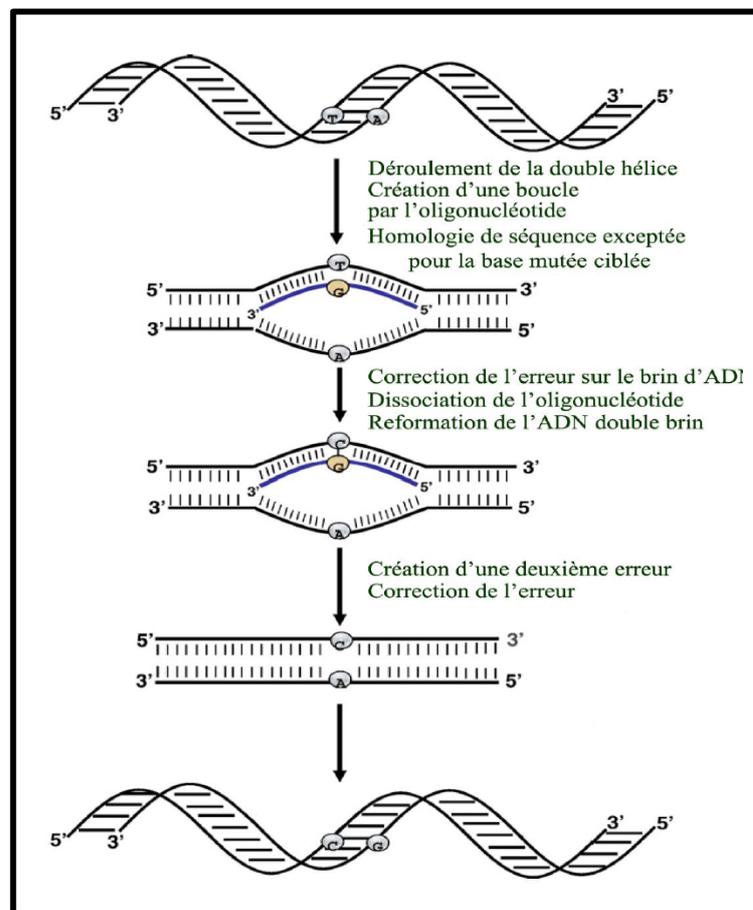
### II.2.2.2. Correction génomique

Sur la base du fait que les mutations ponctuelles affectant le gène de la dystrophine représentent jusqu'à 15% des cas de DMD, l'utilisation d'oligodésoxynucléotides (**Figure 14**) permettrait de réparer ce type de mutations. La souris *mdx* a été un excellent modèle pour vérifier ce principe. En effet, la déficience en dystrophine chez cette souris était due à une mutation ponctuelle générant un codon Stop dans le gène codant la dystrophine. Ainsi les premières expériences réalisées chez cette souris donnèrent des résultats encourageants. La correction fut démontrée au niveau génomique ainsi qu'au niveau de l'ARNm, l'expression de dystrophine ayant été démontrée *in vitro* et *in vivo* [Rando *et al.*, 2000; Bertoni et Rando, 2002; Bertoni *et al.*, 2005]. À l'instar des AONs, l'utilisation des oligodésoxynucléotides nécessiterait une ingénierie constante de ces vecteurs pour chaque zone de mutation. De plus, il faudrait aussi noter la faible efficacité de cette approche, puisque seules 1 à 5% des cellules traitées produisent de la dystrophine. Enfin, même si la correction au sein des cellules répondantes est permanente, il n'en demeure pas moins qu'il y a un renouvellement cellulaire important lors des évènements de dégénérescence/ régénérescence musculaire [Rando, 2007].

### II.2.3. Approche plasmidique

C'est pendant le début des années quatre-vingt-dix que les premières observations concernant la faisabilité, mais surtout l'efficacité, de l'injection intramusculaire d'un plasmide codant pour la dystrophine a été rapportée chez la souris *mdx* [Acsadi *et al.*, 1991; Danko *et al.*, 1993]. Depuis, l'efficacité de distribution et d'expression des vecteurs délivrés a été améliorée en utilisant diverses techniques dont l'électroporation [Hartikka *et al.*, 2001] qui reste tout de même une méthode invasive. En effet, quelques essais cliniques sur des patients atteints de dystrophie musculaire de Duchenne ou de Becker ont montré que trois semaines après l'injection intramusculaire d'un plasmide contenant la séquence de la dystrophine pleine longueur, on pouvait détecter l'expression de la dystrophine chez les deux tiers des enfants traités, le nombre de fibres qui exprimaient la dystrophine était cependant très faible [Fardeau *et al.*, 2005]. A la lumière de ce résultat, d'autres moyens pour induire l'intégration de plasmide dans le génome ont été testés, et ce afin de permettre une expression à long terme de la protéine. Ainsi, la co-expression d'une intégrase ( $\Phi$ C31) avec un plasmide contenant des séquences qu'elle reconnaît (*attP*) permettait une intégration spécifique du plasmide dans le génome des mammifères [Thyagarajan *et al.*, 2001]. De plus, l'intégration se faisant d'une façon spécifique, le risque d'une insertion aléatoire était écarté. En effet, l'utilisation de cette

technologie chez la souris *mdx* a entraîné une expression à très long terme de la dystrophine [Bertoni *et al.*, 2006]. D'autre part, il a aussi pu être montré que la transplantation de cellules myogéniques obtenus à partir de souris dystrophiques permettait de régénérer à long terme l'expression de la dystrophine une fois nucléofectées avec le plasmide codant pour le transgène (la dystrophine) en présence de l'intégrase  $\Phi$ C31 [Quenneville *et al.*, 2007].



**Figure 14.** Mécanisme moléculaire de la correction génomique médiée par les oligodésoxynucleotides. Dans cet exemple, le phénotype sauvage G-C est remplacé par une hypothétique mutation de bases T-A. L'oligodésoxynucleotide présente une parfaite homologie de séquence avec la zone entourant la mutation à l'exception de la base mutée. Ce non-appariement au niveau de la base mutée est alors corrigé par la machinerie endogène de réparation de l'ADN en deux phases successives [Rando, 2007].

#### II.2.4. Transfection d'ADN nu

Cette approche consiste en l'introduction du transgène sans vecteur viral, ce qui permet d'ailleurs d'éviter toute réponse immunitaire dirigée contre les protéines virales. L'efficacité de la transfection d'ADN nu codant la dystrophine ou la micro-dystrophine s'est cependant avérée très faible, puisque lors d'essais cliniques, l'introduction de l'ADNc de la dystrophine n'augmentait que de moins de 6% le taux de la protéine. Des méthodes physiques ou chimiques peuvent néanmoins être utilisées pour augmenter le taux de transfection de cet ADN, telle l'électroporation. Appliquée aux souris *mdx*, cette méthode induisait ainsi l'expression de la dystrophine pendant un mois [Romero *et al.*, 2004; Pichavant *et al.*, 2011].

#### II.3. Thérapie cellulaire

La thérapie cellulaire consiste à introduire dans le muscle du patient atteint de DMD des cellules musculaires provenant d'un patient non-atteint permettant ainsi de restaurer l'expression de dystrophine dans leurs muscles. Ces cellules peuvent soit provenir d'un donneur ou être des cellules autologues dont le gène de la dystrophine a été corrigé par thérapie génique *ex vivo*. Deux formes de cette thérapie sont présentement à l'étude : l'injection intra-artérielle de cellules, notamment de mésoangioblastes [Sampaolesi *et al.*, 2006] ou l'injection intramusculaire de cellules, notamment de myoblastes [Peault *et al.*, 2007]. Les mésangioblastes sont des cellules isolées à partir des vaisseaux sanguins et peuvent être injectées de manière intra-artérielle, passer à travers la paroi vasculaire et se diriger vers le muscle pour finalement se différencier en cellules musculaires [Peault *et al.*, 2007]. L'injection intramusculaire de myoblastes permet d'introduire dans le muscle dystrophique des cellules précurseurs exprimant une dystrophine non-mutée et qui fusionneront avec les fibres musculaires endommagées du patient. Des essais *in vivo* ont été effectués sur des animaux et des essais cliniques ont même été envisagés [Skuk *et al.*, 2002; Skuk *et al.*, 2007]. Cette thérapie est très prometteuse pour nombre de maladies génétiques, bien qu'elle doive cependant faire face à plusieurs obstacles : la faible dispersion des myoblastes hors des sites d'injections, la mort rapide et précoce des myoblastes suite à l'injection, le rejet à moyen et long terme dû à la réponse immune spécifique [Péault *et al.*, 2007; Benchaouir *et al.*, 2008; Darabi *et al.*, 2008].

## Chapitre V : Diagnostic des dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker

### I. Analyses cliniques et para-cliniques

L'analyse clinique reste déterminante pour aboutir à un diagnostic positif et étiologique d'une myopathie. Dans la très grande majorité des cas, le diagnostic de DMD est évoqué à l'occasion de difficultés à la marche s'installant en général chez un petit garçon vers l'âge de 3 à 4 ans, plus tardivement vers l'âge de 12 ans dans le cas de BMD [De Recondo et De Recondo, 2001; Petiot et Urtizbera, 2004].

Est particulièrement évaluée la capacité de l'enfant dystrophique à se relever à partir d'une position allongée. L'enfant s'aide alors pour se lever de ses membres supérieurs d'abord en se tenant sur ses bras et genoux puis se met debout en appuyant ses mains droites sur ses jambes : cette manœuvre dite de "Gowers" permet de mettre en valeur un affaiblissement des muscles inférieurs.

Pour confirmer le diagnostic de myopathie, le médecin est pourtant parfois amené à prescrire d'autres examens complémentaires.

- *Electromyographie* : Il est possible de vérifier si les muscles et les nerfs fonctionnent correctement en réalisant un électromyogramme, consistant à stimuler les muscles par de petits chocs électriques et permettant alors d'étudier l'activité électrique générée par le muscle lorsqu'il se contracte. Même s'il permet de constater l'existence d'anomalies musculaires, cet examen n'est cependant pas spécifique de DMD/BMD [Gibertoni *et al.*, 1987; Engel et Franzini-Armstrong, 1994; Karpati *et al.*, 2001].

- *Dosage des enzymes musculaires* : La nécrose des cellules libère des protéines dans le sang (les créatines kinases, CK) qui, ayant une concentration élevée, participent au phénotype de dystrophie musculaire, mais ce dosage n'est cependant pas différentiel. Chez un enfant atteint et parfois chez la mère porteuse de DMD/BMD, le taux de CK peut ainsi atteindre 50-100 fois les valeurs d'un sujet normal (comprise entre 10 et 200 UI/l) [Bradley *et al.*, 1993; Engel et Franzini-Armstrong, 1994; Karpati *et al.*, 2001; Lankester *et al.*, 2007].

### II. Analyses histologiques, immunohistochimiques et western blotting

Bien que certaines techniques nécessitent de disposer d'une biopsie musculaire, acte médical invasif parfois traumatisant, dans certains cas, l'analyse histologique et immunohistochimique peuvent être nécessaires pour établir un diagnostic rapide et précis [Anderson et Davison, 1999; Petiot et Urtizbera, 2004; Fernandez *et al.*, 2008; Bushby *et al.*, 2009; Abbs *et al.*, 2010; Soltanzadeh *et al.*, 2010] :

- *Analyse histologique* : Un petit échantillon de muscle est prélevé et examiné par microscopie, montrant, en cas de dystrophie musculaire, la présence dans le muscle de nombreuses fibres musculaires mortes et de dimensions anormalement grandes. À mesure que la maladie progresse, le tissu musculaire nécrosé se trouve également remplacé par du tissu gras ou d'autres types de tissus.

- *Analyse immunohistochimique* : L'immunofluorescence indirecte sur des coupes congelées de muscle fournit des données importantes pour l'analyse de la dystrophine, puisque chez les individus normaux, l'immuno-marquage de la dystrophine est détecté comme un anneau homogène autour de la périphérie de toutes les fibres musculaires. Chez un patient DMD l'anneau n'est pas détecté, mais chez un patient BMD, la coloration varie de légère à presque normale. Bien que très utile chez les hommes, le test est plus utile pour détecter les femmes porteuses DMD qui ont souvent des plaques de fibres négatives parmi les fibres positives en raison de l'inactivation du chromosome X. L'immunofluorescence ne semble toutefois pas bien appropriée pour détecter les porteurs de BMD.

- *Western Blotting* : Le tissu musculaire approprié (musculaire, squelettique, ou lisse) doit d'abord être obtenu et immédiatement conservés à  $-70^{\circ}\text{C}$  pour une détection directe de la dystrophine après une extraction des protéines totales suivie de l'utilisation d'une batterie d'anticorps anti-dystrophine reconnaissant cette protéine en C-terminal, N-terminal et domaine central. L'analyse d'une biopsie musculaire est alors en mesure d'évaluer les altérations qui siègent au niveau du muscle, notamment suite à l'examen du profil protéique par western blotting après biopsie musculaire, mettant en évidence l'absence, la présence ou la diminution quantitative de dystrophine, offrant ainsi notamment un moyen de distinguer entre les deux types de dystrophies, celle de Becker étant caractérisée par une abondance réduite de protéine dystrophine (>95% de précision) alors que celle de Duchenne est individualisée par une absence de dystrophine (>99% de précision). D'autre part, le même type d'analyse permet de mettre en évidence si la protéine dystrophine a la taille attendue ou si, au contraire, elle est mutée et a une taille plus petite, suggérant que c'est donc une protéine tronquée et que le phénotype BMD serait le plus probable. La dystrophine y est en effet représentée sous forme d'une bande spécifique correspondant à un poids moléculaire de 427 kDa. Chez les patients DMD, cette bande est absente ou très faiblement exprimée (<3%), alors que chez les patients BMD, cette bande est d'intensité plus ou moins diminuée et peut correspondre à une taille normale, augmentée ou réduite selon le type de lésion moléculaire en cause (mutation ponctuelle, duplication, délétion) (**Figure 15**) [Bulman *et al.*, 1991; Anderson et Davison, 1999].

### III. Analyses moléculaires

Les hommes affectés suspectés d'avoir une dystrophinopathie sur la base du diagnostic clinique sont dirigés vers une confirmation moléculaire réalisée pour démontrer la présence d'une altération clairement pathogène dans le gène *DMD*, et en tenant

compte de la sensibilité de la procédure moléculaire utilisée. La rapidité du diagnostic reste toutefois extrêmement importante afin de réduire l'anxiété et le risque de récurrence de la maladie dans la famille [Abbs *et al.*, 2010; Soltanzadeh *et al.*, 2010].

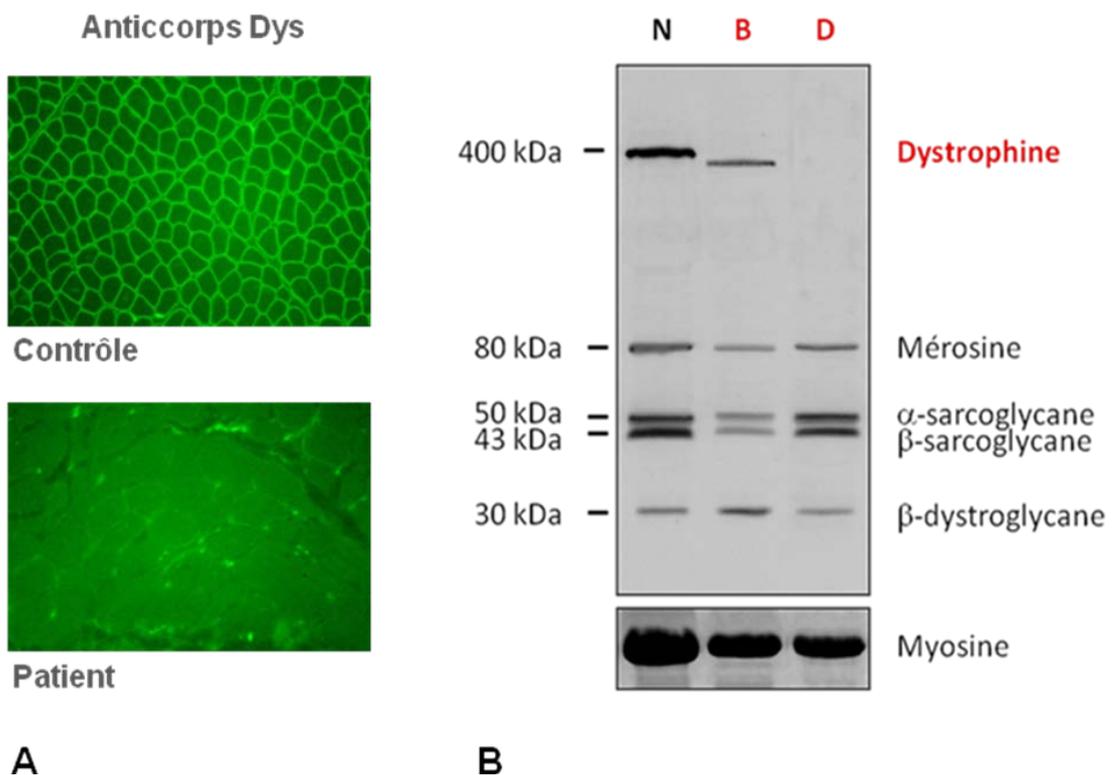
Puisque les délétions intragéniques sont les principales mutations affectant le gène *DMD* (65%), des tests moléculaires de première instance seraient de tenter de détecter la majorité des délétions avec un minimum de procédures techniques, avantages offerts par la PCR multiplexe qui permet d'amplifier simultanément les exons connus pour être le plus souvent délétés. Deux PCRs multiplexes ont ainsi été mises au point, celle de Chamberlain *et al.* (1988) et Beggs *et al.* (1990), permettant la détection d'environ 98% des délétions caractérisées dans le gène *DMD*. Etant donné que ces deux tests ne caractérisent pas les bordures de toutes les délétions, il est pourtant parfois nécessaire de réaliser PCRs supplémentaires pour caractériser l'étendue exacte lorsqu'une délétion n'est pas bordée de ses deux cotés [Chamberlain *et al.*, 1988; Beggs *et al.*, 1990; Abbs *et al.*, 2010].

Des analyses quantitatives de tous les exons offrent une amélioration du taux de détection de mutations puisqu'elles détectent toutes les délétions intragéniques et, en outre, toutes les duplications (5-10% des mutations). D'autres avantages sont que ces analyses caractérisent les bordures de la plupart des réarrangements et peuvent également être utilisés pour tester les femmes porteuses. La méthode quantitative la plus utilisée est la MLPA (pour "Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification") [White *et al.*, 2002; Ashton *et al.*, 2008; Abbs *et al.*, 2010].

Une autre approche quantitative, CGH array (pour "array Comparative Genomic Hybridization"), a été mise au point pour doser le gène *DMD* avec une haute résolution, permettant de détecter le nombre de copies, exons et introns compris, à travers l'ensemble des 2.2 Mb de la région génomique contenant ce gène et individualisant donc les points de réarrangement en des intervalles relativement étroits. Cette approche permet aussi de détecter la perte ou le gain de séquences introniques aux points liés à des inversions et des réarrangements complexes, offrant ainsi un taux plus élevé de détection de mutations que la MLPA ou les autres tests ciblant seulement les exons [Abbs *et al.*, 2010].

Si aucune délétion ou duplication n'a été trouvée, le diagnostic clinique ne peut être ni confirmé ni exclu. Si les caractéristiques cliniques, les antécédents familiaux et/ou les résultats d'analyse de la biopsie musculaire laissent suggérer une dystrophinopathie, d'autres tests peuvent être envisagés pour rechercher des mutations pathogènes. De nombreuses méthodes peuvent ainsi être utilisées pour analyser de petits changements nucléotidiques dans le gène *DMD* (SSCP pour "Single Strand Conformation Polymorphism", dHPLC pour "denaturing High Performance Liquid Chromatography", PTT pour "Protein Truncation Test", ...), offrant une alternative moins coûteuse que le séquençage de tous les 79 exons du gène *DMD*. Le séquençage du gène *DMD*, peut quant à lui, être effectuée par RT-PCR d'ADNc dérivées de l'ARN du muscle (à condition de disposer de ce matériel

génétique) ou à partir d'ADN génomique. De nouvelles approches de séquençage offrent d'ailleurs aujourd'hui la probabilité de détecter l'ensemble des mutations dans le gène *DMD*, puisque le gène en entier peut être exploré [Flanigan *et al.*, 2003; Abbs *et al.*, 2010; Torella *et al.*, 2010].



**Figure 15.** Mise en évidence d'altérations et déficits affectant la protéine dystrophine par immunohistochimie (A.) et par western blot (B.). (A) Marquage de coupes histologiques réalisées à partir de muscles avec un anticorps spécifique reconnaissant la protéine dystrophine (Dys), mettant ainsi en évidence (comparativement à un individu contrôle) un déficit de cette protéine chez le patient analysé. (B) Western blot montrant deux types d'altérations rencontrées chez les patients présentant une dystrophie musculaire de Becker/Duchenne: Patient B, présentant une dystrophie musculaire de Becker, avec présence d'une protéine tronquée et d'expression très légèrement diminuée, Patient D, présentant une dystrophie musculaire de Duchenne, avec absence de dystrophine, comparativement à un individu contrôle N. Myosine, protéine contrôle [Kaplan *et al.*, 1996; Anderson et Davison, 1999; Ehmsen *et al.*, 2002].

**MATERIELS  
ET  
METHODES**

## I. DONNEES CLINIQUES

Notre travail a porté sur l'analyse moléculaire de 103 patients issus de familles indépendantes qui nous avaient été adressés au courant des années 2010 et 2011 par les Services de Neurologie des Centres Hospitalo-Universitaires d'Alger Centre et de Ben Aknoun et de l'Etablissement Hospitalier Spécialisé Ali Aït Idir, en vue d'explorations moléculaires. Les médecins traitants de ces malades avaient en effet évoqué une suspicion de dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) ou de Becker (BMD) sur la base d'explorations cliniques (*Tableau IV*), nous adressant alors un prélèvement sanguin sur tube avec anticoagulant pour chacun de ces patients, après les en avoir informé et obtenu d'eux un consentement éclairé.

## II. METHODES

### II.1. Extraction d'ADN génomique total

#### II.1.1. Extraction d'ADN génomique total à partir de sang périphérique par la méthode au Phénol:Chloroforme

##### a. Principe

La méthode au Phénol:Chloroforme est une méthode classique d'extraction et de purification de l'ADN basée sur la solubilité différentielle des acides nucléiques entre deux phases non miscibles : le phénol, qui est un déprotéinisant puissant dans lequel ceux-ci ne sont pas solubles, et le chloroforme, qui complète l'extraction phénolique en dénaturant les protéines et en aidant à la séparation des phases aqueuses et organiques [Sambrook *et al.*, 1989].

##### b. Solutions

- Solution de lyse des globules rouges (SLR) (10 mM Tris, pH 7.6, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaCl).
- Solution de lyse des globules blancs (SLB) (10 mM Tris, pH 7.6, 10 mM EDTA, pH 8.0, 10 mM NaCl).
- SDS 10% (Sigma<sup>®</sup>) (détergent anionique).
- Protéinase K (20 mg/ml) (Sigma<sup>®</sup>) (protéase ayant une forte activité protéolytique et clivant les liaisons peptidiques entre les acides aminés).
- Phénol:Chloroforme:Isoamyl alcool (25:24:1) (Sigma<sup>®</sup>).
- Chloroforme:Isoamyl alcool (24:1) (Sigma<sup>®</sup>).
- Ethanol 100% (Sigma<sup>®</sup>).
- Ethanol 70%.
- NaCl 3 M
- Tampon TE (10 mM Tris, pH 7.6, 1 mM EDTA, pH 8.0).

**Tableau IV.** Données cliniques sur les patients DMD/BMD explorés. (DMD, dystrophie musculaire de Duchenne; BMD, dystrophie musculaire de Becker; M, sexe masculin).

Patients	Diagnostic clinique	Age	Sexe	Patients	Diagnostic clinique	Age	Sexe
P1	BMD	15 ans	M	P53	DMD	7 ans	M
P2	BMD	20 ans	M	P54	BMD	20 ans	M
P3	DMD	13 ans	M	P55	DMD	9 ans	M
P4	BMD	14 ans	M	P56	BMD	13 ans	M
P5	DMD	6 ans	M	P57	DMD	5 ans	M
P6	BMD	13 ans	M	P58	BMD	14 ans	M
P7	BMD	17 ans	M	P59	BMD	20 ans	M
P8	BMD	15 ans	M	P60	DMD	3 ans	M
P9	DMD	5 ans	M	P61	DMD	7 ans	M
P10	BMD	32 ans	M	P62	DMD	12 ans	M
P11	BMD	15 ans	M	P63	BMD	10 ans	M
P12	BMD	20 ans	M	P64	DMD	11 ans	M
P13	DMD	9 ans	M	P65	BMD	22 ans	M
P14	BMD	13 ans	M	P66	DMD	13 ans	M
P15	BMD	13 ans	M	P67	DMD	17 ans	M
P16	BMD	22 ans	M	P68	DMD	11 ans	M
P17	BMD	18 ans	M	P69	BMD	30 ans	M
P18	DMD	8 ans	M	P70	BMD	18 ans	M
P19	DMD	6 ans	M	P71	BMD	20 ans	M
P20	DMD	10 ans	M	P72	BMD	9 ans	M
P21	DMD	9 ans	M	P73	BMD	33 ans	M
P22	BMD	11 ans	M	P74	DMD	14 ans	M
P23	BMD	20 ans	M	P75	DMD	13 ans	M
P24	DMD	15 ans	M	P76	BMD	21 ans	M
P25	DMD	14 ans	M	P77	BMD	15 ans	M
P26	DMD	9 ans	M	P78	BMD	20 ans	M
P27	DMD	10 ans	M	P79	BMD	23 ans	M
P28	BMD	20 ans	M	P80	DMD	12 ans	M
P29	BMD	22 ans	M	P81	BMD	19 ans	M
P30	BMD	14 ans	M	P82	BMD	16 ans	M
P31	BMD	21 ans	M	P83	BMD	14 ans	M
P32	DMD	7 ans	M	P84	DMD	10 ans	M
P33	BMD	12 ans	M	P85	BMD	17 ans	M
P34	DMD	7 ans	M	P86	BMD	15 ans	M
P35	DMD	13 ans	M	P87	BMD	21 ans	M
P36	DMD	4 ans	M	P88	BMD	16 ans	M
P37	BMD	25 ans	M	P89	DMD	11 ans	M
P38	DMD	12 ans	M	P90	BMD	10 ans	M
P39	BMD	34 ans	M	P91	BMD	15 ans	M
P40	DMD	14 ans	M	P92	BMD	18 ans	M
P41	BMD	15 ans	M	P93	DMD	13 ans	M
P42	BMD	19 ans	M	P94	BMD	15 ans	M
P43	DMD	9 ans	M	P95	DMD	10 ans	M
P44	BMD	13 ans	M	P96	DMD	10 ans	M
P45	DMD	15 ans	M	P97	BMD	20 ans	M
P46	BMD	31 ans	M	P98	BMD	13 ans	M
P47	BMD	15 ans	M	P99	DMD	12 ans	M
P48	BMD	12 ans	M	P100	BMD	11 ans	M
P49	DMD	8 ans	M	P101	BMD	23 ans	M
P50	BMD	10 ans	M	P102	DMD	12 ans	M
P51	DMD	11 ans	M	P103	DMD	8 ans	M
P52	BMD	16 ans	M				

**c. Mode opératoire**

1. Prélever 10 ml de sang total dans un tube avec anticoagulant.
2. Transférer le sang dans un tube de 50 ml.
3. Compléter à 40 ml avec la solution SLR, puis mettre les tubes dans la glace pendant 20 min.
4. Centrifuger à 3.000 tpm pendant 10 min, puis éliminer le surnageant constitué de globules rouges lysés.
5. Répéter les deux précédentes étapes jusqu'à obtention d'un culot blanc.
6. Resuspendre le culot constitué de globules blancs dans 9 ml de solution SLB, puis ajouter 1 ml de SDS 10% et 50 µl de Protéinsae K (20 mg/ml).
7. Incuber durant toute une nuit à 37°C sous agitation.
8. Ajouter le Phénol:Chloroforme:Isoamyl alcool (25:24:1) Volume/Volume et homogénéiser par retournement pendant 5 min.
9. Centrifuger à 3.000 tpm pendant 15 min.
10. Transférer la phase supérieure dans un nouveau tube, puis ajouter le Chloroforme Volume/Voiume et homogénéiser par retournement pendant 5 min.
11. Centrifuger à 3.000 tpm pendant 15 min, et transférer la phase supérieure dans un nouveau tube.
12. Ajouter 2.5 Volumes d'Ethanol 100% et du NaCl à une concentration finale de 0.3 M.
13. Agiter délicatement par retournement jusqu'à apparition de la méduse d'ADN
14. Récupérer la méduse avec une pipette Pasteur et la transférer dans un microtube de 1.5 ml.
15. Laver avec 1 ml d'Ethanol 70%, deux à trois fois.
16. Sécher l'ADN à température ambiante.
17. Resuspendre l'ADN dans du tampon TE.
18. Conserver à +4°C.

**II.1.2. Extraction d'ADN génomique total à partir de sang périphérique par la méthode de relarguage salin ("salting out")****a. Principe**

La méthode de relarguage salin ("salting out") se base sur la propriété qu'a une concentration saline à très forte molarité de précipiter une grande partie des débris générés par la lyse de la cellule. L'étape subséquente de précipitation de l'ADN par de l'éthanol permet alors de précipiter l'ADN [Sambrook *et al.*, 1989].

**b. Solutions**

- Solution de lyse des globules rouges (SLR) (10 mM Tris, pH 7.6, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaCl).

- Solution de lyse des globules blancs (SLB) (10 mM Tris, pH 7.6, 10 mM EDTA, pH 8.0, 10 mM NaCl).
- SDS 10% (Sigma<sup>®</sup>) (détergent anionique).
- Protéinase K (20 mg/ml) (Sigma<sup>®</sup>) (protéase ayant une forte activité protéolytique et clivant les liaisons peptidiques entre les acides aminés).
- NaCl 6 M.
- Ethanol 100% (Sigma<sup>®</sup>).
- Ethanol 70%.
- Tampon TE (10 mM Tris, pH 7.6, 1 mM EDTA, pH 8.0).

### c. Mode opératoire

1. Prélever 10 ml de sang total dans un tube avec anticoagulant.
2. Transférer le sang dans un tube de 50 ml.
3. Compléter à 40 ml avec la solution SLR, puis mettre les tubes dans la glace pendant 20 min.
4. Centrifuger à 3.000 tpm pendant 10 min, puis éliminer le surnageant constitué de globules rouges lysés.
5. Répéter les deux précédentes étapes jusqu'à obtention d'un culot blanc.
6. Resuspendre le culot constitué de globules blancs dans 9 ml de solution SLB, puis ajouter 1 ml de SDS 10% et 50 µl de Protéinase K (20 mg/ml).
7. Incuber durant toute une nuit à 37°C sous agitation.
8. Ajouter 1 ml de NaCl 6 M et agiter vigoureusement pendant 15 sec.
9. Centrifuger à 3.000 tpm pendant 15 min à 4°C.
10. Transférer le surnageant dans un tube de 50 ml.
11. Ajouter 2.5 Volumes d'Ethanol 100% et mélanger doucement par retournement jusqu'à apparition de la méduse d'ADN.
12. Récupérer la méduse avec une pipette Pasteur et la transférer dans un microtube de 1.5 ml.
13. Laver la méduse avec 1 ml d'Ethanol 70% puis éliminer l'éthanol.
14. Laisser sécher l'ADN à température ambiante.
15. Resuspendre l'ADN dans du tampon TE.
16. Conserver à +4°C.

### II.1.3. Extraction d'ADN génomique total à l'aide du kit QIAamp DNA Mini Kit<sup>®</sup> (Qiagen<sup>®</sup>)

#### a. Principe

Le kit d'extraction QIAamp DNA Mini Kit<sup>®</sup> (Qiagen<sup>®</sup>) permet l'extraction et la purification de l'ADN génomique à partir de prélèvements cliniques ou biologiques, entre autres le sang périphérique total. Il est basé sur l'utilisation de tampons optimums pour lyser complètement le prélèvement et augmenter l'adsorption sélective des acides nucléiques sur une membrane dans une colonne composée de surfaces de silices (SiO<sub>2</sub>) ayant une

remarquable affinité pour l'ADN. Après addition d'alcool, l'ADN est adsorbé par cette membrane, alors que les contaminants passent à travers. Les inhibiteurs, tout comme les cations divalents et les protéines, sont complètement éliminés par deux lavages successifs. L'ADN est alors décroché de cette matrice par élution dans un tampon adéquat.

## **b. Solutions**

- Tampon de lyse AL<sup>®</sup> (Qiagen<sup>®</sup>)
- Protéinase K (10 mg/ml) (Qiagen<sup>®</sup>)
- Ethanol 100% (Sigma<sup>®</sup>)
- Tampon de lavage AW1<sup>®</sup> (Qiagen<sup>®</sup>)
- Tampon de lavage AW2<sup>®</sup> (Qiagen<sup>®</sup>)
- Tampon TE (10 mM Tris, pH 7.6, 1 mM EDTA, pH 8.0).

## **c. Mode opératoire**

1. A l'échantillon <sup>(\*)</sup>, rajouter 200 µl de tampon de lyse AL<sup>®</sup>.
2. Rajouter 20 µl de Protéinase K et vortexer pendant 15 sec.
3. Incuber à 65°C pendant 1 heure.
4. Rajouter 200 µl d'Ethanol 100% et vortexer.
5. Déposer le mélange dans une colonne disposée sur un tube de collecte et centrifuger à 10.000 tpm pendant 1 min.
6. Placer la colonne sur un nouveau tube de collecte, y rajouter 500 µl de tampon de lavage AW1<sup>®</sup> et centrifuger à 10.000 tpm pendant 1 min.
7. Placer la colonne sur un nouveau tube de collecte, y rajouter 500 µl de tampon de lavage AW2<sup>®</sup> et centrifuger à 10.000 tpm pendant 3 min.
8. Placer la colonne sur un microtube de 1.5 ml, y rajouter 200 µl de tampon TE, laisser incuber pendant 5 min à température ambiante et centrifuger à 10.000 tpm pendant 1 min

<sup>(\*)</sup> L'échantillon utilisé peut être 200 µl de sang périphérique total ou 200 µl d'un culot de globules blancs resuspendus dans de l'eau distillée.

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

### **a. Principe**

Deux méthodes principales pour estimer la quantité et la qualité de l'ADN sont utilisées [Sambrook *et al.*, 1989] :

- La spectrophotométrie : L'acide nucléique et la plupart des macromolécules biologiques étant incolores, elles ne manifestent aucune absorption dans la gamme visible du spectre. En revanche, l'ADN montre une absorbance aux rayons ultraviolets (UV) spécifique, avec un maximum à 260 nm et un minimum à 230 nm. La quantité de radiation ultraviolette

absorbée par une solution d'ADN étant directement proportionnelle à la quantité d'ADN contenue dans l'échantillon, le spectrophotomètre à ultraviolet est donc utilisé pour quantifier l'ADN, tandis que la qualité de l'extrait est évaluée en calculant la contamination par les protéines et l'ARN.

- L'électrophorèse sur gel d'agarose : C'est une méthode d'analyse et/ou de purification de l'ADN au cours de laquelle des échantillons d'acides nucléiques sont déposés dans un gel d'agarose immergé dans un tampon (TAE ou TBE) et mis à migrer sous l'effet d'un champ électrique (l'ADN étant un polyanion). Le gel agit comme un tamis moléculaire laissant passer plus facilement les petits fragments. L'ADN est visualisé en ajoutant du bromure d'éthidium qui fluoresce en s'intercalant entre les bases d'ADN. La vitesse de migration dépend, entre autres, de la taille de la molécule d'ADN. On peut ainsi, en utilisant les marqueurs de taille ("ladders") adéquats, déterminer la taille des molécules ou des fragments présents dans un échantillon.

Dans le cadre de notre travail, nous avons quantifié et estimé la qualité des ADN par électrophorèse sur gel d'agarose.

## **b. Solutions**

- Tampon TBE (Tris-Borate-EDTA) 1x (89 mM Tris, 89 mM Acide borique, 2 mM EDTA, pH 8.0).
- Bromure d'éthidium (10 mg/ml) (Sigma<sup>®</sup>).
- Bleu de dépôt (0.05% Bleu de bromophénoI, 60% Glycérol).
- ADN  $\lambda$  (50 ng/ $\mu$ l) (Pharmacia<sup>®</sup>) (utilisé pour réaliser une gamme permettant d'évaluer la concentration de l'ADN extrait).

## **c. Mode opératoire**

1. Préparer un gel d'agarose à 0.8% dans du tampon TBE 1x supplémenté de bromure d'éthidium à une concentration finale de 0.5  $\mu$ g/ml.
2. Préparer les échantillons :
  - 1  $\mu$ l d'ADN génomique
  - + 3  $\mu$ l de Bleu de dépôt
  - + 6  $\mu$ l d'H<sub>2</sub>O
3. Préparer une gamme de concentration d'un ADN  $\lambda$  à 100, 200 et 400 ng.
4. Déposer échantillons et gamme de concentration dans les puits, puis laisser migrer à 100 V pendant 30 min.
5. Révéler l'ADN par exposition du gel sous rayons UV.

## II.3. Recherche par PCRs multiplexes de délétions intragéniques dans le gène *DMD*

### II.3.1. PCRs multiplexes ciblant le gène *DMD*

#### a. Principe

La PCR ("Polymerase Chain Reaction" ou Réaction de Polymérisation en Chaîne) permet d'obtenir un grand nombre de copies d'un segment particulier d'ADN, nommé ADN cible en utilisant deux amorces, courtes séquences d'ADN (18-24 nucléotides), qui s'hybrident en des sites complémentaires situés en orientation inversée sur les deux brins de l'ADN et qui encadrent la région que l'on veut amplifier. L'élongation des brins complémentaires à partir des amorces est alors assurée par une enzyme de polymérisation thermorésistante, la *Taq* polymérase dérivée d'une bactérie thermophile *Thermus aquaticus* et qui présente la propriété d'être stable à la chaleur [Mullis *et al.*, 1994].

La réaction PCR se déroule en un nombre répété de cycles (25-40), eux-mêmes composés de trois étapes généralement:

- une dénaturation de l'ADN à haute température (15-60 sec à 95-96°C) conduisant à la séparation des deux brins d'ADN.
- une hybridation des amorces spécifiques à une température dépendant de la composition nucléotidique des amorces et de leur longueur (15-60 sec à 50-65°C).
- une élongation des brins d'ADN, effectuée à 72°C pendant 15 sec-2 min selon la taille de la séquence à amplifier.

La PCR multiplexe est une variante de la PCR classique décrite ci-dessus, consistant à amplifier simultanément plusieurs régions différentes de l'ADN en utilisant les couples d'amorces correspondants.

Compte tenu des conditions d'amplification précises qui caractérisent ces amplifications simultanées, une telle approche se révèle être très complexe, mais d'une très grande utilité lorsque l'on veut explorer un gène d'une grande taille ou composé d'une multitude d'exons, comme cela est le cas pour le gène *DMD* (79 exons).

#### b. Solutions

- Tampon PCR (10x, Roche®)
- MgCl<sub>2</sub> (25 mM, Roche®)
- dNTPs (mélange équimolaire de dATP, dTTP, dGTP, dCTP, à 10 mM chacun, Roche®)
- Amorces sens et reverse (Eurgentec®, voir plus loin)
- *Taq* polymérase (5 U/μl, Roche®)

### c. Mode opératoire

L'exploration des dystrophinopathies pour la recherche de délétions intragéniques dans le gène DMD s'appuie sur l'observation que deux hot spots mutationnels, dénommés Xj et P20, rendent compte d'une grande partie (~90%) de ces altérations moléculaires [Leturcq et Kaplan, 2005].

Deux PCRs multiplexes indépendantes ciblent donc ces deux sites, permettant d'explorer en globalité 19 exons: la PCR multiplexe de Chamberlain *et al.* (1988) et la PCR multiplexe de Beggs *et al.* (1990).

La PCR multiplexe de Chamberlain *et al.* (1988) permet d'amplifier simultanément les régions comprenant les exons 4, 8, 12, 17, 19, 44, 45, 46, 48 et 51, alors que la PCR multiplexe de Beggs *et al.* (1990) permet d'amplifier en même temps les régions comprenant le promoteur musculaire PM et les exons 3, 6, 13, 43, 47, 50, 52 et 60.

1. Chacune des deux PCRs multiplexes a été réalisée dans un volume total de 50 µl contenant :
  - 250 ng d'ADN génomique
  - 1.5 mM de dNTPS
  - 25 pmol de chacune des amorces (sens et reverse) selon le pool
  - 6.7 mM de MgCl<sub>2</sub>
  - 5 U de Taq polymerase
  - un tampon d'amplification 1x final
2. Les réactions PCR ont été réalisées dans un thermocycler programmé pour exécuter le profil suivant :
 

PCR de Chamberlain <i>et al.</i> (1988)	- 94°C, 7 min - [ 94°C, 30 sec - 53°C, 30 sec - 65°C, 4 min ] 23x - 65°C, 7 min - 4°C, infini
PCR de Beggs <i>et al.</i> (1990)	- 94°C, 7 min - [ 94°C, 30 sec - 53°C, 30 sec - 65°C, 4 min ] 25x - 65°C, 10 min - 4°C, infini

### II.3.2. Mise en évidence des profils d'amplification

#### a. Principe

Le contrôle des produits d'amplification sur gel d'agarose permet de s'assurer que la PCR s'est déroulée correctement, permettant ainsi d'apprécier : (i) qu'il y ait effectivement un produit d'amplification (dans notre protocole, 10 fragments pour la PCR multiplexe de Chamberlain *et al.* (1988) et 9 pour celle de Beggs *et al.* (1990)), (ii) que ces fragments aient

la taille attendue, (iii) qu'il n'y ait pas d'amplifications parasites ou de contaminants [Sambrook *et al.*, 1989].

#### **b. Solutions**

- Tampon TBE (Tris-Borate-EDTA) 1x (89 mM Tris, 89 mM Acide borique, 2 mM EDTA, pH 8.0).
- Bromure d'éthidium (10 mg/ml) (Sigma®).
- Bleu de dépôt (0.05% Bleu de bromophénol, 60% Glycérol).
- Marqueur de poids moléculaire 100-Base pair ladder (1 µg/ml) (Invitrogen®).

#### **c. Mode opératoire**

1. Préparer un gel d'agarose à 2.5% dans du tampon TBE 1x supplémenté de bromure d'éthidium à une concentration finale de 0.5 µg/ml.
2. Préparer les échantillons :
  - 30 µl de produit PCR
  - + 10 µl de Bleu de dépôt
3. Déposer les échantillons et le marqueur de poids moléculaire dans le gel et laisser migrer à 100 V pendant 3-4 heures.
4. Révéler les produits d'amplification par exposition du gel sous rayons UV.

### **II.4. Estimation de la taille et du poids moléculaire des protéines produites**

La bioinformatique, branche multidisciplinaire récente de la biologie, permet de disposer d'une quantité quasi-infinie de données biologiques, mais aussi et surtout d'analyser une information biologique à travers des outils simples ou complexes, sans cesse améliorés.

Dans notre travail, nous avons eu à utiliser un de ces outils simples, SMS Manipulation Suite (<http://www.bioinformatics.org/sms2/>) qui permet de manipuler des séquences, qu'elles soient nucléotidiques ou protéiques.

L'interface de ce logiciel permet notamment, à partir d'une séquence nucléotidique (dans notre cas, celui du gène *DMD*), d'en réaliser la traduction pour en générer une succession ordonnée d'acides aminés et estimer ainsi la taille de la protéine (en nombre d'acides aminés et en poids moléculaire).

Elle permet alors, selon ce même principe, d'estimer les mêmes paramètres pour une protéine mutée (tronquée ou pas) générée suite à une délétion intragénique affectant ce gène, comme cela était le cas pour les patients que nous avons exploré.

# **RESULTATS**

## I. Analyse des données cliniques et généalogiques

Lors de notre travail, qui s'est déroulé au courant des années 2010 et 2011, nous avons eu l'opportunité de disposer de plus d'une centaine de prélèvements sanguins (103) réalisés à partir de patients issus de familles indépendantes pour lesquels une suspicion clinique de dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) ou de Becker (BMD) avait été évoquée par leur médecin traitant au niveau des Services de Neurologie des Centres Hospitalo-Universitaires d'Alger Centre et de Ben Aknoun et de l'Etablissement Hospitalier Spécialisé Ali Aït Idir, et qui nous avaient été dès lors adressés pour explorations moléculaires.

Etant donné que le but de nos analyses était d'explorer au plan moléculaire un panel au minimum d'une centaine de patients DMD/BMD en vue d'essayer de mettre en évidence une éventuelle corrélation phénotype-génotype, et ce à travers la recherche d'altérations moléculaires au sein du gène *DMD* codant la dystrophine et responsable de ces deux types de dystrophies, notre premier souci fut d'abord d'être conforté dans la certitude du diagnostic de dystrophinopathie (DMD ou BMD) soulevé par les médecins traitants.

Au fur et à mesure du recrutement des malades, nous n'avons ainsi retenu dans notre étude que ceux pour lesquels un diagnostic clinique précis DMD ou BMD était mentionné, en excluant ceux pour lesquels une étiquette clinique plus large de dystrophie musculaire progressive (DMP) avait été suspectée.

Malgré la quantité d'informations cliniques limitée dont nous disposions à propos de nos patients, nous avons tout de même pu nous assurer que seuls des individus de sexe masculin nous avaient été adressés, une condition nécessaire et en accord avec un mode de transmission récessif et lié et chromosome X qui caractérise les dystrophies musculaires de Duchenne/Becker.

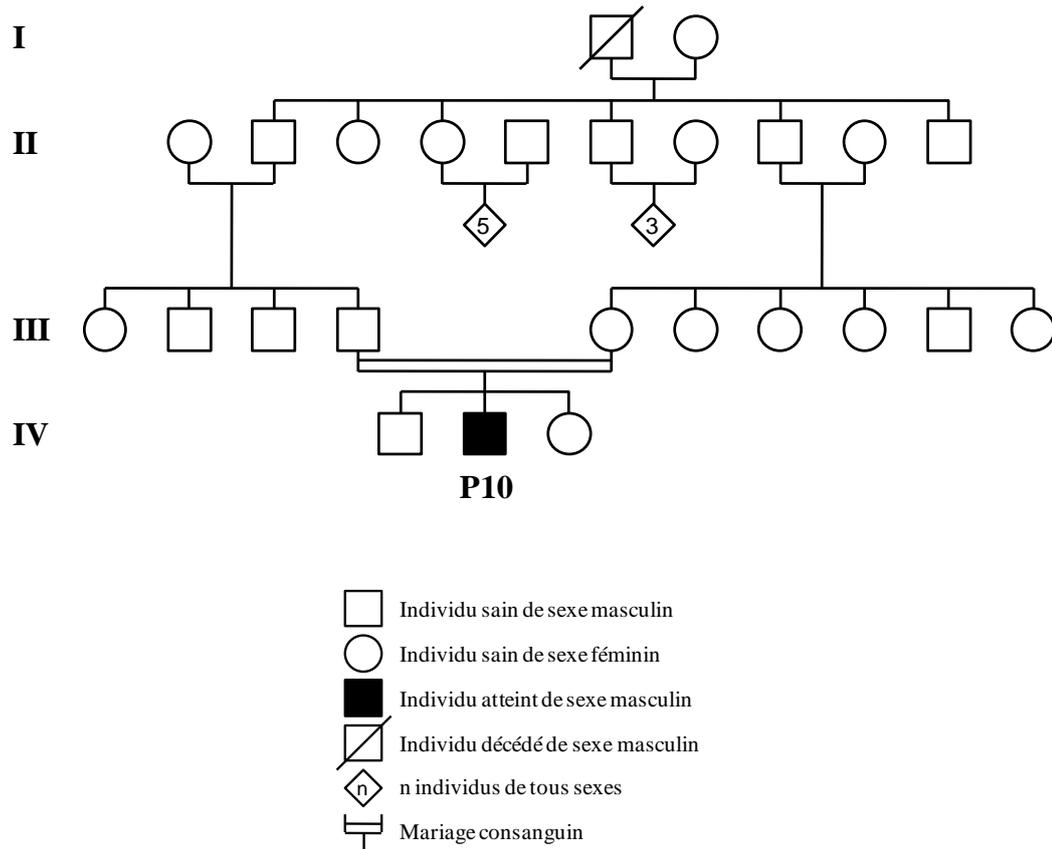
D'autre part, le questionnaire établi lors des consultations au niveau des services hospitaliers ne mentionnant pas une atteinte des parents, ni celle d'autres membres des fratries (sœurs principalement), constituait autant d'arguments signant un mode effectivement récessif et lié au chromosome X de la maladie qui ségrégeait dans les différentes familles d'où étaient issus les patients étudiés, bien que nous ne puissions toutefois pas totalement exclure que certains malades puissent constituer des cas d'atteinte de *novo* et faisant alors que la maladie qui les affecte est à transmission dominante (qu'elle soit autosomique ou liée au chromosome X).

A titre d'exemple, nous illustrerons nos affirmations par un des arbres généalogiques (**Figure 16**) dont nous disposions pour l'un de nos patients (P10) qui individualise bien :

(i) une atteinte horizontale, alors limitée à une fratrie et sans antécédents au cours des générations antérieures

(ii) une atteinte exclusive du sexe masculin, garçon lui-même issu de parents non atteints

(iii) l'absence d'une transmission père-fils.



**Figure 16.** Arbre généalogique de la famille du patient P10, âgé de 32 ans et de phénotype clinique BMD (dystrophie musculaire de Becker). I, II, III, IV, numéro de génération.

En tout état de cause, nous avons ainsi posé comme postulat de départ que tous les patients, objets de notre étude, avaient bien une atteinte de type dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) ou Becker (BMD), ce qui suggérait qu'ils porteraient des altérations moléculaires au sein du gène *DMD*, responsable de ces deux types de dystrophinopathies.

A nos grands regrets, aucune analyse para-clinique : biochimique (dosage de créatine kinase sérique, CK), électromyographique ou histologique n'était disponible, faute de leur conduction en routine au niveau des structures nous ayant adressé les prélèvements.

Ceci étant, ces tests n'auraient au mieux que permis de mettre en évidence une atteinte musculaire au niveau cellulaire, comme auraient pu le montrer des coupes histologiques du muscle touché, ou des anomalies au niveau de l'électromyogramme, ou un taux de CK élevé, sans que ces résultats puissent cependant d'une quelconque manière nous orienter vers un type particulier de dystrophie musculaire progressive, surtout l'on connaît la très grande hétérogénéité clinique, elle-même sous-tendue par une grande hétérogénéité génétique, qui caractérise ce type d'affections.

Bien que l'âge des patients dont nous disposions ne constituait pas l'âge de début d'apparition des symptômes de la maladie, ce qui nous aurait certainement orienté quant au diagnostic clinique évoqué, la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) étant à manifestation très précoce avec une issue fatale survenant au cours de la deuxième/troisième décennie, comparativement à la dystrophie musculaire de Becker (BMD), plus tardive et n'affectant pas systématiquement le pronostic vital, nous avons tout de même pris avantage de la disponibilité de ces âges considérés comme âges de première consultation pour essayer d'en dégager une information différentielle DMD/BMD.

L'âge moyen des 103 patients de notre panel était de  $14,6 \pm 4,7$  ans, un âge compatible avec les deux formes de dystrophinopathies si l'on considère que cet âge traduit le moment auquel le patient subit des gênes musculaires telles qu'elles l'amènent à consulter, sans omettre de souligner une période d'errance à laquelle le malade a peut-être été confronté jusqu'à aboutir dans un service spécialisé où la consultation a enfin pu poser un diagnostic adéquat.

Sur l'ensemble de nos malades, 44 (soit 42,72%) avaient un phénotype clinique de DMD, contre 59 (soit 57,28%) de BMD, un déséquilibre en faveur de la dystrophie musculaire de Becker que l'on pourrait simplement expliquer à ce stade de nos analyses par une occurrence plus fréquente de cette forme de dystrophinopathie, ou alors en raison de la létalité de la forme sévère de Duchenne qui fait que la forme atténuée de Becker se retrouve plus fréquemment chez les individus de sexe masculin alors en vie.

Pour ce qui concerne l'âge moyen des patients de chacune des deux catégories DMD et BMD, il était de  $9,5 \pm 2,6$  ans dans le premier cas et de  $17,8 \pm 4,5$  ans dans le deuxième, individualisant ainsi une atteinte durant la première décennie dans le cas de la DMD et durant la

deuxième décade dans le cas de la BMD, tout au moins pour ce qui concerne notre panel de patients.

Ces observations semblent tout à fait compatibles avec les données cliniques décrites pour ces deux affections alléliques, soit une précocité et une sévérité de l'atteinte musculaire chez nos malades DMD, par contraste avec des manifestations plus tardives dans le cas de ceux BMD, bien que, nous le soulignerons encore, ces âges devraient être considérés avec précaution étant donné qu'ils ne rendent compte que de l'âge des patients au moment des explorations cliniques et non du début d'apparition des symptômes de la maladie.

## II. Extraction d'ADN génomique total à partir de sang périphérique

Nous avons eu à extraire les acides nucléiques dont nous avons besoin à partir du sang périphérique des patients à travers trois protocoles différents, le premier étant la méthode au phénol-chloroforme, le deuxième celle du relarguage salin ("salting-out") et, enfin, le troisième celle d'un kit d'extraction QIAamp DNA Mini Kit<sup>®</sup> (Qiagen<sup>®</sup>).

Nous ne nous attarderons nullement sur le principe propre à chaque méthode d'extraction, mais soulignerons par contre les caractéristiques propres à chacune d'elles et mettrons en avant les avantages et inconvénients de chacune dans le cadre du protocole d'analyses diagnostique que nous avons à conduire.

En effet, la méthode au phénol-chloroforme est un protocole opératoire qui nous permet de générer un acide nucléique d'une grande pureté. C'est d'ailleurs la méthode de choix lorsque l'on veut disposer d'ADN apte à être utilisé dans n'importe quelle technique de biologie moléculaire. Il faut toutefois noter que c'est une technique longue, délicate et fastidieuse, comparativement aux deux autres méthodes, avec de surcroît l'utilisation d'un produit toxique pour l'expérimentateur, le phénol-chloroforme, dont la manipulation nécessite de travailler dans des conditions contraignantes et dont l'élimination en temps que déchet doit être soumise à des conditions particulières (contenants adéquats et incinération, notamment).

La technique d'extraction par relarguage salin ("salting-out") réunit quand à elle les avantages de la rapidité et de la simplicité de son exécution avec un minimum d'étapes, l'utilisation d'un nombre restreint et non toxique de réactifs, faisant ainsi que cette méthode se révèle être moins onéreuse. D'autre part, son exécution fait qu'elle permet d'obtenir des acides nucléiques en quantité appréciable, avec l'inconvénient que cet ADN est pourtant de qualité moindre si l'on s'en réfère à celui obtenu par la méthode au phénol-chloroforme. Cette dernière propriété est à prendre en considération lorsque l'on sait que quelques techniques très fines de biologie moléculaire sont extrêmement sensibles à la qualité de l'ADN (analyses génomiques globales, microarrays, ...), voire, comme cela est le cas dans notre travail, la réalisation d'amplifications géniques délicates et fortement tributaires de la source d'ADN matriciel de départ.

Nous avons fort heureusement pu montrer que tous les ADN<sub>s</sub> extraits par la technique de relarguage salin s'adaptèrent pleinement aux analyses moléculaires que nous voulions accomplir.

D'autre part, au gré du déroulement de nos analyses moléculaires, nous avons parfois eu à extraire de l'ADN à partir de sang total en fonction de la quantité initiale de ce matériel source, puisque parfois l'âge des patients n'avait pas permis d'obtenir suffisamment de ce liquide biologique sur tube avec anticoagulant, soit dans certains cas à peine 1 ml de sang. Cette contrainte nous exposait ainsi à un échec d'obtention d'ADN génomique total, alors même que cette étape conditionnait totalement la réalisation du protocole opératoire subséquent.

L'opportunité d'avoir disposé du kit d'extraction QIAamp DNA Mini Kit<sup>®</sup> (Qiagen), réputé extrêmement performant, nous a alors permis d'accomplir cette première étape cruciale avec succès dans tous les cas, d'autant qu'il offrait également la possibilité de réaliser nos extractions d'ADN directement sur du sang total, sans devoir disposer au préalable de globules blancs seuls.

Cette propriété intrinsèque du kit d'extraction utilisé nous a ainsi permis de parer aux contraintes de disponibilité du précieux liquide biologique qui nous était parfois adressé par les divers médecins traitants des centres hospitaliers, étant donné que l'étape de lyse des globules rouges pouvait ainsi être levée, minimisant ainsi au maximum les pertes de globules blancs que cette étape pouvait occasionner.

D'autre part, bien qu'une extraction réalisée directement sur du sang total permettait d'obtenir de l'ADN avec un rendement inférieur, comparativement à une extraction effectuée uniquement sur des globules blancs, nous avons toutefois pu ultérieurement montrer que cela n'affectait en rien les étapes ultérieures d'analyses moléculaires basées sur la PCR.

Le kit d'extraction que nous avons utilisé, d'ailleurs au même titre que tous les divers types de kits d'extraction, est d'une extrême fiabilité, permettant d'aboutir facilement et rapidement à un ADN de très bonne qualité, en quantité suffisante et directement accessible aux analyses de biologie moléculaire. Ces kits permettent ainsi le plus souvent de disposer d'un ADN directement resuspendu dans un tampon, contrairement aux deux méthodes que sont les extractions au phénol-chloroforme ou par relarguage salin qui, elles, nécessitent un certain temps (quelques jours) avant que l'ADN ne soit entièrement resuspendu.

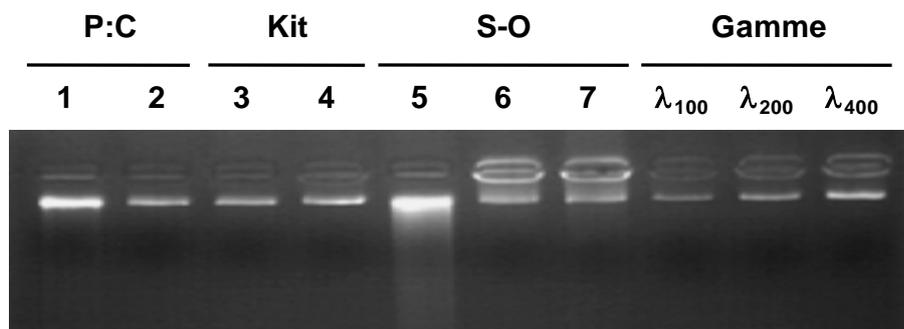
Un des inconvénients majeurs des kits d'extraction reste toutefois leur disponibilité, largement tributaire des firmes qui les commercialisent, mais surtout leur coût extrêmement élevé.

Il faudra toutefois souligner que la méthode d'extraction d'ADN génomique total à partir de sang périphérique par relarguage salin se révèle être d'une grande souplesse et d'une grande adaptabilité, offrant l'opportunité d'utiliser une variabilité de sels pour la précipitation

des méduses d'ADN (chlorure de sodium, ammonium acétate, potassium acétate, ...), aussi bien que de détergents pour lyser les globules blancs (SDS, Tween, ...).

A titre simplement illustratif, la **Figure 17** montre quantité et qualité des ADNs pour quelques uns de nos patients, profils obtenus après électrophorèse sur gel d'agarose 0,8% d'1  $\mu$ l de suspension d'ADN en présence d'une gamme de concentration d'un ADN contrôle lambda à 100, 200 et 400 ng, et ce selon les trois méthodes d'extraction utilisées : méthode au phénol-chloroforme (puits 1 et 2), avec le kit d'extraction (puits 3 et 4) et par relargage salin (puits 5, 6 et 7). Ce gel atteste ainsi d'extraits de bonne qualité en raison de bandes uniques, intenses et non dégradées, en sus de quantités suffisamment importantes, critères qui permettaient de nous conforter dans la réalisation de la suite de nos explorations moléculaires.

Ce qui demeurait cependant le plus important était l'étape cruciale des amplifications géniques multiplexes, délicates et sensibles, et notre travail, comme nous le verrons plus loin, a montré que tous nos ADNs ont pu être traités avec succès, permettant d'obtenir des profils d'amplification pour l'ensemble des patients explorés.



**Figure 17.** Estimation de la concentration et de la qualité des ADNs génomiques totaux extraits par Phénol:Chloroforme (*P:C*) (échantillons 1 et 2), kit Qiagen® (*Kit*) (échantillons 3 et 4) et relargage salin (*S-O*) (échantillons 5, 6 et 7) après électrophorèse sur gel d'agarose 0.8% en présence de bromure d'éthidium (0.5  $\mu\text{g/ml}$ ). 1-7: ADNs génomiques extraits à partir des patients DMD/BMD;  $\lambda_{100}$ ,  $\lambda_{200}$ ,  $\lambda_{400}$ : Gamme de concentration (*Gamme*). Le sens de migration est haut > bas.

### III. Amplifications géniques par PCRs multiplexes de régions ciblées dans le gène *DMD*

La première étape de notre protocole diagnostique, nommément l'extraction de l'ADN génomique total à partir du sang périphérique des patients, étant la condition *sine qua none* qu'il nous fallait impérativement remplir, tant en quantité qu'en qualité, nous avons alors pu aborder plus sereinement la suite de notre travail, qui consistait alors à cribler le gène *DMD* responsable des dystrophinopathies DMD/BMD à la recherche d'altérations moléculaires qui y siègeraient.

En effet, les dystrophies musculaires de Duchenne (DMD) et de Becker (BMD) sont des formes alléliques de dystrophies et sont toutes deux dues à des altérations moléculaires dans un même gène, le gène *DMD*, qui code la protéine musculaire dystrophine, d'où d'ailleurs la dénomination de dystrophinopathies.

Le critère distinctif entre DMD et BMD est clinique, la première forme se caractérisant par une sévérité nettement plus prononcée et une apparition plus précoce de la symptomatologie que la seconde, d'où l'intérêt de nos investigations moléculaires dont le but était d'essayer de mettre en évidence une corrélation, avec l'espoir qu'elle soit différentielle.

Le gène *DMD* peut en fait être le siège de plusieurs types de mutations que l'on subdivise classiquement en trois grands groupes: des délétions intragéniques d'étendues plus ou moins larges, affectant un ou plusieurs exons et rendant compte d'environ 65-70% des mutations chez les patients DMD/BMD; des mutations de type duplications affectant des portions plus ou moins larges du gène *DMD* et représentant près de 5-10% des altérations chez malades; et, enfin, de petites mutations pouvant concerner la totalité de la séquence codante du gène, sans sites "hot-spot" particuliers, et comptant pour environ 20% des mutations [Chamberlain *et al.*, 1988; Beggs *et al.*, 1990; Dalkilic et Kunkel, 2003; Leturcq et Kaplan, 2005; Aartsma-Rus *et al.*, 2006; Deburgrave *et al.*, 2007].

En raison de son énorme taille, il est pourtant difficile et lourd d'explorer en totalité ce gène, d'où le choix de tester en priorité les altérations moléculaires les plus fréquemment rencontrées dans les deux types de dystrophies DMD et BMD, en l'occurrence les délétions intragéniques qui, d'un point de vue génomique, siègent préférentiellement en deux sites mutationnels "hot-spots", Xj et P20, regroupant à eux deux 90% des altérations délétionnelles intragéniques, englobant ainsi les exons 43 à 52 avec des points de cassure dans l'intron 44 pour le site P20, et des points de cassure fréquents dans l'intron 7 pour le site Xj) [Leturcq et Kaplan, 2005; Oshima *et al.*, 2009].

Nous avons pour notre part choisi de cibler spécifiquement ces deux sites en amplifiant plusieurs exons simultanément, à travers deux amplifications PCRs multiplexes, celle décrite par Chamberlain *et al.* (1988) (que l'on désignera PCR de Chamberlain) permettant d'amplifier les exons 4, 8, 12, 17, 19, 44, 45, 46, 48 et 51, et celle décrite par

Beggs *et al.* (1990) (qu'on nommera PCR de Beggs) permettant d'amplifier une région du promoteur musculaire PM et les exons 3, 6, 13, 43, 47, 50, 52 et 60.

Pour chacune de ces deux réactions d'amplification multiplexes, un profil normal se caractérisait par la présence du nombre de bandes attendues (soit 10 dans le cas de la PCR multiplexe de Chamberlain et 9 dans le cas de celle de Beggs), fragments dont la taille correspondait à celles indiquées en exemple et qui illustre la vérification de nos protocoles d'amplification à partir d'individus contrôles normaux (individus 1 à 10, pour les PCRs C1 à C10 de Chamberlain, et B1 à B10 de Beggs) (**Figure 18**). Ces gels obtenus après migration électrophorétique sur gel d'agarose 2,5% traduisent ainsi la présence des produits d'amplification attendus, à la bonne taille et sans aucune autre amplification parasite, de surcroît en quantité suffisante pour apprécier distinctement la présence/l'absence d'un amplificat.

En effet, l'absence de l'un ou plusieurs de ces produits d'amplification dans le panel de malades que nous voulions analyser nous indiquerait alors une délétion intragénique du ou des exons absents.

#### **IV. Mise en évidence de délétions intragéniques dans le gène *DMD* dans notre panel de malades**

Les amplifications par PCRs multiplexes (de Chamberlain et de Beggs) que nous avons obtenues pour l'ensemble de nos 103 patients a permis de montrer que 72 d'entre eux (soit environ 70% des malades) présentaient une délétion intragénique affectant au moins un des exons que nous avons ciblé (**Figures 19, 20, 21, 22, 23, 24 et 25; Tableau V**).

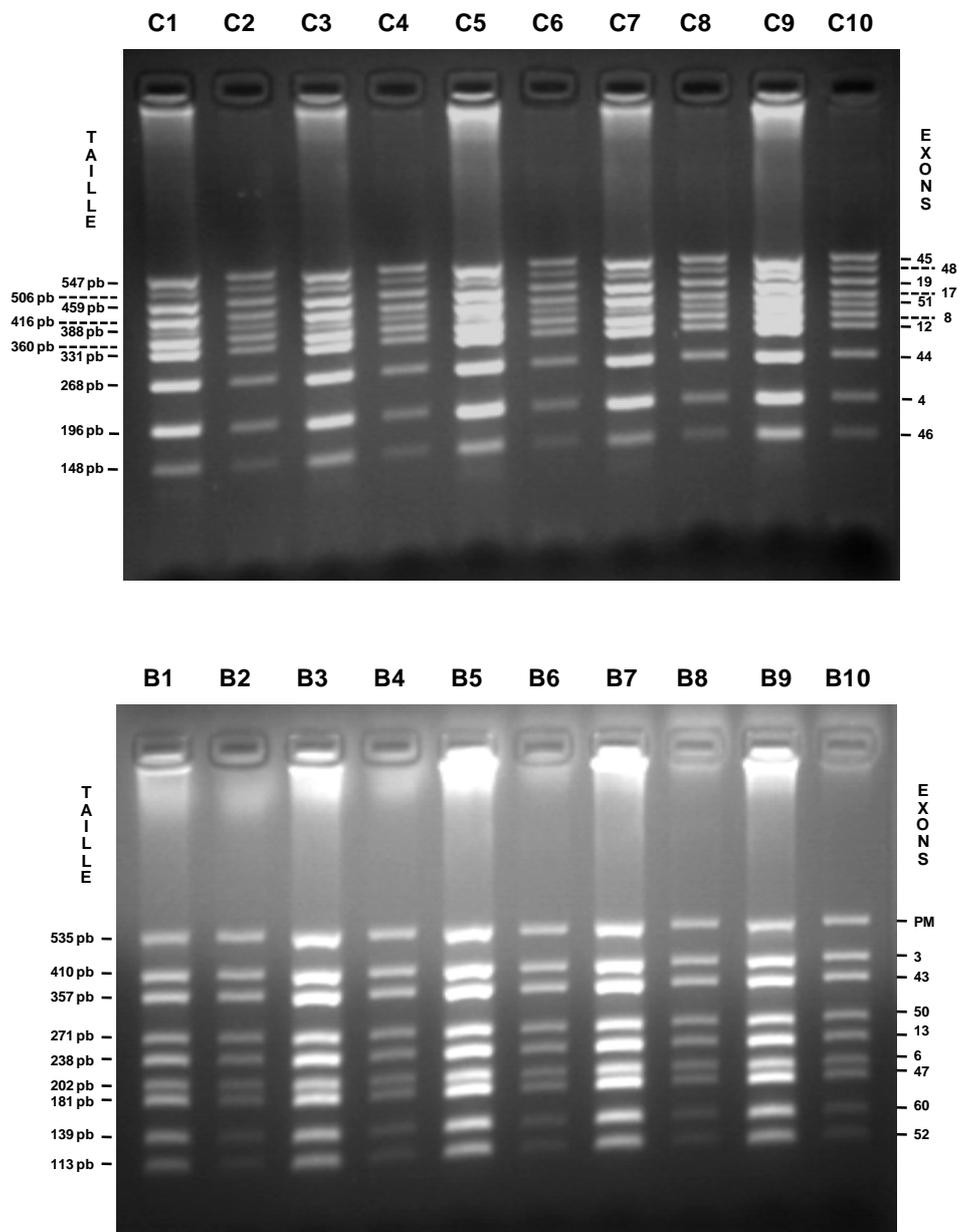
Sur ces 72 individus porteurs d'une délétion au sein du gène *DMD*, nous avons constaté que 38 (soit environ 37% sur l'ensemble des malades testés) avaient un phénotype de dystrophie musculaire de Duchenne (*DMD*) et 34 (approximativement 33% par rapport à l'ensemble des patients) celui de dystrophie musculaire de Becker (*BMD*), soit à peu près autant d'un type que de l'autre (ratio de patients mutés *DMD/BMD* de 1,1).

Ramenés au nombre d'individus mutés selon chaque type de dystrophie musculaire, ces chiffres étaient cependant assez différents, puisque dans notre panel, seuls 44 avaient un phénotype de Duchenne contre 59 pour celui de Becker : 86% patients avec suspicion clinique de *DMD* (38 sur 44) avaient effectivement une délétion d'au moins un exon dans le gène *DMD*, contre seulement 56% (34 sur 59) pour ceux *BMD*.

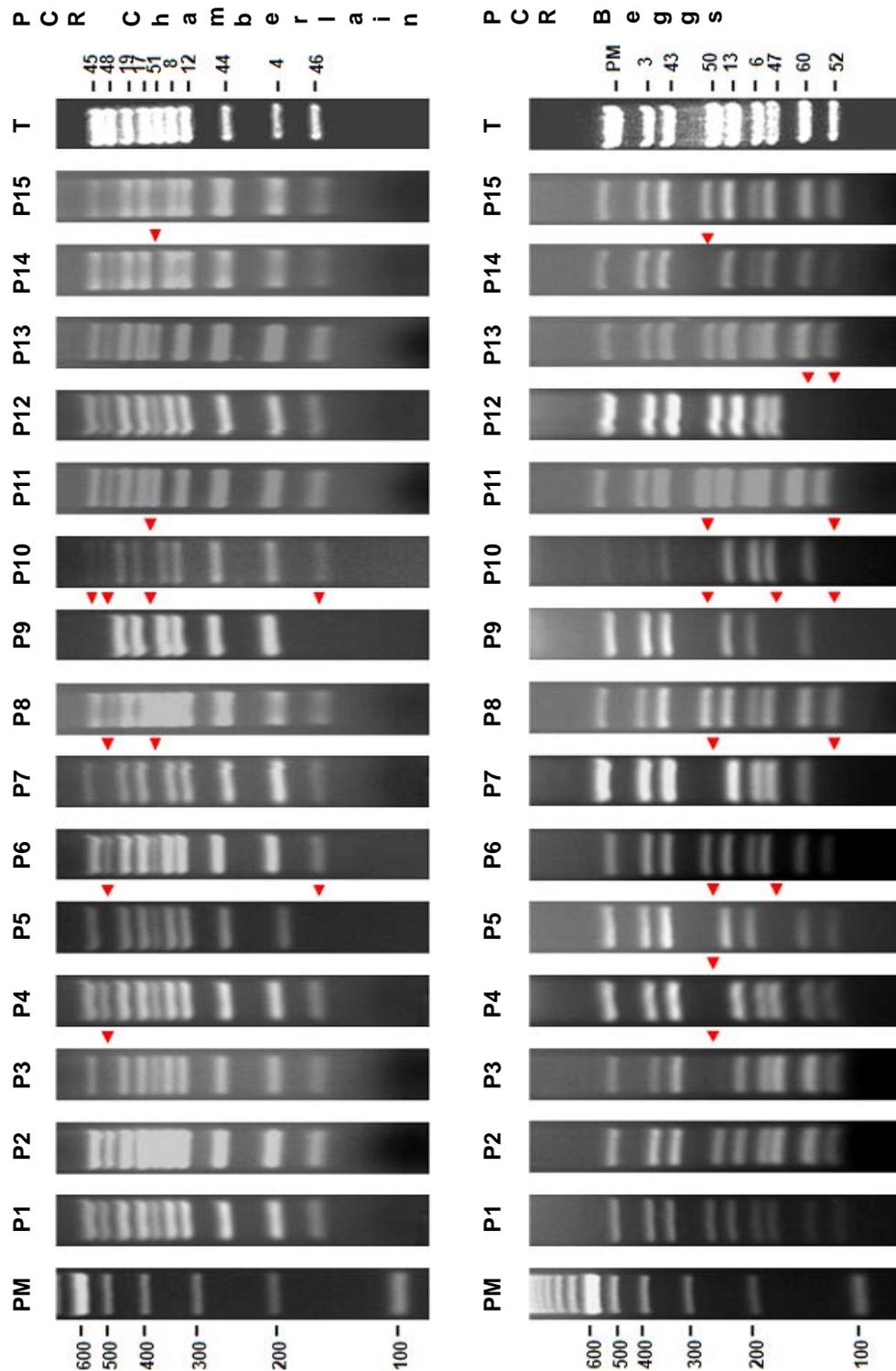
Du point de vue des âges moyens des patients présentant une délétion intragénique pour chacun de ces deux types de dystrophies musculaires, ils étaient de  $9,8 \pm 2,6$  ans pour les patients *DMD* et  $16,0 \pm 3,8$  ans pour les malades *BMD*, âges ne différant pas significativement de ceux calculés pour tous les patients avant analyse moléculaire ( $9,5 \pm 2,6$  ans pour *DMD* et  $17,8 \pm 4,5$  ans pour *BMD*), confirmant encore une atteinte suffisamment

invalidante au cours de la première décade pour les patients DMD et durant la deuxième décade dans le cas des malades BMD de notre panel.

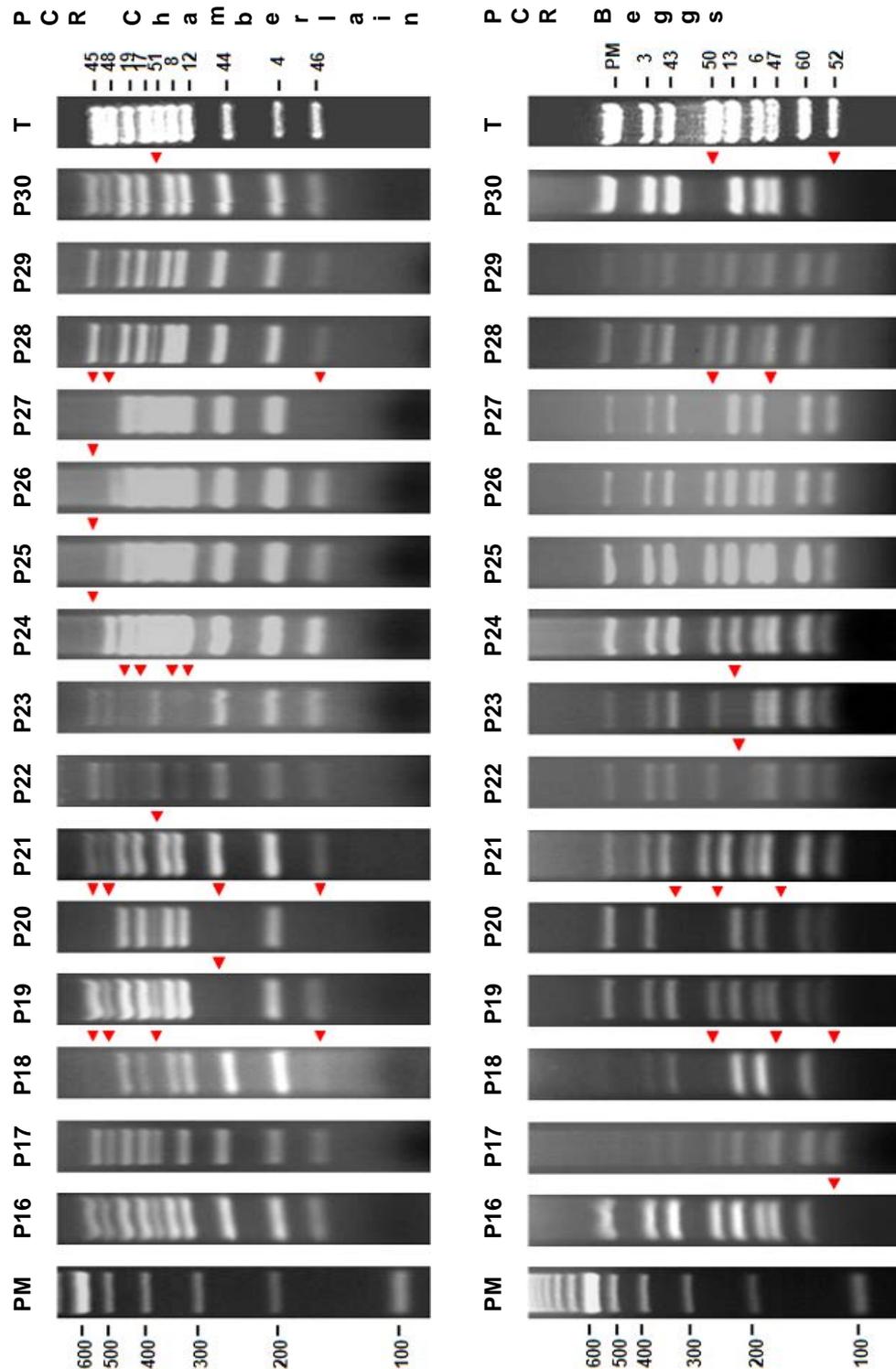
Quant aux 31 malades ne présentant pas de délétions intragéniques (soit P1, P2, P6, P8, P11, P13, P15, P17, P28, P29, P33, P37, P39, P41, P42, P45, P46, P59, P64, P65, P67, P71, P73, P75, P76, P79, P81, P84, P87, P97 et P100) (soit environ 30%), 6 avaient un phénotype DMD et 25 un diagnostic clinique BMD, soit quasiment 5 fois plus avec un tableau clinique BMD comparativement à une forme sévère DMD, des résultats qui peuvent trouver une explication dans le fait qu'un diagnostic pouvait être beaucoup plus facilement posé pour DMD que pour BMD en raison du tableau clinique plus frappant, d'où les chiffres que nous avons obtenus.



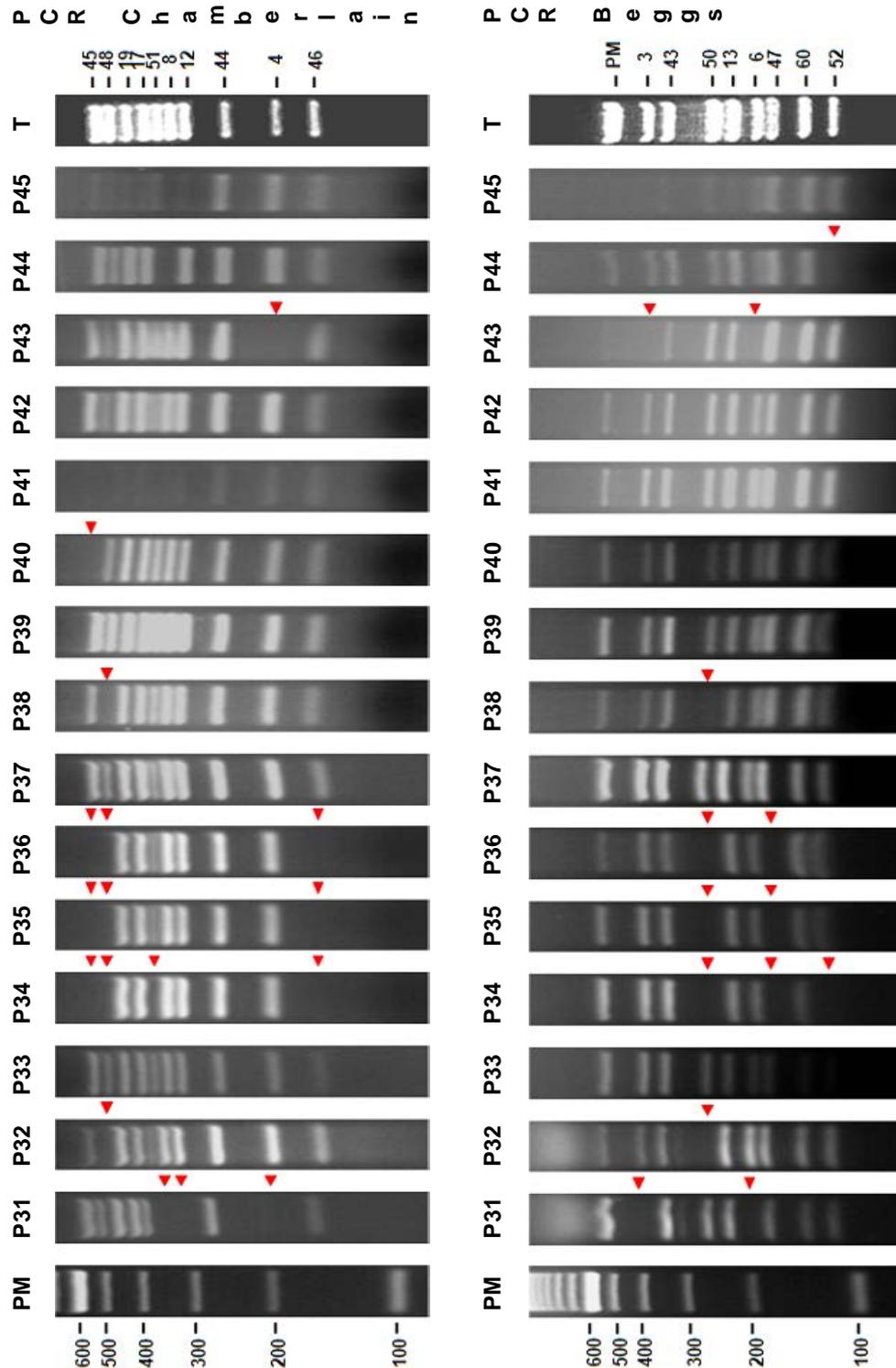
**Figure 18.** Profils d'amplification obtenus à partir de contrôles normaux après électrophorèse sur gel d'agarose 2.5% des produits des deux PCRs multiplexes de Chamberlain *et al.* (1988) (*en haut*) et de Beggs *et al.* (1990) (*en bas*). A droite de chaque gel sont indiqués les exons du gène *DMD* amplifiés. A gauche de chaque gel sont indiquées les tailles respectives des produits amplifiés (en pb); C1-10: produits d'amplification de la PCR de Chamberlain à partir d'individus contrôles 1-10; B1-10: produits d'amplification de la PCR de Beggs à partir d'individus contrôles 1-10. Le sens de migration est haut>bas.



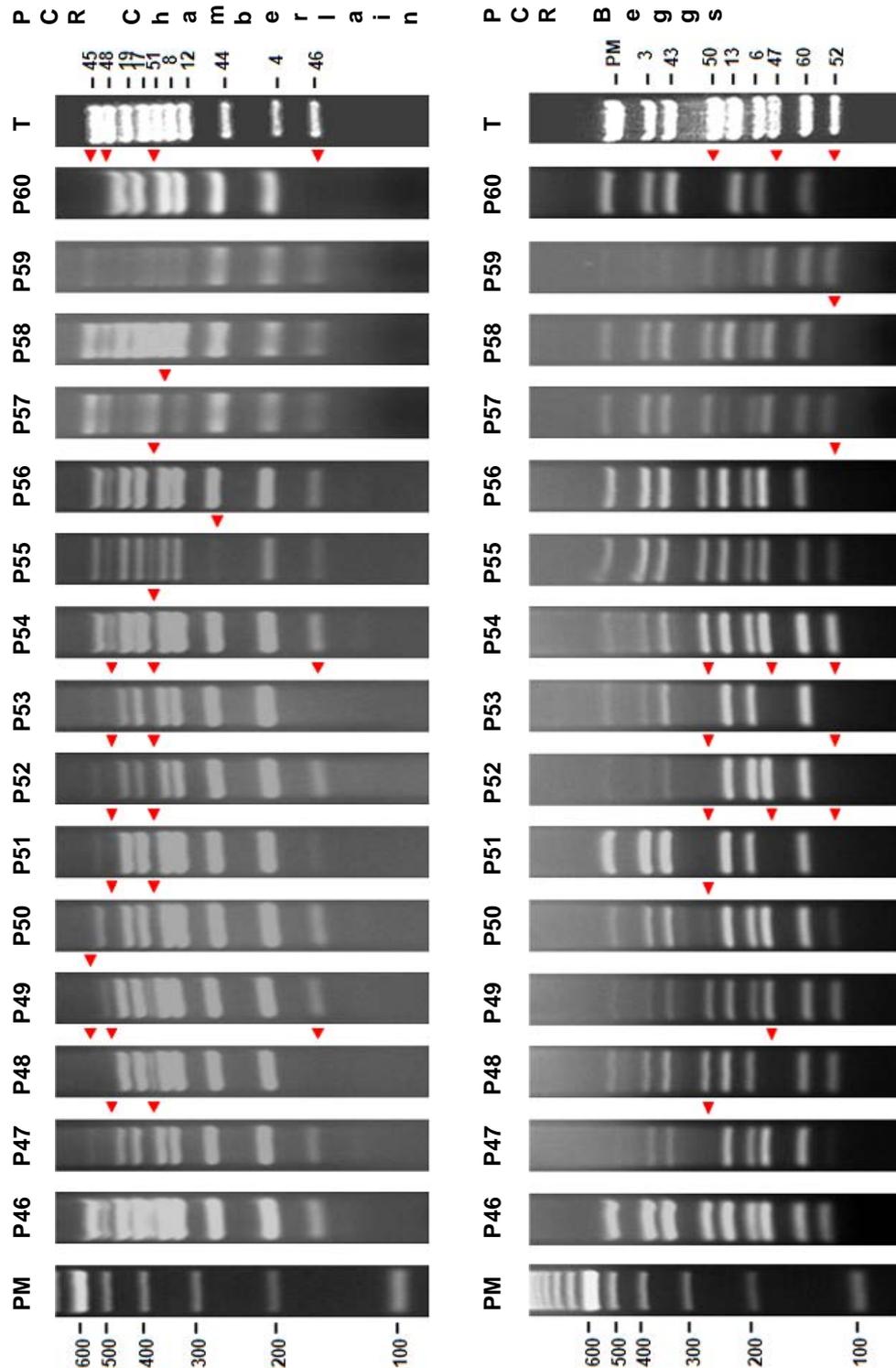
**Figure 19.** Profils d'amplification obtenus à partir des patients P1 à P15 après électrophorèse sur gel d'agarose 2,5% des produits des deux PCRs multiplexes de Chamberlain *et al.* (1988) (à gauche) et de Beggs *et al.* (1990) (à droite). A droite de chaque gel sont indiqués les exons du gène *DMD* amplifiés. A gauche de chaque gel sont indiquées les tailles des fragments du marqueur de taille (en pb). PM: Marqueur de poids moléculaire (100-base-pair ladder); T: Témoin sain; P1-15: Patients 1 à 15. Les flèches rouges indiquent les exons manquants. Le sens de migration est haut>bas.



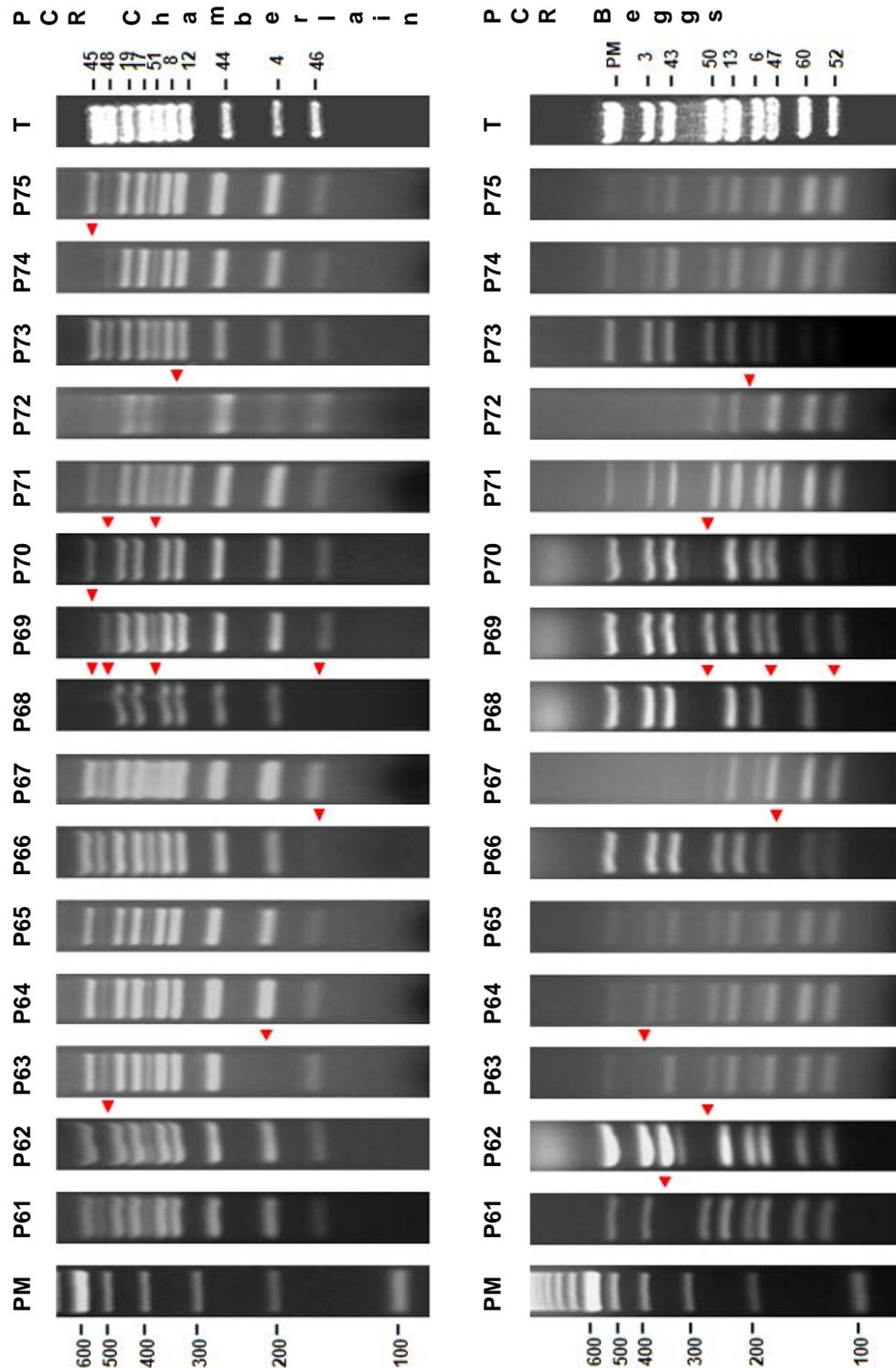
**Figure 20.** Profils d'amplification obtenus à partir des patients P16 à P30 après électrophorèse sur gel d'agarose 2.5% des produits des deux PCRs multiplexes de Chamberlain *et al.* (1988) (à gauche) et de Beggs *et al.* (1990) (à droite). A droite de chaque gel sont indiqués les exons du gène *DMD* amplifiés. A gauche de chaque gel sont indiquées les tailles des fragments du marqueur de taille (en pb). PM: Marqueur de poids moléculaire (100-base-pair ladder); T: Témoin sain; P16-30: Patients 16 à 30. Les flèches rouges indiquent les exons manquants. Le sens de migration est haut>bas.



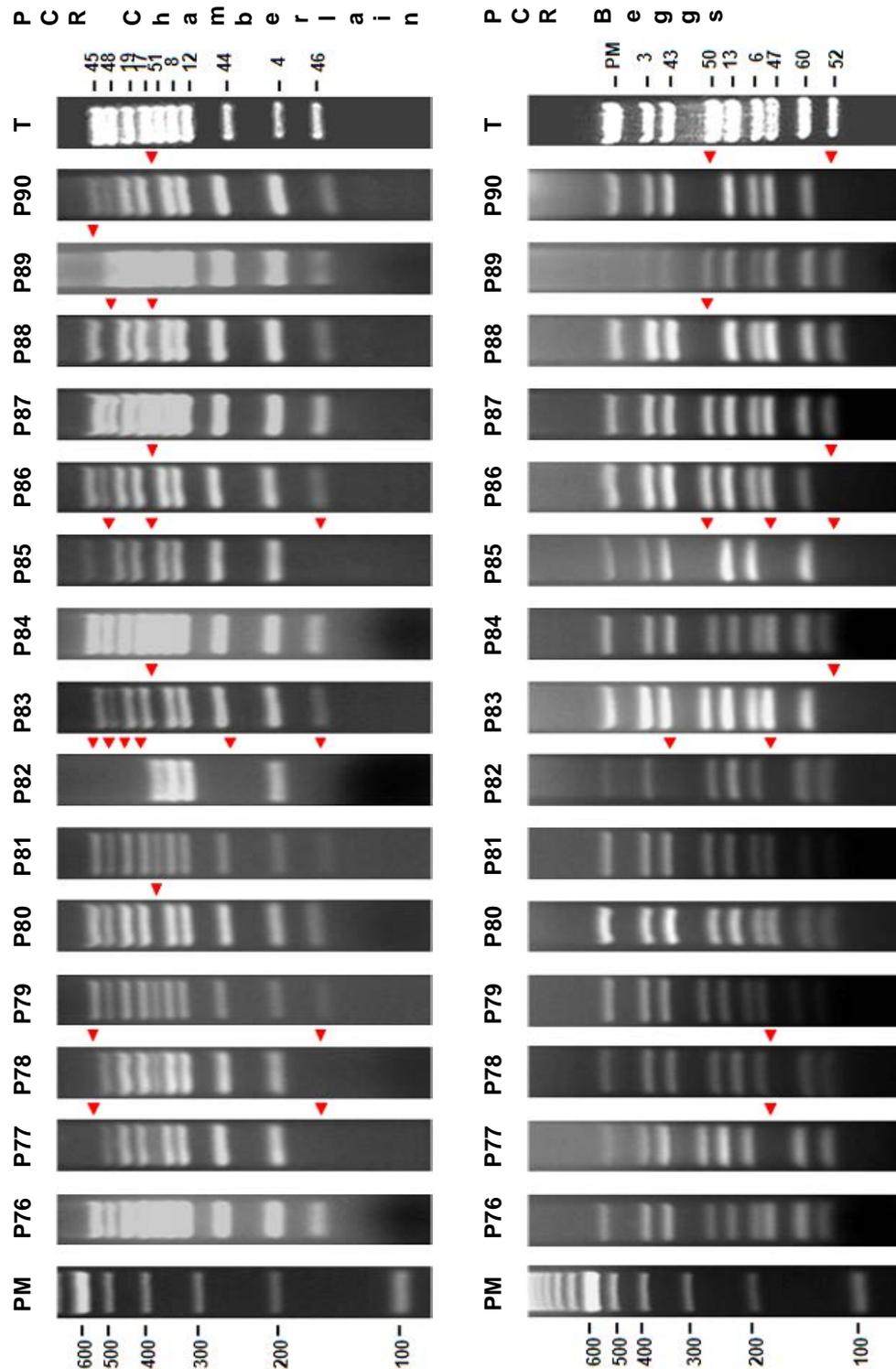
**Figure 21.** Profils d'amplification obtenus à partir des patients P31 à P45 après électrophorèse sur gel d'agarose 2.5% des produits des deux PCRs multiplexes de Chamberlain *et al.* (1988) (à gauche) et de Beggs *et al.* (1990) (à droite). A droite de chaque gel sont indiqués les exons du gène *DMD* amplifiés. A gauche de chaque gel sont indiquées les tailles des fragments du marqueur de taille (en pb). PM: Marqueur de poids moléculaire (100-base-pair ladder); T: Témoin sain; P31-45: Patients 31 à 45. Les flèches rouges indiquent les exons manquants. Le sens de migration est haut>bas.



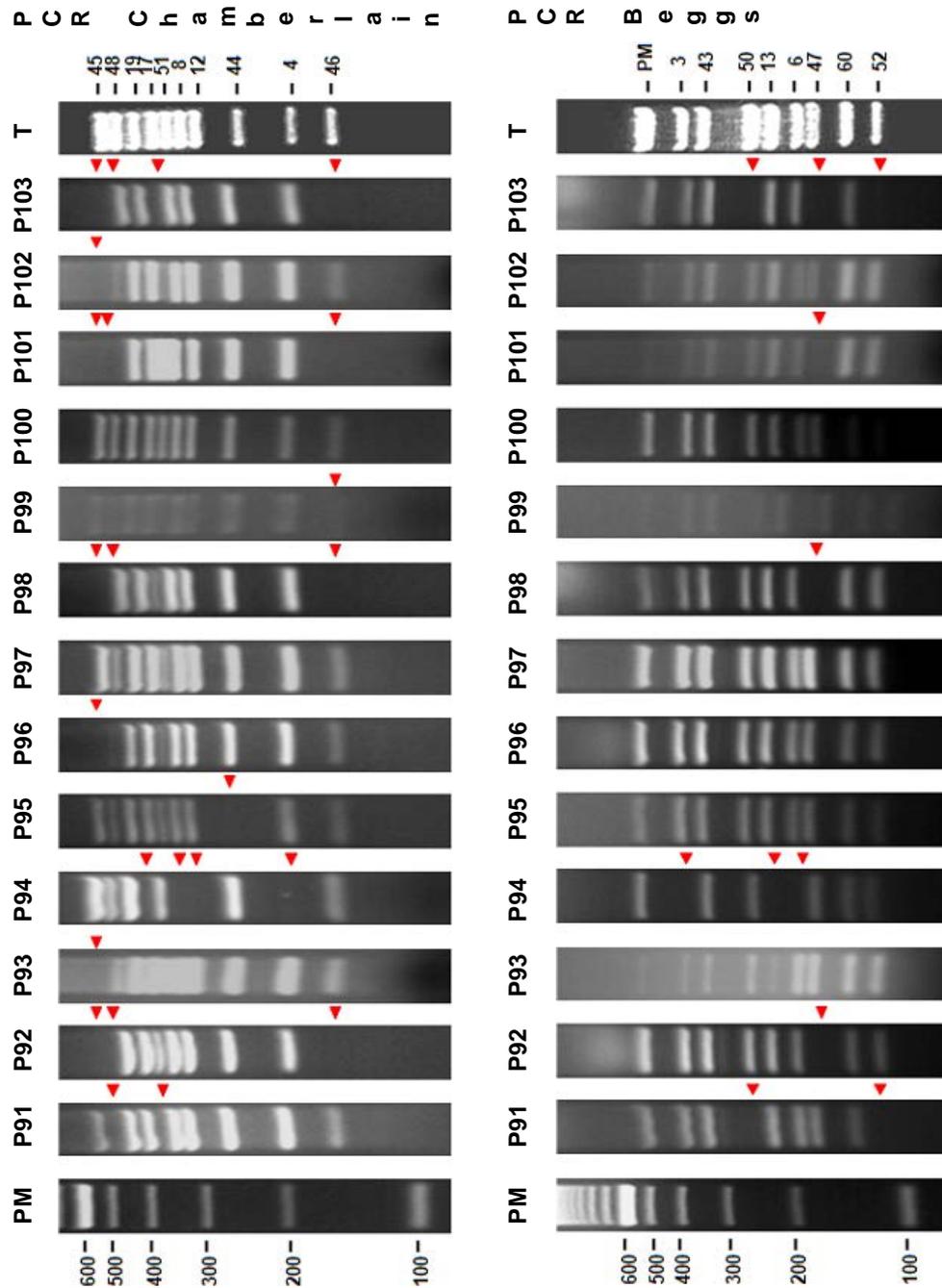
**Figure 22.** Profils d'amplification obtenus à partir des patients P46 à P60 après électrophorèse sur gel d'agarose 2.5% des produits des deux PCRs multiplexes de Chamberlain *et al.* (1988) (à gauche) et de Beggs *et al.* (1990) (à droite). A droite de chaque gel sont indiqués les exons du gène *DMD* amplifiés. A gauche de chaque gel sont indiquées les tailles des fragments du marqueur de taille (en pb). PM: Marqueur de poids moléculaire (100-base-pair ladder); T: Témoin sain; P46-60: Patients 46 à 60. Les flèches rouges indiquent les exons manquants. Le sens de migration est haut>bas.



**Figure 23.** Profils d'amplification obtenus à partir des patients P61 à P75 après électrophorèse sur gel d'agarose 2.5% des produits des deux PCRs multiplexes de Chamberlain *et al.* (1988) (à gauche) et de Beggs *et al.* (1990) (à droite). A droite de chaque gel sont indiqués les exons du gène *DMD* amplifiés. A gauche de chaque gel sont indiquées les tailles des fragments du marqueur de taille (en pb). PM: Marqueur de poids moléculaire (100-base-pair ladder); T: Témoin sain; P61-75: Patients 61 à 75. Les flèches rouges indiquent les exons manquants. Le sens de migration est haut>bas.



**Figure 24.** Profils d'amplification obtenus à partir des patients P76 à P90 après électrophorèse sur gel d'agarose 2.5% des produits des deux PCRs multiplexes de Chamberlain *et al.* (1988) (à gauche) et de Beggs *et al.* (1990) (à droite). A droite de chaque gel sont indiqués les exons du gène *DMD* amplifiés. A gauche de chaque gel sont indiquées les tailles des fragments du marqueur de taille (en pb). PM: Marqueur de poids moléculaire (100-base-pair ladder); T: Témoin sain; P76-90: Patients 76 à 90. Les flèches rouges indiquent les exons manquants. Le sens de migration est haut>bas.



**Figure 25.** Profils d'amplification obtenus à partir des patients P91 à P103 après électrophorèse sur gel d'agarose 2.5% des produits des deux PCR multiplexes de Chamberlain *et al.* (1988) (à gauche) et de Beggs *et al.* (1990) (à droite). A droite de chaque gel sont indiqués les exons du gène *DMD* amplifiés. A gauche de chaque gel sont indiquées les tailles des fragments du marqueur de taille (en pb). PM: Marqueur de poids moléculaire (100-base-pair ladder); T: Témoin sain; P91-103: Patients 91 à 103. Les flèches rouges indiquent les exons manquants. Le sens de migration est haut>bas.

**Tableau V.** Tableau récapitulatif des délétions intragéniques mises en évidence chez nos patients DMD/BMD et étendue de la délétion observée. P3-103: Patients 3 à 103. Les cases en rouge indiquent les exons ciblés par la PCR de Beggs *et al.* (1990). Les cases en bleus indiquent les exons ciblés par la PCR de Chamberlain *et al.* (1988). Les cases en gris affublées d'un signe (-) indiquent les exons délétés pour chaque patient. Les régions PM, 3, 4, 6, 8, 12, 13, 17 et 19 entourent le site mutationnel Xj. Les régions 43, 44, 45, 46, 47, 48, 50, 51, 52, 60 entourent le site mutationnel P20.

Patients	Régions ciblées par les PCRs multiplexes de Chamberlain <i>et al.</i> (1988) et de Beggs <i>et al.</i> (1990)																		
	PM	3	4	6	8	12	13	17	19	43	44	45	46	47	48	50	51	52	60
P3															-	-			
P4																-			
P5												-	-	-	-				
P7															-	-	-	-	
P9												-	-	-	-	-	-	-	
P10																-	-	-	
P12																		-	-
P14																-	-		
P16																		-	
P18												-	-	-	-	-	-	-	
P19											-								
P20										-	-	-	-	-	-	-			
P21																		-	
P22																			
P23						-	-	-	-										
P24												-							
P25												-							
P26												-							
P27												-	-	-	-	-			
P30																-	-	-	
P31		-	-	-	-	-													
P32																-	-		
P34												-	-	-	-	-	-	-	
P35												-	-	-	-	-			
P36												-	-	-	-	-			
P38															-	-			
P40												-							
P43		-	-	-															
P44																			-
P47																-	-	-	
P48												-	-	-	-				
P49												-							
P50															-	-	-	-	
P51														-	-	-	-	-	

Patients	Régions ciblées par les PCRs multiplexes de Chamberlain <i>et al.</i> (1988) et de Beggs <i>et al.</i> (1990)																		
	PM	3	4	6	8	12	13	17	19	43	44	45	46	47	48	50	51	52	60
P52															-	-	-	-	
P53													-	-	-	-	-	-	
P54																			
P55											-								
P56																	-	-	
P57					-														
P58																			-
P60												-	-	-	-	-	-	-	
P61										-									
P62																			
P63		-	-																
P66													-	-					
P68												-	-	-	-	-	-	-	
P69												-							
P70															-	-	-		
P72				-	-														
P74													-						
P77													-	-	-				
P78													-	-	-				
P80																		-	
P82								-	-	-	-	-	-	-	-				
P83																		-	-
P85													-	-	-	-	-	-	
P86																		-	-
P88															-	-	-		
P89													-						
P90																-	-	-	
P91															-	-	-	-	
P92													-	-	-	-			
P93													-						
P94		-	-	-	-	-	-	-											
P95												-							
P96													-						
P98													-	-	-	-			
P99													-						
P101													-	-	-	-			
P102													-						
P103													-	-	-	-	-	-	

72 patients sur 103 (69,90%) mutés	
9 patients sur 72 (12,50%) mutés en Xj	63 patients sur 72 (87,50%) mutés en P20

## V. Analyse moléculaire de l'étendue des délétions intragéniques identifiées dans le gène *DMD* chez nos patients

L'analyse des délétions intragéniques chez les patients qui en étaient porteurs a montré que leur nature et leur étendue était très hétérogène, variant de l'absence d'un seul exon (cas des patients DMD P19, P21, P24, P25, P26, P40, P49, P55, P57, P61, P69, P74, P80, P89, P93, P95, P96, P99 ou P102 présentant des délétions respectives de l'exon 44, 51, 45, 45, 45, 45, 45, 44, 8, 43, 45, 45, 51, 45, 45, 44, 45, 46 ou 45, ou des individus BMD P4, P16, P22, P44, P54 ou P58 présentant des délétions respectives de l'exon 50, 52, 13, 52, 51 ou 52) jusqu'à un maximum de 32 exons (cas du patient P82 avec une délétion allant des exons 17 à 48, et pourtant avec un diagnostic clinique BMD) (*Tableau VI*).

L'étendue moyenne des délétions intragéniques que nous avons identifiées était alors de 4 exons en moyenne, avec un maximum de patients (25, soit 35%) ayant une délétion d'un seul exon, suivi de 10 (14%), 9 (13%), 6 (8%) et 7 (8%) montrant l'absence de 3, 4, 2 et 8 exons respectivement.

En tenant compte du phénotype de dystrophinopathie soulevé, nous avons pu voir que nos patients DMD montraient une étendue de délétions variant de 1 à 8, alors qu'était observée une plus grande variabilité pour les malades BMD puisque ces derniers montraient l'absence de 1 à 32 exons.

Les malades DMD avaient ainsi en moyenne une délétion de 3 exons, avec toutefois une nette prédominance de délétions d'un seul exon (47% des patients DMD), comparativement à une absence de 5 exons en moyenne chez les individus BMD, 82% d'entre eux ayant une étendue de délétions variant de 1 à 5 exons.

A ce stade initial de l'analyse de l'ensemble de nos délétions, on pouvait toutefois prudemment avancer qu'une plus grande homogénéité de taille de délétions caractérisait nos patients DMD, contre une variabilité plus large pour les individus BMD.

Ce résultat qui fait que les plus grandes délétions intragéniques aient été caractérisées chez les patients BMD était assez surprenant en ce sens que les protéines générées par ces gènes mutés seraient les plus affectées, entraînant pourtant un phénotype atténué de dystrophie musculaire de Becker. Nous verrons plus tard que ce raisonnement simpliste méritait une analyse plus détaillée.

**Tableau VI.** Taille des délétions intragéniques identifiées chez l'ensemble de nos patients et selon le phénotype de dystrophinopathie. DMD: dystrophie musculaire de Duchenne; BMD: dystrophie musculaire de Becker.

Taille de la délétion (nombres exons absents)	Nombre total de patients (%)	Nombre de patients DMD (%)	Nombre de patients BMD (%)
1	25 (34,72%)	18 (47,37%)	7 (20,59%)
2	6 (8,33%)	1 (2,63%)	5 (14,71%)
3	10 (13,88%)	4 (10,53%)	6 (17,65%)
4	9 (12,50%)	1 (2,63%)	8 (23,52%)
5	4 (5,56%)	1 (2,63%)	3 (8,82%)
6	4 (5,56%)	4 (10,53%)	-
7	2 (2,77%)	1 (2,63%)	1 (2,94%)
8	7 (9,72%)	7 (18,42%)	-
9	1 (1,39%)	-	1 (2,94%)
10	1 (1,39%)	-	1 (2,94%)
12	1 (1,39%)	-	1 (2,94%)
15	1 (1,39%)	-	1 (2,94%)
32	1 (1,39%)	-	1 (2,94%)
<b>Total</b>	<b>72 (100%)</b>	<b>38 (100%)</b>	<b>34 (100%)</b>

## VI. Analyse moléculaire des sites de délétions intragéniques identifiées dans le gène *DMD* chez nos patients

Bien qu'il semble que certains exons soient préférentiellement retrouvés délétés à l'état individuel (cas des exons 44, 45 ou 46 dans le cas des malades DMD, ou de manière un peu moins évidente 52 pour les individus BMD), il semblerait toutefois que le site d'altération puisse être assez variable étant donné que les patients d'un type de dystrophie musculaire pouvaient aussi bien être mutés en amont qu'en aval (préférentiellement au-delà de 43, mais aussi au niveau de l'exon 8, pour les malades DMD; surtout au-delà de 50, mais également au sein de l'exon 13, pour les individus BMD).

Cette manière de considérer les délétions individuellement est pourtant biaisée et souffre du fait que toute l'étendue de la délétion n'est pas prise en compte dans sa totalité, d'où le fait de les analyser plus globalement.

Ainsi, en considérant la fréquence de chaque exon en tenant compte de l'ensemble des délétions identifiées chez les malades, et ce qu'elle que soit l'étendue de ces délétions, il ressort ainsi que les exons retrouvés le plus fréquemment délétés étaient les exons 45, 46, 47, 48, 50, 51 et 52 avec un nombre respectif de 28, 22, 22, 30, 30, 26 et 22 fois (correspondant à des fréquences de délétion de 12,90, 10,14, 10,14, 13,82, 13,82, 11,98 et 10,14% respectivement), un résultat qui met bien en avant le fait que la région la plus fréquemment altérée par les délétions intragéniques dans notre panel de malades était le site P20 distal (*Tableaux V et VII*).

Plus en détail, lorsqu'était uniquement considérés les patients DMD, ce sont également ces mêmes exons qui étaient le plus fréquemment ciblés par des délétions, soit 45, 46, 47, 48, 50, 51 et 52 avec des occurrences respectives de 20, 14, 14, 18, 18, 11 et 8 fois (pour des fréquences de délétion relatives de 17,70, 12,30, 12,30, 15,90, 15,90, 9,73 et 7,08% respectivement), quasiment de la même manière pour les individus BMD avec atteinte préférentielle des mêmes exons 8, 8, 8, 12, 12, 15 et 14 fois (pour des fréquences relatives comparables de 7,69, 7,69, 7,69, 11,5, 11,5, 14,4 et 13,4% respectivement).

En considérant uniquement les exons délétés 45, 46, 47, 48, 50, 51 et 52 dans cet ordre, on remarquait toutefois que les fréquences de délétion étaient globalement décroissantes dans le cas des malades DMD, contrairement aux patients BMD pour lesquels ces chiffres étaient plutôt croissants, un résultat auquel on pouvait s'attendre étant donné que dans les cas de phénotype DMD, ce serait plutôt une protéine dystrophine beaucoup plus raccourcie qui serait produite comparativement à celle retrouvée chez les individus BMD.

Cependant, de manière surprenante, nous avons constaté que les individus BMD étaient beaucoup plus fréquemment affectés en Xj : en considérant les exons 3, 4, 6, 8, 12, 13, 17 et 19, ces derniers étaient retrouvés délétés entre 2 et 4 fois (1,9 à 3,8%), contrairement aux patients DMD, altérés au mieux 1 fois (0,8%). Cette donnée qui individualisait nos malades BMD était assez intrigante car elle signifiait que l'altération en amont produirait une protéine

extrêmement raccourcie, non fonctionnelle ou carrément non existante, ce qui ne manquerait pas de générer un phénotype extrêmement sévère, à l'inverse de ce que nous observions. Nous tenterons plus loin d'apporter une explication à ces observations et à ce raisonnement qui manque quelque peu de justesse.

Nous avons enfin estimé que la possibilité qu'une délétion affecte l'un ou l'autre des exons 45, 46, 47, 48, 50, 51 ou 52 était de 82,94% quel que soit le phénotype DMD ou BMD considéré, une probabilité très élevée qui se voyait encore augmenter lorsqu'était uniquement considérés les patients DMD (91,15%) et à une fréquence moindre pour les individus BMD (74,03%).

En considérant de manière globale que les exons 3, 4, 6, 8, 12, 13, 17 et 19 sont regroupés autour du site Xj, alors que les exons 43, 44, 45, 46, 47, 48, 50, 51 et 52 sont regroupés autour du site P20, il apparaît clairement que quelle que soit la forme de dystrophinopathie, 9 patients (soit 12,5%) étaient mutés en Xj proximal contre une majorité de 63 (soit 87,5%) altérés en P20 distal

D'autre part, nous avons également pu constater dans notre panel de malades que lorsque le site Xj était altéré, la longueur de la région délétée était relativement importante, ôtant ainsi en moyenne 9 exons au gène *DMD*, tandis que pour le site en aval P20, les altérations moléculaires étaient de moins grande importance avec seulement 3-4 exons en moyenne, résultats qui s'accordent avec la constatation que nous avons fait auparavant et qui montrait que le site P20 était plus sujet à des délétions individuelles d'exons.

**Tableau VII.** Récapitulatif du pourcentage de délétion de chacune des 19 régions (PM et exons) testées par les deux PCRs multiplexes de Chamberlain *et al.* (1988) et de Beggs *et al.* (1990) chez nos patients DMD/BMD. DMD: Dystrophie musculaire de Duchenne; BMD: Dystrophie musculaire de Becker.

Régions ciblées	PM	3	4	6	8	12	13	17	19	43	44	45	46	47	48	50	51	52	60	Total
<b>Nombre délétions Patients totaux</b>	0	4	4	4	5	3	3	3	2	3	5	28	22	22	30	30	26	22	1	<b>217</b>
<b>% délétion</b>	0,00	1,84	1,84	1,84	2,30	1,38	1,38	1,38	0,92	1,38	2,30	12,90	10,14	10,14	13,82	13,82	11,98	10,14	0,46	<b>100</b>
<b>Nombre délétions Patients DMD</b>	0	1	1	1	1	0	0	0	0	2	4	20	14	14	18	18	11	8	0	<b>113</b>
<b>% délétion</b>	0,00	0,88	0,88	0,88	0,88	0,00	0,00	0,00	0,00	1,77	3,54	17,70	12,39	12,39	15,93	15,93	9,73	7,08	0,00	<b>100</b>
<b>Nombre délétions Patients BMD</b>	0	3	3	3	4	3	3	3	2	1	1	8	8	8	12	12	15	14	1	<b>104</b>
<b>% délétion</b>	0,00	2,88	2,88	2,88	3,85	2,88	2,88	2,88	1,92	0,96	0,96	7,69	7,69	7,69	11,54	11,54	14,42	13,46	0,96	<b>100</b>

## VII. Analyse moléculaire de l'effet des délétions intragéniques identifiées dans le gène *DMD* chez nos patients

Sur la base de la séquence génomique du gène *DMD* codant la dystrophine humaine (Référence dans la banque de données NCBI: NM\_004006), nous avons pu reconstituer les cadres de lecture des 79 exons qui constituent ce gène (soit, comme indiqué dans le **Tableau VIII**, en utilisant la dénomination internationale 1, 2 et 3 pour indiquer la phase de lecture du codon pour chaque début et fin d'exon), ce qui nous a alors permis d'établir pour chaque patient, en fonction de la délétion intragénique qu'il présentait, si cette dernière entraînait un décalage du cadre de lecture ou pas.

Nous avons pu individualiser trois catégories de patients :

(i) ceux pour lesquels la délétion intragénique était précisément bordée en proximal et en distal, comme cela est le cas du patient P3 présentant une délétion de 48 à 50 ou du malade P88 montrant l'absence des exons 48 à 51.

(ii) ceux pour lesquels la délétion intragénique caractérisée n'était bordée qu'en proximal, comme cela est le cas du patient P7 auquel manquait les exons de 48 à 52 ou de l'individu P9 ayant une délétion des exons 45 à 52, avec, pour les deux, présence de l'exon 60 mais sans savoir quels autres exons étaient absents entre 52 et 60 du fait que ces régions n'étaient pas testées par nos deux PCR multiplexes.

(iii) ceux pour lesquels la délétion intragénique identifiée était bordée en distal, comme cela était le cas pour le patient P20 avec une délétion allant des exons 43 à 50 ou du malade P61 ayant une délétion de l'exon 43, sans savoir quels autres régions étaient altérés entre les exons 19 et 43, du fait qu'ils n'étaient pas testés par notre protocole opératoire.

Une fois cette première étape de bordure des extrémités des délétions intragéniques pour chaque patient réalisée, nous étions alors en mesure de caractériser l'effet que chaque altération moléculaire avait causé, soit par exemple :

(i) dans la première catégorie : un décalage du cadre de lecture dans le cas du patient P3 (délétion de 48 à 50), la phase de lecture passant à 47(3-3)-51(2-3), contrairement à l'individu P88 (délétion 48 à 51) où la phase de lecture 47(3-3)-52(1-1) était conservée. Dans le premier cas, une protéine tronquée constituée des acides aminés seulement codées par les 47 premiers exons était générée (un codon Stop prématuré apparaissant dans l'exon 51 alors juxtaposé au 47), alors que dans le second était produite une protéine dystrophine à laquelle manquait uniquement la région protéique codée par les exons 48 à 51.

**Tableau VIII.** Tableau récapitulatif de l'effet sur le cadre de lecture du gène *DMD* des délétions intragéniques caractérisées chez nos patients. P3-103: Patients 3 à 103; DMD/BMD: Dystrophie musculaire de Duchenne/Becker; (1-1),(1-2),(1-3),(2-3),(3-3): Phases de lecture; aa: acides aminés; PM: Poids moléculaire; kDa: kDaltons. (?) indique que la délétion intragénique n'est pas précisément caractérisée ("à partir de" ou "jusqu'à" quel exon).

Patient	Délétions des exons	Phénotype clinique	Phase lecture exons bordants	Effet sur le cadre de lecture	Nombre acides aminés, PM
P3	48,50	DMD	47(3-3)...51(2-3)	Stop en 51 : Décalage	2262 aa, 263.21 kDa
P4	50	BMD	49(1-3)...51(2-3)	Stop en 51 : Décalage	2408 aa, 279.88 kDa
P5	46,47,48,50	DMD	45(1-2)...51(2-3)	Stop en 51 : Décalage	2219 aa, 257.83 kDa
P7	48,50,51,52	BMD	47(3-3)...?...60(1-3)	Au moins 47 premiers exons conservés	2304 aa, 267.82 kDa
P9	45,46,47,48,50,51,52	DMD	44(3-3)...?...60(1-3)	Au moins 44 premiers exons conservés	2146 aa, 249.68 kDa
P10	50,51,52	BMD	49 (1-3)...?...60(1-3)	Au moins 48 premiers exons conservés	2366 aa, 275.04 kDa
P12	52,60	BMD	51(2-3)...?...60(1-3)	Au moins 51 premiers exons conservés	2514 aa, 291.63 kDa
P14	50,51	BMD	49(1-3)...52(1-1)	Pas de décalage, partie interne absente	3571 aa, 414.03 kDa
P16	52	BMD	51(2-3)...?...60(1-3)	Au moins 51 premiers exons conservés	2514 aa, 291.63 kDa
P18	45,46,47,48,50,51,52	DMD	44(3-3)... ?...60(1-3)	Au moins 44 premiers exons conservés	2146 aa, 249.68 kDa
P19	44	DMD	43(1-1)...45(1-2)	Stop en 45 : Décalage	2112 aa, 244.82 kDa
P20	43,44,45,46,47,48,50	DMD	?...51(2-3)	Au moins 19 premiers exons conservés	794 aa, 91.67 kDa
P21	51	DMD	50(1-1)...52(1-1)	Stop en 52 : Décalage	2486 aa, 286.41 kDa
P22	13	BMD	12(1-3)...14(1-3)	Pas de décalage, partie interne absente	3645 aa, 422.37 kDa
P23	8,12,13,17,19	BMD	7(3-1)...20(2-3)	Pas de décalage, partie interne absente	3108 aa, 360.25 kDa
P24	45	DMD	44(3-3)...46(3-3)	Stop en 46 : Décalage	2162 aa, 251.72 kDa
P25	45	DMD	44(3-3)...46(3-3)	Stop en 46 : Décalage	2162 aa, 251.72 kDa
P26	45	DMD	44(3-3)...46(3-3)	Stop en 46 : Décalage	2162 aa, 251.72 kDa
P27	45,46,47,48,50	DMD	44(3-3)...51(2-3)	Stop en 51 : Décalage	2154 aa, 250.70 kDa
P30	50,51,52	BMD	49 (1-3)...?...60(1-3)	Au moins 48 premiers exons conservés	2366 aa, 275.04 kDa
P31	3,4,6,8,12	BMD	2(2-3)...13(1-3)	Pas de décalage, partie interne absente	3222 aa, 373.63 kDa
P32	48,50	DMD	47(3-3)...51(2-3)	Stop en 51 : Décalage	2262 aa, 263.21 kDa
P34	45,46,47,48,50,51,52	DMD	44(3-3)...?...60(1-3)	Au moins 44 premiers exons conservés	2146 aa, 249.68 kDa
P35	45,46,47,48,50	DMD	44(3-3)...51(2-3)	Stop en 51 : Décalage	2154 aa, 250.70 kDa
P36	45,46,47,48,50	DMD	44(3-3)...51(2-3)	Stop en 51 : Décalage	2154 aa, 250.70 kDa
P38	48,50	DMD	47(3-3)...51(2-3)	Stop en 51 : Décalage	2262 aa, 263.21 kDa
P40	45	DMD	44(3-3)...46(3-3)	Stop en 46 : Décalage	2162 aa, 251.72 kDa
P43	3,4,6	DMD	2(2-3)...7(3-1)	Stop en 7 : Décalage	66 aa, 7.91 kDa
P44	52	BMD	51(2-3)...?...60(1-3)	Au moins 51 premiers exons conservés	2437 aa, 282.95 kDa
P47	48,50,51	BMD	47(3-3)...52(1-1)	Pas de décalage, partie interne absente	3475 aa, 402.99 kDa
P48	45,46,47,48	BMD	44(3-3)...49(1-3)	Pas de décalage, partie interne absente	3465 aa, 401.44 kDa
P49	45	DMD	44(3-3)...46(3-3)	Stop en 46 : Décalage	2162 aa, 251.72 kDa
P50	48,50,51	BMD	47(3-3)...52(1-1)	Pas de décalage, partie interne absente	3475 aa, 402.99 kDa
P51	47,48,50,51,52	DMD	46(3-3)...?...60(1-3)	Au moins 46 premiers exons conservés	2254 aa, 262.19 kDa
P52	48,50,51,52	BMD	47(3-3)... ?...60(1-3)	Au moins 47 premiers exons conservés	2304 aa, 267.82 kDa

P53	46,47,48,50,51,52	DMD	45(1-2)...?...60(1-3)	Au moins 45 premiers exons conservés	2205 aa, 256.39 kDa
P54	51	BMD	50(1-1)...52(1-1)	Stop en 52 : Décalage	2486 aa, 286.41 kDa
P55	44	DMD	43(1-1)...45(1-2)	Stop en 45 : Décalage	2112 aa, 244.82 kDa
P56	51,52	BMD	50(1-1)...?...60(1-3)	Au moins 50 premiers exons conservés	2437 aa, 282.95 kDa
P57	8	DMD	7(3-1)...9(1-3)	Stop en 9 : Décalage	217 aa, 25.12 kDa
P58	52	BMD	51(2-3)...?...60(1-3)	Au moins 51 premiers exons conservés	2437 aa, 282.95 kDa
P60	45,46,47,48,50,51,52	DMD	44(3-3)...?...60(1-3)	Au moins 44 premiers exons conservés	2146 aa, 249.68 kDa
P61	43	DMD	?...44(3-3)	Au moins 19 premiers exons conservés	794 aa, 91.67 kDa
P62	48,50	DMD	47(3-3)...51(2-3)	Stop en 51 : Décalage	2262 aa, 263.21 kDa
P63	3,4	BMD	2(2-3)... 5(1-3)	Pas de décalage, partie interne absente	3628 aa, 420.36 kDa
P66	46,47	DMD	45(1-2)...48(1-3)	Stop en 48 : Décalage	2220 aa, 258.29 kDa
P68	45,46,47,48,50,51,52	DMD	44(3-3)...?...60(1-3)	Au moins 44 premiers exons conservés	2146 aa, 249.68 kDa
P69	45	DMD	44(3-3)...46(3-3)	Stop en 46 : Décalage	2162 aa, 251.72 kDa
P70	48,50,51	BMD	47(3-3)...52(1-1)	Pas de décalage, partie interne absente	3475 aa, 402.99 kDa
P72	6,8	BMD	5(1-3)...9(1-3)	Pas de décalage, partie interne absente	3527 aa, 408.42 kDa
P74	45	DMD	44(3-3)...46(3-3)	Stop en 46 : Décalage	2162 aa, 251.72 kDa
P77	45,46,47	BMD	44(3-3)...48(1-3)	Pas de décalage, partie interne absente	3527 aa, 408.66 kDa
P78	45,46,47	BMD	44(3-3)...48(1-3)	Pas de décalage, partie interne absente	3527 aa, 408.66 kDa
P80	51	DMD	50(1-1)...52(1-1)	Stop en 52 : Décalage	2486 aa, 286.41 kDa
P82	17,19,43,44,45,46,47,48	BMD	16(1-3)...49(1-3)	Pas de décalage, partie interne absente	1983 aa, 228.57 kDa
P83	51,52	BMD	50(1-1)...?...60(1-3)	Au moins 50 premiers exons conservés	2437 aa, 282.95 kDa
P85	46,47,48,50,51,52	BMD	45(1-2)...?...60(1-3)	Au moins 45 premiers exons conservés	2205 aa, 256.39 kDa
86	51,52	BMD	50(1-1)...?...60(1-3)	Au moins 50 premiers exons conservés	2437 aa, 282.95 kDa
88	48,50,51	BMD	47(3-3)...52(1-1)	Pas de décalage, partie interne absente	3475 aa, 402.99 kDa
89	45	DMD	44(3-3)...46(3-3)	Stop en 46 : Décalage	2162 aa, 251.72 kDa
90	50,51,52	BMD	48 ou 49(1-3)...?...60(1-3)	Au moins 48 premiers exons conservés	2366 aa, 275.04 kDa
91	48,50,51,52	BMD	47(3-3)... ?...60(1-3)	Au moins 47 premiers exons conservés	2304 aa, 267.82 kDa
92	45,46,47,48	BMD	44(3-3)...49(1-3)	Pas de décalage, partie interne absente	3465 aa, 401.44 kDa
P93	45	DMD	44(3-3)...46(3-3)	Stop en 46 : Décalage	2162 aa, 251.72 kDa
P94	3,4,6,8,12,13,17	BMD	2(2-3)... 18(3-3)	Stop en 18 : Décalage	34 aa, 4.21 kDa
			2(2-3)...19(1-1)	Pas de décalage, partie interne absente	2952 aa, 342.55 kDa
P95	44	DMD	43(1-2)...45(1-2)	Stop en 45 : Décalage	2112 aa, 244.82 kDa
P96	45	DMD	44(3-3)...46(3-3)	Stop en 46 : Décalage	2162 aa, 251.72 kDa
P98	45,46,47,48	BMD	44(3-3)...49(1-3)	Pas de décalage, partie interne absente	3465 aa, 401.44 kDa
P99	46	DMD	45(1-2)...47(3-3)	Stop en 47 : Décalage	2220 aa, 258.20 kDa
P101	45,46,47,48	BMD	44(3-3)...49(1-3)	Pas de décalage, partie interne absente	3465 aa, 401.44 kDa
P102	45	DMD	44(3-3)...46(3-3)	Stop en 46 : Décalage	2162 aa, 251.72 kDa
P103	45,46,47,48,50,51,52	DMD	44(3-3)...?...60(1-3)	Au moins 44 premiers exons conservés	2146 aa, 249.68 kDa

(ii) dans la deuxième catégorie : pour le patient P7 la production d'une protéine forcément raccourcie et constituée d'au moins la partie codée par les exons allant de 1 à 47 (le malade étant délété de 48 à 52), de même que l'individu P9 (délété de 45 à 52) avec une protéine dystrophine raccourcie composé d'au moins les régions codées par les exons 1 à 44, l'absence d'informations sur les délétions entre les exons 52 et 60 (exon présent) ne permettant pas de savoir si un décalage du cadre de lecture survenait ou pas.

(iii) dans la troisième catégorie : pour le patient P20 une incertitude liée au fait que nous ne savions pas quels exons étaient délétés entre les exons 19 (présent chez le malade) et 43 (absent jusqu'au 50) et qui nous permettait alors seulement de suggérer que la protéine dystrophine était produite à partir d'au moins 19 exons (de 1 à 19), de la même façon que pour le patient P61 (délétion de l'exon 43) ne nous donnait pas l'opportunité de connaître quelles autres régions étaient absentes entre les exons 19 et 43, nous permettant donc de poser la même hypothèse quant à la génération de la protéine mutée.

Nous devons également préciser que la présence de cadres de lecture "in-frame" pour certains exons non testés lors de nos PCRs multiplexes (comme cela est par exemple le cas des exons 49(1-3) ou 5(1-3)) nous permettait avantageusement de connaître avec précision l'effet qu'avaient les délétions intragéniques identifiées chez les patients délétés autour de ces exons.

L'outil bioinformatique utilisé (SMS Manipulation Suite), a permis pour chaque patient :

(i) lorsqu'était bordée la délétion intragénique en distal et en proximal, caractériser avec exactitude la position du codon Stop prématuré lorsqu'un décalage de lecture était créé et ainsi identifier les quelques nouveaux acides aminés dans l'exon juxtaposé qui étaient rajoutés à la protéine tronquée, ou alors connaître la protéine mutée produite et seulement tronquée des exons absents lorsque l'altération moléculaire n'entraînait pas de décalage du cadre de lecture ("in-frame"), avec dans les deux cas l'estimation de la taille de la protéine (séquence et nombre d'acides aminés, poids moléculaire) (voir *Annexe*).

(ii) lorsque nous ne disposions d'informations de bordure que d'un seul côté (que ce soit en distal ou en proximal), estimer la taille minimale que la protéine devait avoir (séquence et nombre d'acides aminés, poids moléculaire) (voir *Annexe*).

Nous noterons toutefois qu'en dépit de la disponibilité de données complètes sur la séquence génomique du gène *DMD* codant la protéine dystrophine, une incertitude majeure subsistait pour l'une des délétions intragéniques que nous avons caractérisée chez l'un de nos patients, P94 (délétion 3 à 17). Un manque d'information, dû au fait que la présence de l'exon 18 (phase de lecture 3-3, donc "out-of-frame" ou décalante) n'était pas testée lors de nos expériences d'amplification, ne nous permettant pas de savoir s'il était présent chez ce malade, situation qui nous permettait dès lors d'envisager deux possibilités exclusives aux conséquences totalement différentes : la création d'un décalage du cadre de lecture, avec production d'une protéine dystrophine mutée de taille insignifiante (34 acides aminés, 4,21 kDa), si cet exon était présent; ou la production d'une protéine seulement tronquée des régions codées par les exons 3 à 18 (2952 acides aminés, 342,55 kDa), si l'exon 18 était délété en plus des exons 3 à 17.

Comme nous le verrons un peu plus loin, l'analyse globale de l'ensemble des résultats obtenus pour l'effet des délétions intragéniques que nous avons observées, alliée aux précieuses données que nous a procuré le puissant outil bioinformatique utilisé, nous a permis pour ce patient P94 de pencher plutôt en faveur d'une de ces deux possibilités.

Tous les patients pour lesquels la délétion intragénique identifiée ne provoquait pas de décalage du cadre de lecture au sein du gène *DMD*, aboutissant alors à la production d'une protéine de taille raccourcie à laquelle manquait seulement la partie interne codée par les exons délétés, avaient un phénotype atténué BMD, soit les malades P14, P22, P23, P31, P47, P48, P50, P63, P70, P72, P77, P78, P88, P92 et P101 (pour lesquels une protéine de taille minimale 360,25 kDa et constituée de 3108 acides aminés serait générée).

Cette règle, même si elle n'est pas absolue, a un poids tel sur la prédiction du phénotype de dystrophinopathie que même une délétion intragénique de grande taille, telle celle des exons 17 à 48 pour le patient P82, du fait qu'elle était "in-frame", n'occasionnait qu'un phénotype de dystrophie musculaire de Becker malgré la taille réduite de la protéine mutée générée (1983 acides aminés, 228,57 kDa).

Sur la base du même principe, les patients P3, P5, P19, P24, P25, P26, P27, P32, P35, P36, P38, P40, P43, P49, P55, P57, P62, P66, P69, P74, P80, P89, P93, P95, P96, P99 et P102 avaient quant à eux une délétion provoquant un décalage du cadre de lecture de la séquence codante du gène *DMD*, produisant une protéine tronquée de taille raccourcie (de 66 à 2262 acides aminés, de 7,91 à 263,21 kDa) : dans ce cas, le phénotype qui était évoqué était par contre sévère DMD.

Il pourrait donc nous sembler à première vue que l'effet de l'altération moléculaire (décalante ou pas) était prépondérant, sans que la taille et la constitution de la protéine mutée ne puissent intervenir (à l'image de la protéine dystrophine qui serait produite chez le patient P82 ayant une délétion de 32 exons, mais "in-frame").

Toutefois, si l'on considère les patients BMD P7, P10, P12, P16, P30, P44, P52, P56, P58, P83, P85, P86, P90 et P91, ceux-ci présentaient des délétions intragéniques diverses et variées (pourtant toutes au niveau du site distal P20) produisant une dystrophine mutée de plus petite taille (de 2304 à 2514 acides aminés, de poids moléculaire 267,82 à 291,63 kDa), alors que les malades DMD P9, P18, P20, P34, P51, P60, P61, P68 et P103 (tous également altérés dans la région en aval P20) synthétiseraient une protéine de taille encore plus courte (de 794 à 2254 acides aminés, de poids moléculaire 91,67 à 262,19 kDa), laissant poindre à l'horizon une sorte de règle de taille "minimale" de protéine dystrophine.

Cette observation nous permettait d'ailleurs d'avancer la suggestion suivante pour le patient P94 : le phénotype évoqué étant BMD, il paraît beaucoup plus probable que la protéine dystrophine qu'il possède soit partiellement fonctionnelle, condition ne pouvant être assurée avec une aussi petite protéine de 34 acides aminés : cet individu aurait ainsi une protéine de 2952 acides aminés et de poids moléculaire 342,55 kDa et présenterait alors aussi une délétion de l'exon 18, affirmation qui devrait néanmoins être vérifiée au plan moléculaire en testant par PCR l'absence de cet exon.

# **DISCUSSION**

Bien que les malades nous aient été envoyés par des hôpitaux d'Alger, il faut toutefois souligner que ces structures drainent un grand nombre de malades de toutes les régions d'Algérie, probablement en raison de la disponibilité de meilleures compétences médicales et de la disponibilité de services spécialisés, ce qui fait que l'origine géographique de notre panel de patients pouvait être assez représentative de l'ensemble du pays, tout au moins en ce qui concerne l'affection que nous avons étudié.

Egalement, il faut noter que le grand nombre de patients atteints de dystrophies musculaires que nous avons pu collecté atteste d'une forte prévalence de cette maladie au niveau des services hospitaliers qui ont participé à cette étude, tout comme il traduit certainement une fréquence élevée d'occurrence de cette affection héréditaire à travers tout le territoire national.

Dans le cadre des analyses moléculaires que nous avons envisagé, nous nous sommes retrouvés face aux atteintes neuromusculaires que sont les dystrophies musculaires, ce qui aurait largement suggéré que les altérations cellulaires ou moléculaires que nous voulions mettre en évidence puissent être directement recherchées ou mises en évidence au siège même de cette atteinte, le muscle.

Il aurait pour cela fallu que nous disposions de morceaux de muscles pour chacun des patients, prélèvements qui peuvent ainsi être obtenus suite à une petite opération chirurgicale sous anesthésie locale, la biopsie musculaire.

Toutefois, ces biopsies auraient dû être réalisées de manière correcte et uniforme au niveau de tous les Services de Neurologie qui ont participé à ce travail, contrainte toutefois mineure.

En fait, l'inconvénient majeur de la réalisation de biopsies musculaires est son invasivité, générant ainsi des conditions de prélèvement traumatisantes pour le malade, déjà souvent lui-même affecté au niveau musculaire.

Le but de notre travail était d'ailleurs en partie de pouvoir proposer une alternative simple, efficace, précise et la moins traumatisante pour le patient lui-même, ainsi qu'en terme de protocole opératoire proprement technique.

Prenant avantage de la nature héréditaire des dystrophies musculaires, l'analyse de la molécule-reine qu'est l'ADN pourrait donc avantageusement se substituer à une analyse protéique qui elle serait réalisée après une extraction de protéines à partir de biopsies musculaires.

Nous avons donc opté pour la conduction de nos analyses moléculaires à partir d'ADN, matériel génétique présent dans toutes les cellules qui constituent notre organisme.

Le choix d'un simple prélèvement de sang total était en outre dicté par la simplicité de son obtention, la facilité de sa conservation et l'aisance de son transport (comparativement à une biopsie musculaire qui, en plus de la délicatesse de sa réalisation et son invasivité pour le patient, devrait être immédiatement plongée dans de l'azote liquide et conservée puis transportée dans ce liquide si l'on veut pouvoir en extraire et analyser les protéines de manière idoine).

Egalement, nous nous sommes orienté dans la voie de réalisation d'un diagnostic pouvant être mis en place en routine, avec le plus de simplicité et le moins de lourdeur possible, dans le contexte actuel que peut être un laboratoire de biologie moléculaire dans notre pays.

A travers un simple prélèvement sanguin s'offrait à nous toute une panoplie de méthodes d'extraction d'ADN, différant tant dans leur principe que dans la nature du produit d'extraction final, le but escompté n'étant pas de les comparer ou d'estimer précisément les données quantitatives et qualitatives de l'acide nucléique extrait, mais plutôt de nous adapter aux contraintes de disponibilité de certains réactifs ou consommables et ainsi d'apprécier que chacune d'elle pouvait en fait avantageusement être remplacée par l'autre si nécessité s'en faisait ressentir.

Nous avons ainsi accordé une attention toute particulière à la qualité des ADN extraits par le relargage salin (salting-out), en prenant soin de les tester au préalable jusqu'au bout de notre protocole opératoire. Des échecs, même partiels, d'aboutissement de ce protocole nous auraient ainsi limités dans notre protocole d'extraction d'ADN, qui se serait ainsi vu écarté dans une optique d'exécution en routine.

Les amplifications par PCRs multiplexes que nous avons obtenues en analysant notre panel de 103 patients a permis de montrer que près de 3/4 d'entre eux présentaient une délétion intragénique affectant au moins un des exons du gène *DMD*, permettant dès lors de poser un diagnostic moléculaire de dystrophinopathie et ainsi de confirmer le diagnostic clinique évoqué pour ces patients, et ce qu'elle que soit l'étendue de la délétion caractérisée.

Néanmoins, les différences de fréquence d'occurrence de délétions selon le type de dystrophinopathie que nous observées (86% pour DMD et 56% pour BMD) pourraient trouver en partie une explication sur la base même de l'étiquette clinique posée par les médecins. En effet, la forme de dystrophie musculaire de Duchenne est une forme tellement précoce et sévère que sa symptomatologie évoque facilement un diagnostic de DMD, suspicion médicale qui se trouve alors facilement confirmée en mettant en évidence des délétions intragéniques dans le gène *DMD*. Pour la forme de dystrophie musculaire de Becker, ses symptômes cliniques moins sévères et plus tardifs peuvent parfois entraîner une confusion quant à l'établissement d'un diagnostic précis, compte tenu de la grande hétérogénéité clinique qui caractérise les dystrophies musculaires progressives et qui fait que les symptomatologies se chevauchent aisément avec l'impossibilité de poser un diagnostic de certitude : d'autres formes de dystrophies musculaires peuvent ainsi être responsables du

phénotype observé chez les patients, formes alors non liées au gène *DMD*, d'où l'absence de mise en évidence de délétions intragéniques dans ce gène.

A ces explications, vient également s'ajouter d'autres données moléculaires et opératoires à considérer. En effet, il faut savoir que nous n'avons ciblé qu'une partie des exons du gène *DMD* à travers les PCRs multiplexes de Chamberlain et de Beggs, d'où l'éventualité que des mutations de type délétionnelles siègent en d'autres positions du gène que nous n'explorons pas à travers notre protocole.

Toutefois, les deux sites, Xj et P20, que nous explorons par nos deux PCRs multiplexes permettent de rendre compte d'environ 90% des délétions intragéniques observées chez les malades DMD/BMD [Leturcq et Kaplan, 2005; Oshima *et al.*, 2009], donnée moléculaire qui ne permet dès lors pas d'expliquer la différence de présence de délétions intragéniques entre nos patients DMD et ceux BMD.

Egalement, nous ne pouvons pas exclure que d'autres types d'altérations moléculaires puissent affecter le gène *DMD* chez nos patients : il peut en effet être la cible d'altérations de type duplications emportant des portions variables du gène, mais également de mutations ponctuelles affectant sa séquence codante ou les jonctions introns-exons [Leturcq et Kaplan, 2005; Aartsma-Rus *et al.*, 2006; Deburgrave *et al.*, 2007]. Ces mutations représentent toutefois respectivement 10% et 20% seulement des mutations retrouvées chez les patients DMD/BMD et ne sauraient à elles seules expliquer cette différence d'occurrence de délétions intragéniques entre patients DMD et BMD.

Pour les autres patients (1/4) pour lesquels nous n'avons pas pu identifier de délétions intragéniques dans les exons du gène *DMD* que nous avons exploré, hormis le fait que des étiquettes cliniques DMD/BMD aient été posées par les médecins traitants, on pourrait toutefois apporter les possibilités suivantes, qu'il serait utile de vérifier, notamment par des explorations cliniques plus poussées ou des investigations moléculaires plus approfondies :

(i) les patients pourraient porter d'autres délétions intragéniques dans le gène *DMD*, différentes de celles que nous avons testé par les deux PCRs multiplexes de Chamberlain *et al.* (1988) et de Beggs *et al.* (1990), délétions qu'il conviendrait peut-être de rechercher dans le cadre de la mise au point d'autres PCRs multiplexes.

(ii) les malades pourraient avoir un type de mutation différent de celui des délétions intragéniques, soit des altérations de type duplication ou de petites mutations ponctuelles, mutations que notre protocole opératoire ne permet pas d'individualiser mais que l'on pourrait alors rechercher par Southern blot pour les premières ou par séquençage pour les deuxièmes.

(iii) les individus atteints auraient un autre type de dystrophie musculaire progressive qui partagerait certains, voire tout, les symptômes cliniques d'une autre dystrophie musculaire, ou alors auraient carrément une affection neuromusculaire différente ... d'où l'intérêt de réaliser un examen ou un réexamen clinique détaillé et précis, rehaussé par des

tests para-cliniques complémentaires. Ces autres dystrophies musculaires étant provoquées par des mutations dans d'autres gènes/protéines musculaires, cela suggère qu'il faudrait dresser une liste de cibles potentielles à tester en priorité en fonction des besoins et moyens disponibles dans notre pays, mais également en fonction d'études préliminaires qu'il faudrait rapidement engager. Il faudrait alors adopter une stratégie de criblage globale, peut être "protéique", que ce soit par western blotting ou par immunohistochimie, ce qui permettrait d'analyser le niveau d'expression des différentes protéines impliquées dans les dystrophies musculaires, mettant alors en évidence des anomalies quantitatives de la (des) protéine(s) déficiente(s) et révélant alors l'effet de ce(s) déficit(s) protéique(s) sur les protéines à laquelle (auxquelles) elle(s) se lie(nt) normalement dans la fibre musculaire [Anderson et Davison, 1999]. Cette approche nécessiterait toutefois de disposer de sources de protéines musculaires particulières dont nous avons discuté auparavant, soit des biopsies musculaires.

(iv) les patients présenteraient une dystrophie musculaire dont le locus/gène est encore aujourd'hui inconnu, auquel cas il faudrait prendre avantage de la disponibilité de nos familles pour l'identifier et le caractériser, notamment par des démarches d'analyse de liaison et d'approches gènes candidats.

Pour ce qui concerne l'étendue de délétions intragéniques identifiées dans le gène *DMD* dans notre panel de patients, il en ressortait une apparente variabilité d'étendue plus grande chez les patients BMD, observation toutefois due à la présence de quelques cas que l'on qualifierait d'uniques, un seul cas ayant été retrouvé pour chacune des délétions de 7, 9, 10, 12, 15 et 32 exons, contrairement aux patients DMD montrant une plus grande homogénéité de taille de délétions.

Cette constatation soulignait ainsi bien que l'étendue de la délétion caractérisée ne pouvait en aucun cas expliquer pleinement les traits cliniques soulevés (DMD ou BMD), en ce sens que la délétion d'un seul exon pouvait aussi bien être responsable de l'une comme de l'autre forme de dystrophinopathie, à tel point qu'une délétion très étendue (patient P82) entraînait même un phénotype BMD.

Les sites de délétions intragéniques identifiées dans le gène *DMD* chez nos patients a en outre montré qu'ils étaient variables et hétérogène, que ce soit lorsqu'on considérait l'ensemble des individus délétés ou seulement ceux DMD ou BMD.

Néanmoins, nous avons tout de même pu observer une nette prédominance d'implication du site P20 (qui se trouvait ainsi affecté dans quasiment 9 cas sur 10), alors que le site en amont Xj comptait pour sa part pour environ seulement 1/10<sup>ème</sup> des cas observés dans notre panel, avec toutefois un résultat quelque peu non attendu de seulement 2 patients DMD, mais de 7 patients BMD altérés au site en amont Xj.

Ces résultats semblant s'écarter quelque peu des données de la bibliographie, qui mentionnent environ 30% de délétions intragéniques au niveau de la partie proximale Xj du gène contre environ 70% plus distalement en P20 [Leturcq et Kaplan, 2005; Oshima *et al.*,

2009], résultats que l'on ne pourrait sans doute approcher qu'à travers l'étude d'un nombre plus élevé de malades atteints de dystrophinopathies.

Le fait que la région P20 soit plus fréquemment affectée que la région Xj chez nos malades a en fait d'importantes implications car elle permet de suggérer que c'est cette région qui doit être analysée en priorité dans le cadre d'une exploration moléculaire du gène *DMD* à la recherche d'altérations intragéniques affectant ce gène.

Dans un souci d'efficacité, il serait donc louable d'entamer les explorations par la recherche de délétions intragéniques au niveau de la région P20, 9/10<sup>ème</sup> des patients délétés de notre panel étant mutés en ce site.

En poussant plus loin ce même principe de gain de temps et d'argent, nous pourrions même prendre avantage de l'observation que certaines séquences exoniques étaient plus fréquemment touchées chez les patients de notre panel pour n'en cibler que certains seulement, au lieu des 19 testés globalement.

Le fait que les exons 48 ou 50 soient par exemple délétés chez 30 patients (soit près de 42%) laisse penser que tester l'un ou l'autre de ces deux exons, et ce à travers une simple PCR individuelle classique, permettrait de poser un diagnostic moléculaire de dystrophinopathie par mise en évidence de délétions intragéniques chez 2/5<sup>ème</sup> des malades, alors que l'analyse des exons 45, 50, 51 et 52 pour la recherche de leur présence aurait permis de mettre en évidence 59 patients délétés (soit 82%), mais près de 94% pour les patients uniquement mutés en P20. Egalement, 7 patients (78%) auraient été mis en évidence avec des délétions en Xj en testant seulement la présence des exons 4 et 8.

L'analyse de la présence de seulement 6 exons (en l'occurrence 4, 8, 45, 50, 51 et 52) parmi les 19 explorés aurait été suffisante pour confirmer qu'une délétion intragénique dans le gène *DMD* était responsable de l'affection chez 65 malades (près de 88% du total des malades DMD et BMD), soulignant ainsi toute l'attention qu'il fallait porter à la présence/l'absence de ces régions durant les procédures expérimentales, notamment la PCR multiplexe de Chamberlain *et al.* (1988) qui semblerait être la plus discriminante, les exons 4, 8, 45 et 51 qu'elle permet d'amplifier ayant permis d'identifier des délétions chez 54 patients (3/4 des malades).

Les délétions intragéniques que nous avons caractérisées chez nos patients DMD/BMD dans le gène *DMD* affectaient l'un des deux sites génomiques Xj ou P20, deux régions qui se trouvent proches des domaines protéiques de la dystrophine impliqués dans l'ancrage ou les interactions avec d'autres protéines musculaires (actine, dystroglycane, syntrophines, ... notamment).

Néanmoins, nous avons pu souligner que ni la présence d'une délétion intragénique particulière, ni son étendue, ni le site impliqué ne pouvaient à eux seuls rendre compte de la variabilité du phénotype ou d'une corrélation phénotype/génotype.

A plus forte raison, nous avons noté que les hot-spots altérés (Xj ou P20) ne pouvaient à eux seuls constituer un bon marqueur, bien au contraire, pour poser et diriger totalement le diagnostic phénotypique.

Un autre critère plus important, ou tout aussi important, devait ainsi être considéré pour permettre une meilleure discrimination entre les deux types de dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker : l'effet qu'a l'altération délétionnelle sur le cadre de lecture du gène *DMD* et donc sur la protéine dystrophine mutée produite.

En effet, bien qu'il n'existe pas de corrélation nette entre l'étendue de la délétion/duplication et la sévérité du trouble, en règle générale, les mutations qui affectent le gène *DMD* entraînent soit un déficit complet de la production de dystrophine (dystrophie musculaire de Duchenne), soit une altération de cette protéine qui la rend moins fonctionnelle (dystrophie musculaire de Becker), largement déterminée par le cadre de lecture de l'ARNm obtenu à partir de l'allèle délété. Une hypothèse, qu'on appelle souvent l' "hypothèse du cadre de lecture", propose en effet que les délétions qui altèrent le cadre de lecture de l'ARNm de la dystrophine génère une dystrophine non fonctionnelle et produit une dystrophie musculaire de Duchenne sévère, alors que les délétions qui respectent le cadre de lecture peuvent produire une dystrophine partiellement fonctionnelle présentant une délétion interne, provoquant alors une dystrophie moins sévère de Becker. Bien que des exceptions aient été décrites, la règle du cadre de lecture reste néanmoins confirmée dans plus de 90% des cas. Les mutations qui semblent échapper à cette règle sont celles qui affectent les domaines de liaison de la protéine et qui peuvent gravement affecter la fonction de celle-ci même lorsque le cadre de lecture est conservé. Il semblerait en outre que la terminaison prématurée de la traduction ait un impact sur le taux d'ARNm ou induirait une instabilité intra-nucléaire du transcrit, altérant ainsi son transport vers le cytoplasme [Monaco *et al.*, 1988; Koenig *et al.*, 1989; Aartsma-Rus *et al.*, 2006].

Une délétion est donc en mesure de générer deux effets exclusifs sur le cadre de lecture de la région codante totale du gène *DMD* : *(i)* soit créer un décalage du cadre de lecture ("frameshift") avec génération en aval d'une terminaison prématurée de la traduction, aboutissant alors à la synthèse d'une protéine tronquée dont la fonctionnalité pourrait être appréciée selon le site affecté; ou *(ii)* préserver le cadre de lecture, produisant ainsi une plus petite protéine à laquelle manquerait seulement une partie interne du produit final "wild-type" normal, auquel cas il faudra s'atteler à circonscrire le site affecté et le mettre en relation avec les interactions protéiques ou autres qui s'en trouveraient altérés [Hoffmann *et al.*, 1987; Monaco *et al.*, 1988].

Grâce à l'outil bioinformatique, nous avons ainsi pu, pour chaque patient, estimer la taille de la protéine mutée produite (nombre et nature des acides aminés, position du codon Stop lors de la génération d'un arrêt prématuré de synthèse de protéine, poids moléculaire en kDa), des données qui nous ont été très utiles pour l'analyse de l'effet des altérations moléculaires que nous avons identifiées.

En effet, la mise en évidence des conséquences des délétions intragéniques (décalage ou pas du cadre de lecture) et des tailles attendues des protéines mutées produites ont permis de dégager de nettes corrélations entre phénotype soulevé (dystrophie musculaire de Duchenne, DMD, et de Becker, BMD) et génotype caractérisé par PCRs multiplexes (délétion intragénique).

Tous les patients pour lesquels la délétion intragénique identifiée ne provoquait pas de décalage du cadre de lecture au sein du gène *DMD*, avaient un phénotype atténué BMD, alors que ceux qui avaient une délétion provoquant un décalage du cadre de lecture de la séquence codante du gène *DMD*, avaient un phénotype sévère DMD.

Il suffirait ainsi qu'il y ait production d'une protéine même plus petite pour ne produire qu'une forme atténuée BMD, alors qu'une protéine mutée avec création d'un codon Stop prématuré provoquerait une forme sévère DMD.

Cette affirmation suggérerait donc que l'absence de certaines régions de la protéine dystrophine pourrait avoir un effet mineur (occasionnant un phénotype atténué BMD), alors que celle d'autres auraient un effet extrêmement délétère (phénotype DMD).

Bien que cette assertion puisse partiellement être corroborée par certaines de nos données moléculaires, cette règle ne se trouvait pourtant pas toujours vérifiée pour certains de nos patients.

En effet, bien que pour les patients P4 (délétion exon 50) et P54 (délétion exon 51), les altérations aient un effet de décalage du cadre de lecture, le phénotype observé était atténué BMD.

D'autre part, de manière tout à fait inattendue, une même délétion intragénique (délétion de l'exon 51 avec décalage du cadre de lecture) générait deux phénotypes distincts chez nos malades : P21 et P80 étant DMD, alors que P54 était BMD. De même, pour les patients P53 et P85 (délétion des exons 46 à 52), le premier ayant une forme DMD et le second un phénotype BMD.

On pourrait simplement tenter d'expliquer cette observation par deux éventualités : l'une clinique, qui laisserait entendre qu'une erreur de diagnostic ait été faite pour l'individu P54 ou P85 qui aurait alors plutôt une forme sévère DMD (quoique son âge de 20 ans serait assez limite), ou alors BMD pour P54; l'autre génétique, qui suggérerait que d'autres altérations puissent siéger ailleurs (que ce soit dans la dystrophine ou pour d'autres protéines musculaires) modulant ainsi le phénotype chez un individu malade.

Pour tous les autres individus pour lesquels les bordures des délétions intragéniques n'ont pu être délimitées avec précision en proximal et en distal, la taille de la protéine mutée

générée s'est révélée une information clé, puisqu'il semblait alors qu'une taille minimale de protéine soit nécessaire pour parer aux effets gravissimes qu'était la symptomatologie DMD.

Une explication plausible que l'on pourrait proposer pour expliquer cette notion tiendrait au rôle même qu'a la dystrophine dans la fibre musculaire, rôle mécanique assurant l'intégrité des cellules musculaires lors du fonctionnement du muscle : une grande molécule aux propriétés "élastiques" qui interagirait avec des complexes protéiques. Pour peu que ces interactions protéiques ne soient pas trop altérés (auquel cas nous considérerions l'importance de certains régions de la protéine, et par voie de conséquence certains exons du gène *DMD*), la dystrophine doit conserver une taille suffisante pour assurer partiellement ce rôle.

Enfin, on peut également admettre que des altérations moléculaires affectant les autres partenaires protéiques de la dystrophine dans le muscle puissent avoir un effet encore plus délétère.

# **CONCLUSION**

Les techniques d'exploration des maladies neuromusculaires se sont considérablement développées, rendant aujourd'hui l'étude des dystrophies musculaires pluridisciplinaire, avec implication concertée des cliniciens, des anatomopathologistes et des biologistes moléculaires.

A travers notre analyse de plus d'une centaine de patients atteints de dystrophinopathies, dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) et dystrophie musculaire de Becker (BMD), en criblant spécifiquement le gène *DMD*, nous avons pu souligner dans notre population la forte prévalence de ces affections héréditaires lourdement handicapantes, voire létales pour la forme la plus précoce et la plus sévère DMD, près de 3/4 des individus de notre panel de malades ayant des délétions intragéniques affectant au moins un exon du gène exploré.

La caractérisation moléculaire précise de ces altérations par le biais d'une approche de deux PCRs multiplexes a montré toute la puissance et la justesse de cette démarche, soulignant par là-même la forte occurrence de certaines altérations délétionnelles dans le gène causatif *DMD*.

Bien que sommaires, les données que nous n'avons pas manqué de générer suite à nos explorations contribueront ainsi à une meilleure connaissance de la composante de notre population vis-à-vis des affections extrêmement invalidantes que sont les dystrophies musculaires progressives, à la réalisation d'études épidémiologiques qui font cruellement défaut (prévalence et fréquence des pathologies en Algérie, distribution géographique, altérations moléculaires récurrentes, ...) et à l'identification de nouvelles altérations moléculaires causatives.

En effet, la grande hétérogénéité des dystrophies musculaires qui se manifeste tant aux points de vue clinique que génétique fait qu'il est nécessaire d'adopter une stratégie diagnostique rapide et précise, permettant d'aborder efficacement le diagnostic moléculaire des dystrophies musculaires, et particulièrement les dystrophies musculaires de Duchenne (DMD) et de Becker (BMD), affections pour lesquelles les familles se trouvent totalement démunies et les enfants/adolescents qui en sont atteints finissent par sombrer dans une déchéance qui, malheureusement, déteint sur tout l'entourage familial et social, posant en outre de graves problèmes de santé publique.

Notre approche constitue en ce sens une démarche simple et facile à mettre en œuvre en routine, suggérant même que notre protocole opératoire devrait se faire séquentiellement en recherchant d'abord en priorité certaines altérations moléculaires en ciblant d'abord seulement quelques exons du gène *DMD* et également que les analyses bioinformatiques revêtaient toute leur importance quant au traitement des données générées par nos investigations expérimentales.

Nous avons ainsi pu souligner que ni la présence d'une délétion intragénique spécifique, ni son étendue, ni le site impliqué ne pouvaient à eux seuls rendre compte de la

variabilité du phénotype, DMD ou BMD, ou d'une quelconque corrélation phénotype/génotype, et qu'il fallait ainsi considérer avec forte attention le critère discriminant de l'effet potentiel de la mutation sur le cadre de lecture du gène *DMD* codant la protéine dystrophine.

L'identification des exons altérés chez les patients de notre panel nous aura ainsi permis, pour une grande partie d'entre eux, de délimiter les extrémités proximales et distales affectées par les altérations moléculaires caractérisées initialement, permettant alors une estimation de l'effet potentiel de ces délétions sur le cadre de lecture de la protéine dystrophine, esquissant ainsi, toutes analyses confondues, une corrélation phénotype/génotype offrant souvent l'avantage d'établir un diagnostic différentiel DMD/BMD.

Ces précieux résultats, même s'ils méritent encore d'être approfondis, que ce soit par d'autres approches moléculaires ou par leur élargissement à un nombre plus important de malades, permettent en outre de poser les jalons d'une meilleure prise en charge des malades, mais également d'entrevoir la mise en place d'un diagnostic prénatal et d'un conseil génétique fiable et précis à l'attention des familles qui en sont demandeuses.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

- Aartsma-Rus, A., Janson, A.A., Kaman, W.E., Bremmer-Bout, M., van Ommen, G.J., den Dunnen, J.T., and van Deutekom, J.C. (2004) Antisense-induced multi-exon skipping for Duchenne muscular dystrophy makes more sense. *Am. J. Hum. Genet.* **74**: 83-92.
- Aartsma-Rus, A., Van Deutekom, J.C., Fokkema, I.F., Van Ommen, G.J., and Den Dunnen, J.T. (2006) Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. *Hum. Mutat.* **27**: 938-945.
- Abbs, S., Tuffery-Giraud, S., Bakker, E., Ferlini, A., Sejersen, T., and Mueller, C., R. (2010) Best practice guidelines on molecular diagnostics in Duchenne/Becker muscular dystrophies. *Neuromuscul. Disord.* **20**: 422-427.
- Acsadi, G., Dickson, G., Love, D.R., Jani, A., Walsh, F.S., Gurusinge, A., Wolff, J.A., and Davies, K.E. (1991) Human dystrophin expression in *mdx* mice after intramuscular injection of DNA construct. *Nature* **352**: 815-818.
- Ahn, A.H., and Kunkel, L.M. (1993) The structural and functional diversity of dystrophin. *Nat. Genet.* **3**: 283-291.
- Ahn, A.H., and Kunkel, L.M. (1995) Syntrophin binds to an alternatively spliced exon of dystrophin. *J. Cell. Biol.* **128**: 363-371.
- Alderton, J.M., and Steinhardt, R.A. (2000) How calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes. *Trends Cardiovasc Med.* **10**: 268-272.
- Ambrose, H.J., Blake, D.J., Nawrotzki, R.A., and Davies, K.E. (1997) Genomic organization of the mouse dystrobrevin gene: comparative analysis with the dystrophin gene. *Genomics* **39**: 359-369.
- Anderson, L.V., et Davison, K. (1999) Multiplex Western blotting system for the analysis of muscular dystrophy proteins. *Am. J. Pathol.* **154**: 1017-1022.
- Angelini, C. (2007) The rôle of corticosteroids in muscular dystrophy: A critical appraisal. *Muscle Nerve* **36**: 424-435.
- Ashton, E.J., Yau, S.C., Deans, Z.C., and Abbs, S.J. (2008) Simultaneous mutation scanning for gross deletions, duplications and point mutations in the *DMD* gene. *Eur. J. Hum. Genet.* **16**: 53-61.
- Backman, E., Nylander, E., Johansson, I., Henriksson, K.G., and Tagesson, C. (1988) Selenium and vitamin E treatment of Duchenne muscular dystrophy: no effect on muscle function. *Acta Neurol. Scand.* **78**: 429-435.
- Bakker, E., Hofker, M.H., Goor, N., Mandel, J.L., Wrogemann, K., Davies, K.E., Kunkel, L.M., Willard, H.F., Fenton, W.A., and Sandkuyl, L. (1985) Prenatal diagnosis and carrier detection of Duchenne muscular dystrophy with closely linked RFLPs. *Lancet* **1**: 655-658.
- Bakker, E., Van Broeckhoven, C., Bonten, E.J., van de Vooren, M.J., Veenema, H., Van Hul, W., Van Ommen, G.J.B., Vandenberghe, A., and Pearson, P.L. (1987) Germline mosaicism and Duchenne muscular dystrophy mutations. *Nature* **329**: 554-556.
- Balasubramanian, S., Fung, E.T., and Haganir, R.L. (1998) Characterization of the tyrosine phosphorylation and distribution of dystrobrevin isoforms. *FEBS Lett.* **432**: 133-140.
- Banks, G.B., and Chamberlain, J.S. (2008) The value of mammalian models for Duchenne muscular dystrophy in developing therapeutic strategies. *Curr. Top. Dev. Biol.* **84**: 431-453.

- Barohn, R.J., Levine, E.J., Olson, J.O., and Mendell, J.R. (1988) Gastric hypomotility in Duchenne's muscular dystrophy. *N. Engl. J. Med.* **319**: 15-18.
- Bartoli, M., Ramarao, M.K., and Cohen, J.B. (2001) Interactions of the rapsyn RING-H2 domain with dystroglycan. *J. Biol. Chem.* **276**: 24911-24917.
- Barton-Davis, E.R., Cordier, L., Shoturma, D.I., Leland, S.E., and Sweeney, H.L. (1999) Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. *J. Clin. Invest.* **104**: 375-381.
- Baumbach, L.L., Chamberlain, J.S., Ward, P.A., Farwell, N.J., and Caskey, C.T. (1989) Molecular and clinical correlations of deletions leading to Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Neurology* **39**: 465-474.
- Beauchamp, J.R., Heslop, L., Yu, D.S., Tajbakhsh, S., Kelly, R.G., Wernig, A., Buckingham, M.E., Partridge, T.A., et Zammit, P.S. (2000) Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *J. Cell. Biol.* **151**: 1221-1234.
- Beggs, A.H., Koenig, M., Boyce, F.M., and Kunkel, L.M. (1990) Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum. Genet.* **86**: 45-48.
- Benchaouir, R., Merigalli, M., Farini, A., D'Antona, G., Belicchi, M., Goyenvalle, A., Battistelli, M., Bresolin, N., Bottinelli, R., Garcia, L., et Torrente, Y. (2008) Réhabilitation de la dystrophine humaine dans le modèle *scid/mdx* après greffe de cellules souches de patients DMD corrigées par saut d'exon. *Médecine/Sciences* **24**: 99-101.
- Ben Hamida, M., Fardeau, M., and Attia, N. (1983) Severe childhood muscular dystrophy affecting both sexes and frequent in Tunisia. *Muscle Nerve* **6**: 469-480.
- Bennett, R.R., Schneider, H.E., Estrella, E., Burgess, S., Cheng, A.S., Barrett, C., Lip, V., Lai, P.S., Shen, Y., Wu, B.L., Darras, B.T., Beggs, A.H., and Kunkel, L.M. (2009) Automated DNA mutation detection using universal conditions direct sequencing: application to ten muscular dystrophy genes. *BMC Genetic* **10**: 66-76.
- Béroud, C., Hamroun, D., Collod-Béroud, G., Boileau, C., Soussi, T., and Claustres, M. (2005) UMD (Universal Mutation Database): 2005 update. *Hum. Mutat.* **26**: 184-191.
- Bertoni, C., and Rando, T.A. (2002) Dystrophin gene repair in *mdx* muscle precursor cells *in vitro* and *in vivo* mediated by RNA-DNA chimeric oligonucleotides. *Hum. Gene Ther.* **13**: 707-718.
- Bertoni, C., Morris, G.E., and Rando, T.A. (2005) Strand bias in oligonucleotide-mediated dystrophin gene editing. *Hum. Mol. Genet.* **14**: 221-233.
- Bertoni, C., Jarrahan, S., Wheeler, T.M., Li, Y., Olivares, E.C., Calos, M.P., and Rando, T.A. (2006) Enhancement of plasmid-mediated gene therapy for muscular dystrophy by directed plasmid integration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 4194-24.
- Bettecken, T., and Muller, C.R. (1989) Identification of a 220-kb insertion into the Duchenne gene in a family with an atypical course of muscular dystrophy. *Genomics* **4**: 592-596.
- Biggar, W.D., Gingras, M., Fehlings, D.L., Harris, V.A., and Steele, C.A. (2001) Deflazacort treatment of Duchenne muscular dystrophy. *J. Pediatr.* **138**: 45-50.
- Biggar, W.D., Klamut, H.J., Demacio, P.C., Stevens, D.J., and Ray, P.N. (2002) Duchenne muscular dystrophy: current knowledge, treatment, and future prospects. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **401**: 88-106.

- Bladt, F., Riethmacher, D., Isenmann, S., Aguzzi, A., and Birchmeier, C. (1995) Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature* **376**: 768-771.
- Blake, D.J., Hawkes, R., Benson, M.A., and Beesley, P.W. (1999) Different dystrophin-like complexes are expressed in neurons and glia. *J. Cell. Biol.* **147**: 645-658.
- Blake, D.J., Weir, A., Newey, S.E., and Davies, K.E. (2002) Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol. Rev.* **82**: 291-329.
- Blau, H.M., Webster, C., and Pavlath, G.K. (1990) Purification and proliferation of human myoblasts isolated with fluorescence activated cell sorting. *Adv. Exp. Med. Biol.* **280**: 97-100.
- Bockhold, K.J., Rosenblatt, J.D., and Partridge, T.A. (1998) Aging normal and dystrophic mouse muscle: analysis of myogenicity in cultures of living single fibers. *Muscle Nerve* **21**: 173-183.
- Bonifati, M.D., Ruzza, G., Bonometto, P., Berardinelli, A., Gorni, K., Orcesi, S., Lanzi, G., et Angelini, C. (2000) A multicenter, double-blind, randomized trial of deflazacort versus prednisone in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve* **23**: 1344-1347.
- Bougeon, P. (2008) Les myopathies innées et acquises. *Actualités pharmaceutiques* **471**: 10-21.
- Boyd, Y., and Buckle, V.J. (1986) Cytogenetic heterogeneity of translocations associated with Duchenne muscular dystrophy. *Clin. Genet.* **29**: 108-115.
- Boyd, Y., Buckle, V., Holt, S., Munro, E., Hunter, D., and Craig, I. (1986) Muscular dystrophy in girls with X;autosome translocations. *J. Med. Genet.* **23**: 484-490.
- Bradley, D.M., Parsons, E.P., and Clarke, A.J. (1993) Experience with screening newborns for Duchenne muscular dystrophy in Wales. *B.M.J.* **306**: 357-360.
- Bremmer-Bout, M., Aartsma-Rus, A., de Meijer, E.J., Kaman, W.E., Janson, A.A., Vossen, R.H., van Ommen, G.J., den Dunnen, J.T., and van Deutekom, J.C. (2004) Targeted exon skipping in transgenic *hDMD* mice: A model for direct preclinical screening of human-specific antisense oligonucleotides. *Mol. Ther.* **10**: 232-240.
- Brennan, J.E., Chao, D.S., Xia, H., Aldape, K., and Brecht, D.S. (1995) Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* **82**: 743-752.
- Brown, R.H.Jr., and Hoffman, E.P. (1988) Molecular biology of Duchenne muscular dystrophy. *Trends Neurosci.* **11**: 480-484.
- Bujold, M., Caron, N., Camiran, G., Mukherjee, S., Allen, P.D., Tremblay, J.P., and Wang, Y. (2002) Autotransplantation in *mdx* mice of *mdx* myoblasts genetically corrected by an HSV-1 amplicon vector. *Cell Transplant.* **11**: 759-767.
- Bulman, D.E., Gangopadhyay, S.B., Bechuck, K.G., Worton, R.G., and Ray, P.N. (1991) Point mutation in the human dystrophin gene: identification through Western blot analysis. *Genomics* **10**: 457-460.
- Bushby, K.M., Gardner-Medwin, D., Nicholson, L.V., Johnson, M.A., Haggerty, I.D., Cleghorn, N.J., Harris, J.B., and Bhattacharya, S.S. (1993) The clinical, genetic and dystrophin characteristics of Becker muscular dystrophy. II. Correlation of phenotype with genetic and protein abnormalities. *J. Neurol.* **240**: 105-112.

- Bushby, K.M., Lochmüller, H., Lynn, S., and Straub, V. (2009) Interventions for muscular dystrophy: molecular medicines entering the clinic. *Lancet* **374**: 1849-1456.
- Byers, T.J., Lidov, H.G., and Kunkel, L.M. (1993) An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve. *Nat. Genet.* **4**: 77-81.
- Carpenter, J.L., Hoffman, E.P., Romanul, F.C.A., Kunkel, L.M., Rosales, R.K., Ma, N.S.F., Dasbach, J.J., Rae, J.F., Moore, F.M., McAfee, M.B., and Pearce, L.K. (1989) Feline muscular dystrophy with dystrophin deficiency. *Am. J. Pathol.* **135**: 909-919.
- Chakkalakal, J.V., Thompson, J., Parks, R.J., and Jasmin, B.J. (2005) Molecular, cellular, and pharmacological therapies for Duchenne/Becker muscular dystrophies. *FASEB J.* **19**: 880-891.
- Chamberlain, J.S., Gibbs, R.A., Ranier, J.E., Nguyen, P.N., and Caskey, C.T. (1988) Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res.* **16**: 11141-11156.
- Chelly, J., Kaplan, J.C., Maire, P., Gautron, S., and Kahn, A. (1988) Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissues. *Nature* **333**: 858-860.
- Chelly, J., et Kaplan, J.C. (1988) La myopathie de Duchenne : du gène *DMD* à la dystrophine. *Médecine/Sciences* **4**: 141-150.
- Claudepierre, T., Dalloz, C., Mornet, D., Matsumura, K., Sahel, J., and Rendon, A. (2000) Characterization of the intermolecular associations of the dystrophin-associated glycoprotein complex in retinal Muller glial cells. *J. Cell Sci.* **19**: 3409-3417.
- Cornelison, D.D., and Wold, B.J. (1997) Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Dev. Biol.* **191**: 270-283.
- Cornelison, D.D., Filla, M.S., Stanley, H.M., Rapraeger, A.C., and Olwin, B.B. (2001) Syndecan-3 and syndecan-4 specifically mark skeletal muscle satellite cells and are implicated in satellite cell maintenance and muscle regeneration. *Dev. Biol.* **239**: 79-94.
- Cornelison, D.D., Wilcox-Adelman, S.A., Goetinck, P.F., Rauvala, H., Rapraeger, A.C., and Olwin, B.B. (2004) Essential and separable roles for Syndecan-3 and Syndecan-4 in skeletal muscle development and regeneration. *Genes Dev.* **18**: 2231-2236.
- Cooper, B.J., Gallagher, E.A., Smith, C.A., Valentine, B.A., and Winand, N.J. (1990) Mosaic expression of dystrophin in carriers of canine X-linked muscular dystrophy. *Lab. Invest.* **62**: 171- 178.
- Cox, G.A., Sunada, Y., Campbell, K.P., and Chamberlain, J.S. (1994) Dp71 can restore the dystrophin-associated glycoprotein complex in muscle but fails to prevent dystrophy. *Nature Genet.* **8**: 333-339.
- Crosbie, R.H., Heighway, J., Venzke, D.P., Lee, J.C., and Campbell, K.P. (1997) Sarcospan, the 25-kDa transmembrane component of the dystrophin- glycoprotein complex. *J. Biol. Chem.* **272**: 31221-31224.
- Culligan, K.G., Mackey, A.J., Finn, D.M., Maguire, P.B., and Ohlendick, K., (1998) Role of dystrophin isoforms and associated proteins in muscular dystrophy. *Int. J. Mol. Med.* **2**: 639-648.
- d'Albis, A., Couteaux, R., Janmot, C., Roulet, A., and Mira, J.C. (1988) Regeneration after cardiotoxin injury of innervated and denervated slow and fast muscles of mammals. Myosin isoform analysis. *Eur. J. Biochem.* **174**: 103-110.

- Dalkilic, I., and Kunkel, L.M. (2003) Muscular dystrophies: From genes to pathogenesis. *Curr.Opin.Genet. Dev.* **13**: 231-238.
- Danko, I., Fritz, J.D., Latendresse, J.S., Herweijer, H., Schultz, E., Danko, L., and Wolff, J.A. (1993) Dystrophin expression improves myofiber survival in *mdx* muscle following intramuscular plasmid DNA injection. *Hum. Mol. Genet.* **2**: 2055-2061.
- Darabi, R., Gehlbach, K., Bachoo, R.M., Kamath, S., Osawa, M., Kamm, K.E., Kyba, M., and Perlingeiro, R.C.R. (2008) Functional skeletal muscle regeneration from differentiating embryonic stem cells. *Nat. Med.* **14**: 134-143.
- Davies, K.E., Pearson, P.L., Harper, P.S., Murray, J.M., O'Brien, T., Sarfarazi, M., and Williamson, R. (1983) Linkage analysis of two cloned DNA sequences flanking the Duchenne muscular dystrophy locus on the short arm of the human X chromosome. *Nucleic Acids Res.* **11**: 2303-2312.
- Deburgrave, N., Daoud, F., Llense, S., Barbot, J.C., Récan, D., Peccate, C., Burghes, A.H., Béroud, C., Garcia, L., Kaplan, J.C., Chelly, J., et Leturcq, F. (2007) Protein- and mRNA-based phenotype-genotype correlations in DMD/BMD with point mutations and molecular basis for BMD with nonsense and frameshift mutations in the *DMD* gene. *Hum. Mutat.* **28**: 183-195.
- DelloRusso, C., Scott, J.M., Hartigan-O'Connor, D., Salvatori, G., Barjot, C., Robinson, A.S., Crawford, R.W., Brooks, S.V., and Chamberlain, J.S. (2002) Functional correction of adult *mdx* mouse muscle using gutted adenoviral vectors expressing full-length dystrophin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 12979-12984.
- Denti, M.A., Rosa, A., D'Antona, G., Sthandier, O., De Angelis, F.G., Nicoletti, C., Allocca, M., Pansarasa, O., Parente, V., Musarò, A., Auricchio, A., Bottinelli, R., and Bozzoni, I. (2006) Body-wide gene therapy of Duchenne muscular dystrophy in the *mdx* mouse model. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 3758-3763.
- De Recondo, J., et De Recondo, A.M. (2001) Pathologie du muscle strié. De la biologie cellulaire à la thérapie. Ed. Flammarion Médecine-Sciences, Paris.
- Desnuelle, C. (1994) Les enseignements de la dystrophine. *Presse Med.* **23**: 896-900.
- Dixon, A.K., Tait, T.M., Campbell, E.A., Bobrow, M., Roberts, R.G., and Freeman, T.C. (1997) Expression of the dystrophin-related protein 2 (Drp2) transcript in the mouse. *J. Mol. Biol.* **270**: 551-558.
- Drachman, D.B., Toyka, K.V., and Myer, E. (1974) Prednisone in Duchenne muscular dystrophy. *Lancet* **2**: 1409-1412.
- D'Souza, V.N., Nguyen, T.M., Morris, G.E., Karges, W., Pillers, D.A., and Ray, P.N. (1995) A novel dystrophin isoform is required for normal retinal electrophysiology. *Hum. Mol. Genet.* **4**: 837-842.
- Dupont-Versteegden, E.E., Katz, M.S. and McCarter, R.J. (1995) Beneficial versus adverse effects of long-term use of clenbuterol in *mdx* mice. *Muscle Nerve* **18**: 1447-1459.
- Durbeej, M., Jung, D., Hjalt, T., Campbell, K.P., and Ekblom, P. (1997) Transient expression of Dp140, a product of the Duchenne muscular dystrophy locus, during kidney tubulogenesis. *Dev. Biol.* **181**: 156-167.
- Durbeej, M., and Campbell, K.P. (2002) Muscular dystrophies involving the dystrophin glycoprotein complex: an overview of current mouse models. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**: 349-361.

- Efstathiou, S., and Minson, A.C. (1995) Herpes virus-based vectors. *Br. Med. Bull.* **51**: 45-55.
- Ehmsen, J., Poon, E., and Davies, K. (2002) The dystrophin-associated protein complex. *J. Cell Sci.* **115**: 2801-2803.
- Ehrig, K., Leivo, I., Argraves, W.S., Ruoslahti, E., and Engvall, E. (1990) Merosin, a tissue-specific basement membrane protein, is a laminin-like protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 3264-3268.
- Emery, A.E. (1991) Population frequencies of inherited neuromuscular diseases. A world survey. *Neuromuscul. Disord.* **1**: 19-29.
- Emery, A.E.H. (1993) Duchenne muscular dystrophy. Ed. Oxford University Press, 2<sup>nd</sup> edition.
- Emery, A.E.H. (2002) The muscular dystrophies. *Lancet* **359**: 687-695.
- Engel, A.G., and Franzini-Armstrong, C. (1994) Myology. 3<sup>rd</sup> Edition. McGraw-Hill, USA.
- Ervasti, J.M., Ohlendieck, K., Kahl, S.D., Gaver, M.G., and Campbell, K.P. (1990) Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature* **345**: 315-319.
- Ervasti, J.M., and Campbell, K.P. (1991) Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell* **66**: 1121-1131.
- Ervasti, J.M. and Campbell, K.P. (1993) A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J. Cell. Biol.* **122**: 809-823.
- Fardeau, M., Braun, S., Romero, N.B., Hogrel, J.Y., Rouche, A., Ortega, V., Mourot, B., Squiban, P., Benveniste, O., and Herson, S. (2005) About a phase I gene therapy clinical trial with a full-length dystrophin gene-plasmid in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *J. Soc. Biol.* **199**: 29-32.
- Fassati, A., and Bresolin, N. (2000) Retroviral vectors for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Neurol. Sci.* **21**: 925-927.
- Fernandez, C., Maues De Paula, A., Figarella-Branger, D., Chabrol, B., Pouget, J., et Pellissier, J., F. (2008) Intérêt de la biopsie musculaire dans l'exploration des hyperCKémies chroniques isolées. *Rev. Rhumat.* **75**: 126-129.
- Ferrier, P., Bamatter, F., and Klein, D. (1965) Muscular dystrophy (Duchenne) in a girl with Turner's syndrome. *J. Med. Genet.* **42**: 38-46.
- Fisher, R., Tinsley, J.M., Phelps, S.R., Squire, S.E., Townsend, E.R., Martin, J.E., and Davies, K.E. (2001) Non-toxic ubiquitous over-expression of utrophin in the *mdx* mouse. *Neuromuscul. Disord.* **11**: 713-721.
- Flanigan, K.M., Von Niederhausern, A., Dunn, D.M., Alder, J., Mendell, J.R., and Weiss, R.B. (2003) Rapid direct sequence analysis of the dystrophin gene. *Am. J. Hum. Genet.* **72**: 931-939.
- Forrest, S.M., Cross, G.S., Speer, A., Gardner-Medwin, D., Burns, J.B., and Davis, K.E. (1987) Preferential deletion of exons in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Nature* **329**: 638-640.
- Francke, U., Ochs, H.D., de Martinville, B., Giacalone, J., Lindgren, V., Distèche, C., Pagon, R.A., Hofker, M.H., van Ommen, G.J.B., Pearson, P.L., and Wedgwood, R.J. (1985) Minor Xp21 chromosome deletion in a male associated with expression of Duchenne

- muscular dystrophy, chronic granulomatous disease, retinitis pigmentosa, and McLeod syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **37**: 250-267.
- Franzini-Armsrong, A.G.E. (1994) *Myology : Basic and clinical*. Ed. McGraw-Hill, New York, p.1937.
- Galbiati, F., Razani, B., and Lisanti, M.P.B. (2001) Caveolae and caveolin-3 in muscular dystrophy. *Trends. Mol. Med.* **7**: 435-441.
- Gaschen, F.P., Hoffman, J.R.M., Gorospe, E.W., Uhl, D.F., Gardinet, G.H., and Pearce, L.K. (1992) Dystrophin deficiency causes lethal muscle hypertrophy in cats. *J. Neurol. Sci.* **110**: 149-159.
- Gibertoni, M., Colombo, A., Schoenhuber, R., Galassi, G., Calò, M., Crisi, G., and Martinelli, C.A. (1987) Muscle CT, biopsy and EMG in diagnosis of neuromuscular diseases. *Ital. J. Neurol. Sci.* **8**: 51-53.
- Gilman, S. (2007) *Neurobiology of disease: Muscular dystrophies*. Ed. Elsevier Academic Press.
- Goetsch, S.C., Hawke, T.J., Gallardo, T.D., Richardson, J.A., and Garry, D.J.(2003) Transcriptional profiling and regulation of the extracellular matrix during muscle regeneration. *Physiol. Genomics* **14**: 261-271.
- Gomez, M.R., Engel, A.G. Dewald, G., and Peterson, H.A. (1977) Failure of inactivation of Duchenne dystrophy X chromosome in one of female identical twins. *Neurology* **27**: 537-541.
- Gorecki, D.C., Monaco, A.P., Derry, J.M., Walker, A.P., Barnard, E.A., and Barnard, P.J. (1992) Expression of four alternative dystrophin transcripts in brain regions regulated by different promoters. *Hum. Mol. Genet.* **1**: 505-510.
- Gorospe, J.R., and Hoffman, E.P. (1992) Duchenne muscular dystrophy. *Curr. Opin. Rheumatol.* **4**: 794-800.
- Greenberg, D.S., Sunada, Y., Campbell, K.P., Yaffe, D., et Nudel, U. (1994) Exogenous Dp71 restores the levels of dystrophin associated proteins but does not alleviate muscle damage in *mdx* mice. *Nature Genet.* **8**: 340-344.
- Greenstein, R.M., Reardon, M.P., and Chan, T.S. (1977) An X/autosome translocation in a girl with Duchenne muscular dystrophy (DMD): evidence for DMD gene localization. *Pediatr. Res.* **11**: 457.
- Gregorevic, P., Blankinship, M.J., Allen, J.M., Crawford, R.W., Meuse, L., Miller, D.G., Russell, D.W., and Chamberlain, J.S. (2004) Systemic delivery of genes to striated muscles using adeno-associated viral vectors. *Nature Medicine* **10**: 828-834.
- Grounds, M.D., and McGeachie, J.K. (1992) Skeletal muscle regeneration after crush injury in dystrophic *mdx* mice: an autoradiographic study. *Muscle Nerve* **15**: 580-586.
- Grozdanovic, Z., and Baumgarten, H.G. (1999) Nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: a signaling component of the dystrophin-glycoprotein complex. *Histol. Histopathol.* **14**: 243-256.
- Guis, S., Krahn, M., Fernandez, C., Mattei, J.P., Levy, N., et Bendahane, D. (2010) Pathologies des muscles squelettiques. *EMC (Elsevier Masson SAS, Paris)*, Appareil locomoteur, 15-143-A-10.
- Hagège, A.A., Marolleau, J.P., Vilquin, J.T., Alhérière, A., Peyrard, S., Duboc, D., Abergel, E., Messas, E., Mousseaux, E., Schwartz, K., Desnos, M., and Menasché, P. (2006)

- Skeletal myoblast transplantation in ischemic heart failure: long-term follow-up of the first phase I cohort of patients. *Circulation* **114**: 108-113.
- Harcourt, L.J., Schertzer, J.D., Ryall, J.G., and Lynch, G.S. (2007). Low dose formoterol administration improves muscle function in dystrophic *mdx* mice without increasing fatigue. *Neuromuscul. Disord.* **17**: 47-55.
- Hartikka, J., Sukhu, L., Buchner, C., Hazard, D., Bozoukova, V., Margalith, M., Nishioka, W.K., Wheeler, C.J., Manthorp, M., and Sawdey, M. (2001) Electroporation-facilitated delivery of plasmid DNA in skeletal muscle: plasmid dependence of muscle damage and effect of poloxamer 188. *Mol. Ther.* **4**: 407-415.
- Hoffman, E.P., Brown, R.H., and Kunkel, L.M. (1987) Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* **51**: 919-928.
- Hoffman, E.P., Fischbeck, K.H., Brown, R.H., Johnson, M., Medori, R., Loire, J.D., Harris, J.B., Waterston, R., Brooke, M., Specht, L., Kupsky, W., Chamberlain, J., Caskey, C.T., Shapiro, F., and Kunkel, L.M. (1988) Characterization of dystrophin in muscle-biopsy specimens from patients with Duchenne's or Becker's muscular dystrophy. *N. Engl. J. Med.* **318**: 1363-1368.
- Hoffman, E.P., Morgan, J.E., Watkins, S.C., and Partridge, T.A. (1990) Somatic reversion/suppression of the mouse *mdx* phenotype *in vivo*. *J. Neurol. Sci.* **99**: 9-25.
- Hoffman, E.P., and Kunkel, L.M. (1991) Dystrophin Abnormalities in Duchenne/Becker Muscular Dystrophy. *Neuron* **2**: 1019-1029.
- Holder, E., Maeda, M., and Bies, R.D. (1996) Expression and regulation of the dystrophin Purkinje promoter in human skeletal muscle, heart, and brain. *Hum. Genet.* **97**: 232-239.
- Howard, P.L., Dally, G.Y., Wong, M.H., Ho, A., Weleber, R.G., Pillers, D.A., and Ray, P.N. (1998a) Localization of dystrophin isoform Dp71 to the inner limiting membrane of the retina suggests a unique functional contribution of Dp71 in the retina. *Hum. Mol. Genet.* **7**: 1385-1391.
- Howard, P.L., Klamut, H.J., and Ray, P.N. (1998b) Identification of a novel actin binding site within the Dp71 dystrophin isoform. *FEBS Lett.* **441**: 337-341.
- Hu, X., Ray, P., N., Murphy, E., G., Thompson, M., W., and Worton, R., G. (1990) Duplicational mutation at the Duchenne muscular dystrophy locus: its frequency, distribution, origin, and phenotype-genotype correlation. *Am. J. Hum. Genet.* **46**: 682-695.
- Hu, X., and Worton, R. G. (1992) Partial gene duplication as a cause of human disease. *Hum. Mutat.* **1**: 3-12.
- Irintchev, A., Zweyer, M., and Wernig, A. (1997) Impaired functional and structural recovery after muscle injury in dystrophic *mdx* mice. *Neuromuscul. Disord.* **7**: 117-125.
- Jay, V., and Vajsar, J. (2001) The dystrophy of Duchenne. *Lancet* **357**: 550-552.
- Kaplan, J.C., Jean-Pierre, M., Urtizbera, J.A., et Beckmann, J.S. (1996) Bases moléculaires des dystrophies moléculaires progressives à transmission autosomique récessive. *Ann. Institut Pasteur* **7**: 157-171.
- Karpati, G., Hilton-Jones, D., and Griggs, R.C. (2001) Disorders of voluntary muscle. Cambridge University Press, USA.
- Kilimann, M.W., Pizzuti, A., Grompe, M., and Caskey, C.T. (1992) Point mutations and polymorphisms in the human dystrophin gene identified in genomic DNA sequences amplified by multiplex PCR. *Hum. Genet.* **89**: 253-258.

- Kobzik, L., Reid, M.B., Bredt, D.S., and Stamler, J.S. (1994) Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature* **372**: 546-548.
- Koenig, M., Monaco, A.P., and Kunkel, L.M. (1988) The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* **53**: 219-226.
- Koenig, M., Beggs, A.H., Moyer, M., Scherpf, S., Heindrich K, Bettecken T, Meng G, Muller CR, Lindlof M, et Kaariainen H. (1989) The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am. J. Hum. Genet.* **45**: 498-506.
- Koenig, M., and Kunkel, L.M. (1990) Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility. *J. Biol. Chem.* **265**: 4560-4566.
- Krag, T.O., Bogdanovich, S., Jensen, C.J., Fischer, M.D., Hansen-Schwartz, J., Javazon, E.H., Flake, A.W., Edvinsson, L., and Khurana, T.S. (2004) Heregulin ameliorates the dystrophic phenotype in *mdx* mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 13856-13860.
- Kunkel, L.M., Monaco, A.P., Middlesworth, W., Ochs, H.D., and Latt, S.A. (1985) Specific cloning of DNA fragments absent from the DNA of a male patient with an X chromosome deletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 4778-4782.
- Kwak, K.B., Chung, S.S., Kim, O.M., Kang, M.S., Ha, D.B., and Chung, C.H. (1993) Increase in the level of m-calpain correlates with the elevated cleavage of filamin during myogenic differentiation of embryonic muscle cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **1175**: 243-249.
- Laforêt, P., Eymard, B., et Orlikowski, D. (2008) Principales maladies neuromusculaires et leur semiologie. *J. Euro. Urgences* **21**: 89-93.
- Lankester, B.J.A., Whitehouseb, M.R., and Garganc, M.F. (2007) Duchenne muscular dystrophy. *Current Orthopaedics* **21**: 298-300.
- Lederfein, D., Levy, Z., Augier, N., Mornet, D., Morris, G., Fuchs, O., Yaffe, D., and Nudel, U. (1992) A 71-kilodalton protein is a major product of the Duchenne muscular dystrophy gene in brain and other nonmuscle tissues. *Proc; Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 5346-5350.
- Lederfein, D., Yaffe, D., and Nudel, U. (1993) A housekeeping type promoter, located in the 3' region of the Duchenne muscular dystrophy gene, controls the expression of Dp71, a major product of the gene. *Hum. Mol. Genet.* **2**: 1883-1888.
- Leger, J.J., Augier, N., Leger, J., Mornet, D., et Pons, F. (1991) La ou les dystrophine(s), trois années après leur découverte. *Médecine/Science* **7**: 805-819.
- Lesca, G., Demarquay, G., Liense, S., Streichenberger, N., Petiot, P., Michel-Calemard, L., Récan, D., Vial, C., et Ollagnon-Roman, E. (2003) Les conductrices symptomatiques pour les dystrophinopathies avec biais d'inactivation du chromosome X. *Rev. Neurol.* **159**: 775-780.
- Lescaut, W., Butori, C., Soriani, M.H., et Desnuelles, C. (2004) A propos de quatre cas féminins de dystrophie musculaire de Duchenne et Becker. *Rev. Méd. Int.* **25**: 464-467.
- Leturcq, F., et Kaplan, J.C. (2005) Bases moléculaires des dystrophinopathies. *J. Soc. Biol.* **199**: 5-11.
- Li, S., Fall, B.M., Reyes, M., Angello, J.C., Welikson, R., Hauschka, S.D., and Chamberlain, J.S. (2005) Stable transduction of myogenic cells with lentiviral vectors expressing a minidystrophin. *Gene. Ther.* **12**: 1099-1108.

- Lidov, H.G., Selig, S., and Kunkel, L.M. (1995) Dp140: a novel 140 kDa CNS transcript from the dystrophin locus. *Hum. Mol. Gen.* **4**: 329-335.
- Lidov, H. (2009) Dystrophin, associated proteins and muscular dystrophy. Ed. Elsevier, p.771-784.
- Liechti-Gallati, S., Braga, S., Hirsiger, H., and Moser, H. (1987) Familial deletion in Becker type muscular dystrophy within the pXJ region. *Hum. Genet.* **77**: 267-268.
- Liu, M.Y., Yue, S.Q., Harper, R.W., Grange, J.S., Chamberlain, J.S., and Duan, D. (2005) Adeno-associated virus-mediated microdystrophin expression protects young mdx muscle from contraction-induced injury. *Mol. Ther.* **11**: 245-256.
- Loh, N.Y., Nebenius-Oosthuizen, D., Blake, D.J., Smith, A.J., and Davies, K.E. (2001) Role of betadystrobrevin in non muscle dystrophin-associated protein complex-like complexes in kidney and liver. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 7442-7448.
- Love, D.R., Byth, B.C., Tinsley, J.M., Blake, D.J., and Davies, K.E. (1993) Dystrophin and dystrophin-related proteins: a review of protein and RNA studies. *Neuromuscul. Disord.* **3**: 5-21.
- Lovering, R.M., Porter, N.C., and Bloch, R.J. (2005) The muscular dystrophies: From genes to therapies. *Phys. Ther.* **85**: 1372-1388.
- Lu, Q.L., Morris, G.E., Wilton, S.D., Ly, T., Artem'yeva, O.V., Strong, P., and Partridge, T.A. (2000) Massive idiosyncratic exon skipping corrects the nonsense mutation in dystrophic mouse muscle and produces functional revertant fibers by clonal expansion. *J. Cell. Biol.* **148**: 985-996.
- Lu, Q.L., Rabinowitz, A., Chen, Y.C., Yokota, T., Yin, H., Alter, J., Jadoon, A., Bou-Gharios, G., and Partridge, T. (2005) Systemic delivery of antisense oligoribonucleotide restores dystrophin expression in body-wide skeletal muscles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 198-203.
- Lumeng, C., Lumeng, C., Phelps, S., Crawford, G.E., Walden, P.D., Barald, K., and Chamberlain, J.S. (1999) Interactions between beta 2-syntrophin and a family of microtubule-associated serine/threonine kinases. *Nat. Neurosci.* **2**: 611-617.
- Luz, M.A., Marques, M.J., and Santo Neto, H. (2002) Impaired regeneration of dystrophin-deficient muscle fibers is caused by exhaustion of myogenic cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **35**: 691-695.
- Mann, C.J., Honeyman, K., Cheng, A.J., Ly, T., Lloyd, F., Fletcher, S., Morgan, J.E., Partridge, T.A., and Wilton, S.D. (2001) Antisense-induced exon skipping and synthesis of dystrophin in the *mdx* mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 42-47.
- Martin, H., and Ontell, M. (1988) Regeneration of dystrophic muscle following multiple injections of bupivacaine. *Muscle Nerve* **11**: 588-596.
- Matsumura, K., Tomé, F.M., Collin, H., Azibi, K., Chaouch, M., Kaplan, J.C., Fardeau, M., and Campbell, K.P. (1992) Deficiency of the 50K dystrophin-associated glycoprotein in severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy. *Nature* **359**: 320-322.
- Matsumura, K., Tomé, F.M., Ionasescu, V., Ervasti, J.M., Anderson, R.D., Romero, N.B., Simon, D., Récan, D., Kaplan, J.C., Fardeau, M., and Campbell, K.P. (1993a) Deficiency of dystrophin-associated proteins in Duchenne muscular dystrophy patients lacking COOH-terminal domains of dystrophin. *J. Clin. Invest.* **92**: 866-871.

- Matsumura, K., Yamada, H., Shimizu, T., and Campbell, K.P. (1993b) Differential expression of dystrophin, utrophin and dystrophin-associated proteins in peripheral nerve. *FEBS Lett.* **334**: 281-285.
- Matsuo, M., Masumura, T., Nishio, H., Nakajima, T., Kitoh, Y., Takumi, T., Koga, J., and Nakamura, H. (1991) Exon skipping during splicing of dystrophin mRNA precursor due to an intraexon deletion in the dystrophin gene of Duchenne muscular dystrophy. *Kobe J. Clin. Invest.* **87**: 2127-2131.
- Mehler, M.F. (2000) Brain dystrophin, neurogenetics and mental retardation. *Brain Res. Rev.* **32**: 277-307.
- Mendell, J.R., Moxley, R.T., Griggs, R.C., Brooke, M.H., Fenichel, G.M., Miller, J.P., King, W., Signore, L., Pandya, S., Florence, J., Schierbecker, J., Robison, J., Kaiser, K., Mandel, S., Arfken, C., and Gilder, B. (1989) Randomized, double-blind six-month trial of prednisone in Duchenne's muscular dystrophy. *N. Engl. J. Med.* **320**: 1592-1597.
- Michele, D.E., and Campbell, K.P. (2003) Dystrophin-glycoprotein complex: post-translational processing and dystroglycan function. *J. Biol. Chem.* **278**: 15457-15460.
- Miura, P., and Jasmin, B.J. (2006) Utrophin upregulation for treating Duchenne or Becker muscular dystrophy: how close are we? *Trends Mol. Med.* **12**: 122-129.
- Monaco, A.P., Neve, R.L., Colletti-Feener, C., Bertelson, C.J., Kurnit, D.M., and Kunkel, L.M. (1986) Isolation of candidate cDNAs for portion of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature* **323**: 646-650.
- Monaco, A.P., Bertelson, C.J., Liechti-Gallati, S., Moser, H., and Kunkel, L.M. (1988) An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the *DMD* locus. *Genomics* **2**: 90-95.
- Moser, H. (1984) Duchenne muscular dystrophy: pathogenetic aspects and genetic prevention. *Hum. Genet.* **66**: 17-40.
- Mostacciolo, M.L., Lombardi, A., Cambissa, V., Danieli, G.A., and Angelini, C. (1987) Population data on benign and severe forms of X-linked muscular dystrophy. *Hum. Genet.* **75**: 217-220.
- Mourkioti, F., and Rosenthal, N. (2005) *IGF-1*, inflammation and stem cells: interactions during muscle regeneration. *Trends Immunol.* **26**: 535-542.
- Mullis, K.B., Ferre, K.B.F., and Gibbs, R.A. (1994) The polymerase chain reaction. Ed. Birkhäuser, Boston-Basel-Berlin.
- Muntoni, F., Torelli, S., and Ferlini, A.S. (2003). Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol.* **2**: 731-740.
- Murray, J.M., Davies, K.E., Harper, P.S., Meredith, L., Mueller, C.R., and Williamson, R. (1982) Linkage relationship of a cloned DNA sequence on the short arm of the X chromosome to Duchenne muscular dystrophy. *Nature* **300**: 69-71.
- Newey, S.E., Howman, E.V., Ponting, C.P., Benson, M.A., Nawrotzki, R., Loh, N.Y., Davies, K.E., and Blake, D.J. (2001) Syncoilin, a novel member of the intermediate filament superfamily that interacts with alpha-dystrobrevin in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **276**: 6645-6655.
- Nguyen, F. (2001) La dystrophie musculaire du chien Golden Retriever (GRMD) : Etude histologique de la forme néonatale fulminante et contribution à l'étude de la pathogénie des lésions. Thèse Méd.Vét., Nantes..

- Nicholson, L.V., Johnson, M.A., Bushby, K.M., Gardner-Medwin, D., Curtis, A., Ginjaar, I.B., den Dunnen, J.T., Welch, J.L., Butler, T.J., and Bakker, E. (1993) Integrated study of 100 patients with Xp21 linked muscular dystrophy using clinical, genetic, immunochemical, and histopathological data. Part 3. Differential diagnosis and prognosis. *J. Med. Genet.* **30**: 745-751.
- Oak, S.A., Zhou, Y.W., and Jarrett, H.W. (2003) Skeletal muscle signaling pathway through the dystrophin glycoprotein complex and Rac1. *J. Biol. Chem.* **278**: 39287-39295.
- O'Brien, K.F., and Kunkel, L.M. (2001) Dystrophin and Muscular Dystrophy: Past, Present, and Future. *Mol. Genet. Metab.* **74**: 75-88.
- Odom, G.L., Gregorevic, P., Allen, J.M., and Chamberlain, J.S. (2011) Gene therapy of *mdx* mice with large truncated dystrophins generated by recombination using rAAV6. *Mol. Ther.* **19**: 36-45.
- Ohlendieck, K., and Campbell, K.P. (1991) Dystrophin-associated proteins are greatly reduced in skeletal muscle from *mdx* mice. *J. Cell. Biol.* **115**: 1685-1694.
- Ohlendieck, K., Matsumura, K., Ionasescu, V.V., Towbin, J.A., Bosch, E.P., Weinstein, S.L., Sernett, S.W., and Campbell, K.P. (1993) Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin-associated proteins in the sarcolemma. *Neurology* **43**: 795-800.
- Oshima, J., Magner, D.B., Lee, J.A., Breman, A.M., Schmitt, E.S., White, L.D., Crowe, C.A., Merrill, M., Jayakar, P., Rajadhyaksha, A., Eng, C.M., and del Gaudio, D. (2009) Regional genomic instability predisposes to complex dystrophin gene rearrangements. *Hum. Genet.* **126**: 411-423.
- Ozawa, E., Yoshida, M., Suzuki, A., Mizuno, Y., Hagiwara, Y., and Noguchi, S. (1995) Dystrophin-associated proteins in muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **4** Spec. No: 1711-1716.
- Pasternak, C., Wong, S., and Elson, E.L. (1995) Mechanical function of dystrophin in muscle cells. *J. Cell. Biol.* **128**: 355-361.
- Pawlowicz, S. (2000) Contribution à l'étude clinique de la myopathie dystrophique du Golden Retriever. Thèse Méd.Vét., Alfort.
- Péault, B., Rudnicki, M., Torrente, Y., Cossu, G., Tremblay, J.P., Partridge, T., Gussoni, E., Kunkel, L.M., and Huard, J. (2007) Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy. *Mol. Ther.* **15**: 867-877.
- Peters, M.F., O'Brien, K.F., Sadoulet-Puccio, H.M., Kunkel, L.M., Adams, M.E., and Froehner, S.C. (1997) Beta-dystrobrevin, a new member of the dystrophin family. Identification, cloning, and protein associations. *J. Biol. Chem.* **272**: 31561-31569.
- Petiot, P., and Urtizbera, J.A. (2004) Diagnostic des maladies musculaires. *Encyclopédie médico-chirurgicale* 17-007-A-30.
- Pichavant, C., Aartsma-Rus, A., Clemens, P.R., Davies, K.E., Dickson, G., Takeda, S., Wilton, S.D., Wolff, J.A., Wooddell, C.I., Xiao, X. and Tremblay, J.P. (2011) Current status of pharmaceutical and genetic therapeutic approaches to treat DMD. *Mol. Ther.* **19**: 830-840.
- Pizzuti, A., Pieretti, M., Fenwick, R.G., Gibbs, R.A., and Caskey, C.T. (1992) A transposon-like element in the deletion-prone region of the dystrophin gene. *Genomics* **13**: 594-600.

- Pons, F., Robert, A., Fabbrizio, E., Hugon, G., Califano, J.C., Fehrentz, J.A., Martinez, J., and Mornet, D. (1994) Utrophin localization in normal and dystrophin-deficient heart. *Circulation* **90**: 369-374.
- Poon, E., Howman, E.V., Newey, S.E., and Davies, K.E. (2002) Association of syncoilin and desmin: linking intermediate filament proteins to the dystrophin-associated protein complex. *J. Biol. Chem.* **277**: 3433-3439.
- Porter, J.D., Khanna, S., Kaminski, H.J., Rao, J.S., Merriam, A.P., Richmonds, C.R., Leahy, P., Li, J., Guo, W., and Andrade, F.H. (2002) A chronic inflammatory response dominates the skeletal muscle molecular signature in dystrophin-deficient mdx mice. *Hum. Mol. Genet.* **11**: 263-272.
- Porter, J.D., Guo, W., Merriam, A.P., Khanna, S., Cheng, G., Zhou, X., Andrade, F.H., Richmonds, C., and Kaminski, H.J. (2003) Persistent overexpression of specific CC class chemokines correlates with macrophage and T-cell recruitment in mdx skeletal muscle. *Neuromuscul. Disord.* **13**: 223-235.
- Prior, T.W., and Bridgeman, S.J. (2005) Experience and strategy for the molecular testing of Duchenne muscular dystrophy. *J. Mol. Diagn.* **7**: 317-326.
- Prisk, V., and Huard, J. (2003) Muscle injuries and repair: the role of prostaglandins and inflammation. *Histol. Histopathol.* **18**: 1243-1256.
- Puca, A.A., Nigro, V., Piluso, G., Belsito, A., Sampaolo, S., Quaderi, N., Rossi, E., Di Iorio, G., Ballabio, A., and Franco, B.V. (1998) Identification and characterization of a novel member of the dystrobrevin gene family. *FEBS Lett.* **425**: 7-13.
- Quenneville, S.P., Chapdelaine, P., Skuk, D., Paradis, M., Goulet, M., Rousseau, J., Xiao, X., Garcia, L., and Tremblay, J.P. (2007) Autologous transplantation of muscle precursor cells modified with a lentivirus for muscular dystrophy: human cells and primate models. *Mol. Ther.* **15**: 431-438.
- Raats, C.J., van den Born, J., Bakker, M.A., Oppers-Walgreen, B., Pisa, B.J., Dijkman, H.B., Assmann, K.J., and Berden, J.H. (2000) Expression of agrin, dystroglycan, and utrophin in normal renal tissue and in experimental glomerulopathies. *Am. J. Pathol.* **156**: 1749-1765.
- Rando, T.A., Disatnik, M.H., and Zhou, L.Z. (2000) Rescue of dystrophin expression in mdx mouse muscle by RNA/DNA oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 5363-5368.
- Rando, T.A. (2001) The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle Nerve* **24**: 1575-1594.
- Rando, T.A. (2007) Non-viral gene therapy for Duchenne muscular dystrophy: progress and challenges. *Biochim. Biophys. Acta.* **1772**: 263-271.
- Raper, S.E., Chirmule, N., Lee, F.S., Wivel, N.A., Bagg, A., Gao, G.P., Wilson, J.M., and Batshaw, M.L.N. (2003) Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol. Genet. Metab.* **80**: 148-158.
- Ray, P.N., Belfall, B., Duff, C., Logan, C., Kean, V., Thompson, M.W., Sylvester, J.E., Gorski, J.L., Schmickel, R.D., and Worton, R.G. (1985) Cloning of the breakpoint of an X;21 translocation associated with Duchenne muscular dystrophy. *Nature* **318**: 672-675.
- Read, A. P., Mountford, R. C., Forrest, S. M., Kenwrick, S. J. Davies, K. E., and Harris, R. (1988) Patterns of exon deletions in Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Hum. Genet.* **80**: 152-156.

- Reitter, B., et Goebel, H.H. (1996) Dystrophinopathies. *Semin.Pediatr. Neurol.* **3**: 99-109.
- Relaix, F., Rocancourt, D., Mansouri, A., et Buckingham, M. (2005) A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature* **435**: 948-953.
- Richards, C.S., Watkins, S.C., Hoffman, E.P., Schneider, N.R., Milsark, I.W., Katz, K.S., Cook, J.D., Kunkel, L.M., et Cortada, J.M. (1990) Skewed X inactivation in a female MZ twin results in Duchenne muscular dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* **46**: 672-681.
- Roberts, R.G., Bobrow, M., and Bentley, D.R. (1992) Point mutations in the dystrophin gene. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **89**: 2331-2335.
- Roberts, R.G., Gardner, R.J., and Bobrow, M. (1994) Searching for the 1 in 2,400,000: a review of dystrophin gene point mutations. *Hum. Mutat.* **4**: 1-11.
- Roberts, R.G., and Sheng, M. (2000) Association of dystrophin-related protein 2 (DRP2) with postsynaptic densities in rat brain. *Mol. Cell. Neurosci.* **16**: 674-685.
- Romero, N.B., Braun, S., Benveniste, O., Leturcq, F., Hogrel, J.Y., Morris, G.E., Barois, A., Eymard, B., Payan, C., Ortega, V., Boch, A.L., Lejean, L., Thioudellet, C., Mourot, B., Escot, C., Choquel, A., Recan, D., Kaplan, J.C., Dickson, G., Klatzmann, D., Molinier-Frenckel, V. Guillet, J.G., Squiban, P., Herson, S. and Fardeau, M (2004) Phase I study of dystrophin plasmid-based gene therapy in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Hum. Gene Ther.* **15**: 1065-1076.
- Romitti, P., Puzhankara, S., Mathews, K., Zamba, G., Cunniff, C., Andrews, J., Matthews, D., James, K., Miller, L., Druschel, C., Fox, D., Pandya, S., Ciafaloni, E., Adams, M., Mandel, D., Street, N., Ouyang, L., Constantin, C., and Costa, P. (2009) Prevalence of Duchenne/Becker muscular dystrophy among males aged 5-24 years, four states. *JAMA* **302**: 2539-2546.
- Sadoulet-Puccio, H.M., and Kunkel, L.M. (1996) Dystrophin and its isoforms. *Brain Pathol.* **6**: 25-35.
- Sadoulet-Puccio, H.M., Rajala, M., and Kunkel, L.M.(1997) Dystrobrevin and dystrophin: an interaction through coiled-coil motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 12413-12418.
- Salih, M.A., Sunada, Y., Al-Nasser, M., Ozo, C.O., Al-Turaiki, M.H., Akbar, M., and Campbell, K.P. (1996) Muscular dystrophy associated with beta-Dystroglycan deficiency. *Ann. Neurol.* **40**: 925-928.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. 2<sup>nd</sup> edition, New York, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sampaolesi, M., Blot, S., D'Antona, G., Granger, N., Tonlorenzi, R., Innocenzi, A., Mognol, P., Thibaud, J.L., Galvez, B.G., Barthélémy, I., Perani, L., Mantero, S., Guttinger, M., Pansarasa, O., Rinaldi, C., Cusella De Angelis, M.G., Torrente, Y., Bordignon, C., Bottinelli, R., and Cossu, G. (2006) Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature* **444**: 574-579.
- Sanes, J. (1994) The extracellular matrix. *In: Myology : Basic and clinical.* McGraw-Hill Editor, New-York, p.242-260.
- Sansome, A., Royston, P., and Dubowitz, V. (1993) Steroids in Duchenne muscular dystrophy; pilot study of a new low-dosage schedule. *Neuromuscul. Disord.* **3**: 567-569.
- Schafer, R., Knauf, U., Zweyer, M., Högemeier, O., de Guarrini, F., Liu, X., Eichhorn, H.J., Koch, F.W., Mundegar, R.R., Erzen, I., and Wernig, A. (2006) Age dependence of the human skeletal muscle stemcell in forming muscle tissue. *Artif. Organs* **30**: 130-140.

- Schultz, E., and McCormick, K.M. (1994) Skeletal muscle satellite cells. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **123**: 213-257.
- Sciote, J. J., and Morris, T. J. (2000) Skeletal muscle function and fibre types: the relationship between occlusal function and the phenotype of jaw-closing muscles in human. *J. Orthod.* **27**: 15-30.
- Scott, J.M., Li, S., Harper, S.Q., Welikson, R., Bourque, D., DelloRusso, C., Hauschka, S.D., and Chamberlain, J.S. (2002) Viral vectors for gene transfer of micro-, mini-, or full-length dystrophin. *Neuromuscul. Disord.* **12** Suppl 1: S23-29.
- Seale, P., Sabourin, L.A., Girgis-Gabardo, A., Mansouri, A., Gruss, P., and Rudnicki, M.A. (2000) Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell.* **102**: 777-786.
- Serratrice, G. (2006) Introduction aux affections musculaires. *EMC (Elsevier Masson SAS, Paris)*, 17-171-A-80.
- Sharp, N.J., Kornegay, J.N., Van Camp, S.D., Herbstreith, M.H., Secore, S.L., Kettle, S., Hung, W.Y., Constantinou, C.D., Dykstra, M.J., Roses, A.D., and Bartlett, R.J. (1992) An error in dystrophin mRNA processing in golden retriever muscular dystrophy, an animal homologue of Duchenne muscular dystrophy. *Genomics* **13**: 115-121.
- Shelton, G.D. (2004) Muscular dystrophies: expanding our knowledge in companion animals. *Vet. J.* **168**: 6-8.
- Sherratt, T.G., Vulliamy, T., Dubowitz, V., Sewry, C.A., and Strong, P.N. (1993) Exon skipping and translation in patients with frameshift deletions in the dystrophin gene. *Am. J. Hum. Genet.* **53**: 1007-1015.
- Shi, X., and Garry, D.J. (2006) Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Dev.* **20**: 1692-1708.
- Sicinski, P., Geng, Y., Ryder-Cook, A.S., Barnard, E.A., Darlison, M.G., and Barnard, P.J. (1989) The molecular basis of muscular dystrophy in the *mdx* mouse: a point mutation. *Science* **244**: 1578-1580.
- Skuk, D., Vilquin, J.T., and Tremblay, J.P. (2002) Experimental and therapeutic approaches to muscular dystrophies. *Curr. Opin. Neurol.* **15**: 563-569.
- Skuk, D., Roy, B., Goulet, M., Chapdelaine, P., Bouchard, J.P., Roy, R., Dugré, F.J., Lachance, J.G., Deschênes, L., Hélène, S., Sylvain, M., and Tremblay, J.P. (2004) Dystrophin expression in myofibers of Duchenne muscular dystrophy patients following intramuscular injections of normal myogenic cells. *Mol. Ther.* **9**: 475-482.
- Skuk, D., Goulet, M., Roy, B., Piette, V., Côté, C.H., Chapdelaine, P., Hogrel, J.Y., Paradis, M., Bouchard, J. P., Sylvain, M., Lachance, J.G., and Tremblay, J.P. (2007) First test of a "high-density injection" protocol for myogenic cell transplantation throughout large volumes of muscles in a Duchenne muscular dystrophy patient: eighteen months follow-up. *Neuromuscul. Disord.* **17**: 38-46.
- Slater, C.R. (1988) Muscle proteins and muscular dystrophy. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **1**: 110-114.
- Smalheiser, N.R., and Kim, E. (1995) Purification of cranin, a laminin binding membrane protein. Identity with dystroglycan and reassessment of its carbohydrate moieties. *J. Biol. Chem.* **270**: 15425-15433.

- Soltanzadeh, P., Friez, M.J., Dunn, D., Von Niederhausern, A., Gurvich, O.L., Swoboda, K.J., Sampson, J.B., Pestronk, A., Connolly, A.M., Florence, J.M., Finkel, R.S., Bönnemann, C.G., Medne, L., Mendell, J.R., Mathews, K.D., Wong, B.L., Sussman, M.D., Zonana, J., Kovak, K., Gospe, S.M., Gappmaier, E., Taylor, L.E., Howard, M.T., Weiss, R.B., and Flanigan, K.M. (2010) Clinical and genetic characterization of manifesting carriers of *DMD* mutations. *Neuromuscul. Disord.* **20**: 499-504.
- Srivastava, D., and Ivey, K. N. (2006) Potential of stem-cell-based therapies for heart disease. *Nature* **441**: 1097-1099.
- Tachi, N., Ohya, K., Chiba, S., Matsuo, M., Patria, S.Y., and Matsumura, K.(1997) Deficiency of syntrophin, dystroglycan, and merosin in a female infant with a congenital muscular dystrophy phenotype lacking cysteine-rich and C-terminal domains of dystrophin. *Neurology* **49**: 579-583.
- Takeshima, Y., Yagi, M., Wada, H., Ishibashi, K., Nishiyama, A., Kakumoto, M., Sakaeda, T., Saura, R., Okumura, K., and Matsuo, M. (2006) Intravenous infusion of an antisense oligonucleotide results in exon skipping in muscle dystrophin mRNA of Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr. Res.* **59**: 690-694.
- Tatsumi, R., Anderson, J.E., Nevoret, C.J., Halevy, O., and Allen, R.E. (1998)HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. *Dev. Biol.* **194**: 114-128.
- t'Hoen, P.A., van der Wees, C.G., Aartsma-Rus, A., Turk, R., Goyenvalle, A., Danos, O., Garcia, L., van Ommen, G.J., den Dunnen, J.T., and van Deutekom, J.C. (2006) Gene expression profiling to monitor therapeutic and adverse effects of antisense therapies for Duchenne muscular dystrophy. *Pharmacogenomics* **7**: 281-297.
- Thyagarajan, B., Olivares, E.C., Hollis, R.P., Ginsburg, D.S., and Calos, M.P. (2001) Site-specific genomic integration in mammalian cells mediated by phage phiC31 integrase. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 3926-3934.
- Tinsley, J.M., Blake, D.J., Roche, A., Fairbrother, U., Riss, J., Byth, B.C., Knight, A.E., Kendrick-Jones, J., Suthers, G.K., Love, D.R., Edwards, Y.H., and Davies, K.E. (1992) Primary structure of dystrophin-related protein. *Nature* **360**: 591-593.
- Tinsley, J.M., Blake, D.J., and Davies, K.E. (1993) Apo-dystrophin-3: a 2.2kb transcript from the *DMD* locus encoding the dystrophin glycoprotein binding site. *Hum. Mol. Genet.* **2**: 521-524.
- Tinsley, J., Deconinck, N., Fisher, R., Kahn, D., Phelps, S., Gillis, J.M., and Davies, K. (1998) Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in *mdx* mice. *Nat. Med.* **4**: 1441-1444.
- Tokarz, S.A., Duncan, N.M., Rash, S.M., Sadeghi, A., Dewan, A.K., and Pillers, D.A. (1998) Redefinition of dystrophin isoform distribution in mouse tissue by RT-PCR implies role in nonmuscle manifestations of duchenne muscular dystrophy. *Mol. Genet. Metab.* **65**: 272-281.
- Torella, A., Trimarco, A., Del Vecchio Blanco, F., Cuomo, A., Aurino, S., Piluso, G., Minetti, C., Politano, L., and Nigro, V. (2010) One hundred twenty-one dystrophin point mutations detected from stored DNA samples by combinatorial denaturing high-performance liquid chromatography. *J. Mol. Diag.* **2**: 65-73.

- Tortora, G.J., et Grabowski, S.R. (1994) Principes d'anatomie et de physiologie. Ed. De Boeck University, p.1204.
- Towbin, J.A. (1998) The role of cytoskeletal proteins in cardiomyopathies. *Curr.Opin.Cell Biol*, **10**: 131-139.
- Tubbs, R.S., and Oakes, W.K. (2004) Urinary incontinence in a patient with Duchenne muscular dystrophy and cord in the normal position with fatty filum terminale. *Childs. Nerv. Syst.* **20**: 717-719.
- Tubiello, G., Carrera, P., Soriani, N., Morandi, L., and Ferrari, M. (1995) Mutational analysis of muscle and brain specific promoter regions of dystrophin gene in DMD/BMD Italian patients by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Mol. Cell Probes* **9**: 441-446.
- Tuffery-Giraud, S., Beroud, C., Leturcq, F., Yaou, R.B., Hamroun, D., Michel-Calemard, L., Moizard, M.P., Bernard, R., Cossee, M., Boisseau, P., Blayau, M., et Creveaux, I. (2009) Genotype-phenotype analysis in 2,405 patients with a dystrophinopathy using the UMD-DMD database: a model of nationwide knowledgebase. *Hum. Mutat.* **30**: 934-945.
- Turner, P.R., Fong, P.Y., Denetclaw, W.F., and Steinhardt, R.A. (1991) Increased calcium influx in dystrophic muscle. *J. Cell Biol.* **115**: 1701-1712.
- Tyler, K.L. (2003) Origins and early descriptions of "Duchenne muscular dystrophy". *Muscle Nerve* **28**: 402-422.
- Valentine, B.A., Cooper, B.J., Cummings, J.F., and de Lahunta, A. (1986) Progressive muscular dystrophy in a golden retriever dog: light microscope and ultrastructural features at 4 and 8 months. *Acta Neuropathol.* **71**: 301-310.
- Valentine, B.A., Cooper, B.J., de Lahunta, A., O'Quinn, R., and Blue, J.T. (1988) Canine X-linked muscular dystrophy. An animal model of Duchenne muscular dystrophy: clinical studies. *J. Neurol. Sci.* **88**: 69-81.
- Valentine, B.A., Winand, N.J., Pradhan, D., Moise, N.S., de Lahunta, A., Kornegay, J.N., and Cooper, B.J. (1992) Canine X linked muscular dystrophy as an animal model of Duchenne muscular dystrophy. *Am. J. Med. Genet.* **42**: 352-356.
- Vandebrouck, C., Martin, D., Colson-Van Schoor, M., Debaix, H., and Gailly, P. (2002) Involvement of TRPC in the abnormal calcium influx observed in dystrophic (*mdx*) mouse skeletal muscle fibers. *J. Cell. Biol.* **158**: 1089-1096.
- Verellen-Dumoulin, C., Freund, M., De Meyer, R., Laterre, C., Frédéric, J., Thompson, M.W., Markovic, V.D., and Worton, R.G. (1984) Expression of an X-linked muscular dystrophy in a female due to translocation involving Xp21 and non random inactivation of the normal X chromosome. *Hum. Genet.* **67**: 115-119.
- Vinod, M., Rodino-Klapac, L.R., Viollet, L., and Mendell, J.R. (2010) Aminoglycoside-induced mutation suppression (stop codon readthrough) as a therapeutic strategy for Duchenne muscular dystrophy. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* **3**: 379-389.
- Wagner, K.R., Cohen, J.B., and Haganir, R.L. (1993) The 87K postsynaptic membrane protein from Torpedo is a protein-tyrosine kinase substrate homologous to dystrophin. *Neuron* **10**: 511-522.
- Wagner, K.R., Hamed, S., Hadley, D.W., Gropman, A.L., Burstein, A.H., Escolar, D.M., Hoffman, E.P. and Fischbeck, K.H. (2001) Gentamicin treatment of Duchenne and Becker muscular dystrophy due to nonsense mutations. *Ann. Neurol.* **49**: 706-711.

- Wagner, K.R., Fleckenstein, J.L., Amato, A.A., Barohn, R.J., Bushby, K., Escolar, D.M., Flanigan, K.M., Pestronk, A., Tawil, R., Wolfe, G.I., Eagle, M., Florence, J.M., Wendy, M.K., Pandya, S., Straub, V., Juneau, P., Meyers, K., Csimma, C., Araujo, T., Allen, R., Parsons, S.A., Wozney, J.M., LaVallie, E.R. et Mendell, J.R. (2008) A Phase I/II trial of MYO-029 in adult subjects with Muscular Dystrophy. *Ann. Neurol.* **63**: 561-571.
- Wakayama, Y., Inoue, M., Murahashi, M., Shibuya, S., Jimi, T., Kojima, H., and Oniki, H. (1997) Ultrastructural localization of alpha 1-syntrophin and neuronal nitric oxide synthase in normal skeletal myofiber, and their relation to each other and to dystrophin. *Acta Neuropathol.* **94**: 455-464.
- Wang, B., Li, J., and Xiao, X. (2000) Adeno-associated virus vector carrying human minidystrophin genes effectively ameliorates muscular dystrophy in *mdx* mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. US.* **97**: 13714-13719.
- Wang, Y., Mukherjee, S., Fraefel, C., Breakefield, X.O., and Allen, P.D. (2002) Herpes simplex virus type 1 amplicon vector-mediated gene transfer to muscle. *Hum. Gene. Ther.* **13**: 261-273.
- Wang, Z., Chamberlain, J.S., Tapscott, S.J., and Storb, R. (2009) Gene therapy in large animal models of muscular dystrophy. *ILAR. J.* **50**: 187-198.
- Wells, D.J. (2006) Therapeutic restoration of dystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **27**: 387-398.
- White, S., Kalf, M., Liu, Q., Villerius, M., Engelsma, D., Kriek, M., Vollebregt, E., Bakker, B., van Ommen, G.J.B., Breuning, M.H., and den Dunnen, J.T. (2002) Comprehensive detection of genomic duplications and deletions in the *DMD* gene, by use of multiplex amplifiable probe hybridization. *Am. J. Hum. Genet.* **71**: 365-374.
- White, S.J., Aartsma-Rus, A., Flanigan, K.M., Weiss, R.B., Kneppers, A.L.J., Lalic, T., Janson, A.A.M., Ginjaar, H.B., Breuning, M.H., and den Dunnen, J.T. (2006) Duplications in the *DMD* gene. *Hum. Mutat.* **27**: 938-945.
- Williams, J.H., Sirsi, S.R., Latta, D.R., and Lutz, G.J. (2006) Induction of dystrophin expression by exon skipping in *mdx* mice following intramuscular injection of antisense oligonucleotides complexed with PEG-PEI copolymers. *Mol. Ther.* **14**: 88-96.
- Willmann, R., Possekkel, S., Dubach-Powell, J., Meier, T., and Ruegg, M.A. (2009) Mammalian animal models for Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disorders* **19**: 241-249.
- Winand, N.J., Edwards, M., Pradhan, D., Berian, C.A., and Cooper, B.J. (1994) Deletion of the dystrophin muscle promoter in feline muscular dystrophy. *Neuromusc. Disord.* **4**: 433-445.
- Wood, S., and McGillivray, B.C. (1988) Germinal mosaicism in Duchenne muscular dystrophy. *Hum. Genet.* **78**: 282-284.
- Worton, R.G., Duff, C., Sylvester, J.E., Schmickel, R.D., and Willard, H.F. (1984) Duchenne muscular dystrophy involving translocation of the *DMD* gene next to ribosomal RNA genes. *Science* **224**: 1447-1449.
- Yang, B., Jung, D., Motto, D., Meyer, J., Koretzky, G., and Campbell, K.P. (1995) SH3 domain-mediated interaction of dystroglycan and Grb2. *J. Biol. Chem.* **270**: 11711-11714.
- Yoshida, M. and Ozawa, E. (1990) Glycoprotein complex anchoring dystrophin to sarcolemma. *J. Biochem.* **108**: 748-527.

- Zammit, P.S., Golding, J.P., Nagata, Y., Hudon, V., Partridge, T.A., and Beauchamp, J.R. (2004) Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? *J. Cell Biol.* **166**: 347-357.
- Zatz, M., Vianna-Morgante, A.M., Campos, P., and Diament, A.J. (1981) Translocation (X;6) in a female with Duchenne muscular dystrophy: implications for the localisation of the DMD locus. *J. Med. Genet.* **18**: 442-447.
- Zatz, M., Betti, R.T., and Frota-Pessoa, O. (1986) Treatment of Duchenne muscular dystrophy with growth hormone inhibitors. *Am. J. Med. Genet.* **24**: 549-566.
- Zatz, M., Rapaport, D., Vainzof, M., Pavanello, C., Rocha, J.M., Betti, R.T., and Otto, P.A. (1988) Effect of mazindol on growth hormone levels in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Am. J. Med. Genet.* **31**: 821-833.
- Zeman, R.J., Zhang, Y., and Etlinger, J.D. (1994) Clenbuterol, a beta 2-agonist, retards wasting and loss of contractility in irradiated dystrophic mdx muscle. *Am. J. Physiol.* **267**: C865-868.
- Zeman, R. J., Peng, H., Danon, M.J., and Etlinger, J.D. (2000) Clenbuterol reduces degeneration of exercised or aged dystrophic (*mdx*) muscle. *Muscle Nerve* **23**: 521-528.

# **ANNEXE**

Estimation (selon SMS Manipulation Suite) de la taille de la protéine dystrophine produite (séquence et nombre d'acides aminés, poids moléculaire), normale ou mutée selon la délétion intragénique caractérisée chez chacun de nos patients DMD/BMD. A, Alanine; C, Cystéine; D, Acide aspartique; E, Acide glutamique; F, Phénylalanine; G, Glycine; H, Histidine; I, Isoleucine; K, Lysine; L, Leucine; M, Méthionine; N, Asparagine; P, Proline; Q, Glutamine; R, Arginine; S, Sérine; T, Thréonine; V, Valine; W, Tryptophane; Y, Tyrosine.

#### Protéine dystrophine normale (3685 acides aminés, 426.80 kDa)

MLWEEVEDCYEREDVQKKTFTKWVNAQFSKFGKQHIENLFSDLQDGRRLDLEGLTGQKLPKEKGSSTRVHALNNVNKAALRVLQNNVNDLVNI GSTD IVDGNHKLTLGLIWNIIHLHWQVKNVMKNI MAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVINFTTWSWDGLALNALIHSRHPDLFDWNSVVCQSSATQRLEHAFNIARYQLGIEKLLDPEDVDVTPYDPPKKSILMYITSLFQVLPQQVSEI AEIQEVEMLPRPPKVTKEEHLQHHQMHYSQQITVSLAQGYERTSSPKPRFKSYAYTQAAYVTTSDPTRSPFPSSQHLEAPEDKSFSSLMSEVNLDRYQTALAEVLSWLLSABEDTLQAQGEISNDVVEVKDQFHTHEGYMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLITGTGKLSSEDEETEVEQEMNLLNSRWECLRVASMEKQSNLHRVLMDLQNKQKLELNDWLTKTEERTKMEEEPLGPDLEDLKRQVQKHVQLQEDLEQEQVRVNSLTHMVMVVDESSGDHATAALEEQLVKLGDRWANI CRWTEDRWVLLQDILLKQWRLTEEQCLFSAWLESEKEDAVNKIHTTGFKDQNEMLSSQLKLAVLKADLEKKKQSMGKLYSLKQDLSLTLKNSVTKTEAWLNDNFARCDWNLVQKLEKSTAQISQAVTTTQPSLTQTTVMETVTTVTTREQLVVKHAQEELPPPPQKQRQITVDSEIRKRLDVIDTELHSWITRSEAVLQSPFPAIFRKEGNFSDLKEKVNALIEREKAKEFRKLDQASRSQAALVEQMVNEGVNADSIKQASEQLNSRWIEFCQLLSERLNWLE YQNNII AFYNQLQQLEQMTTTAENWLKIQPTTPSEPTA IKSQKIKCKDEVNRLSGLQPQIERLKIQSIALKEKGGQPMFLDADFVAFTHNFHKQVFSVDVQAREKELQTFIDTLPMPRYQETMSAIRTWVQSQSETKLSIPQLSVTDYEIMEQRLGELQALQSSLEQQSGLYLSTTVKEMSKKAPSEISRKYQSEFEIEIEGRWKKLSQVLEHQCQKLEEQMKNLRIQNHIIQTLKKWMAEVDVFLKEEWPALGDSEILKQKQCRLLVSDIQTIPQSLNSVNEGGQKIKNEAEPEFASRLETELKELNTQWDHMCQQVYARKEALKGGLKTVSLQKDLSEMHEWMTQAE EYLERDFEYKTPDELQKAVAEEMKRAKEEAQQKEAKVKLLTESVNSVIAQAPPAVQAEALKELETLTNTNYQWLCRNLGCKTLEEVWACWHELLESLYKANKWLNVEFKLKTENIPGGAEEISEVLDSELENLMRHSEDNPNQIRILAQTLDGGVMDLINEELETFNRSRRELHEEAVRRQKLEQSIQSAQETEKSLHLIQESLTFIDKQLAAAYIADKVDAAQMPQEAQKIQSDLTSHEISLEEMKKNQKGEAAQRVLSQIDVAQKQLQDVSMMKFRFLQK PANFEQRLEQESKMI LDEVKMHLPALBETKSVQEVVQSQLNHCVNLYKSLSEVKSEVEMVIKTGRQIVQKQKQ TENPKELDERV TALKLHYNELGAKVTERKQQLKCLKLSRMRKEMNVLTEWLAATDMELTKRSASAVEGMPSNLDSEVAWGKATQKEIEKQKVLKSI TEVGEALKTVLGKKE TLVEDKLSLNSNWI AVTSRAEEWLNLLEEQKHMETFDQNVHDI TKWI IQADTLDESEKPKPQKEDVLRKRLKAE LNDIRPKVDSTRDQAANLMANRGDHCRKLVPEQISELNRHFAAISHRIKTKGASIPLKELEQFNSDIQKLEPLEAEIQQGVNKLKEDFNKDMNEDNEGTVKE LLQRGDNLQQRITDERKREIEIKIQQLLQTKHNALKDLRSQRKKALEISHQWVYKQRQADLLKCLDDIEKKLASLEPEPRDERKIKEIDRELOKQKKEELNAVRRAEGLSEDAAMA VEPTQIQLSKRWREIESKFAQFRRLNFAQIHTVREETMMVMTEDMPLIESYVPSYLTETI THVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLFEKQESLKNIKDLSLQSSGRIDI IHSKKTAAALQSATPVERVKLQEAALSQDFQWEKVNMYKDRQGRFDRSVEKWRFFHYDIKIFNQWLTEAEQFLRKTQIPENWEHAKYKWLKELQDGIQGRQTVVTRTLNATGEEIIQSSSKTDASIQEKLGLSGLNRQWVCKQLSDRKRKLEEQKNI LSEFQRDLNEFVWLWLEEADNIIASIPLEPGKEQQLK EKLEQVKLLVEELPLRQGLKQNETGGPVLSAPI SPEEQDKLENLKLQTNLQWIKVSRALPEKQGEIEAQIKDLGLEKLEDELEQLNHLLLWLSPIRNLQLEIYNQPNQEGFPDVQTEIAVQAQKQSDVLEISLKGQHLYKEKQATQVVKRKLLEDSEWAKVNRLLQELRAKQPD LAPGLTII GASPQTQVTLVTPVVTKETAI SKLEM PSSLMLLEVPALADFNRAWTELTDWLSLLDQVIKSQRVMVGDLEDINEMI KQKATMDQLEQRRPQLEELI TAAQNKNKTSNQEARTIITDRIERIQNQWDEVQEHLLQNRRLQNLNEMKLDSTQWLEAKEAEQVVGQARAKLESWKEGPTVDAIKKII TETKQAKDLRQWQNTVDVANDLALKLLRDSYADDTRKVVHMITENINASWRSIHKRVSEREAALBETHRLLQFPDLLEKFLAWL TEAETTANVLQDATRERLLEDSDSGVKEMLKQWQDLQGEIEAHTDVYHNLNDSQKILRSLEGGDDAVLLQRRLDNMFKWSSELKSLNIRSHLEASSDQWKRHLHLSQELLVWLQKDDLELSRQAPIGGDFPAVQKQNDVHRAFKRELKTKPEVIMSTLETVRIFLTEQPLEGLEKLYQEPRELPEERAQNVTRLLRQAE EVNTEWEKLNLSADWQRKIDETLERLQELQEA TDELKLRQAEVIKGSWQPVGDLLIDSLQDHLKVKALRGEIAPLKENVSHVNDLARQTLTLGIQSPYNNLSTLEDLNTRWKLQVAVEDRVRQLHEAHRDFGFPASQHFSTSVQGWERAISPNKVPYIINHETQTTTCWDHPKMTTEIYQSLADLNNVRSAYRTAMKLRRLQKALCLDLSLAAACDALDQHNKQNDQPMDDI IICLNTLTIYDRLEQEHNNLVNVP LCVDMCLNLLNVDVGTGRVLRVLSFKTGIISLCKHLEDKYRLFQKVASSTGFCDRGLLHDSIQIPRQLEVASPFGSNIQEPVSRSCFVANNKPEIEAALFLDWMRLEPQSMVWLPGLRHRVLAETAKHQAKCNICECPIIGFRYRSLKHFNYDIQCSFFSFRVAKGKHMHYPMVEYCTPTTSGEDVRDFACVFNKMKFRKRYFAKHPRMGYLPVQITVLEEGDNMETVPAATLHWPVND SAFPASQQLSHDDTHSRIEHYSARLAEMENSNGSYLNDISPNESIDDEHLLIQHYCQSLNDSPLSQPRSPAQIILISESERGELERILADLEENRNLQAEYDRKQKH EHKGLSPFPPEMPTSPQSPRDAELIAEAKLLRQHKGRLEARMQILLEDHNKQLESQHLRLRQLEEQPAEAKVNGTTVSSPSTLSQRSDSSQPMLLRVVGSSQTSDSMGEEDLLSPQDSTSTGLEEVMEQLNNSFPSSRGRNTPGKPMREDTM

#### Protéine dystrophine mutée générée après délétion des exons 48 à 50 (2262 acides aminés, 263.21 kDa)

MLWEEVEDCYEREDVQKKTFTKWVNAQFSKFGKQHIENLFSDLQDGRRLDLEGLTGQKLPKEKGSSTRVHALNNVNKAALRVLQNNVNDLVNI GSTD IVDGNHKLTLGLIWNIIHLHWQVKNVMKNI MAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVINFTTWSWDGLALNALIHSRHPDLFDWNSVVCQSSATQRLEHAFNIARYQLGIEKLLDPEDVDVTPYDPPKKSILMYITSLFQVLPQQVSEI AEIQEVEMLPRPPKVTKEEHLQHHQMHYSQQITVSLAQGYERTSSPKPRFKSYAYTQAAYVTTSDPTRSPFPSSQHLEAPEDKSFSSLMSEVNLDRYQTALAEVLSWLLSABEDTLQAQGEISNDVVEVKDQFHTHEGYMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLITGTGKLSSEDEETEVEQEMNLLNSRWECLRVASMEKQSNLHRVLMDLQNKQKLELNDWLTKTEERTKMEEEPLGPDLEDLKRQVQKHVQLQEDLEQEQVRVNSLTHMVMVVDESSGDHATAALEEQLVKLGDRWANI CRWTEDRWVLLQDILLKQWRLTEEQCLFSAWLESEKEDAVNKIHTTGFKDQNEMLSSQLKLAVLKADLEKKKQSMGKLYSLKQDLSLTLKNSVTKTEAWLNDNFARCDWNLVQKLEKSTAQISQAVTTTQPSLTQTTVMETVTTVTTREQLVVKHAQEELPPPPQKQRQITVDSEIRKRLDVIDTELHSWITRSEAVLQSPFPAIFRKEGNFSDLKEKVNALIEREKAKEFRKLDQASRSQAALVEQMVNEGVNADSIKQASEQLNSRWIEFCQLLSERLNWLE YQNNII AFYNQLQQLEQMTTTAENWLKIQPTTPSEPTA IKSQKIKCKDEVNRLSGLQPQIERLKIQSIALKEKGGQPMFLDADFVAFTHNFHKQVFSVDVQAREKELQTFIDTLPMPRYQETMSAIRTWVQSQSETKLSIPQLSVTDYEIMEQRLGELQALQSSLEQQSGLYLSTTVKEMSKKAPSEISRKYQSEFEIEIEGRWKKLSQVLEHQCQKLEEQMKNLRIQNHIIQTLKKWMAEVDVFLKEEWPALGDSEILKQKQCRLLVSDIQTIPQSLNSVNEGGQKIKNEAEPEFASRLETELKELNTQWDHMCQQVYARKEALKGGLKTVSLQKDLSEMHEWMTQAE EYLERDFEYKTPDELQKAVAEEMKRAKEEAQQKEAKVKLLTESVNSVIAQAPPAVQAEALKELETLTNTNYQWLCRNLGCKTLEEVWACWHELLESLYKANKWLNVEFKLKTENIPGGAEEISEVLDSELENLMRHSEDNPNQIRILAQTLDGGVMDLINEELETFNRSRRELHEEAVRRQKLEQSIQSAQETEKSLHLIQESLTFIDKQLAAAYIADKVDAAQMPQEAQKIQSDLTSHEISLEEMKKNQKGEAAQRVLSQIDVAQKQLQDVSMMKFRFLQK PANFEQRLEQESKMI LDEVKMHLPALBETKSVQEVVQSQLNHCVNLYKSLSEVKSEVEMVIKTGRQIVQKQKQ TENPKELDERV TALKLHYNELGAKVTERKQQLKCLKLSRMRKEMNVLTEWLAATDMELTKRSASAVEGMPSNLDSEVAWGKATQKEIEKQKVLKSI TEVGEALKTVLGKKE TLVEDKLSLNSNWI AVTSRAEEWLNLLEEQKHMETFDQNVHDI TKWI IQADTLDESEKPKPQKEDVLRKRLKAE LNDIRPKVDSTRDQAANLMANRGDHCRKLVPEQISELNRHFAAISHRIKTKGASIPLKELEQFNSDIQKLEPLEAEIQQGVNKLKEDFNKDMNEDNEGTVKE LLQRGDNLQQRITDERKREIEIKIQQLLQTKHNALKDLRSQRKKALEISHQWVYKQRQADLLKCLDDIEKKLASLEPEPRDERKIKEIDRELOKQKKEELNAVRRAEGLSEDAAMA VEPTQIQLSKRWREIESKFAQFRRLNFAQIHTVREETMMVMTEDMPLIESYVPSYLTETI THVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLFEKQESLKNIKDLSLQSSGRIDI IHSKKTAAALQSATPVERVKLQEAALSQDFQWEKVNMYKDRQGRFDRSVEKWRFFHYDIKIFNQWLTEAEQFLRKTQIPENWEHAKYKWLKELQDGIQGRQTVVTRTLNATGEEIIQSSSKTDASIQEKLGLSGLNRQWVCKQLSDRKRKLEEQKNI LSEFQRDLNEFVWLWLEEADNIIASIPLEPGKEQQLK EKLEQVKLLRLLRLLW

#### Protéine dystrophine mutée générée après délétion de l'exon 50 (2408 acides aminés, 279.88 kDa)

MLWEEVEDCYEREDVQKKTFTKWVNAQFSKFGKQHIENLFSDLQDGRRLDLEGLTGQKLPKEKGSSTRVHALNNVNKAALRVLQNNVNDLVNI GSTD IVDGNHKLTLGLIWNIIHLHWQVKNVMKNI MAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVINFTTWSWDGLALNALIHSRHPDLFDWNSVVCQSSATQRLEHAFNIARYQLGIEKLLDPEDVDVTPYDPPKKSILMYITSLFQVLPQQVSEI AEIQEVEMLPRPPKVTKEEHLQHHQMHYSQQITVSLAQGYERTSSPKPRFKSYAYTQAAYVTTSDPTRSPFPSSQHLEAPEDKSFSSLMSEVNLDRYQTALAEVLSWLLSABEDTLQAQGEISNDVVEVKDQFHTHEGYMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLITGTGKLSSEDEETEVEQEMNLLNSRWECLRVASMEKQSNLHRVLMDLQNKQKLELNDWLTKTEERTKMEEEPLGPDLEDLKRQVQKHVQLQEDLEQEQVRVNSLTHMVMVVDESSGDHATAALEEQLVKLGDRWANI CRWTEDRWVLLQDILLKQWRLTEEQCLFSAWLESEKEDAVNKIHTTGFKDQNEMLSSQLKLAVLKADLEKKKQSMGKLYSLKQDLSLTLKNSVTKTEAWLNDNFARCDWNLVQKLEKSTAQISQAVTTTQPSLTQTTVMETVTTVTTREQLVVKHAQEELPPPPQKQRQITVDSEIRKRLDVIDTELHSWITRSEAVLQSPFPAIFRKEGNFSDLKEKVNALIEREKAKEFRKLDQASRSQAALVEQMVNEGVNADSIKQASEQLNSRWIEFCQLLSERLNWLE YQNNII AFYNQLQQLEQMTTTAENWLKIQPTTPSEPTA IKSQKIKCKDEVNRLSGLQPQIERLKIQSIALKEKGGQPMFLDADFVAFTHNFHKQVFSVDVQAREKELQTFIDTLPMPRYQETMSAIRTWVQSQSETKLSIPQLSVTDYEIMEQRLGELQALQSSLEQQSGLYLSTTVKEMSKKAPSEISRKYQSEFEIEIEGRWKKLSQVLEHQCQKLEEQMKNLRIQNHIIQTLKKWMAEVDVFLKEEWPALGDSEILKQKQCRLLVSDIQTIPQSLNSVNEGGQKIKNEAEPEFASRLETELKELNTQWDHMCQQVYARKEALKGGLKTVSLQKDLSEMHEWMTQAE EYLERDFEYKTPDELQKAVAEEMKRAKEEAQQKEAKVKLLTESVNSVIAQAPPAVQAEALKELETLTNTNYQWLCRNLGCKTLEEVWACWHELLESLYKANKWLNVEFKLKTENIPGGAEEISEVLDSELENLMRHSEDNPNQIRILAQTLDGGVMDLINEELETFNRSRRELHEEAVRRQKLEQSIQSAQETEKSLHLIQESLTFIDKQLAAAYIADKVDAAQMPQEAQKIQSDLTSHEISLEEMKKNQKGEAAQRVLSQIDVAQKQLQDVSMMKFRFLQK PANFEQRLEQESKMI LDEVKMHLPALBETKSVQEVVQSQLNHCVNLYKSLSEVKSEVEMVIKTGRQIVQKQKQ TENPKELDERV TALKLHYNELGAKVTERKQQLKCLKLSRMRKEMNVLTEWLAATDMELTKRSASAVEGMPSNLDSEVAWGKATQKEIEKQKVLKSI TEVGEALKTVLGKKE TLVEDKLSLNSNWI AVTSRAEEWLNLLEEQKHMETFDQNVHDI TKWI IQADTLDESEKPKPQKEDVLRKRLKAE LNDIRPKVDSTRDQAANLMANRGDHCRKLVPEQISELNRHFAAISHRIKTKGASIPLKELEQFNSDIQKLEPLEAEIQQGVNKLKEDFNKDMNEDNEGTVKE LLQRGDNLQQRITDERKREIEIKIQQLLQTKHNALKDLRSQRKKALEISHQWVYKQRQADLLKCLDDIEKKLASLEPEPRDERKIKEIDRELOKQKKEELNAVRRAEGLSEDAAMA VEPTQIQLSKRWREIESKFAQFRRLNFAQIHTVREETMMVMTEDMPLIESYVPSYLTETI THVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLFEKQESLKNIKDLSLQSSGRIDI IHSKKTAAALQSATPVERVKLQEAALSQDFQWEKVNMYKDRQGRFDRSVEKWRFFHYDIKIFNQWLTEAEQFLRKTQIPENWEHAKYKWLKELQDGIQGRQTVVTRTLNATGEEIIQSSSKTDASIQEKLGLSGLNRQWVCKQLSDRKRKLEEQKNI LSEFQRDLNEFVWLWLEEADNIIASIPLEPGKEQQLK EKLEQVKLLRLLRLLW

WLDNFARCDWNLVQKLEKSTAQISQAVTTTQPSLTQTTVMETVTTVTTTREQILVKHAQEEELPPPPQKQRQITVDSEIRKRLDVIDITELHSWITRSEAVLQSPFEAIFRKEGNFSDLKEKVNAREKA EKFRKLDQASRSQAALVEQMVNEGVNADSIKQASEQLNSRWIEFCQLLSERLNWLYQNNIIAFYNQLQQLQEMTTTAAENWLKIQPTTPSEPTAIKSQLKICKDEVNRLSGLQPQIERLKIQSIALKEKGGQPMFLDADFVAFTNHFQKQVSDVQAREKELQTFIDTFLPMRYQETMSAIRTWVQOSETKLSIPQLSVTDYDIMEQRLGELQALQSSLEQQSGLYYLSTTVKEMSKKAPSEISRKYQSEFEIEIEGRWKKLSQLVEHCQKLEEQMKNLKRKIQNHIIQTLKKWMAEVDVFLKEEWPALGDSEILKQKQCRLLVSDIQTIPQSLNSVNEGGQKIKNEAEPEFASRLETELKELNTQWDHMCQQVYARKEALKGGLEKTVSLQKDLSEMHEWMTQAE EYLERDFEYKTPDELQKAVEEMKRAKEEAQQKEAKVKLLTESVNSVIAQAPPVAQEALKELETLTNTYQWLCRNLNGCKTLEEVWACWHELLESYLEKANKWLNEVEFKLTTENIPGGAEEISEVLDLENLNRHSEDNPNQIRILAQTLTDGGVMDLINEELETFNRSRWRELHEEAVRRQKLEQSIQSAQETEKSLHLIQESLTFIDKQLAAYIADKVDAAQMPQEAQKIQSDLTSHESISLEEMKKNHQGKEAAQRVLSQIDVAQKQLQDVSMKFRFLQKQANFEQRLQESKMI LDEVKMHLPALETKSVQEVEVQSQNLNHCVNLYKLSSEVKSEVEMVIKTGRQIVQKQKQTEPKELDERVLTALKLHYNELGAKVTERKQKLEKCLKLSRKRMEKMNVLTEWLAATDMELTKRSVEGMPSNLDESEAWGKATQKEIEKQKVHLKSI TEVGEALKTVLGKKE TLVEDKLSLLNSNWI AVTSRAEEWLNLLEEQKHMETFQDQNVHDITKWI IQADTLDESEKPKPQQKEDVLRKRLKAELENDIRPKVDSTRDQAANLMANRNGDHCRLKLEVPQISELNRHFAAISHRIKTKGASIPKLELEQFNDSIQKLEPLEAEIQQGVNLEKEDFNKDMNEDNEGTVKELLQRGDNLQQRITDERKREIEIKIQQLLQTKHNALKDLRSQRKKALEISHQWYQYKQADDLKCLDDIEKKLASLEPEPRDERKIEIDRELOKKEELNAVRRQAEGLEDGAMAVEPTQIQLSKRWRREIESKFAQFRRLNFAQIHTVREETMMVMTEDMPLEISYVPSYTYLTEITHVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLQKQESLKNIKDLSLQSSGRIDIIHSSKTAALQASATPVERVKLQEALSQDLDFQWEKVNMYKDRQGRFDRSVEKWRRFHYDIKIFNQWLTAEQFLRKTQIPENWEHAKYKWLKELQDGIQGRQTVVRTL NATGEEIIQSSKTDASILQEKLGSLNLRWQEVCKQLSDRKRKLEEQKNI LSEFQRDLNEFVWLWEADNIIASIPLEPGKEQQLK EKLEQVKLLVEELPLRQIGILKQNETGGPVLVSAPI SPEEQDKLENLQKQTNLQWIKVSRALPEKQGEIEAQIKDLGQLEKLEDELEQLNHLLWLSPIRNLQLEIYNQPNQEGPFVDQETETIAVQAKQPDVEEILSKGHLYKEKPATQVVKLLRLLLL

### Protéine dystrophine mutée générée après délétion des exons 46 à 50 (2219 acides aminés, 257.83 kDa)

MLWEEVEDCYEREDVQKKTFTKWVNAQFSKFGKQHIENLFSDLQDGRRLDLEGLTGQKLPKEKGS TRVHALNNVNKAALRVLQNNVLDVNI GSTDIVDGNHKLTLGLIWNII LHWQKVNVMKNI MAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVINFTTWSWDGLALNALI HSHRDLDFDWNVVCQSSATQRLHAFNIRARYQLGIEKLLDPEVDVDTTYPDKKSI LMYITSLFQVLPQQVSI EAIQEVEMLPRPKVTKEEHFQLHHQMHSYQQTITVSLAQGYERTSSPKPRFKS YAYTQAAVVTTSDDTRSPFPSSQHLEAPEDKSFSGSSLMSEVNLDRYQTALEEVLSWLSAEDTLQAQGEISNDVEVVKDQFHTHEGYMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLIGTGKLSDEEETEVEQEQMNLNLSRWECRLVASMEEKQSNLHRLVMDLQNKQLKELNDWLTKEERTKRMEEEPGLPDELDRQVQKHVLEDELEQEQVVRVNSLTHMVMVVDSESGDHATAALEEQKLV LGDRWANCRTWIEDRWVLLQDII LKQWRLTEEQCLFSAWLSEKEDAVNKIHTTGFQKQNMSSQLKLAVLKADLEKQKQSMGKLYSLKQDLSLTKNKSVTQKTEAWLDNFARCDWNLVQKLEKSTAQISQAVTTTQPSLTQTTVMETVTTVTTTREQILVKHAQEEELPPPPQKQRQITVDSEIRKRLDVIDITELHSWITRSEAVLQSPFEAIFRKEGNFSDLKEKVNAREKA EKFRKLDQASRSQAALVEQMVNEGVNADSIKQASEQLNSRWIEFCQLLSERLNWLYQNNIIAFYNQLQQLQEMTTTAAENWLKIQPTTPSEPTAIKSQLKICKDEVNRLSGLQPQIERLKIQSIALKEKGGQPMFLDADFVAFTNHFQKQVSDVQAREKELQTFIDTFLPMRYQETMSAIRTWVQOSETKLSIPQLSVTDYDIMEQRLGELQALQSSLEQQSGLYYLSTTVKEMSKKAPSEISRKYQSEFEIEIEGRWKKLSQLVEHCQKLEEQMKNLKRKIQNHIIQTLKKWMAEVDVFLKEEWPALGDSEILKQKQCRLLVSDIQTIPQSLNSVNEGGQKIKNEAEPEFASRLETELKELNTQWDHMCQQVYARKEALKGGLEKTVSLQKDLSEMHEWMTQAE EYLERDFEYKTPDELQKAVEEMKRAKEEAQQKEAKVKLLTESVNSVIAQAPPVAQEALKELETLTNTYQWLCRNLNGCKTLEEVWACWHELLESYLEKANKWLNEVEFKLTTENIPGGAEEISEVLDLENLNRHSEDNPNQIRILAQTLTDGGVMDLINEELETFNRSRWRELHEEAVRRQKLEQSIQSAQETEKSLHLIQESLTFIDKQLAAYIADKVDAAQMPQEAQKIQSDLTSHESISLEEMKKNHQGKEAAQRVLSQIDVAQKQLQDVSMKFRFLQKQANFEQRLQESKMI LDEVKMHLPALETKSVQEVEVQSQNLNHCVNLYKLSSEVKSEVEMVIKTGRQIVQKQKQTEPKELDERVLTALKLHYNELGAKVTERKQKLEKCLKLSRKRMEKMNVLTEWLAATDMELTKRSVEGMPSNLDESEAWGKATQKEIEKQKVHLKSI TEVGEALKTVLGKKE TLVEDKLSLLNSNWI AVTSRAEEWLNLLEEQKHMETFQDQNVHDITKWI IQADTLDESEKPKPQQKEDVLRKRLKAELENDIRPKVDSTRDQAANLMANRNGDHCRLKLEVPQISELNRHFAAISHRIKTKGASIPKLELEQFNDSIQKLEPLEAEIQQGVNLEKEDFNKDMNEDNEGTVKELLQRGDNLQQRITDERKREIEIKIQQLLQTKHNALKDLRSQRKKALEISHQWYQYKQADDLKCLDDIEKKLASLEPEPRDERKIEIDRELOKKEELNAVRRQAEGLEDGAMAVEPTQIQLSKRWRREIESKFAQFRRLNFAQIHTVREETMMVMTEDMPLEISYVPSYTYLTEITHVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLQKQESLKNIKDLSLQSSGRIDIIHSSKTAALQASATPVERVKLQEALSQDLDFQWEKVNMYKDRQGRFDRSVEKWRRFHYDIKIFNQWLTAEQFLRKTQIPENWEHAKYKWLKELQDGIQGRQTVVRTL NATGEEIIQSSKTDASILQEKLGSLNLRWQEVCKQLSDRKRKLEEQKNI LSEFQRDLNEFVWLWEADNIIASIPLEPGKEQQLK EKLEQVKLLVEELPLRQIGILKQNETGGPVLVSAPI SPEEQDKLENLQKQTNLQWIKVSRALPEKQGEIEAQIKDLGQLEKLEDELEQLNHLLWLSPIRNLQLEIYNQPNQEGPFVDQETETIAVQAKQPDVEEILSKGHLYKEKPATQVVKLLRLLLL

### Protéine dystrophine mutée générée jusqu'aux 47 premiers exons (2304 acides aminés, 267.82 kDa)

MLWEEVEDCYEREDVQKKTFTKWVNAQFSKFGKQHIENLFSDLQDGRRLDLEGLTGQKLPKEKGS TRVHALNNVNKAALRVLQNNVLDVNI GSTDIVDGNHKLTLGLIWNII LHWQKVNVMKNI MAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVINFTTWSWDGLALNALI HSHRDLDFDWNVVCQSSATQRLHAFNIRARYQLGIEKLLDPEVDVDTTYPDKKSI LMYITSLFQVLPQQVSI EAIQEVEMLPRPKVTKEEHFQLHHQMHSYQQTITVSLAQGYERTSSPKPRFKS YAYTQAAVVTTSDDTRSPFPSSQHLEAPEDKSFSGSSLMSEVNLDRYQTALEEVLSWLSAEDTLQAQGEISNDVEVVKDQFHTHEGYMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLIGTGKLSDEEETEVEQEQMNLNLSRWECRLVASMEEKQSNLHRLVMDLQNKQLKELNDWLTKEERTKRMEEEPGLPDELDRQVQKHVLEDELEQEQVVRVNSLTHMVMVVDSESGDHATAALEEQKLV LGDRWANCRTWIEDRWVLLQDII LKQWRLTEEQCLFSAWLSEKEDAVNKIHTTGFQKQNMSSQLKLAVLKADLEKQKQSMGKLYSLKQDLSLTKNKSVTQKTEAWLDNFARCDWNLVQKLEKSTAQISQAVTTTQPSLTQTTVMETVTTVTTTREQILVKHAQEEELPPPPQKQRQITVDSEIRKRLDVIDITELHSWITRSEAVLQSPFEAIFRKEGNFSDLKEKVNAREKA EKFRKLDQASRSQAALVEQMVNEGVNADSIKQASEQLNSRWIEFCQLLSERLNWLYQNNIIAFYNQLQQLQEMTTTAAENWLKIQPTTPSEPTAIKSQLKICKDEVNRLSGLQPQIERLKIQSIALKEKGGQPMFLDADFVAFTNHFQKQVSDVQAREKELQTFIDTFLPMRYQETMSAIRTWVQOSETKLSIPQLSVTDYDIMEQRLGELQALQSSLEQQSGLYYLSTTVKEMSKKAPSEISRKYQSEFEIEIEGRWKKLSQLVEHCQKLEEQMKNLKRKIQNHIIQTLKKWMAEVDVFLKEEWPALGDSEILKQKQCRLLVSDIQTIPQSLNSVNEGGQKIKNEAEPEFASRLETELKELNTQWDHMCQQVYARKEALKGGLEKTVSLQKDLSEMHEWMTQAE EYLERDFEYKTPDELQKAVEEMKRAKEEAQQKEAKVKLLTESVNSVIAQAPPVAQEALKELETLTNTYQWLCRNLNGCKTLEEVWACWHELLESYLEKANKWLNEVEFKLTTENIPGGAEEISEVLDLENLNRHSEDNPNQIRILAQTLTDGGVMDLINEELETFNRSRWRELHEEAVRRQKLEQSIQSAQETEKSLHLIQESLTFIDKQLAAYIADKVDAAQMPQEAQKIQSDLTSHESISLEEMKKNHQGKEAAQRVLSQIDVAQKQLQDVSMKFRFLQKQANFEQRLQESKMI LDEVKMHLPALETKSVQEVEVQSQNLNHCVNLYKLSSEVKSEVEMVIKTGRQIVQKQKQTEPKELDERVLTALKLHYNELGAKVTERKQKLEKCLKLSRKRMEKMNVLTEWLAATDMELTKRSVEGMPSNLDESEAWGKATQKEIEKQKVHLKSI TEVGEALKTVLGKKE TLVEDKLSLLNSNWI AVTSRAEEWLNLLEEQKHMETFQDQNVHDITKWI IQADTLDESEKPKPQQKEDVLRKRLKAELENDIRPKVDSTRDQAANLMANRNGDHCRLKLEVPQISELNRHFAAISHRIKTKGASIPKLELEQFNDSIQKLEPLEAEIQQGVNLEKEDFNKDMNEDNEGTVKELLQRGDNLQQRITDERKREIEIKIQQLLQTKHNALKDLRSQRKKALEISHQWYQYKQADDLKCLDDIEKKLASLEPEPRDERKIEIDRELOKKEELNAVRRQAEGLEDGAMAVEPTQIQLSKRWRREIESKFAQFRRLNFAQIHTVREETMMVMTEDMPLEISYVPSYTYLTEITHVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLQKQESLKNIKDLSLQSSGRIDIIHSSKTAALQASATPVERVKLQEALSQDLDFQWEKVNMYKDRQGRFDRSVEKWRRFHYDIKIFNQWLTAEQFLRKTQIPENWEHAKYKWLKELQDGIQGRQTVVRTL NATGEEIIQSSKTDASILQEKLGSLNLRWQEVCKQLSDRKRKLEEQKNI LSEFQRDLNEFVWLWEADNIIASIPLEPGKEQQLK EKLEQVKLLVEELPLRQIGILKQNETGGPVLVSAPI SPEEQDKLENLQKQTNLQWIKVSRALPEKQGEIEAQIKDLGQLEKLEDELEQLNHLLWLSPIRNLQLEIYNQPNQEGPFVDQETETIAVQAKQPDVEEILSKGHLYKEKPATQVVKLLRLLLL

### Protéine dystrophine mutée générée jusqu'aux 44 premiers exons (2146 acides aminés, 249.68 kDa)

MLWEEVEDCYEREDVQKKTFTKWVNAQFSKFGKQHIENLFSDLQDGRRLDLEGLTGQKLPKEKGS TRVHALNNVNKAALRVLQNNVLDVNI GSTDIVDGNHKLTLGLIWNII LHWQKVNVMKNI MAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVINFTTWSWDGLALNALI HSHRDLDFDWNVVCQSSATQRLHAFNIRARYQLGIEKLLDPEVDVDTTYPDKKSI LMYITSLFQVLPQQVSI EAIQEVEMLPRPKVTKEEHFQLHHQMHSYQQTITVSLAQGYERTSSPKPRFKS YAYTQAAVVTTSDDTRSPFPSSQHLEAPEDKSFSGSSLMSEVNLDRYQTALEEVLSWLSAEDTLQAQGEISNDVEVVKDQFHTHEGYMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLIGTGKLSDEEETEVEQEQMNLNLSRWECRLVASMEEKQSNLHRLVMDLQNKQLKELNDWLTKEERTKRMEEEPGLPDELDRQVQKHVLEDELEQEQVVRVNSLTHMVMVVDSESGDHATAALEEQKLV LGDRWANCRTWIEDRWVLLQDII LKQWRLTEEQCLFSAWLSEKEDAVNKIHTTGFQKQNMSSQLKLAVLKADLEKQKQSMGKLYSLKQDLSLTKNKSVTQKTEAWLDNFARCDWNLVQKLEKSTAQISQAVTTTQPSLTQTTVMETVTTVTTTREQILVKHAQEEELPPPPQKQRQITVDSEIRKRLDVIDITELHSWITRSEAVLQSPFEAIFRKEGNFSDLKEKVNAREKA EKFRKLDQASRSQAALVEQMVNEGVNADSIKQASEQLNSRWIEFCQLLSERLNWLYQNNIIAFYNQLQQLQEMTTTAAENWLKIQPTTPSEPTAIKSQLKICKDEVNRLSGLQPQIERLKIQSIALKEKGGQPMFLDADFVAFTNHFQKQVSDVQAREKELQTFIDTFLPMRYQETMSAIRTWVQOSETKLSIPQLSVTDYDIMEQRLGELQALQSSLEQQSGLYYLSTTVKEMSKKAPSEISRKYQSEFEIEIEGRWKKLSQLVEHCQKLEEQMKNLKRKIQNHIIQTLKKWMAEVDVFLKEEWPALGDSEILKQKQCRLLVSDIQTIPQSLNSVNEGGQKIKNEAEPEFASRLETELKELNTQWDHMCQQVYARKEALKGGLEKTVSLQKDLSEMHEWMTQAE EYLERDFEYKTPDELQKAVEEMKRAKEEAQQKEAKVKLLTESVNSVIAQAPPVAQEALKELETLTNTYQWLCRNLNGCKTLEEVWACWHELLESYLEKANKWLNEVEFKLTTENIPGGAEEISEVLDLENLNRHSEDNPNQIRILAQTLTDGGVMDLINEELETFNRSRWRELHEEAVRRQKLEQSIQSAQETEKSLHLIQESLTFIDKQLAAYIADKVDAAQMPQEAQKIQSDLTSHESISLEEMKKNHQGKEAAQRVLSQIDVAQKQLQDVSMKFRFLQKQANFEQRLQESKMI LDEVKMHLPALETKSVQEVEVQSQNLNHCVNLYKLSSEVKSEVEMVIKTGRQIVQKQKQTEPKELDERVLTALKLHYNELGAKVTERKQKLEKCLKLSRKRMEKMNVLTEWLAATDMELTKRSVEGMPSNLDESEAWGKATQKEIEKQKVHLKSI TEVGEALKTVLGKKE TLVEDKLSLLNSNWI AVTSRAEEWLNLLEEQKHMETFQDQNVHDITKWI IQADTLDESEKPKPQQKEDVLRKRLKAELENDIRPKVDSTRDQAANLMANRNGDHCRLKLEVPQISELNRHFAAISHRIKTKGASIPKLELEQFNDSIQKLEPLEAEIQQGVNLEKEDFNKDMNEDNEGTVKELLQRGDNLQQRITDERKREIEIKIQQLLQTKHNALKDLRSQRKKALEISHQWYQYKQADDLKCLDDIEKKLASLEPEPRDERKIEIDRELOKKEELNAVRRQAEGLEDGAMAVEPTQIQLSKRWRREIESKFAQFRRLNFAQIHTVREETMMVMTEDMPLEISYVPSYTYLTEITHVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLQKQESLKNIKDLSLQSSGRIDIIHSSKTAALQASATPVERVKLQEALSQDLDFQWEKVNMYKDRQGRFDRSVEKWRRFHYDIKIFNQWLTAEQFLRKTQIPENWEHAKYKWLKELQDGIQGRQTVVRTL NATGEEIIQSSKTDASILQEKLGSLNLRWQEVCKQLSDRKRKLEEQKNI LSEFQRDLNEFVWLWEADNIIASIPLEPGKEQQLK EKLEQVKLLVEELPLRQIGILKQNETGGPVLVSAPI SPEEQDKLENLQKQTNLQWIKVSRALPEKQGEIEAQIKDLGQLEKLEDELEQLNHLLWLSPIRNLQLEIYNQPNQEGPFVDQETETIAVQAKQPDVEEILSKGHLYKEKPATQVVKLLRLLLL

KEDVLRKRLKAELENDIRPKVDSTRDQAANLMANRGDHCRKLVPEQISELNHRFAAISHRIKTKGASIPLKELEQFNDSIQKLEPLEAEIQQGVNLKEEDFNKDMNED  
 NEGTVKELLQRGDNLQQRITDEKRREIEIKIKQQLLQTKHNALKDLRSQRKKALEISHQWYQYKRQADDLLKCLDDIEKKLASLEPEPDERKIKEIDRELOKQKKEEL  
 NAVRQAEGLEDGAAVAPEPTQIQLSKRWRREIESKFAQFRRLNFAQIHTVREETMMVMTEDMPLEISYVPSYLYTEITHVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLKF  
 QEESLKNIKDSLQSSGRIDIHSHKTAALQSATPVERVKLQEALSQDLDFQWEKVNMYKDRQGRFDRSVEKWRFRHYDIKIFNQWLTEAEQFLRKTQIPENWEHAK  
 KYWYK

### Protéine dystrophine mutée générée jusqu'aux 48 premiers exons (2366 acides aminés, 275.04 kDa)

MLWEEVEDCYEREDVQKKTFTKWNVAQFSKFGKQHIENLFSDLQDGRRLDLEGLTGQKLPKEKGSSTRVHALNNVNKAALRVLQNNVNDLVNIGSTDIVDGNHKL  
 LGLIWNIIHLHWQVKNVMKNIAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVNFTTWSWDGLALNALIHSRDPDLFDWNSVVCQASATQRLHAFNIARYQLGIEKLLD  
 PEDVDTTYPDKKSIILMYITSLFQVLPQQVSEIAIQEVEMLPRPPKVTKEEHFQLHHQMHSQQITVSLAQGYERTSSPKPRFKSYAYTQAAYVTTSDPTRSPFPSSQ  
 LEAPEDKSFSSLMSEVNLDRYQTALEEVLSWLLSAEDTLQAQGEISNDVEVVKDQFHTHEGYMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLITGTGKLEDEEETVQEQMNLN  
 SRWECLRVASMEKQSNLHRVLMDLQNKQKLELNDWLTKEERTKMEEEPLGPDLEDLKRQVQKHVLEQDELEQEQVRVNSLTHMVVVDSESSGDHATAALEEQLV  
 LGRWANICRWETEDRWVLLQDILLKQWRLTEEQCLFSAWLESEKEDAVNKIHTTGFKDQNEMLSSQLKAVLKADELEKQKQSMGKLYSLKQDLSLTKNKSVTQKTEA  
 WLDNFARCDWNLVQKLEKSTAQISQAVTTQPSLTQTTVMETVTTVTTREQILVKAHAQEELPPPPQKQRQITVDSEIRKRLDVIDTELSHWITRSEAVLQSPFAI  
 FRKEGNFSDLKEKVNAREKAKEFRKLDASRAQALVEQMVNEGVNADSIKQASEQLNSRWIEFCQLLSERLNWLEYQNNIIAFYNQLQLEQMTTAAENWLKIQ  
 PTPPSEPTAIKSQLKICKDEVNRLSGLQPQIERLKIQSIALKEKQGGPMPDLADDFVAFTHNFQKQVSDVQAREKELQTFDFTLPMRYQETMSAIRTWVQSSSETKLS  
 IPQLSVTDYEMEQRLELQALQSSLEQQSGLYLLSTTVKEMSKKAPSEISRYQSEFEIEEGRWKKLSQLVEHCQKLEEQMNLKRIQNHIIQTLKKWMAEVDV  
 LKEEWPALGDSEILKKQLKQCRLLVSDIQTIPQSLNSVNEGGQKIKNEAEPEFASRLETELKELNTQWDHMCQQVYARKEALKGGLEKTVSLQKDLSEMHEWMTQAE  
 EYLERDFEYKTPDELQKAVEEMKRAKEEAQKQKAVKLLTESVNSVIAQAPPVAQEALEKLETLTNTNYQWLCTRLNGKCKTLEEVWACWHELLESLYKANKWLN  
 VEFKLTITENIPGGAEEISEVLDLSENLMRHSNEDNPQIRILAQTLTDGGVMDLEINEELETFNRSRRELHEEAVRRQKLEQSIQSAQETKSLHLIQESLTFIDK  
 QLAAYIADKVDAAQMPQEAQIKQSDLTSHEISLEEMKKNQGEAAQVRLSQIDVAQKQLQDVSMKFRFLQKQANFQRLQESKMI LDEVKMLPALETKSVEQEVV  
 QSQNLHCVNLYKSLSEVKSSEVEMVITGRQIVQKQKQTEPKELDERVATLKLHYNELGAKVTERKQLEKCLKLSRMRKEMNVLTEWLAATDMELTKRSVAVGMP  
 NLDSEVAVGKATQKIEKQVHLKSI TEVGEALKTVLGKKE TLVEDKLSLNSNWI AVTSRAEAWNLLEBYQKHMETFDQNVDIHKWI IQADTLDESEKPKPQ  
 KEDVLRKRLKAELENDIRPKVDSTRDQAANLMANRGDHCRKLVPEQISELNHRFAAISHRIKTKGASIPLKELEQFNDSIQKLEPLEAEIQQGVNLKEEDFNKDMNED  
 NEGTVKELLQRGDNLQQRITDEKRREIEIKIKQQLLQTKHNALKDLRSQRKKALEISHQWYQYKRQADDLLKCLDDIEKKLASLEPEPDERKIKEIDRELOKQKKEEL  
 NAVRQAEGLEDGAAVAPEPTQIQLSKRWRREIESKFAQFRRLNFAQIHTVREETMMVMTEDMPLEISYVPSYLYTEITHVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLKF  
 QEESLKNIKDSLQSSGRIDIHSHKTAALQSATPVERVKLQEALSQDLDFQWEKVNMYKDRQGRFDRSVEKWRFRHYDIKIFNQWLTEAEQFLRKTQIPENWEHAK  
 KYWYKLELQDGIQQRQTVVTRTLNATGEEIIQSSKTDASILQEKLGSLNLRWQVCKQLSDRKRKLEEQKNI LSEFQRDLNEFVWLWEADNIIASIPLEPGKEQQLK  
 EKLEQVLLVEELPLRQGIKQLNETGGPVLVSAPI SPEGQDKLENLKLQTNLQWIKVSRALPEKQGEIEAQIKDLGQLEKLEDELEQLNHLHLWLSPIRNLQEIY  
 NQPNQEGFPDQV

### Protéine dystrophine mutée générée jusqu'aux 51 premiers exons (2514 acides aminés, 291.63 kDa)

MLWEEVEDCYEREDVQKKTFTKWNVAQFSKFGKQHIENLFSDLQDGRRLDLEGLTGQKLPKEKGSSTRVHALNNVNKAALRVLQNNVNDLVNIGSTDIVDGNHKL  
 LGLIWNIIHLHWQVKNVMKNIAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVNFTTWSWDGLALNALIHSRDPDLFDWNSVVCQASATQRLHAFNIARYQLGIEKLLD  
 PEDVDTTYPDKKSIILMYITSLFQVLPQQVSEIAIQEVEMLPRPPKVTKEEHFQLHHQMHSQQITVSLAQGYERTSSPKPRFKSYAYTQAAYVTTSDPTRSPFPSSQ  
 LEAPEDKSFSSLMSEVNLDRYQTALEEVLSWLLSAEDTLQAQGEISNDVEVVKDQFHTHEGYMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLITGTGKLEDEEETVQEQMNLN  
 SRWECLRVASMEKQSNLHRVLMDLQNKQKLELNDWLTKEERTKMEEEPLGPDLEDLKRQVQKHVLEQDELEQEQVRVNSLTHMVVVDSESSGDHATAALEEQLV  
 LGRWANICRWETEDRWVLLQDILLKQWRLTEEQCLFSAWLESEKEDAVNKIHTTGFKDQNEMLSSQLKAVLKADELEKQKQSMGKLYSLKQDLSLTKNKSVTQKTEA  
 WLDNFARCDWNLVQKLEKSTAQISQAVTTQPSLTQTTVMETVTTVTTREQILVKAHAQEELPPPPQKQRQITVDSEIRKRLDVIDTELSHWITRSEAVLQSPFAI  
 FRKEGNFSDLKEKVNAREKAKEFRKLDASRAQALVEQMVNEGVNADSIKQASEQLNSRWIEFCQLLSERLNWLEYQNNIIAFYNQLQLEQMTTAAENWLKIQ  
 PTPPSEPTAIKSQLKICKDEVNRLSGLQPQIERLKIQSIALKEKQGGPMPDLADDFVAFTHNFQKQVSDVQAREKELQTFDFTLPMRYQETMSAIRTWVQSSSETKLS  
 IPQLSVTDYEMEQRLELQALQSSLEQQSGLYLLSTTVKEMSKKAPSEISRYQSEFEIEEGRWKKLSQLVEHCQKLEEQMNLKRIQNHIIQTLKKWMAEVDV  
 LKEEWPALGDSEILKKQLKQCRLLVSDIQTIPQSLNSVNEGGQKIKNEAEPEFASRLETELKELNTQWDHMCQQVYARKEALKGGLEKTVSLQKDLSEMHEWMTQAE  
 EYLERDFEYKTPDELQKAVEEMKRAKEEAQKQKAVKLLTESVNSVIAQAPPVAQEALEKLETLTNTNYQWLCTRLNGKCKTLEEVWACWHELLESLYKANKWLN  
 VEFKLTITENIPGGAEEISEVLDLSENLMRHSNEDNPQIRILAQTLTDGGVMDLEINEELETFNRSRRELHEEAVRRQKLEQSIQSAQETKSLHLIQESLTFIDK  
 QLAAYIADKVDAAQMPQEAQIKQSDLTSHEISLEEMKKNQGEAAQVRLSQIDVAQKQLQDVSMKFRFLQKQANFQRLQESKMI LDEVKMLPALETKSVEQEVV  
 QSQNLHCVNLYKSLSEVKSSEVEMVITGRQIVQKQKQTEPKELDERVATLKLHYNELGAKVTERKQLEKCLKLSRMRKEMNVLTEWLAATDMELTKRSVAVGMP  
 NLDSEVAVGKATQKIEKQVHLKSI TEVGEALKTVLGKKE TLVEDKLSLNSNWI AVTSRAEAWNLLEBYQKHMETFDQNVDIHKWI IQADTLDESEKPKPQ  
 KEDVLRKRLKAELENDIRPKVDSTRDQAANLMANRGDHCRKLVPEQISELNHRFAAISHRIKTKGASIPLKELEQFNDSIQKLEPLEAEIQQGVNLKEEDFNKDMNED  
 NEGTVKELLQRGDNLQQRITDEKRREIEIKIKQQLLQTKHNALKDLRSQRKKALEISHQWYQYKRQADDLLKCLDDIEKKLASLEPEPDERKIKEIDRELOKQKKEEL  
 NAVRQAEGLEDGAAVAPEPTQIQLSKRWRREIESKFAQFRRLNFAQIHTVREETMMVMTEDMPLEISYVPSYLYTEITHVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLKF  
 QEESLKNIKDSLQSSGRIDIHSHKTAALQSATPVERVKLQEALSQDLDFQWEKVNMYKDRQGRFDRSVEKWRFRHYDIKIFNQWLTEAEQFLRKTQIPENWEHAK  
 KYWYKLELQDGIQQRQTVVTRTLNATGEEIIQSSKTDASILQEKLGSLNLRWQVCKQLSDRKRKLEEQKNI LSEFQRDLNEFVWLWEADNIIASIPLEPGKEQQLK  
 EKLEQVLLVEELPLRQGIKQLNETGGPVLVSAPI SPEGQDKLENLKLQTNLQWIKVSRALPEKQGEIEAQIKDLGQLEKLEDELEQLNHLHLWLSPIRNLQEIY  
 NQPNQEGFPDQVETIEIAVQAKQPDVEEILSKGQHLYKEKPATQPVKRLKLELDSSEWKAVERNLLQELRAKQPDPLAPLGTIIGASPTQTVTLVTPQVVTKEAI SKLEM  
 PSLMLLEVPALADFNRAWTELTDLWLSLDDQVKSQRVMVGDLEINEMIKQK

### Protéine dystrophine mutée générée après délétion des exons 50 à 51 (3571 acides aminés, 414.03 kDa)

MLWEEVEDCYEREDVQKKTFTKWNVAQFSKFGKQHIENLFSDLQDGRRLDLEGLTGQKLPKEKGSSTRVHALNNVNKAALRVLQNNVNDLVNIGSTDIVDGNHKL  
 LGLIWNIIHLHWQVKNVMKNIAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVNFTTWSWDGLALNALIHSRDPDLFDWNSVVCQASATQRLHAFNIARYQLGIEKLLD  
 PEDVDTTYPDKKSIILMYITSLFQVLPQQVSEIAIQEVEMLPRPPKVTKEEHFQLHHQMHSQQITVSLAQGYERTSSPKPRFKSYAYTQAAYVTTSDPTRSPFPSSQ  
 LEAPEDKSFSSLMSEVNLDRYQTALEEVLSWLLSAEDTLQAQGEISNDVEVVKDQFHTHEGYMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLITGTGKLEDEEETVQEQMNLN  
 SRWECLRVASMEKQSNLHRVLMDLQNKQKLELNDWLTKEERTKMEEEPLGPDLEDLKRQVQKHVLEQDELEQEQVRVNSLTHMVVVDSESSGDHATAALEEQLV  
 LGRWANICRWETEDRWVLLQDILLKQWRLTEEQCLFSAWLESEKEDAVNKIHTTGFKDQNEMLSSQLKAVLKADELEKQKQSMGKLYSLKQDLSLTKNKSVTQKTEA  
 WLDNFARCDWNLVQKLEKSTAQISQAVTTQPSLTQTTVMETVTTVTTREQILVKAHAQEELPPPPQKQRQITVDSEIRKRLDVIDTELSHWITRSEAVLQSPFAI  
 FRKEGNFSDLKEKVNAREKAKEFRKLDASRAQALVEQMVNEGVNADSIKQASEQLNSRWIEFCQLLSERLNWLEYQNNIIAFYNQLQLEQMTTAAENWLKIQ  
 PTPPSEPTAIKSQLKICKDEVNRLSGLQPQIERLKIQSIALKEKQGGPMPDLADDFVAFTHNFQKQVSDVQAREKELQTFDFTLPMRYQETMSAIRTWVQSSSETKLS  
 IPQLSVTDYEMEQRLELQALQSSLEQQSGLYLLSTTVKEMSKKAPSEISRYQSEFEIEEGRWKKLSQLVEHCQKLEEQMNLKRIQNHIIQTLKKWMAEVDV  
 LKEEWPALGDSEILKKQLKQCRLLVSDIQTIPQSLNSVNEGGQKIKNEAEPEFASRLETELKELNTQWDHMCQQVYARKEALKGGLEKTVSLQKDLSEMHEWMTQAE  
 EYLERDFEYKTPDELQKAVEEMKRAKEEAQKQKAVKLLTESVNSVIAQAPPVAQEALEKLETLTNTNYQWLCTRLNGKCKTLEEVWACWHELLESLYKANKWLN  
 VEFKLTITENIPGGAEEISEVLDLSENLMRHSNEDNPQIRILAQTLTDGGVMDLEINEELETFNRSRRELHEEAVRRQKLEQSIQSAQETKSLHLIQESLTFIDK  
 QLAAYIADKVDAAQMPQEAQIKQSDLTSHEISLEEMKKNQGEAAQVRLSQIDVAQKQLQDVSMKFRFLQKQANFQRLQESKMI LDEVKMLPALETKSVEQEVV  
 QSQNLHCVNLYKSLSEVKSSEVEMVITGRQIVQKQKQTEPKELDERVATLKLHYNELGAKVTERKQLEKCLKLSRMRKEMNVLTEWLAATDMELTKRSVAVGMP  
 NLDSEVAVGKATQKIEKQVHLKSI TEVGEALKTVLGKKE TLVEDKLSLNSNWI AVTSRAEAWNLLEBYQKHMETFDQNVDIHKWI IQADTLDESEKPKPQ  
 KEDVLRKRLKAELENDIRPKVDSTRDQAANLMANRGDHCRKLVPEQISELNHRFAAISHRIKTKGASIPLKELEQFNDSIQKLEPLEAEIQQGVNLKEEDFNKDMNED  
 NEGTVKELLQRGDNLQQRITDEKRREIEIKIKQQLLQTKHNALKDLRSQRKKALEISHQWYQYKRQADDLLKCLDDIEKKLASLEPEPDERKIKEIDRELOKQKKEEL  
 NAVRQAEGLEDGAAVAPEPTQIQLSKRWRREIESKFAQFRRLNFAQIHTVREETMMVMTEDMPLEISYVPSYLYTEITHVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLKF  
 QEESLKNIKDSLQSSGRIDIHSHKTAALQSATPVERVKLQEALSQDLDFQWEKVNMYKDRQGRFDRSVEKWRFRHYDIKIFNQWLTEAEQFLRKTQIPENWEHAK  
 KYWYKLELQDGIQQRQTVVTRTLNATGEEIIQSSKTDASILQEKLGSLNLRWQVCKQLSDRKRKLEEQKNI LSEFQRDLNEFVWLWEADNIIASIPLEPGKEQQLK  
 EKLEQVLLVEELPLRQGIKQLNETGGPVLVSAPI SPEGQDKLENLKLQTNLQWIKVSRALPEKQGEIEAQIKDLGQLEKLEDELEQLNHLHLWLSPIRNLQEIY  
 NQPNQEGFPDQVETIEIAVQAKQPDVEEILSKGQHLYKEKPATQPVKRLKLELDSSEWKAVERNLLQELRAKQPDPLAPLGTIIGASPTQTVTLVTPQVVTKEAI SKLEM  
 NEMLKDSTQWLEAKEEAEQVLGQARAKLESWKEGYPYTVDAIQK IETETKQLAKDLRQWQTNVDVANDLAKLLDRDY SADDTRKVMHITENINASWRSIHKRVSERA

ALEETHRLQLQFPLDLEKFLAWLTEAETTANVLQDATRKRERLLEDSKGVKELMKQWQDLQGEIEAHTDVYHNLDENSQKILRSLEGSDDAVLLQRRRLDMMNFKWSL  
 RKKSLNIRSHLEASSDQWKRHLHLSLQELLVWLQKDDLELSRQAPIGDFPVAQKQNDVHRFAFRKELKTEKPEVIMSTLETVRIFLTEQPLEGLEKLYQEPRELPPEER  
 AQNVTRLLRKAQAEVNTWEKLNLSADWQRKIDETLERLQELQEADELDLKLQAEVIGKSWQVGDLLIDSLQDHLKVKALRGEIAPLKENVSHVNDLARQLT  
 TLIQLSPYNLSLEDLNTRWKLLQVAVEDRVRLQEAHRDFGPAHQHFLSTVSGQWPERAISPKNVFPYINHETQTTCDWHPKMTELYQSLADLNNVRFSAYRTAM  
 KLRRQLKALCLDILLSLAACDALLDQHNKQNDQPMDLQIINCLTTIYDRLEQHNHNLVNVPLCVDMCLNWLNLVYDTRGRIIRVLSFKGTIGISLCKAHLKEDKRY  
 LFKQVASTGFCQDQRRLLGLLHDSIQIPRQLGEVAFSGSNI EP SVRSFCQFANNKPEIEAALFLDWMRLEPQSMVWLPVLRVHVAEAETAKHQAKCNIKCECPIIGF  
 RYRSCLKHFNYDIQCSCFFSRGAVKAGHKMHYPMVEYCTPTTSGEDVDRFAKVLKNNKFRTRKFAKHPRMGYLPVQTVLEGDNMETPVTLINFWPVD SAPASSPQLSHD  
 DTHSRIEHYASRLAEMENSNGSVLNDISI SPNESI DDEHLLIQHYCQSLNQDPSLSQPRSPAQILLSLESEERGERLRIADLEEMENRNLQAEYDRLLKQHQHEKGLSP  
 LPSPPEMPTSPQSPRAELIAEAKLLRQHKGRLEARMQILEDHKNQLESQHLRLRQLLEQPQAEAKVNGTTVSSPSTSLQRSDSSQPMLLRVVGSGTSDSMGEEDL  
 LSPQDQDTSTGLEEVMEQLNNSFPSSRGRNTPGKPMREDTM

### Protéine dystrophine mutée générée après délétion de l'exon 52 (2514 acides aminés, 291.63 kDa)

MLWVEEVEDCYEREDVQKKTFTKWVNAQFSKFGKQHIENLFSDLQDGRRLDLDLEGLTGQKLPKEKGS TRVHALNPNVNAKALRVLQNNVNDLVNIGSTDIVDGNHKL  
 LGLIWNIIHLHWQVKNVMKNI MAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVINFTTWSWDGLALNALIHSRHPDLFDWNSVVCQSSATQRLEHAFNIARYQLGIEKLLD  
 PEDVDTTYPDKKSIILMYITSLFQVLPQQVSI EA IQEVEMLPRPPKVTKEEHLQHHQMHYSQQITVSLAQGYERTSSPKPRFKSYAYTQAAYVTTSDPTRSPFPSSQH  
 LEAPEDKSFSGSSLMESVNLDRYQTALEEVLSWLLSAEDTLQAQGEISNDVEVVKDQFHTHEGYMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLIGTGKLSSEDETEVQEQMNLN  
 SRWECLRVASMEKQSNLHRVLMDLQNKLELNDWLTKEERTRKMEEEP LGGPDLKRVQVQHKVLEDELEQEQVRVNSLTHMVVVDSESSGDHATAALEEQLVK  
 LGRDWANICRWTEEDRWVLLQDI LLKQWRLTEEQCLFSAWLESEKEDAVNKIHTTGFKDQNEMLSSQLKAVLKADLEKKKQSMGKLYSLKQDLSLTKNKSVTQKTEA  
 WLDNFARCDWNLVQKLEKSTAQISQAVTTTQPSLTQTTVMETVTTVTTREQLLVKHAQEELPPPPQKRRQITVDSEIRKRLDVIDITELHSWITRSEAVLQSPFPAI  
 FRKEGNFSDLKEKVNAIEREKAEKFRKLQDASRAQALVEQMVNEGVNADSIKQASEQLNSRWIEFCQLLSERLNWLLEYQNNIIAFYNQLQOLEQMTTAAENWLKIQ  
 PTPPSEPTAIKSQLKICKDEVNRLSGLQPPQIERLKIQSIALKEKGGQPMFLADDFVAFTHNFQKQVSDVQAREKELQTFIDTLPMPRYQETMSAIRTWVQVQSETKLS  
 IPQLSVTDYBIMEQRLGELQALQSSLEQQSGLYLSTTVKEMSKKAPSEISRKYQSEFEIEEGRWKKLSQLVEHCQKLEEQMKNLKRKIQNHIIQTLKKNMAEVDV  
 LKEEWPALGDSEILKQLKQCRLLVSDIQTIPQSLNSVNEGGQKIKNEAEPEFASRLETELKELNTQWDHMCQQVYARKEALKGGLEKTVSLQKDLSEMHEWMTQAE  
 EYLERDFEYKTPDELQKAVEEMKRAKEEAQQEAKVKLLTESVNSVIAQAPPVAQEALKELETLTNYQWLCRNLGCKCTLEEVWACWHELHLSYLEKANKWLNE  
 VEFKLTETENIPGGAIEISEVLDSELENLMRHSNPNQIRILAQTLTDGGVMDLEINEELETFNRSRRELHEEA VRROKLELQSIQSAQETEKSLHLIQESLTFIDK  
 QLAAYIADKVDAAQMPQEAQIKQSDLTSHEISLEEMKKNQKGEAAQRVLSQIDVAQKLLQDVSMMKFRFLQK PANFEQRLQESKMI LDEVKMLHLPALTEKSVQEVV  
 QSLNHCVNLYKSLSEVKSSEVMVITGRQIVQKQKQ TENPKELDERVTA LKLYHNEI GAKVTERKQKLEKCLKLSRMRKEMNVLTEWLAATDMELTKRSVAVGMP  
 NLDSEVAVGKATQKIEIKQVHLKSI TEVGEALKTVLGGKETLVEDKLSLNSNWI AVTSRAEEWLNLLEEQKHMETFQDQNVHITKWI IQADTLDESEKPKPQ  
 KEDVLRKLAELNDIRPKVDSTRDQAANLMANRGDHCRLKLEVPQISELNHRFAAISHRIKGTGKASIPLKELEQFNDSIQKLEPLEAEIQQGVNLEKEDFNKDMNED  
 NEGTVKELLQRGDNLQQRITDEKREIEIKIQKQLLQTKHNALKDLRSQRRKKALEISHQWYQYKQADDDLLCDDIEKKLASLPEPRDERKIKEIDRELOKKKKEE  
 NAVRRAEGLSEDGAAMAVEPTQIQLSKRWREIESKFAQFRRLNFAQIHTVREETMMVMTEDMPLIESYVPSYTYLTIHVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLKF  
 QEESLKNIKDLSQSSGRIDI IHSKKAALQSATPVERVKLEALSQDFQWKEVKNMXYDRQGRFDRSVEKWRFRHYDIKIFNQWLTBAEQFLRPTQIPENWEHAK  
 KYWYKLELDGIQQRQTVVRLNATGEEIIQSSKTDASILQEKLGNLNRWQEVCKQLSDRKRKLEEQKNI LSEFQRDLNEFWLWLEADNIASIPLEPGKEQQL  
 EKLEQVKLVLEELPLRQILKQDNETGGPVLVSAPI SPEEQDKLENLQTNLQWIKVSRALPEKQGEIEAQIKDLGQLEKLEDELEQLNHLHLLWLSPIRNLQLEIY  
 NQPNQEGFVDVQTEIAVQAKQPDVEEILSKGQHLKPKPATQVPRKRLLEDLSSEWKA VNRLLQELRAKQPD LAPGLTTIGAS

### Protéine dystrophine mutée générée après délétion de l'exon 44 (2112 acides aminés, 244.82 kDa)

MLWVEEVEDCYEREDVQKKTFTKWVNAQFSKFGKQHIENLFSDLQDGRRLDLDLEGLTGQKLPKEKGS TRVHALNPNVNAKALRVLQNNVNDLVNIGSTDIVDGNHKL  
 LGLIWNIIHLHWQVKNVMKNI MAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVINFTTWSWDGLALNALIHSRHPDLFDWNSVVCQSSATQRLEHAFNIARYQLGIEKLLD  
 PEDVDTTYPDKKSIILMYITSLFQVLPQQVSI EA IQEVEMLPRPPKVTKEEHLQHHQMHYSQQITVSLAQGYERTSSPKPRFKSYAYTQAAYVTTSDPTRSPFPSSQH  
 LEAPEDKSFSGSSLMESVNLDRYQTALEEVLSWLLSAEDTLQAQGEISNDVEVVKDQFHTHEGYMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLIGTGKLSSEDETEVQEQMNLN  
 SRWECLRVASMEKQSNLHRVLMDLQNKLELNDWLTKEERTRKMEEEP LGGPDLKRVQVQHKVLEDELEQEQVRVNSLTHMVVVDSESSGDHATAALEEQLVK  
 LGRDWANICRWTEEDRWVLLQDI LLKQWRLTEEQCLFSAWLESEKEDAVNKIHTTGFKDQNEMLSSQLKAVLKADLEKKKQSMGKLYSLKQDLSLTKNKSVTQKTEA  
 WLDNFARCDWNLVQKLEKSTAQISQAVTTTQPSLTQTTVMETVTTVTTREQLLVKHAQEELPPPPQKRRQITVDSEIRKRLDVIDITELHSWITRSEAVLQSPFPAI  
 FRKEGNFSDLKEKVNAIEREKAEKFRKLQDASRAQALVEQMVNEGVNADSIKQASEQLNSRWIEFCQLLSERLNWLLEYQNNIIAFYNQLQOLEQMTTAAENWLKIQ  
 PTPPSEPTAIKSQLKICKDEVNRLSGLQPPQIERLKIQSIALKEKGGQPMFLADDFVAFTHNFQKQVSDVQAREKELQTFIDTLPMPRYQETMSAIRTWVQVQSETKLS  
 IPQLSVTDYBIMEQRLGELQALQSSLEQQSGLYLSTTVKEMSKKAPSEISRKYQSEFEIEEGRWKKLSQLVEHCQKLEEQMKNLKRKIQNHIIQTLKKNMAEVDV  
 LKEEWPALGDSEILKQLKQCRLLVSDIQTIPQSLNSVNEGGQKIKNEAEPEFASRLETELKELNTQWDHMCQQVYARKEALKGGLEKTVSLQKDLSEMHEWMTQAE  
 EYLERDFEYKTPDELQKAVEEMKRAKEEAQQEAKVKLLTESVNSVIAQAPPVAQEALKELETLTNYQWLCRNLGCKCTLEEVWACWHELHLSYLEKANKWLNE  
 VEFKLTETENIPGGAIEISEVLDSELENLMRHSNPNQIRILAQTLTDGGVMDLEINEELETFNRSRRELHEEA VRROKLELQSIQSAQETEKSLHLIQESLTFIDK  
 QLAAYIADKVDAAQMPQEAQIKQSDLTSHEISLEEMKKNQKGEAAQRVLSQIDVAQKLLQDVSMMKFRFLQK PANFEQRLQESKMI LDEVKMLHLPALTEKSVQEVV  
 QSLNHCVNLYKSLSEVKSSEVMVITGRQIVQKQKQ TENPKELDERVTA LKLYHNEI GAKVTERKQKLEKCLKLSRMRKEMNVLTEWLAATDMELTKRSVAVGMP  
 NLDSEVAVGKATQKIEIKQVHLKSI TEVGEALKTVLGGKETLVEDKLSLNSNWI AVTSRAEEWLNLLEEQKHMETFQDQNVHITKWI IQADTLDESEKPKPQ  
 KEDVLRKLAELNDIRPKVDSTRDQAANLMANRGDHCRLKLEVPQISELNHRFAAISHRIKGTGKASIPLKELEQFNDSIQKLEPLEAEIQQGVNLEKEDFNKDMNED  
 NEGTVKELLQRGDNLQQRITDEKREIEIKIQKQLLQTKHNALKDLRSQRRKKALEISHQWYQYKQADDDLLCDDIEKKLASLPEPRDERKIKEIDRELOKKKKEE  
 NAVRRAEGLSEDGAAMAVEPTQIQLSKRWREIESKFAQFRRLNFAQIHTVREETMMVMTEDMPLIESYVPSYTYLTIHVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLKF  
 QEESLKNIKDLSQSSGRIDI IHSKKAALQSATPVERVKLEALSQDFQWKEVKNMXYDRQGRFDRSVEKWRFRHYDIKIFNQWLTBAEQFLRPTQIPENWEHAK  
 KYWYKLELDGIQQRQTVVRLNATGEEIIQSSKTDASILQEKLGNLNRWQEVCKQLSDRKRKLEEQKNI LSEFQRDLNEFWLWLEADNIASIPLEPGKEQQL  
 EKLEQVKLVLEELPLRQILKQDNETGGPVLVSAPI SPEEQDKLENLQTNLQWIKVSRALPEKQGEIEAQIKDLGQLEKLEDELEQLNHLHLLWLSPIRNLQLEIY  
 NQPNQEGFVDVQTEIAVQAKQPDVEEILSKGQHLKPKPATQVPRKRLLEDLSSEWKA VNRLLQELRAKQPD LAPGLTTIGAS

### Protéine dystrophine mutée générée jusqu'aux 19 premiers exons (794 acides aminés, 91.67 kDa)

MLWVEEVEDCYEREDVQKKTFTKWVNAQFSKFGKQHIENLFSDLQDGRRLDLDLEGLTGQKLPKEKGS TRVHALNPNVNAKALRVLQNNVNDLVNIGSTDIVDGNHKL  
 LGLIWNIIHLHWQVKNVMKNI MAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVINFTTWSWDGLALNALIHSRHPDLFDWNSVVCQSSATQRLEHAFNIARYQLGIEKLLD  
 PEDVDTTYPDKKSIILMYITSLFQVLPQQVSI EA IQEVEMLPRPPKVTKEEHLQHHQMHYSQQITVSLAQGYERTSSPKPRFKSYAYTQAAYVTTSDPTRSPFPSSQH  
 LEAPEDKSFSGSSLMESVNLDRYQTALEEVLSWLLSAEDTLQAQGEISNDVEVVKDQFHTHEGYMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLIGTGKLSSEDETEVQEQMNLN  
 SRWECLRVASMEKQSNLHRVLMDLQNKLELNDWLTKEERTRKMEEEP LGGPDLKRVQVQHKVLEDELEQEQVRVNSLTHMVVVDSESSGDHATAALEEQLVK  
 LGRDWANICRWTEEDRWVLLQDI LLKQWRLTEEQCLFSAWLESEKEDAVNKIHTTGFKDQNEMLSSQLKAVLKADLEKKKQSMGKLYSLKQDLSLTKNKSVTQKTEA  
 WLDNFARCDWNLVQKLEKSTAQISQAVTTTQPSLTQTTVMETVTTVTTREQLLVKHAQEELPPPPQKRRQITVDSEIRKRLDVIDITELHSWITRSEAVLQSPFPAI  
 FRKEGNFSDLKEKVNAIEREKAEKFRKLQDASRAQALVEQMVNEGVNADSIKQASEQLNSRWIEFCQLLSERLNWLLEYQNNIIAFYNQLQOLEQMTTAAENWLKIQ  
 PTPPSEPTAIKSQLKICKDEVNRLSGLQPPQIERLKIQSIALKEKGGQPMFLADDFVAFTHNFQKQVSDVQAREKELQTFIDTLPMPRYQETMSAIRTWVQVQSETKLS  
 IPQLSVTDYBIMEQRLGELQALQSSLEQQSGLYLSTTVKEMSKKAPSEISRKYQSEFEIEEGRWKKLSQLVEHCQKLEEQMKNLKRKIQNHIIQTLKKNMAEVDV  
 LKEEWPALGDSEILKQLKQCRLLVSDIQTIPQSLNSVNEGGQKIKNEAEPEFASRLETELKELNTQWDHMCQQVYARKEALKGGLEKTVSLQKDLSEMHEWMTQAE  
 EYLERDFEYKTPDELQKAVEEMKRAKEEAQQEAKVKLLTESVNSVIAQAPPVAQEALKELETLTNYQWLCRNLGCKCTLEEVWACWHELHLSYLEKANKWLNE  
 VEFKLTETENIPGGAIEISEVLDSELENLMRHSNPNQIRILAQTLTDGGVMDLEINEELETFNRSRRELHEEA VRROKLELQSIQSAQETEKSLHLIQESLTFIDK  
 QLAAYIADKVDAAQMPQEAQIKQSDLTSHEISLEEMKKNQKGEAAQRVLSQIDVAQKLLQDVSMMKFRFLQK PANFEQRLQESKMI LDEVKMLHLPALTEKSVQEVV  
 QSLNHCVNLYKSLSEVKSSEVMVITGRQIVQKQKQ TENPKELDERVTA LKLYHNEI GAKVTERKQKLEKCLKLSRMRKEMNVLTEWLAATDMELTKRSVAVGMP  
 NLDSEVAVGKATQKIEIKQVHLKSI TEVGEALKTVLGGKETLVEDKLSLNSNWI AVTSRAEEWLNLLEEQKHMETFQDQNVHITKWI IQADTLDESEKPKPQ  
 KEDVLRKLAELNDIRPKVDSTRDQAANLMANRGDHCRLKLEVPQISELNHRFAAISHRIKGTGKASIPLKELEQFNDSIQKLEPLEAEIQQGVNLEKEDFNKDMNED  
 NEGTVKELLQRGDNLQQRITDEKREIEIKIQKQLLQTKHNALKDLRSQRRKKALEISHQWYQYKQADDDLLCDDIEKKLASLPEPRDERKIKEIDRELOKKKKEE  
 NAVRRAEGLSEDGAAMAVEPTQIQLSKRWREIESKFAQFRRLNFAQIHTVREETMMVMTEDMPLIESYVPSYTYLTIHVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLKF  
 QEESLKNIKDLSQSSGRIDI IHSKKAALQSATPVERVKLEALSQDFQWKEVKNMXYDRQGRFDRSVEKWRFRHYDIKIFNQWLTBAEQFLRPTQIPENWEHAK  
 KYWYKLELDGIQQRQTVVRLNATGEEIIQSSKTDASILQEKLGNLNRWQEVCKQLSDRKRKLEEQKNI LSEFQRDLNEFWLWLEADNIASIPLEPGKEQQL  
 EKLEQVKLVLEELPLRQILKQDNETGGPVLVSAPI SPEEQDKLENLQTNLQWIKVSRALPEKQGEIEAQIKDLGQLEKLEDELEQLNHLHLLWLSPIRNLQLEIY  
 NQPNQEGFVDVQTEIAVQAKQPDVEEILSKGQHLKPKPATQVPRKRLLEDLSSEWKA VNRLLQELRAKQPD LAPGLTTIGAS

### Protéine dystrophine mutée générée après délétion de l'exon 51 (2486 acides aminés, 286.41 kDa)

MLWVEEVEDCYEREDVQKKTFTKWVNAQFSKFGKQHIENLFSDLQDGRRLDLDLEGLTGQKLPKEKGS TRVHALNPNVNAKALRVLQNNVNDLVNIGSTDIVDGNHKL  
 LGLIWNIIHLHWQVKNVMKNI MAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVINFTTWSWDGLALNALIHSRHPDLFDWNSVVCQSSATQRLEHAFNIARYQLGIEKLLD  
 PEDVDTTYPDKKSIILMYITSLFQVLPQQVSI EA IQEVEMLPRPPKVTKEEHLQHHQMHYSQQITVSLAQGYERTSSPKPRFKSYAYTQAAYVTTSDPTRSPFPSSQH  
 LEAPEDKSFSGSSLMESVNLDRYQTALEEVLSWLLSAEDTLQAQGEISNDVEVVKDQFHTHEGYMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLIGTGKLSSEDETEVQEQMNLN  
 SRWECLRVASMEKQSNLHRVLMDLQNKLELNDWLTKEERTRKMEEEP LGGPDLKRVQVQHKVLEDELEQEQVRVNSLTHMVVVDSESSGDHATAALEEQLVK  
 LGRDWANICRWTEEDRWVLLQDI LLKQWRLTEEQCLFSAWLESEKEDAVNKIHTTGFKDQNEMLSSQLKAVLKADLEKKKQSMGKLYSLKQDLSLTKNKSVTQKTEA  
 WLDNFARCDWNLVQKLEKSTAQISQAVTTTQPSLTQTTVMETVTTVTTREQLLVKHAQEELPPPPQKRRQITVDSEIRKRLDVIDITELHSWITRSEAVLQSPFPAI  
 FRKEGNFSDLKEKVNAIEREKAEKFRKLQDASRAQALVEQMVNEGVNADSIKQASEQLNSRWIEFCQLLSERLNWLLEYQNNIIAFYNQLQOLEQMTTAAENWLKIQ  
 PTPPSEPTAIKSQLKICKDEVNRLSGLQPPQIERLKIQSIALKEKGGQPMFLADDFVAFTHNFQKQVSDVQAREKELQTFIDTLPMPRYQETMSAIRTWVQVQSETKLS  
 IPQLSVTDYBIMEQRLGELQALQSSLEQQSGLYLSTTVKEMSKKAPSEISRKYQSEFEIEEGRWKKLSQLVEHCQKLEEQMKNLKRKIQNHIIQTLKKNMAEVDV  
 LKEEWPALGDSEILKQLKQCRLLVSDIQTIPQSLNSVNEGGQKIKNEAEPEFASRLETELKELNTQWDHMCQQVYARKEALKGGLEKTVSLQKDLSEMHEWMTQAE  
 EYLERDFEYKTPDELQKAVEEMKRAKEEAQQEAKVKLLTESVNSVIAQAPPVAQEALKELETLTNYQWLCRNLGCKCTLEEVWACWHELHLSYLEKANKWLNE  
 VEFKLTETENIPGGAIEISEVLDSELENLMRHSNPNQIRILAQTLTDGGVMDLEINEELETFNRSRRELHEEA VRROKLELQSIQSAQETEKSLHLIQESLTFIDK  
 QLAAYIADKVDAAQMPQEAQIKQSDLTSHEISLEEMKKNQKGEAAQRVLSQIDVAQKLLQDVSMMKFRFLQK PANFEQRLQESKMI LDEVKMLHLPALTEKSVQEVV  
 QSLNHCVNLYKSLSEVKSSEVMVITGRQIVQKQKQ TENPKELDERVTA LKLYHNEI GAKVTERKQKLEKCLKLSRMRKEMNVLTEWLAATDMELTKRSVAVGMP  
 NLDSEVAVGKATQKIEIKQVHLKSI TEVGEALKTVLGGKETLVEDKLSLNSNWI AVTSRAEEWLNLLEEQKHMETFQDQNVHITKWI IQADTLDESEKPKPQ  
 KEDVLRKLAELNDIRPKVDSTRDQAANLMANRGDHCRLKLEVPQISELNHRFAAISHRIKGTGKASIPLKELEQFNDSIQKLEPLEAEIQQGVNLEKEDFNKDMNED  
 NEGTVKELLQRGDNLQQRITDEKREIEIKIQKQLLQTKHNALKDLRSQRRKKALEISHQWYQYKQADDDLLCDDIEKKLASLPEPRDERKIKEIDRELOKKKKEE  
 NAVRRAEGLSEDGAAMAVEPTQIQLSKRWREIESKFAQFRRLNFAQIHTVREETMMVMTEDMPLIESYVPSYTYLTIHVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLKF  
 QEESLKNIKDLSQSSGRIDI IHSKKAALQSATPVERVKLEALSQDFQWKEVKNMXYDRQGRFDRSVEKWRFRHYDIKIFNQWLTBAEQFLRPTQIPENWEHAK  
 KYWYKLELDGIQQRQTVVRLNATGEEIIQSSKTDASILQEKLGNLNRWQEVCKQLSDRKRKLEEQKNI LSEFQRDLNEFWLWLEADNIASIPLEPGKEQQL  
 EKLEQVKLVLEELPLRQILKQDNETGGPVLVSAPI SPEEQDKLENLQTNLQWIKVSRALPEKQGEIEAQIKDLGQLEKLEDELEQLNHLHLLWLSPIRNLQLEIY  
 NQPNQEGFVDVQTEIAVQAKQPDVEEILSKGQHLKPKPATQVPRKRLLEDLSSEWKA VNRLLQELRAKQPD LAPGLTTIGAS

EEYLERDFEYKTPDELQKAVEEMKRAKEEAQQKEAKVKLLTESVNSVIAQAPPVAQEAALKKELETLTNTNYQWLCTRLNGKCKTLEEVWACWHELLSYLEKANKWLNE  
 VEPFLKTTENIPGGAEI SEVLDSLENLMRHSNDPNQIRILAQTLDGGVMDLEINELETFNRSRWRLEHEAVRRQKLEQS IQSAQETEKSLHLIQESLTFIDK  
 QLAAYIADKVDAAQMPQEAQKIQSDLTSHEISLEEMKHNQGEAAQRVLSQIDVAQKQLQDVSMKFRFLQK PANF EQRLQESKMI LDEVKMHLPALETKSVQEVEV  
 QSQNLNHCNVNLYKSLSEVKSEVEMVIKTGRQIVQKQKTENPKELDERVTALKLHYNELGAKVTERKQLEKCLKLSRMRKEMNVLTEWLAATDMELTKRSVAEGMPS  
 NLDSEVAWGKATQKIEIKQKVLHKSITVEGEALKTVLGGKETLVEDKLSLNSNVIATVSRABEAWLNLLEEQKHMETFQDQNVHITKWI IQADTLDESEKPKPQQ  
 KEDVLRKLAELNDIRPKVDSTRDQAANLMANRGDHCRLKLEVPQISELNHRFAAISHRIKTGKASIPLKELEQFNDSIQKLLLEPLAEIQQGVNLEEDFNKDMNED  
 NEGTVKELLQRGDNLQQRITDERKREIEIKIQQLLQTKHNALKDLRSQRKKALEISHQWYQYKRQADDLLKCLDDIEKKLASLPEPRDERKIKEIDRELQKKEEL  
 NAVRROAEGLSDEGAAMAVEPTQIQLSKRWREIESKFAQFRRLNFAQIHTVREETMMVMTEDMPLIEISYVPSYLTETI THVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLFK  
 QEESLKNIKDSLQSSGRIDI IHSKKTAAQASATPVERVKLQEAALSQDFQWEKVNKMYKDRQGRFDRSVEKWRFRHYDIKIFNQWLTAEQFLRKTQIPENWEHAK  
 KYWYLKELQDGIQGRQTVVTRTLNATGEEIIQSSKTDASILQEKLGSLNLRWQEVCKQLSDRKKRLEEQKNI LSEFQRDLNLFVWLWEEADNIIASIPLEPGKEQQLK  
 EKLEQVKLLVEELPLRQGLKQLNETGGPVLVSAPI SPEEQDKLENKLLQTNLQWIKVSRALPEKQGEIEAQIKDLGQLEKLELDEEQLNHLHLLWLSPIRNLQLEIY  
 NQPNQEGFPDVEQTEIAVQAKQPDVEEILSKGQHLYKEKPATQPVKRKLLEDLSSEWKAVERNLLQELRAKQPD LAPGLTTI GACNNAGFTEASPVRGTHYRCKPFKE  
 QQQSRG

### Protéine dystrophine mutée générée après délétion de l'exon 13 (3645 acides aminés, 422.37 kDa)

MLWEEVEDCYEREDVQKKTFTKWNVAQFSKFGKQHIENLFSDLQDGRRLDLDLEGLTGQKLPKEKGS TRVHALNNVNKAALRVLQNNVNDLVNIGSTDIVDGNHKL  
 LGLIWNII LHWQVKNVMKNI MAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVINFTTWSWDGLALNALI HSHR PDLFDWNSVVCQASATQRLEHAFNIARYQLGIEKLLD  
 PEDVDTTYPDKKSI LMYITSLFQVLPQQVSEIAEQEVMLPRPQKVTKEEHFQLHHQMHYSQQITVSLAQGYERTSSPKPRFKSYAYTQAAYTTSDPTSRSPFSQH  
 LEAPEDKSFSSLMESVNLDRYQTALEEVLSWLLSABDTLQAQGEISNDVEVVKDQFHTHEGYMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLITGTGKLSDEBETEVEQEMNLLN  
 SRWECLRVASMEKQSNLHRVLMDLQNKLELNDWLTKEERTKMEEEP LGGPDLLEDLKRQVQKHVLDGRWANI CRWTEDRWVLLQDILLKWQLRTEEQCLFSAW  
 SEKEDAVNKIHTTGFEKQDNEMLSLQKLAVLKADLEKQKQSMGKLYSLKQDLSLTKNKSVTQRTAEWLDNFARCWDLNLPKLEKSTAIQSAVTTTQPSLTTQTTVM  
 ETVTTVTTRQIQLVKAHQEELPPPPPQKQRQITVDSIEIRKRLVDVITELHSWITRSEAVLSQPEFAIFRKEGNFSDLEKVNAIEREKAEKFRKLQDASRSQAALVE  
 QMVNEGVNADSIKQASEQLNSRWIEFCQLLSERLNWLEYQNNIIAFYNLQQLLEQMTTAAENWLKIQPTTSPETAIKSOLKICKDEVNRLSGLQPIERLKIQSI  
 LKKEGQGPMLDADFVAFTNHFKQVFDVQAREKELQTFDPTLPPMYRQETMSAIRTWQVQSETKLSIPQLSVTDYIEMEQRLEGLQALQSSLEQSGLYLSTTV  
 KEMSKAPSEISRKYQSEFEIEIEGRWKKLSQVLEHCQKLEEQMKNLKRKI QNHITQLKKNMAEVDVFLKEEWPALGDSEIEKQKQLKQCRLLVSDIQTTPSLSNSVNE  
 GGQKIKNEAPEFASRLETELKELNTQWDHMCQQVYARKEALGGLEKTVSLQKDLSEMHWEWMTQAEIEYLERDFEYKTPDELQKAVEEMKRAKEEAQQKEAKVKLL  
 TESVNSVIAQAPPVAQEAALKKELETLTNTNYQWLCTRLNGKCKTLEEVWACWHELLSYLEKANKWLNEVEPKLKTENIPGGAEI SEVLDSLENLMRHSNDPNQIR  
 ILAQTLDGGVMDLEINELETFNRSRWRLEHEAVRRQKLEQS IQSAQETEKSLHLIQESLTFIDKQLAAYIADKVDAAQMPQEAQIQSDLTSHEISLEEMKHN  
 QGKEAAQRVLSQIDVAQKQLQDVSMKFRFLQK PANF EQRLQESKMI LDEVKMHLPALETKSVQEVEVQSQNLNHCNVNLYKSLSEVKSEVEMVIKTGRQIVQKQKTEN  
 KEDERVTALKLHYNELGAKVTERKQLEKCLKLSRMRKEMNVLTEWLAATDMELTKRSVAEGMPSNLDSEVAWGKATQKEIEKQKVLHKSITVEGEALKTVLGGKET  
 ETLVEDKLSLNSNVIATVSRABEAWLNLLEEQKHMETFQDQNVHITKWI IQADTLDESEKPKPQQKEDVLRKLAELNDIRPKVDSTRDQAANLMANRGDHCRLK  
 VEPQISELNHRFAAISHRIKTGKASIPLKELEQFNDSIQKLLLEPLAEIQQGVNLEEDFNKDMNEDNEGTVKELLQRGDNLQQRITDERKREIEIKIQQLLQTKHN  
 ALKDLRSQRKKALEISHQWYQYKRQADDLLKCLDDIEKKLASLPEPRDERKIKEIDRELQKKEELNAVRROAEGLSDEGAAMAVEPTQIQLSKRWREIESKFAQFR  
 RLNFAQIHTVREETMMVMTEDMPLIEISYVPSYLTETI THVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLFKQEEESLKNIKDSLQSSGRIDI IHSKKTAAQASATPVERVK  
 LQEAALSQDFQWEKVNKMYKDRQGRFDRSVEKWRFRHYDIKIFNQWLTAEQFLRKTQIPENWEHAKYKWLKELQDGIQGRQTVVTRTLNATGEEIIQSSKTDAS  
 ILQEKLGSLNLRWQEVCKQLSDRKKRLEEQKNI LSEFQRDLNLFVWLWEEADNIIASIPLEPGKEQQLKKELEQVKLLVEELPLRQGLKQLNETGGPVLVSAPISPEE  
 QDKLENKLLQTNLQWIKVSRALPEKQGEIEAQIKDLGQLEKLELDEEQLNHLHLLWLSPIRNLQLEIYNQPNQEGFPDVEQTEIAVQAKQPDVEEILSKGQHLYKEKP  
 ATQPVKRKLLEDLSSEWKAVERNLLQELRAKQPD LAPGLTTI GASPTQTVTLVTPQVVTKETAI SKLEMPSSMLLEVPALADFNRAWTELTDWLSDLDQV IKSQRVMDGL  
 DLEDINEMIIKQKATMQDLEQRFPQLEELITAAQNKNKTSNQEARTITDRIERIQNWQDEVEQHLQNRQQLNEMKLDSTQWLEAKEAEAEQVLGQARAKLESWKE  
 GPYTVDAIQKKIETFKQLAKDLRQWQTNVDVANDLALKLLRDYSADTRKVMHITENINASWRSIHKRVSEREAALERTHRLQLQFPDLDEKFLAWLTAETTANVLQ  
 QDATTRERLLEDKSGVKELMKQWDLQGEIEAHTDVYHNLNLDENSQVILRSLEGGSDAVLLQRRLDNMNFKWSERLKKSLNIRSHLEASDQWRKLLHLSLQELLVWLQ  
 LKDDLESRQAPIGGDFPAVQKQNDVHRAFRKRELKTEPEVIMSTLETVRIFLTEQPLEGLEKLYQEPRELPEERAQNVTRLLRKAQEEVNTWEKLNHLSADWQRKI  
 DETLERLQELQEAATDELDDLKRAQEAIVKGSWQVPGDILLIDSLQDHLKVKALRGEIAPLKENVSHVNDLARQLTTLGIQLSPYNLSTLEDLNRWKLQVAVEDRVQ  
 QLEHAHRDFGPASQHFLLSTVSQGPWERAISPKNVPYIINHETQTTCDWHPKMTLEYQSLADLNMFVFSAYRTAMKLRRLQKALCLDLSL SAACDALDQHNKQNDQPM  
 PMDILQIINCLTTIYDRLEQEHNNLVNPLCVDMLNLLNVYDTRGTGRIRVLSFKTGIISLCKAHLEDKRYRFLFKQVASSGTFCDQRRRLGLLHDSIQIPRQLGE  
 VASFGGNSIIEPSVRSQFQANNKPEIEAALFLDWMRLPEQSMVWLPVLRHVAEAETAHKQAKCNICKECPIIGFRYRSLKHFNYDIQCSCFFSGRVAKGHKMHYPMVEY  
 EYCTPTTSGEDVDRFAKVLNKRFTKRYFAKHPRMGYLPVQTVLEGNMTEPTVTLNFWPVD SAPASSPQLSHDDTHSRIEHYASRLAEMENSNGS YLNDISPNES  
 IDDEHLLIHYQCSQNLQDPSLSPQSPAPQILISLESEERGELERILADLEENRNLAQYDRLLKQHEHKGSLPSPPEMPTSPQSPRAELIAEAKLLRQHKGR  
 LEARMQILEDHNKQLESQHLRLRQLLEQPAEAKVNGTTVSSPSTSLQRSDSSQPMLLRVVGSTSDSMGEEEDLSPPDQDSTGLLEEVMEQLNNSFPSSRGRNTPGK  
 PMREDT

### Protéine dystrophine mutée générée après délétion des exons 8 à 19 (3108 acides aminés, 360.25 kDa)

MLWEEVEDCYEREDVQKKTFTKWNVAQFSKFGKQHIENLFSDLQDGRRLDLDLEGLTGQKLPKEKGS TRVHALNNVNKAALRVLQNNVNDLVNIGSTDIVDGNHKL  
 LGLIWNII LHWQVKNVMKNI MAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVINFTTWSWDGLALNALI HSHR PDLFDWNSVVCQASATQRLEHAFNIARYQLGIEKLLD  
 PEDGVNADSIKQASEQLNSRWIEFCQLLSERLNWLEYQNNIIAFYNLQQLLEQMTTAAENWLKIQPTTSPETAIKSOLKICKDEVNRLSGLQPIERLKIQSI  
 ALEKQGGPMLDADFVAFTNHFKQVFDVQAREKELQTFDPTLPPMYRQETMSAIRTWQVQSETKLSIPQLSVTDYIEMEQRLEGLQALQSSLEQSGLYLSTTVK  
 MSKAPSEISRKYQSEFEIEIEGRWKKLSQVLEHCQKLEEQMKNLKRKI QNHITQLKKNMAEVDVFLKEEWPALGDSEIEKQKQLKQCRLLVSDIQTTPSLSNSVNE  
 QKIKNEAPEFASRLETELKELNTQWDHMCQQVYARKEALGGLEKTVSLQKDLSEMHWEWMTQAEIEYLERDFEYKTPDELQKAVEEMKRAKEEAQQKEAKVKLLTE  
 SVNSVIAQAPPVAQEAALKKELETLTNTNYQWLCTRLNGKCKTLEEVWACWHELLSYLEKANKWLNEVEPKLKTENIPGGAEI SEVLDSLENLMRHSNDPNQIRIL  
 AQTLDGGVMDLEINELETFNRSRWRLEHEAVRRQKLEQS IQSAQETEKSLHLIQESLTFIDKQLAAYIADKVDAAQMPQEAQIQSDLTSHEISLEEMKHNQ  
 KEAAQRVLSQIDVAQKQLQDVSMKFRFLQK PANF EQRLQESKMI LDEVKMHLPALETKSVQEVEVQSQNLNHCNVNLYKSLSEVKSEVEMVIKTGRQIVQKQKTEN  
 LDERVTALKLHYNELGAKVTERKQLEKCLKLSRMRKEMNVLTEWLAATDMELTKRSVAEGMPSNLDSEVAWGKATQKEIEKQKVLHKSITVEGEALKTVLGGKET  
 LVEDKLSLNSNVIATVSRABEAWLNLLEEQKHMETFQDQNVHITKWI IQADTLDESEKPKPQQKEDVLRKLAELNDIRPKVDSTRDQAANLMANRGDHCRLK  
 VEPQISELNHRFAAISHRIKTGKASIPLKELEQFNDSIQKLLLEPLAEIQQGVNLEEDFNKDMNEDNEGTVKELLQRGDNLQQRITDERKREIEIKIQQLLQTKHNAL  
 KDLRSQRKKALEISHQWYQYKRQADDLLKCLDDIEKKLASLPEPRDERKIKEIDRELQKKEELNAVRROAEGLSDEGAAMAVEPTQIQLSKRWREIESKFAQFR  
 LNFAQIHTVREETMMVMTEDMPLIEISYVPSYLTETI THVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLFKQEEESLKNIKDSLQSSGRIDI IHSKKTAAQASATPVERVK  
 EAALSQDFQWEKVNKMYKDRQGRFDRSVEKWRFRHYDIKIFNQWLTAEQFLRKTQIPENWEHAKYKWLKELQDGIQGRQTVVTRTLNATGEEIIQSSKTDASILQ  
 EKLGSLNLRWQEVCKQLSDRKKRLEEQKNI LSEFQRDLNLFVWLWEEADNIIASIPLEPGKEQQLKKELEQVKLLVEELPLRQGLKQLNETGGPVLVSAPISPEE  
 QDKLENKLLQTNLQWIKVSRALPEKQGEIEAQIKDLGQLEKLELDEEQLNHLHLLWLSPIRNLQLEIYNQPNQEGFPDVEQTEIAVQAKQPDVEEILSKGQHLYKEKP  
 ATQPVKRKLLEDLSSEWKAVERNLLQELRAKQPD LAPGLTTI GASPTQTVTLVTPQVVTKETAI SKLEMPSSMLLEVPALADFNRAWTELTDWLSDLDQV IKSQRVMDGL  
 DLEDINEMIIKQKATMQDLEQRFPQLEELITAAQNKNKTSNQEARTITDRIERIQNWQDEVEQHLQNRQQLNEMKLDSTQWLEAKEAEAEQVLGQARAKLESWKE  
 YTVDAIQKKIETFKQLAKDLRQWQTNVDVANDLALKLLRDYSADTRKVMHITENINASWRSIHKRVSEREAALERTHRLQLQFPDLDEKFLAWLTAETTANVLQ  
 QDATTRERLLEDKSGVKELMKQWDLQGEIEAHTDVYHNLNLDENSQVILRSLEGGSDAVLLQRRLDNMNFKWSERLKKSLNIRSHLEASDQWRKLLHLSLQELLVWLQ  
 LKDDLESRQAPIGGDFPAVQKQNDVHRAFRKRELKTEPEVIMSTLETVRIFLTEQPLEGLEKLYQEPRELPEERAQNVTRLLRKAQEEVNTWEKLNHLSADWQRKI  
 DETLERLQELQEAATDELDDLKRAQEAIVKGSWQVPGDILLIDSLQDHLKVKALRGEIAPLKENVSHVNDLARQLTTLGIQLSPYNLSTLEDLNRWKLQVAVEDRVQ  
 QLEHAHRDFGPASQHFLLSTVSQGPWERAISPKNVPYIINHETQTTCDWHPKMTLEYQSLADLNMFVFSAYRTAMKLRRLQKALCLDLSL SAACDALDQHNKQNDQPM  
 PMDILQIINCLTTIYDRLEQEHNNLVNPLCVDMLNLLNVYDTRGTGRIRVLSFKTGIISLCKAHLEDKRYRFLFKQVASSGTFCDQRRRLGLLHDSIQIPRQLGE  
 VASFGGNSIIEPSVRSQFQANNKPEIEAALFLDWMRLPEQSMVWLPVLRHVAEAETAHKQAKCNICKECPIIGFRYRSLKHFNYDIQCSCFFSGRVAKGHKMHYPMVEY  
 EYCTPTTSGEDVDRFAKVLNKRFTKRYFAKHPRMGYLPVQTVLEGNMTEPTVTLNFWPVD SAPASSPQLSHDDTHSRIEHYASRLAEMENSNGS YLNDISPNES  
 IDDEHLLIHYQCSQNLQDPSLSPQSPAPQILISLESEERGELERILADLEENRNLAQYDRLLKQHEHKGSLPSPPEMPTSPQSPRAELIAEAKLLRQHKGR  
 LEARMQILEDHNKQLESQHLRLRQLLEQPAEAKVNGTTVSSPSTSLQRSDSSQPMLLRVVGSTSDSMGEEEDLSPPDQDSTGLLEEVMEQLNNSFPSSRGRNTPGK  
 PMREDT

**Protéine dystrophine mutée générée après délétion de l'exon 45 (2162 acides aminés, 251.72 kDa)**

MLWWEVEEDCYEREDVQKKTFTKWVNAQFSKFGKQH IENLFSDLQDGRRLDLDLEGLTGQKLPKEKGS TRVHALNNVNKA LRVLQNNVNDLVNI GSTD IVDGNHKL T  
LGLIWN I I LHWQVKNVMKNI MAGLQQ TNSSEKI LLSWRVQSTRNY PQVNVINFTT SWS DGLALNAL I HSHR PDLFDWNSVVCQ QSATQRLEHAFN IARYQLGIEKLLD  
PEDVDTTYPDKKSI LMY I TSLFQVLPQQVSI EA I QEVEMLP RPPKVKTEEHFQLHHQMHSYQQ I TVSLAQGYERTSSPKPRFKSYAYTQAAYVTTSDPTRSFPFSQH  
LEAPEDKSFSSLMESVNLDRYQTAL E EVLSWLLS AEDTLQAQGE I SNDVEVVKDQFHTHEGYMMDLTAHQGRVGN I LQLGSKL I GTGKLS EDEBETEVEQEMNLLN  
SRWECLRVASMEKQSNLHRV LMDLQNKQLK ELNDWLT KTEERTKMEEEPLGPDLEDLKRQVQQHKV LQEDLEQE QVRVNSLTHMVVVVDES SGDHATAALEEQ LKV  
LGRDWANI CRWTE DRWVLLQDI I L LKWKQRLTEEQCLFSAW LSEKEDAVNK IHTTGFKQDNEMLSLQK LAVL KADLEK KQSMGKLYSLKQD LLS TLKNS SVTQKTEA  
WLDNFARCDWNLVQKLEKSTAQ I SQA VTTTQP SLTQT T V M E T V T T V T T R E Q I L V K H A Q E E L P P P P Q K K R Q I T V D S E I R K R L D V D I T E L H S W I T R S E A V L Q S P E F A I  
FRKEGNFSDLKEKVN A I EREKAEKFRKLQDASRSQAALVEQM VNEGVNADSIKQASEQLNSRWI EFCQLL SERLNWLE YQNN I IAFYNQLQQLEQMTT TAENWLK I Q  
PTTSP EPTAIKSQLKI CKDEVNRLSGLQPQ IERLKI QS IALKEKQGQPMFLDADFVAFTNHFKQVFS DVQAREKELQ T I FDTLP P M R Y Q E T M S A I R T W V Q Q S E T K L S  
I P Q L S V T D Y E I M E Q R L G E L Q A L Q S S L Q E Q Q S G L Y Y L S T T V K E M S K K A P S E I S R K Y Q S E F E E I E G R W K K L S S Q L V E H C Q K L E E Q M N K L R K I Q N H I Q T L K K W M A E V D V F  
LKEEWPALGDSE I L K K Q L K Q C R L L V S D I Q T I Q P S L N S V N E G G Q K I K N E A E P E F A S R L E T E L K E L N T Q W D H M C Q Q V Y A R K E A L K G G L E K T V S L Q K D L S E M H E W M T Q A E  
E E Y L E R D F E Y K T P D E L Q K A V E E M K R A K E E A Q Q K E A K V K L L T E S V N S V I A Q A P P V A Q E A L K K E L E T L T T N Y Q W L C T R L N G K C K T L E E V W A C W H E L L S Y L E K A N K W L N E  
V E F K L K T T E N I P G G A E I S E V L D S L E N L M R H S E D N P N Q I R I L A Q T L T D G G V M D E L I N E E L E T F N S R W R E L H E E A V R R Q K L L E Q S I Q S A Q E T E K S L H L I Q E S L T F I D K  
Q L A A Y I A D K V D A A Q M P Q E A Q K I Q S D L T S H E I S L E M K K H N Q G K E A A Q R V L S Q I D V A Q K K L Q D V S M K F R L F Q K P A N F E Q R L Q E S K M I L D E V K M H L P A L E T K S V E Q E V V  
Q S Q L N H C V N L Y K S L S E V K S E V E M V I K T G R Q I V Q K K Q T E N P K E L D E R V T A L K L H Y N E L G A K V T E R K Q Q L E K C L K L S R K M R K E M N V L T E W L A A T D M E L T K R S A V E G M P S  
N L D S E V A W G K A T Q K E I E K Q K V H L K S I T E V G E A L K T V L G K K E T L V E D K L S L L S N S N I A V T S R A E E W L N L L L E Y Q K H M E T F D Q N V D H I T K W I I Q A D T L L D E S E K K P Q Q  
K E D V L K R L K A E L N D I R P K V D S T R D Q A A N L M A N R G D H C R K L V E P Q I S E L N H R F A A I S H R I K T G K A S I P L K E L E Q F N S D I Q K L L E P L E A E I Q Q G V N L K E E D F N K D M N E D  
N E G T V K E L L Q R G D N L Q R I T D E R K R E E I K I K Q Q L L Q T K H N A L K D L R S Q R R K A L E I S H Q W Y Q Y K R Q A D D L L K C L D D I E K K L A S L P E P R D E R K I K E I D R E L Q K K K E E L  
N A V R R Q A E G L S E D G A A M A V E P T Q I Q L S K R W R E I E S K F A Q F R R L N F A I H T V R E E T M M V M T E D M P L E I S Y V P S T Y L T E I T H V S Q A L L E V E Q L L N A P D L C A K D F E D L F K  
Q E E S L K N I K D S L Q Q S S G R I D I I H S K K T A A L Q S A T P V E R V K L Q E A L S Q L D F Q W E K V N K M Y K D R Q G R F D R S V E K W R R F H Y D I K I F N Q W L T E A E Q F L R K T Q I P E N W E H A K  
Y K W Y L K A R R T K E Y L V R I S K R F K

**Protéine dystrophine mutée générée après délétion des exons 45 à 50 (2154 acides aminés, 250.70 kDa)**

MLWWEVEEDCYEREDVQKKTFTKWVNAQFSKFGKQH IENLFSDLQDGRRLDLDLEGLTGQKLPKEKGS TRVHALNNVNKA LRVLQNNVNDLVNI GSTD IVDGNHKL T  
LGLIWN I I LHWQVKNVMKNI MAGLQQ TNSSEKI LLSWRVQSTRNY PQVNVINFTT SWS DGLALNAL I HSHR PDLFDWNSVVCQ QSATQRLEHAFN IARYQLGIEKLLD  
PEDVDTTYPDKKSI LMY I TSLFQVLPQQVSI EA I QEVEMLP RPPKVKTEEHFQLHHQMHSYQQ I TVSLAQGYERTSSPKPRFKSYAYTQAAYVTTSDPTRSFPFSQH  
LEAPEDKSFSSLMESVNLDRYQTAL E EVLSWLLS AEDTLQAQGE I SNDVEVVKDQFHTHEGYMMDLTAHQGRVGN I LQLGSKL I GTGKLS EDEBETEVEQEMNLLN  
SRWECLRVASMEKQSNLHRV LMDLQNKQLK ELNDWLT KTEERTKMEEEPLGPDLEDLKRQVQQHKV LQEDLEQE QVRVNSLTHMVVVVDES SGDHATAALEEQ LKV  
LGRDWANI CRWTE DRWVLLQDI I L LKWKQRLTEEQCLFSAW LSEKEDAVNK IHTTGFKQDNEMLSLQK LAVL KADLEK KQSMGKLYSLKQD LLS TLKNS SVTQKTEA  
WLDNFARCDWNLVQKLEKSTAQ I SQA VTTTQP SLTQT T V M E T V T T V T T R E Q I L V K H A Q E E L P P P P Q K K R Q I T V D S E I R K R L D V D I T E L H S W I T R S E A V L Q S P E F A I  
FRKEGNFSDLKEKVN A I EREKAEKFRKLQDASRSQAALVEQM VNEGVNADSIKQASEQLNSRWI EFCQLL SERLNWLE YQNN I IAFYNQLQQLEQMTT TAENWLK I Q  
PTTSP EPTAIKSQLKI CKDEVNRLSGLQPQ IERLKI QS IALKEKQGQPMFLDADFVAFTNHFKQVFS DVQAREKELQ T I FDTLP P M R Y Q E T M S A I R T W V Q Q S E T K L S  
I P Q L S V T D Y E I M E Q R L G E L Q A L Q S S L Q E Q Q S G L Y Y L S T T V K E M S K K A P S E I S R K Y Q S E F E E I E G R W K K L S S Q L V E H C Q K L E E Q M N K L R K I Q N H I Q T L K K W M A E V D V F  
LKEEWPALGDSE I L K K Q L K Q C R L L V S D I Q T I Q P S L N S V N E G G Q K I K N E A E P E F A S R L E T E L K E L N T Q W D H M C Q Q V Y A R K E A L K G G L E K T V S L Q K D L S E M H E W M T Q A E  
E E Y L E R D F E Y K T P D E L Q K A V E E M K R A K E E A Q Q K E A K V K L L T E S V N S V I A Q A P P V A Q E A L K K E L E T L T T N Y Q W L C T R L N G K C K T L E E V W A C W H E L L S Y L E K A N K W L N E  
V E F K L K T T E N I P G G A E I S E V L D S L E N L M R H S E D N P N Q I R I L A Q T L T D G G V M D E L I N E E L E T F N S R W R E L H E E A V R R Q K L L E Q S I Q S A Q E T E K S L H L I Q E S L T F I D K  
Q L A A Y I A D K V D A A Q M P Q E A Q K I Q S D L T S H E I S L E M K K H N Q G K E A A Q R V L S Q I D V A Q K K L Q D V S M K F R L F Q K P A N F E Q R L Q E S K M I L D E V K M H L P A L E T K S V E Q E V V  
Q S Q L N H C V N L Y K S L S E V K S E V E M V I K T G R Q I V Q K K Q T E N P K E L D E R V T A L K L H Y N E L G A K V T E R K Q Q L E K C L K L S R K M R K E M N V L T E W L A A T D M E L T K R S A V E G M P S  
N L D S E V A W G K A T Q K E I E K Q K V H L K S I T E V G E A L K T V L G K K E T L V E D K L S L L S N S N I A V T S R A E E W L N L L L E Y Q K H M E T F D Q N V D H I T K W I I Q A D T L L D E S E K K P Q Q  
K E D V L K R L K A E L N D I R P K V D S T R D Q A A N L M A N R G D H C R K L V E P Q I S E L N H R F A A I S H R I K T G K A S I P L K E L E Q F N S D I Q K L L E P L E A E I Q Q G V N L K E E D F N K D M N E D  
N E G T V K E L L Q R G D N L Q R I T D E R K R E E I K I K Q Q L L Q T K H N A L K D L R S Q R R K A L E I S H Q W Y Q Y K R Q A D D L L K C L D D I E K K L A S L P E P R D E R K I K E I D R E L Q K K K E E L  
N A V R R Q A E G L S E D G A A M A V E P T Q I Q L S K R W R E I E S K F A Q F R R L N F A I H T V R E E T M M V M T E D M P L E I S Y V P S T Y L T E I T H V S Q A L L E V E Q L L N A P D L C A K D F E D L F K  
Q E E S L K N I K D S L Q Q S S G R I D I I H S K K T A A L Q S A T P V E R V K L Q E A L S Q L D F Q W E K V N K M Y K D R Q G R F D R S V E K W R R F H Y D I K I F N Q W L T E A E Q F L R K T Q I P E N W E H A K  
Y K W Y L K L L L R L L L W

**Protéine dystrophine mutée générée après délétion des exons 3 à 12 (3222 acides aminés, 373.63 kDa)**

MLWWEVEEDCYEREDVQKKTFTKWVNAQFSKVLQEDLEQE QVRVNSLTHMVVVVDES SGDHATAALEEQ LKVLGDRWANI CRWTE DRWVLLQDI I L L K W Q R L T E E Q C L  
FSAW LSEKEDAVNK IHTTGFKQDNEMLSLQK LAVL KADLEK KQSMGKLYSLKQD LLS TLKNS SVTQKTEAWLDNFARCDWNLVQKLEKSTAQ I SQA VTTTQP SLT  
QT T V M E T V T T V T T R E Q I L V K H A Q E E L P P P P Q K K R Q I T V D S E I R K R L D V D I T E L H S W I T R S E A V L Q S P E F A I F R K E G N F S D L K E K V N A I E R E K A E K F R K L Q D A S R A  
Q A L V E Q M V N E G V N A D S I K Q A S E Q L N S R W I E F C Q L L S E R L N W L E Y Q N N I I A F Y N Q L Q Q L E Q M T T A E N W L K I Q P T T P S P E T A I K S Q L K I C K D E V N R L S G L Q P Q I E R L K  
I Q S I A L K E K Q G Q P M F L D A D F V A F T N H F K Q V F S D V Q A R E K E L Q T I F D T L P P M R Y Q E T M S A I R T W V Q Q S E T K L S I P Q L S V T D Y E I M E Q R L G E L Q A L Q S S L Q E Q Q S G L Y Y  
L S T T V K E M S K K A P S E I S R K Y Q S E F E E I E G R W K K L S S Q L V E H C Q K L E E Q M N K L R K I Q N H I Q T L K K W M A E V D V F L K E E W P A L G D S E I L K K Q L K Q C R L L V S D I Q T I Q P S L  
N S V N E G G Q K I K N E A E P E F A S R L E T E L K E L N T Q W D H M C Q Q V Y A R K E A L K G G L E K T V S L Q K D L S E M H E W M T Q A E E E Y L E R D F E Y K T P D E L Q K A V E E M K R A K E A  
K V K L L T E S V N S V I A Q A P P V A Q E A L K K E L E T L T T N Y Q W L C T R L N G K C K T L E E V W A C W H E L L S Y L E K A N K W L N E V E F K L K T T E N I P G G A E E I S E V L D S L E N L M R H S E D N  
P N Q I R I L A Q T L T D G G V M D E L I N E E L E T F N S R W R E L H E E A V R R Q K L L E Q S I Q S A Q E T E K S L H L I Q E S L T F I D K Q L A A Y I A D K V D A A Q M P Q E A Q K I Q S D L T S H E I S L E E  
M K K H N Q G K E A A Q R V L S Q I D V A Q K K L Q D V S M K F R L F Q K P A N F E Q R L Q E S K M I L D E V K M H L P A L E T K S V E Q E V V Q S Q L N H C V N L Y K S L S E V K S E V E M V I K T G R Q I V Q K K  
Q T E N P K E L D E R V T A L K L H Y N E L G A K V T E R K Q Q L E K C L K L S R K M R K E M N V L T E W L A A T D M E L T K R S A V E G M P S N L D S E V A W G K A T Q K E I E K Q K V H L K S I T E V G E A L K T  
V L G K K E T L V E D K L S L L S N S N I A V T S R A E E W L N L L L E Y Q K H M E T F D Q N V D H I T K W I I Q A D T L L D E S E K K P Q Q K E D V L K R L K A E L N D I R P K V D S T R D Q A A N L M A N R G D  
H C R K L V E P Q I S E L N H R F A A I S H R I K T G K A S I P L K E L E Q F N S D I Q K L L E P L E A E I Q Q G V N L K E E D F N K D M N E D N E G T V K E L L Q R G D N L Q R I T D E R K R E E I K I K Q Q L L  
Q T K H N A L K D L R S Q R R K A L E I S H Q W Y Q Y K R Q A D D L L K C L D D I E K K L A S L P E P R D E R K I K E I D R E L Q K K K E E L N A V R R Q A E G L S E D G A A M A V E P T Q I Q L S K R W R E I E S  
K F A Q F R R L N F A I H T V R E E T M M V M T E D M P L E I S Y V P S T Y L T E I T H V S Q A L L E V E Q L L N A P D L C A K D F E D L F K Q E E S L K N I K D S L Q Q S S G R I D I I H S K K T A A L Q S A T P  
V E R V K L Q E A L S Q L D F Q W E K V N K M Y K D R Q G R F D R S V E K W R R F H Y D I K I F N Q W L T E A E Q F L R K T Q I P E N W E H A K Y K W Y L K E L Q D G I G Q R Q T V V R T L N A T G E E I I Q S S K  
T D A S I L Q E K L G S L N L R W Q E V C K Q L S D R K R L E E Q K N I L S E F Q R D L N E F V L W L E A D N I A S I P L E P G K E Q Q L K E K L E Q V K L V E E L P L R Q G I L K Q L N E T G P V L V S A P  
I S P E E Q D K L E N K L Q T N L Q W I K V S R A L P E K Q G E I E A Q I K D L G Q L E K K L E D L E E Q L N H L L W L S P I R N Q L E I Y N Q P N Q E G P F D V Q E T E I A V Q A K Q P D V E E I I S K G Q H L  
Y K E K P A T Q P V K R K L E D L S S E W K A V N R L L Q E L R A K Q P D L A P L G T T I G A S P T Q T V T L V T Q P V T K E T A I S K L E M P S S L M L E V P A L A D F N R A W T E L T D W L S L L D Q V I K S Q  
R V M V G D L E D I N E M I I K Q K A T M Q D L E Q R R P Q L E E L I T A A Q N L K N T S N Q E A R T I I T D R I E R I Q N Q W D E V Q E H L Q N R R Q L N E M L K D S T Q W L E A K E A E Q V L G Q A R A K L  
E S W K E G P Y T V D A I Q K K I T E T K Q L A K D L R Q W T N V D V A N D L A L K L R D Y S A D D T R K V H M I T E N I N A S W R S I H K R V S E R A A L E E T H R L L Q Q F P L D L E K F L A W L T E A E T  
T A N V L Q D A T R K E R L L E D S K G V E L M K Q W D L Q G E I E A H T D V Y H N L D E N S Q K I L R S L E S G D L A V L L Q R R L D N M N F K W S E L R K K S L N R S H L E A S S D Q W R K L H L S L Q E L  
L V W L Q L K D D E L S R Q A P I G D F P A V Q K Q N D V H R A F K R E L K T E P I M S T L E T V R I F L T E Q P L E G L E K L Y Q E P R E L P P E R A Q N V T R L R K Q A E V N T E W E K L N L H S A D  
W Q R K I D E T L E R L Q E A T D E L D L K R Q A E V I K G S W P V G D L L I D S L Q D H L E K V K A L R G E T A P L K E N V S H V N D L A R Q L T T L G I Q L S P Y N L S T L E D L N T R W K L L Q V A D  
G P A S V E Y C T P H R F L S T S V Q G P W E R A I S P N K V P Y I N H E T Q T C W D H P K M T E Q S L A D L N N V R F S A Y R T A M K L R R L Q K L C L D L L S A A C D A L D Q H N L  
K Q N D Q P M D I L Q I I N C L T T I Y D R L E Q E H N N L V N V P L C V D M C L N W L L N V Y D T G R T G R I R V L S F K T G I I S L C K A H L E D K Y R L F P K Q V A S S T G F C D Q R R L G L L L H D S I Q I P  
R Q L G E V A S F G G S N I E P S V R S C F Q F A N N K P E I E A A L F L D W M R L E P Q S M V W L P L H R V A A E T A K H Q A K C N I C K E C P I I G F R Y R S L K H F N Y D I C Q S C F F S G R V A K G H K M  
H Y P M V E Y T P H R F L S T S V Q G P W E R A I S P N K V P Y I N H E T Q T C W D H P K M T E Q S L A D L N N V R F S A Y R T A M K L R R L Q K L C L D L L S A A C D A L D Q H N L  
I S P N E S I D D E H L L I Q H Y C Q S L N Q D S P L S Q P R S P A Q I L I S L E S E E R G E L E R I L A D L E E N R N L Q A E Y D R L K Q Q H E H K G L S P L S P P E M M P T S P Q S P R D A E L I A E A K L L R  
Q H K G R L E A R M Q I L E D H N K Q F L E S Q L H R L R Q L L E Q P Q A E A K V N G T T V S S P S T L E Q R S D S S Q P M L L R V V G S Q T S D S M G E D L L S P P Q D T S T G L E E V M E Q L N N S F P S R R G R  
N T P G K P M R E D T M

**Protéine dystrophine mutée générée après délétion des exons 3 à 6 (66 acides aminés, 7.91 kDa)**

MLWWEVEDCYEREDVQKKTFTKWVNAQFSKFGKQHIENLFSDLQDGRRLDLDLEGLTGQKLPKEKGSSTRVHALNNVNKAALRVLQNNVNDLVNIGSTDIVDGNHKLTLGLIWNIIHLHWQARPF

**Protéine dystrophine mutée générée après délétion des exons 48 à 51 (3475 acides aminés, 402.99 kDa)**

MLWWEVEDCYEREDVQKKTFTKWVNAQFSKFGKQHIENLFSDLQDGRRLDLDLEGLTGQKLPKEKGSSTRVHALNNVNKAALRVLQNNVNDLVNIGSTDIVDGNHKLTLGLIWNIIHLHWQVKNVMKNI MAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVNFTTSSWSDGLALNALIHSRHPDLFDWNSVVCQSSATQRLEHAFN IARYQLGIEKLLD PEDVDVTTYDPDKKSILMYITSLFQVLPQQVSI EAIQEVEMLPRPPKVTKEEHFQLHHQMHSYQQITVSLAQGYERTSSPKPRFKSYAYTQAAVYVTS DPTSRSPFPSSQH LEAPEDKSFSGSSLMSEVNLD RYQTALEEVLSWLLSAEDTLQAQGEISNDVEVVKDQFHTHEGYMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLITGTGKLSDEEETEVEQEMNLLN SRWELCRVASMEEKQSNLHRVLMDLQNKQKLELNDWLTKEERTRKMEEEPLGPDLEDLKRQVQHKVLEQDLEQEQVVRVNSLTHMVMVVDSESSGDHATAALEEQKLVK LGDRWANI CRWTE DRWVLLQDI LLKQRLTEEQCLFSAWLSEKEDAVNKIHTTGFKDQNEMLSSQLKLAVLKADLEKKKQSMGKLYSLKQDLSLTKNKSVTQKTEA WLDNFARCDWNLVQKLEKSTAQISQAVTTTQPSTLTQTTVMETVTVTTRTREQILVKHAQEELEPPPPQKRRQITVDSEIRKRLDVIDITELHSWITRSEAVLQSPFAI FRKEGNFSDLKEKVNAIERERKAEKFRKLDASRSQAALVEQMVNNEGYNADSIKQASEQLNSRWIEFCQLLSERLNLWLEYQNNIIAFYNQLQQLMPTTAAENWLKIQ PPTPSEPTAIKSQLKICKDEVNRLSGLQPQIERLKIQSIALKEKGQGPMLFADFAVTFNHFKQVSDVQAREKELQTFIDTLPMPRYQETMSAIRTWVQOSETKLS IPQLSVTDYEIMEQRLGELQALQSSLEQQSGLYLLSTTVKEMSKKAPSEISRKYQSEFEIEIEGRWKKLSQLVEHCQKLEEQMKNLKRKIQNHIIQTLKKWMAEVDVFLKEEWPALGDSEILKKQLKQCRLLVSDIQTIPQSLNSVNEGQQIKNEAEPFASRLAETELKELNTQWDHMCQQVYARKEALKGGLEKTVSLQKDLSEMHEWMTQAE EYLERDFEYKTPDELQKAVEEMKRAKEEAQQEAKVKLLTESVNSVIAQAPPVAQEALKELETLTNYQWLCRNLGCKTLEEVWACWHELLSYLEKANKWLNVEFKLKT TENIPGGAEEISEVLDLSENLMRHS EDNPNQIRILAQTLDGGVMDLELINEELETFNRSRRELHEEAVRRQKLEEQS IQSAQETEKSLHLIQESLTFIDK QLAAYIADKVDAAQMPQEAQKIQSDLTSHEISLEEMKKNQKGEAAQVLSQIDVAQKLDQVSMKFRFLQK PANFEQRLEQESKMI LDEVKMLPALETKSVEQEVV QSQLNHCVNLYKSLSEVKSEVMV IKTGRQIVQKKQ TENPKELDERV TALKLHYNELGAKVT ERKQLEKCLKLSRKRMEEMNVLTEWLAATDMELTKRSAVEGMP S NLDSEVAWGKATQKEIEKQVHLKSI TEVGEALKTVLGKKE TLVEDKLSLLNSNWI AVTSRAEELWNL LLEYQKHMETFQDQVNDHITKWI IQADTLDESEKPKPQQ KEDVLRKLAELNDIRPKVDSTRDQAANLMANRGDHCRKLVPEQISELNRHFAAISHRIKTKGKASIPLKELEQFNSDIQKLEPLEAEIQQGVNLEKEDFNKDMNED NEGTVKELLQRGDNLQQRITDERKREIEIKIQQLLQTKHNALKDLRSQRKKALEISHQWYQYKQADDLKCLDDIEKKLASLEPEPRDERKIKEIDRELQKKKEEL NAVRRQAEGLEDGAMAVEPTQIQLSKRWREIESKFAQFRRLNFAQIHTVREETMMVMTEDMPLIEISYVPSYTLTEITHVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLFEK QESLKNIKDSLQSSGRIDI IHSKTAALQSA TPVERVKLQEAALSQDFQWEKVNMYKDRQGRFDRSVEKWRRFHYDIKIFNQWLTAEQFLRKTQIPENWEHAK YKWLKETEIAVQAQPDVEEILSKGQHLYEKPAEQVKKRLEDLSSEWAVNRLQELRAKQPD LAPGLTTI GASPTQTVTLTPQVVFVETAI SKLEMPSSLML EVPALADFNRAWTELDTWLSLLDQVIKSRVMVGDLEDINEMI KQKATMDQLEQRRPQLEELITAAQNLKNKTSNQEARTITDRIERIQNWDEVQEHLQNRQQ LNEMLKDSTQWLEAKEEAQVQLGQARAKLESWKEGPTVDAIQKII TETKQLAKDLRQWQTNVNDVANDLALKLLRDSADTRKWHMII TENINASWRSIHKRVSERE AALEETHRLLQQFPDLLEKFLAWL TEAETTANVLDQATRERLEEDSKGVKELMKQWDLQGEIEAHTDVYHNL DENSQKILRSLEGGSDAVLLQRR LDNMNFKWSELRRKSLNIRSHLEASSDQWKRLLHLSQELLVWLQKLDDEL SRQAPIGGDFPAVQKQNDVHRAFKRELKTKEPVIMSTLETVRIFLTEQPLEGLEKLYQEPREL PPEERLQNRKQAEVNTWEKLNLSADWQRKIDETLERLQELQEATDEL DLKLRQAEV IKGSWQVPGDLDLDSLQDHLBKVKALRGEIAPLKENVSHVNDLARQ L T T L G I Q L S P Y N L S T L E D L N T R W K L L Q V A V E D R V R Q L H E A H R D F G P A S Q H F L S T S V Q G P W E R A I S P N K V P Y I N H E T Q T C W D H P K M T E L Y Q S L A D L N M K L R R I Q K A L C L D L S L S A A C D A L D Q H N L K Q N D Q P M D I L Q I N C L T T I Y D R L E Q E H N N L V N V P L C V D M C L N W L N V Y D T G R T G R I R V L S F K T G I I S C K A H L E D K Y R Y L F K Q V A S S T G F C D Q R R L G L L H D S I Q I P R Q L G E V A S F G G S N I E P S V R S C F Q F A N N K P E I E A A L F D W M R L E P Q S M V W P L V L H R V A A A E T A K H Q A C N I C K E C P I I G F R Y S L K H F N Y D I C Q S C F F S G R V A K G H K M H Y P M V E Y C T P T T S G E D V R D F A K V L N K F R T K R Y F A K H P R M G Y L P V Q T V L E G D N M E T P V T L I N F W P V D S A P A S S P Q L S H D D T H S R I E H Y A S R L A E M E N S N G S Y L N D S I P N E S I D D E H L L I Q H Y C Q S L N Q D S P L S Q P R S P A Q I L I S L E S E E R G E L E R I L A D L E E E N R N L Q A E Y D R L Q Q H E H K G L S P L S P P E M M P T S P Q S P R D A E L I A E A K L L R Q H K G R L E A R M Q I L E D H N K Q L E S Q L H R L R Q L L E Q P Q A E A K V N G T T V S S P S T S L Q R S D S S Q P M L L R V V G S Q T S D S M G E E D L L S P P Q D T S T G L E E V M E Q L N N S F P S S R G R N T P G K P M R E D T M

**Protéine dystrophine mutée générée après délétion des exons 45 à 48 (3465 acides aminés, 401.44 kDa)**

MLWWEVEDCYEREDVQKKTFTKWVNAQFSKFGKQHIENLFSDLQDGRRLDLDLEGLTGQKLPKEKGSSTRVHALNNVNKAALRVLQNNVNDLVNIGSTDIVDGNHKLTLGLIWNIIHLHWQVKNVMKNI MAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVNFTTSSWSDGLALNALIHSRHPDLFDWNSVVCQSSATQRLEHAFN IARYQLGIEKLLD PEDVDVTTYDPDKKSILMYITSLFQVLPQQVSI EAIQEVEMLPRPPKVTKEEHFQLHHQMHSYQQITVSLAQGYERTSSPKPRFKSYAYTQAAVYVTS DPTSRSPFPSSQH LEAPEDKSFSGSSLMSEVNLD RYQTALEEVLSWLLSAEDTLQAQGEISNDVEVVKDQFHTHEGYMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLITGTGKLSDEEETEVEQEMNLLN SRWELCRVASMEEKQSNLHRVLMDLQNKQKLELNDWLTKEERTRKMEEEPLGPDLEDLKRQVQHKVLEQDLEQEQVVRVNSLTHMVMVVDSESSGDHATAALEEQKLVK LGDRWANI CRWTE DRWVLLQDI LLKQRLTEEQCLFSAWLSEKEDAVNKIHTTGFKDQNEMLSSQLKLAVLKADLEKKKQSMGKLYSLKQDLSLTKNKSVTQKTEA WLDNFARCDWNLVQKLEKSTAQISQAVTTTQPSTLTQTTVMETVTVTTRTREQILVKHAQEELEPPPPQKRRQITVDSEIRKRLDVIDITELHSWITRSEAVLQSPFAI FRKEGNFSDLKEKVNAIERERKAEKFRKLDASRSQAALVEQMVNNEGYNADSIKQASEQLNSRWIEFCQLLSERLNLWLEYQNNIIAFYNQLQQLMPTTAAENWLKIQ PPTPSEPTAIKSQLKICKDEVNRLSGLQPQIERLKIQSIALKEKGQGPMLFADFAVTFNHFKQVSDVQAREKELQTFIDTLPMPRYQETMSAIRTWVQOSETKLS IPQLSVTDYEIMEQRLGELQALQSSLEQQSGLYLLSTTVKEMSKKAPSEISRKYQSEFEIEIEGRWKKLSQLVEHCQKLEEQMKNLKRKIQNHIIQTLKKWMAEVDVFLKEEWPALGDSEILKKQLKQCRLLVSDIQTIPQSLNSVNEGQQIKNEAEPFASRLAETELKELNTQWDHMCQQVYARKEALKGGLEKTVSLQKDLSEMHEWMTQAE EYLERDFEYKTPDELQKAVEEMKRAKEEAQQEAKVKLLTESVNSVIAQAPPVAQEALKELETLTNYQWLCRNLGCKTLEEVWACWHELLSYLEKANKWLNVEFKLKT TENIPGGAEEISEVLDLSENLMRHS EDNPNQIRILAQTLDGGVMDLELINEELETFNRSRRELHEEAVRRQKLEEQS IQSAQETEKSLHLIQESLTFIDK QLAAYIADKVDAAQMPQEAQKIQSDLTSHEISLEEMKKNQKGEAAQVLSQIDVAQKLDQVSMKFRFLQK PANFEQRLEQESKMI LDEVKMLPALETKSVEQEVV QSQLNHCVNLYKSLSEVKSEVMV IKTGRQIVQKKQ TENPKELDERV TALKLHYNELGAKVT ERKQLEKCLKLSRKRMEEMNVLTEWLAATDMELTKRSAVEGMP S NLDSEVAWGKATQKEIEKQVHLKSI TEVGEALKTVLGKKE TLVEDKLSLLNSNWI AVTSRAEELWNL LLEYQKHMETFQDQVNDHITKWI IQADTLDESEKPKPQQ KEDVLRKLAELNDIRPKVDSTRDQAANLMANRGDHCRKLVPEQISELNRHFAAISHRIKTKGKASIPLKELEQFNSDIQKLEPLEAEIQQGVNLEKEDFNKDMNED NEGTVKELLQRGDNLQQRITDERKREIEIKIQQLLQTKHNALKDLRSQRKKALEISHQWYQYKQADDLKCLDDIEKKLASLEPEPRDERKIKEIDRELQKKKEEL NAVRRQAEGLEDGAMAVEPTQIQLSKRWREIESKFAQFRRLNFAQIHTVREETMMVMTEDMPLIEISYVPSYTLTEITHVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLFEK QESLKNIKDSLQSSGRIDI IHSKTAALQSA TPVERVKLQEAALSQDFQWEKVNMYKDRQGRFDRSVEKWRRFHYDIKIFNQWLTAEQFLRKTQIPENWEHAK YKWLKETEIAVQAQPDVEEILSKGQHLYEKPAEQVKKRLEDLSSEWAVNRLQELRAKQPD LAPGLTTI GASPTQTVTLTPQVVFVETAI SKLEMPSSLML EVPALADFNRAWTELDTWLSLLDQVIKSRVMVGDLEDINEMI KQKATMDQLEQRRPQLEELITAAQNLKNKTSNQEARTITDRIERIQNWDEVQEHLQNRQQ LNEMLKDSTQWLEAKEEAQVQLGQARAKLESWKEGPTVDAIQKII TETKQLAKDLRQWQTNVNDVANDLALKLLRDSADTRKWHMII TENINASWRSIHKRVSERE AALEETHRLLQQFPDLLEKFLAWL TEAETTANVLDQATRERLEEDSKGVKELMKQWDLQGEIEAHTDVYHNL DENSQKILRSLEGGSDAVLLQRR LDNMNFKWSELRRKSLNIRSHLEASSDQWKRLLHLSQELLVWLQKLDDEL SRQAPIGGDFPAVQKQNDVHRAFKRELKTKEPVIMSTLETVRIFLTEQPLEGLEKLYQEPREL PPEERLQNRKQAEVNTWEKLNLSADWQRKIDETLERLQELQEATDEL DLKLRQAEV IKGSWQVPGDLDLDSLQDHLBKVKALRGEIAPLKENVSHVNDLARQ L T T L G I Q L S P Y N L S T L E D L N T R W K L L Q V A V E D R V R Q L H E A H R D F G P A S Q H F L S T S V Q G P W E R A I S P N K V P Y I N H E T Q T C W D H P K M T E L Y Q S L A D L N M K L R R I Q K A L C L D L S L S A A C D A L D Q H N L K Q N D Q P M D I L Q I N C L T T I Y D R L E Q E H N N L V N V P L C V D M C L N W L N V Y D T G R T G R I R V L S F K T G I I S C K A H L E D K Y R Y L F K Q V A S S T G F C D Q R R L G L L H D S I Q I P R Q L G E V A S F G G S N I E P S V R S C F Q F A N N K P E I E A A L F D W M R L E P Q S M V W P L V L H R V A A A E T A K H Q A C N I C K E C P I I G F R Y S L K H F N Y D I C Q S C F F S G R V A K G H K M H Y P M V E Y C T P T T S G E D V R D F A K V L N K F R T K R Y F A K H P R M G Y L P V Q T V L E G D N M E T P V T L I N F W P V D S A P A S S P Q L S H D D T H S R I E H Y A S R L A E M E N S N G S Y L N D S I P N E S I D D E H L L I Q H Y C Q S L N Q D S P L S Q P R S P A Q I L I S L E S E E R G E L E R I L A D L E E E N R N L Q A E Y D R L Q Q H E H K G L S P L S P P E M M P T S P Q S P R D A E L I A E A K L L R Q H K G R L E A R M Q I L E D H N K Q L E S Q L H R L R Q L L E Q P Q A E A K V N G T T V S S P S T S L Q R S D S S Q P M L L R V V G S Q T S D S M G E E D L L S P P Q D T S T G L E E V M E Q L N N S F P S S R G R N T P G K P M R E D T M

**Protéine dystrophine mutée générée jusqu'aux 46 premiers exons (2254 acides aminés, 262.19 kDa)**

MLWWEVEDCYEREDVQKKTFTKWVNAQFSKFGKQHIENLFSDLQDGRRLDLDLEGLTGQKLPKEKGSSTRVHALNNVNKAALRVLQNNVNDLVNIGSTDIVDGNHKLTLGLIWNIIHLHWQVKNVMKNI MAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVNFTTSSWSDGLALNALIHSRHPDLFDWNSVVCQSSATQRLEHAFN IARYQLGIEKLLD PEDVDVTTYDPDKKSILMYITSLFQVLPQQVSI EAIQEVEMLPRPPKVTKEEHFQLHHQMHSYQQITVSLAQGYERTSSPKPRFKSYAYTQAAVYVTS DPTSRSPFPSSQH LEAPEDKSFSGSSLMSEVNLD RYQTALEEVLSWLLSAEDTLQAQGEISNDVEVVKDQFHTHEGYMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLITGTGKLSDEEETEVEQEMNLLN SRWELCRVASMEEKQSNLHRVLMDLQNKQKLELNDWLTKEERTRKMEEEPLGPDLEDLKRQVQHKVLEQDLEQEQVVRVNSLTHMVMVVDSESSGDHATAALEEQKLVK LGDRWANI CRWTE DRWVLLQDI LLKQRLTEEQCLFSAWLSEKEDAVNKIHTTGFKDQNEMLSSQLKLAVLKADLEKKKQSMGKLYSLKQDLSLTKNKSVTQKTEA

WLDNFARCDWNLVQKLEKSTAQISQAVTTTQPSLTQTVMETVTVTTRQIILVKHAQEEELPPPPQKRRQITVDSEIRKRLDVIDITELHSWITRSEAVLQSPFEAIFRKEGNFSDLKEKVNAIEREKAEKFRKLQDASRSQAALVEQMVNEGVNADSIKQASEQLNSRWIEFCQLLSERLNWLEYQNNIIAFYNQLQOLEQMTTAAENWLKIQPTTPSEPTAIAKSQLKICKDEVNRLSGLQPQIERLKIQSIALKEKGQGPMLDADFVAFTNHFKQVSDVQAREKELQTFIDTLPMPRYQETMSAIRTWVQOSETKLSIPQLSVTDYBIMEQRLGELQALQSSLEQQSGLYYLSTTVKEMSKKAPSEISRKYQSEFEIEIEGRWKKLSQLVEHCQKLEEQMKNLKRKIQNHIIQTLKKNWMAEVDVFLKEEWPALGDSEILKKQLKQCRLLVSDIQTIPQSLNSVNEGGQKIKNEAPEPEFASRLETELKELNTQWDHMCQQVYARKEALKGGLEKTVSLQKDLSEMHEWMTQAE EYLERDFEYKTPDELQKAVEEMKRAKEEAQQEAKVKLLTESVNSVIAQAPPVAQEALKELETLTNYQWLCRNLNGCKTLEEVWACWHELLSYLEKANKWLNVEFKLKTENIPGGAEEISEVLDLSENLMRHSEDPNPQIRILAQTLTDGGVMDLELINEELETFNRSRRELHEEAVRRQKLEQS IQSAQETKSLHLIQESLTFIDKQLAAAYIADKVDAAQMPQEAQKIQSDLTSHESISEEMKKNQKGEAAQVRVSDIDVAQKQLQDVSMKFRFLQK PANFEQRLQESKMI LDEVKMLHPALPALETKSVEQEVVQSQNLHCVNLYKSLSEVKSEVEMVIKTRGRQIVQKKQ TENPKELDERV TALKLHYNELGAKVTERKQOLEKCLKLSRKRKEMNVLTEWLAATDMELTKRSVEGMPSNLDESEVANGKATQKEIEKQVHLKSI TEVGEALKTVLGKKE TLVEDKLSLLNSNWI AVTSRAEEWLNLLEYQKHMETFQDQNVHITKWI IQADTLDESEKKKPQQKEDVLRKRLKAEELNDIRPKVDSTRDQAANLMANRGDHCRKLVPEQISELNRHFAAISHR IKTGKASIPLKELEQFNDSIQKLEPLEABEQGVNLEKEDFNKDMNEDNEGTVKELLQRGDNLQQRITDERKREIEIKIQQLLQTKHNALKDLRSQRKKALEISHQWYQYKQADDLKCLDDIEKKLASLEPPRDERKIKEIDRELQKKKEELNAVRRQAEGLEDGAAAMAVEPTQIQLSKRWREIESKFAQFRRLNFAQIHTVREE TMMVMTEDMPL EISYVPSYTYL TEI THVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLFFKQESLKNIKDSLQSSGRIDIIHSSKTAALQSATPVERVKLQEALSQDLFQWEKVNMYKDRQGRFDRSVEKWRFRHYDIKIFNQLWLEBQVFLRKTQIPENWEHAKYKWLKELQDGIQRQTVVRLNATGEEIIQSSKTDASILEKLGSLNLRWQEVCKQLSDRKRLEEQKNI LSEFQRDLNEFVWLWLEADNIIASIPLEPGKEQQLK EKLEQVK

### Protéine dystrophine mutée générée jusqu'aux 45 premiers exons (2205 acides aminés, 256.39 kDa)

MLWEEVEDCYEREDVQKKTFTKWNVAQFSKFGKQHIENLFSDLQDGRRLDLEGLTGQKLPKEKSTRVHALNNVNKAALRVLQNNVNDLVNIGSTDIVDGNHKLTLGLIWNII LHWQVKNVMKNI MAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVINFTTWSWDGLALNALIHSRHPDLFDWNSVVCQASATQRLEHAFNIARYQLGIEKLLDPEDVDVTTYPDKKSIILMYITSLFQVLPQQVSI EAIQEVEMLPRPPKVKTEEHFQLHHQMHSYQIITVSLAQGYERTSSPKPRFKSYAYTQAAYVTTSDPTRSPFPSSQHLEAPEDKSFSSLMSEVNLDRYQTALAEVLSWLLS AEDTLQAQGEISNDVEVVKDQFHTHEGYMMDLTAHQGRVGNILQGLSKLIGTGKLSSEDETEVQEQMNLNLSRWECLRVASMEKQSNLHRVLMDLQNKQLKELNDWLTKTEERTRKMEEPGLPDELDLKRQVQKHVQLQEDLEQEQVRVNSLTHMVVVVDESSGDHATAALEEQLVKLGDRWANICRWTEDRWVLLQDILLKQRLTEEQCLFSAWLESEKEDAVNKIHTTGFKDQNEMLSSQLKLAVALKADLEKKQSMGKLYSLKQDLSLTKNKSVTQKTEAWLDNFARCDWNLVQKLEKSTAQISQAVTTTQPSLTQTVMETVTVTTRQIILVKHAQEEELPPPPQKRRQITVDSEIRKRLDVIDITELHSWITRSEAVLQSPFEAIFRKEGNFSDLKEKVNAIEREKAEKFRKLQDASRSQAALVEQMVNEGVNADSIKQASEQLNSRWIEFCQLLSERLNWLEYQNNIIAFYNQLQOLEQMTTAAENWLKIQPTTPSEPTAIAKSQLKICKDEVNRLSGLQPQIERLKIQSIALKEKGQGPMLDADFVAFTNHFKQVSDVQAREKELQTFIDTLPMPRYQETMSAIRTWVQOSETKLSIPQLSVTDYBIMEQRLGELQALQSSLEQQSGLYYLSTTVKEMSKKAPSEISRKYQSEFEIEIEGRWKKLSQLVEHCQKLEEQMKNLKRKIQNHIIQTLKKNWMAEVDVFLKEEWPALGDSEILKKQLKQCRLLVSDIQTIPQSLNSVNEGGQKIKNEAPEPEFASRLETELKELNTQWDHMCQQVYARKEALKGGLEKTVSLQKDLSEMHEWMTQAE EYLERDFEYKTPDELQKAVEEMKRAKEEAQQEAKVKLLTESVNSVIAQAPPVAQEALKELETLTNYQWLCRNLNGCKTLEEVWACWHELLSYLEKANKWLNVEFKLKTENIPGGAEEISEVLDLSENLMRHSEDPNPQIRILAQTLTDGGVMDLELINEELETFNRSRRELHEEAVRRQKLEQS IQSAQETKSLHLIQESLTFIDKQLAAAYIADKVDAAQMPQEAQKIQSDLTSHESISEEMKKNQKGEAAQVRVSDIDVAQKQLQDVSMKFRFLQK PANFEQRLQESKMI LDEVKMLHPALPALETKSVEQEVVQSQNLHCVNLYKSLSEVKSEVEMVIKTRGRQIVQKKQ TENPKELDERV TALKLHYNELGAKVTERKQOLEKCLKLSRKRKEMNVLTEWLAATDMELTKRSVEGMPSNLDESEVANGKATQKEIEKQVHLKSI TEVGEALKTVLGKKE TLVEDKLSLLNSNWI AVTSRAEEWLNLLEYQKHMETFQDQNVHITKWI IQADTLDESEKKKPQQKEDVLRKRLKAEELNDIRPKVDSTRDQAANLMANRGDHCRKLVPEQISELNRHFAAISHR IKTGKASIPLKELEQFNDSIQKLEPLEABEQGVNLEKEDFNKDMNEDNEGTVKELLQRGDNLQQRITDERKREIEIKIQQLLQTKHNALKDLRSQRKKALEISHQWYQYKQADDLKCLDDIEKKLASLEPPRDERKIKEIDRELQKKKEELNAVRRQAEGLEDGAAAMAVEPTQIQLSKRWREIESKFAQFRRLNFAQIHTVREE TMMVMTEDMPL EISYVPSYTYL TEI THVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLFFKQESLKNIKDSLQSSGRIDIIHSSKTAALQSATPVERVKLQEALSQDLFQWEKVNMYKDRQGRFDRSVEKWRFRHYDIKIFNQLWLEBQVFLRKTQIPENWEHAKYKWLKELQDGIQRQTVVRLNATGEEIIQSSKTDASILEKLGSLNLRWQEVCKQLSDRKRLEEQKNI LSEFQRDLNEFVWLWLEADNIIASIPLEPGKEQQLK EKLEQVK

### Protéine dystrophine mutée générée jusqu'aux 50 premiers exons (2437 acides aminés, 282.95 kDa)

MLWEEVEDCYEREDVQKKTFTKWNVAQFSKFGKQHIENLFSDLQDGRRLDLEGLTGQKLPKEKSTRVHALNNVNKAALRVLQNNVNDLVNIGSTDIVDGNHKLTLGLIWNII LHWQVKNVMKNI MAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVINFTTWSWDGLALNALIHSRHPDLFDWNSVVCQASATQRLEHAFNIARYQLGIEKLLDPEDVDVTTYPDKKSIILMYITSLFQVLPQQVSI EAIQEVEMLPRPPKVKTEEHFQLHHQMHSYQIITVSLAQGYERTSSPKPRFKSYAYTQAAYVTTSDPTRSPFPSSQHLEAPEDKSFSSLMSEVNLDRYQTALAEVLSWLLS AEDTLQAQGEISNDVEVVKDQFHTHEGYMMDLTAHQGRVGNILQGLSKLIGTGKLSSEDETEVQEQMNLNLSRWECLRVASMEKQSNLHRVLMDLQNKQLKELNDWLTKTEERTRKMEEPGLPDELDLKRQVQKHVQLQEDLEQEQVRVNSLTHMVVVVDESSGDHATAALEEQLVKLGDRWANICRWTEDRWVLLQDILLKQRLTEEQCLFSAWLESEKEDAVNKIHTTGFKDQNEMLSSQLKLAVALKADLEKKQSMGKLYSLKQDLSLTKNKSVTQKTEAWLDNFARCDWNLVQKLEKSTAQISQAVTTTQPSLTQTVMETVTVTTRQIILVKHAQEEELPPPPQKRRQITVDSEIRKRLDVIDITELHSWITRSEAVLQSPFEAIFRKEGNFSDLKEKVNAIEREKAEKFRKLQDASRSQAALVEQMVNEGVNADSIKQASEQLNSRWIEFCQLLSERLNWLEYQNNIIAFYNQLQOLEQMTTAAENWLKIQPTTPSEPTAIAKSQLKICKDEVNRLSGLQPQIERLKIQSIALKEKGQGPMLDADFVAFTNHFKQVSDVQAREKELQTFIDTLPMPRYQETMSAIRTWVQOSETKLSIPQLSVTDYBIMEQRLGELQALQSSLEQQSGLYYLSTTVKEMSKKAPSEISRKYQSEFEIEIEGRWKKLSQLVEHCQKLEEQMKNLKRKIQNHIIQTLKKNWMAEVDVFLKEEWPALGDSEILKKQLKQCRLLVSDIQTIPQSLNSVNEGGQKIKNEAPEPEFASRLETELKELNTQWDHMCQQVYARKEALKGGLEKTVSLQKDLSEMHEWMTQAE EYLERDFEYKTPDELQKAVEEMKRAKEEAQQEAKVKLLTESVNSVIAQAPPVAQEALKELETLTNYQWLCRNLNGCKTLEEVWACWHELLSYLEKANKWLNVEFKLKTENIPGGAEEISEVLDLSENLMRHSEDPNPQIRILAQTLTDGGVMDLELINEELETFNRSRRELHEEAVRRQKLEQS IQSAQETKSLHLIQESLTFIDKQLAAAYIADKVDAAQMPQEAQKIQSDLTSHESISEEMKKNQKGEAAQVRVSDIDVAQKQLQDVSMKFRFLQK PANFEQRLQESKMI LDEVKMLHPALPALETKSVEQEVVQSQNLHCVNLYKSLSEVKSEVEMVIKTRGRQIVQKKQ TENPKELDERV TALKLHYNELGAKVTERKQOLEKCLKLSRKRKEMNVLTEWLAATDMELTKRSVEGMPSNLDESEVANGKATQKEIEKQVHLKSI TEVGEALKTVLGKKE TLVEDKLSLLNSNWI AVTSRAEEWLNLLEYQKHMETFQDQNVHITKWI IQADTLDESEKKKPQQKEDVLRKRLKAEELNDIRPKVDSTRDQAANLMANRGDHCRKLVPEQISELNRHFAAISHR IKTGKASIPLKELEQFNDSIQKLEPLEABEQGVNLEKEDFNKDMNEDNEGTVKELLQRGDNLQQRITDERKREIEIKIQQLLQTKHNALKDLRSQRKKALEISHQWYQYKQADDLKCLDDIEKKLASLEPPRDERKIKEIDRELQKKKEELNAVRRQAEGLEDGAAAMAVEPTQIQLSKRWREIESKFAQFRRLNFAQIHTVREE TMMVMTEDMPL EISYVPSYTYL TEI THVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLFFKQESLKNIKDSLQSSGRIDIIHSSKTAALQSATPVERVKLQEALSQDLFQWEKVNMYKDRQGRFDRSVEKWRFRHYDIKIFNQLWLEBQVFLRKTQIPENWEHAKYKWLKELQDGIQRQTVVRLNATGEEIIQSSKTDASILEKLGSLNLRWQEVCKQLSDRKRLEEQKNI LSEFQRDLNEFVWLWLEADNIIASIPLEPGKEQQLK EKLEQVKLLVEELPLRQILKQNETGGPVLSAPI SPEEQDKLENLKLQTNLQWIKVSRALPEKQGEIEAQIKDLGQLEKLELDEQLNHLHLLWLSPIRNLQLEIYNQPNQEGPFDVQETEAIVAQAKQDVPEEILSKGQHLYKEKPAQVPRKLELDESSEWKAVERNLLQELRAKQPD LAPGLTTIGAS

### Protéine dystrophine mutée générée après délétion de l'exon 8 (217 acides aminés, 25.12 kDa)

MLWEEVEDCYEREDVQKKTFTKWNVAQFSKFGKQHIENLFSDLQDGRRLDLEGLTGQKLPKEKSTRVHALNNVNKAALRVLQNNVNDLVNIGSTDIVDGNHKLTLGLIWNII LHWQVKNVMKNI MAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVINFTTWSWDGLALNALIHSRHPDLFDWNSVVCQASATQRLEHAFNIARYQLGIEKLLDPEDVDVTTYPDKKSIILMYITSLFQVLPQQVSI EAIQEVEMLPRPPKVKTEEHFQLHHQMHSYQIITVSLAQGYERTSSPKPRFKSYAYTQAAYVTTSDPTRSPFPSSQHLEAPEDKSFSSLMSEVNLDRYQTALAEVLSWLLS AEDTLQAQGEISNDVEVVKDQFHTHEGYMMDLTAHQGRVGNILQGLSKLIGTGKLSSEDETEVQEQMNLNLSRWECLRVASMEKQSNLHRVLMDLQNKQLKELNDWLTKTEERTRKMEEPGLPDELDLKRQVQKHVQLQEDLEQEQVRVNSLTHMVVVVDESSGDHATAALEEQLVKLGDRWANICRWTEDRWVLLQDILLKQRLTEEQCLFSAWLESEKEDAVNKIHTTGFKDQNEMLSSQLKLAVALKADLEKKQSMGKLYSLKQDLSLTKNKSVTQKTEAWLDNFARCDWNLVQKLEKSTAQISQAVTTTQPSLTQTVMETVTVTTRQIILVKHAQEEELPPPPQKRRQITVDSEIRKRLDVIDITELHSWITRSEAVLQSPFEAIFRKEGNFSDLKEKVNAIEREKAEKFRKLQDASRSQAALVEQMVNEGVNADSIKQASEQLNSRWIEFCQLLSERLNWLEYQNNIIAFYNQLQOLEQMTTAAENWLKIQPTTPSEPTAIAKSQLKICKDEVNRLSGLQPQIERLKIQSIALKEKGQGPMLDADFVAFTNHFKQVSDVQAREKELQTFIDTLPMPRYQETMSAIRTWVQOSETKLSIPQLSVTDYBIMEQRLGELQALQSSLEQQSGLYYLSTTVKEMSKKAPSEISRKYQSEFEIEIEGRWKKLSQLVEHCQKLEEQMKNLKRKIQNHIIQTLKKNWMAEVDVFLKEEWPALGDSEILKKQLKQCRLLVSDIQTIPQSLNSVNEGGQKIKNEAPEPEFASRLETELKELNTQWDHMCQQVYARKEALKGGLEKTVSLQKDLSEMHEWMTQAE EYLERDFEYKTPDELQKAVEEMKRAKEEAQQEAKVKLLTESVNSVIAQAPPVAQEALKELETLTNYQWLCRNLNGCKTLEEVWACWHELLSYLEKANKWLNVEFKLKTENIPGGAEEISEVLDLSENLMRHSEDPNPQIRILAQTLTDGGVMDLELINEELETFNRSRRELHEEAVRRQKLEQS IQSAQETKSLHLIQESLTFIDKQLAAAYIADKVDAAQMPQEAQKIQSDLTSHESISEEMKKNQKGEAAQVRVSDIDVAQKQLQDVSMKFRFLQK PANFEQRLQESKMI LDEVKMLHPALPALETKSVEQEVVQSQNLHCVNLYKSLSEVKSEVEMVIKTRGRQIVQKKQ TENPKELDERV TALKLHYNELGAKVTERKQOLEKCLKLSRKRKEMNVLTEWLAATDMELTKRSVEGMPSNLDESEVANGKATQKEIEKQVHLKSI TEVGEALKTVLGKKE TLVEDKLSLLNSNWI AVTSRAEEWLNLLEYQKHMETFQDQNVHITKWI IQADTLDESEKKKPQQKEDVLRKRLKAEELNDIRPKVDSTRDQAANLMANRGDHCRKLVPEQISELNRHFAAISHR IKTGKASIPLKELEQFNDSIQKLEPLEABEQGVNLEKEDFNKDMNEDNEGTVKELLQRGDNLQQRITDERKREIEIKIQQLLQTKHNALKDLRSQRKKALEISHQWYQYKQADDLKCLDDIEKKLASLEPPRDERKIKEIDRELQKKKEELNAVRRQAEGLEDGAAAMAVEPTQIQLSKRWREIESKFAQFRRLNFAQIHTVREE TMMVMTEDMPL EISYVPSYTYL TEI THVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLFFKQESLKNIKDSLQSSGRIDIIHSSKTAALQSATPVERVKLQEALSQDLFQWEKVNMYKDRQGRFDRSVEKWRFRHYDIKIFNQLWLEBQVFLRKTQIPENWEHAKYKWLKELQDGIQRQTVVRLNATGEEIIQSSKTDASILEKLGSLNLRWQEVCKQLSDRKRLEEQKNI LSEFQRDLNEFVWLWLEADNIIASIPLEPGKEQQLK EKLEQVKLLVEELPLRQILKQNETGGPVLSAPI SPEEQDKLENLKLQTNLQWIKVSRALPEKQGEIEAQIKDLGQLEKLELDEQLNHLHLLWLSPIRNLQLEIYNQPNQEGPFDVQETEAIVAQAKQDVPEEILSKGQHLYKEKPAQVPRKLELDESSEWKAVERNLLQELRAKQPD LAPGLTTIGAS

### Protéine dystrophine mutée générée après délétion des exons 3 à 4 (3628 acides aminés, 420.36 kDa)

MLWEEVEDCYEREDVQKKTFTKWNVAQFSKVDLVNIGSTDIVDGNHKLTLGLIWNII LHWQVKNVMKNI MAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVINFTTWSWDGLALNALIHSRHPDLFDWNSVVCQASATQRLEHAFNIARYQLGIEKLLDPEDVDVTTYPDKKSIILMYITSLFQVLPQQVSI EAIQEVEMLPRPPKVKTEEHFQLHHQMHSYQIITVSLAQGYERTSSPKPRFKSYAYTQAAYVTTSDPTRSPFPSSQHLEAPEDKSFSSLMSEVNLDRYQTALAEVLSWLLS AEDTLQAQGEISNDVEVVKDQFHTHEGYMMDLTAHQGRVGNILQGLSKLIGTGKLSSEDETEVQEQMNLNLSRWECLRVASMEKQSNLHRVLMDLQNKQLKELNDWLTKTEERTRKMEEPGLPDELDLKRQVQKHVQLQEDLEQEQVRVNSLTHMVVVVDESSGDHATAALEEQLVKLGDRWANICRWTEDRWVLLQDILLKQRLTEEQCLFSAWLESEKEDAVNKIHTTGFKDQNEMLSSQLKLAVALKADLEKKQSMGKLYSLKQDLSLTKNKSVTQKTEAWLDNFARCDWNLVQKLEKSTAQISQAVTTTQPSLTQTVMETVTVTTRQIILVKHAQEEELPPPPQKRRQITVDSEIRKRLDVIDITELHSWITRSEAVLQSPFEAIFRKEGNFSDLKEKVNAIEREKAEKFRKLQDASRSQAALVEQMVNEGVNADSIKQASEQLNSRWIEFCQLLSERLNWLEYQNNIIAFYNQLQOLEQMTTAAENWLKIQPTTPSEPTAIAKSQLKICKDEVNRLSGLQPQIERLKIQSIALKEKGQGPMLDADFVAFTNHFKQVSDVQAREKELQTFIDTLPMPRYQETMSAIRTWVQOSETKLSIPQLSVTDYBIMEQRLGELQALQSSLEQQSGLYYLSTTVKEMSKKAPSEISRKYQSEFEIEIEGRWKKLSQLVEHCQKLEEQMKNLKRKIQNHIIQTLKKNWMAEVDVFLKEEWPALGDSEILKKQLKQCRLLVSDIQTIPQSLNSVNEGGQKIKNEAPEPEFASRLETELKELNTQWDHMCQQVYARKEALKGGLEKTVSLQKDLSEMHEWMTQAE EYLERDFEYKTPDELQKAVEEMKRAKEEAQQEAKVKLLTESVNSVIAQAPPVAQEALKELETLTNYQWLCRNLNGCKTLEEVWACWHELLSYLEKANKWLNVEFKLKTENIPGGAEEISEVLDLSENLMRHSEDPNPQIRILAQTLTDGGVMDLELINEELETFNRSRRELHEEAVRRQKLEQS IQSAQETKSLHLIQESLTFIDKQLAAAYIADKVDAAQMPQEAQKIQSDLTSHESISEEMKKNQKGEAAQVRVSDIDVAQKQLQDVSMKFRFLQK PANFEQRLQESKMI LDEVKMLHPALPALETKSVEQEVVQSQNLHCVNLYKSLSEVKSEVEMVIKTRGRQIVQKKQ TENPKELDERV TALKLHYNELGAKVTERKQOLEKCLKLSRKRKEMNVLTEWLAATDMELTKRSVEGMPSNLDESEVANGKATQKEIEKQVHLKSI TEVGEALKTVLGKKE TLVEDKLSLLNSNWI AVTSRAEEWLNLLEYQKHMETFQDQNVHITKWI IQADTLDESEKKKPQQKEDVLRKRLKAEELNDIRPKVDSTRDQAANLMANRGDHCRKLVPEQISELNRHFAAISHR IKTGKASIPLKELEQFNDSIQKLEPLEABEQGVNLEKEDFNKDMNEDNEGTVKELLQRGDNLQQRITDERKREIEIKIQQLLQTKHNALKDLRSQRKKALEISHQWYQYKQADDLKCLDDIEKKLASLEPPRDERKIKEIDRELQKKKEELNAVRRQAEGLEDGAAAMAVEPTQIQLSKRWREIESKFAQFRRLNFAQIHTVREE TMMVMTEDMPL EISYVPSYTYL TEI THVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLFFKQESLKNIKDSLQSSGRIDIIHSSKTAALQSATPVERVKLQEALSQDLFQWEKVNMYKDRQGRFDRSVEKWRFRHYDIKIFNQLWLEBQVFLRKTQIPENWEHAKYKWLKELQDGIQRQTVVRLNATGEEIIQSSKTDASILEKLGSLNLRWQEVCKQLSDRKRLEEQKNI LSEFQRDLNEFVWLWLEADNIIASIPLEPGKEQQLK EKLEQVKLLVEELPLRQILKQNETGGPVLSAPI SPEEQDKLENLKLQTNLQWIKVSRALPEKQGEIEAQIKDLGQLEKLELDEQLNHLHLLWLSPIRNLQLEIYNQPNQEGPFDVQETEAIVAQAKQDVPEEILSKGQHLYKEKPAQVPRKLELDESSEWKAVERNLLQELRAKQPD LAPGLTTIGAS

FTNHFKQVSDVQAREKELQTI FDTLPPMR YQETMSAIRTVWQQSETKLS IPQLSVTDYE IMEQLRGLGELQALQSSSLQEQSSGLYLLSTTVKEMSKKAPSEISRKYQS  
 EFEE IEGRWKLLSSQLVEHCQKLEEQMNLKRLKI QNH IQTLLKKNMAEVDVFLKEEWPALGDSE ILKQKQLKQCRLLVSDIQT IQPSLNSVNEGGQK IKNBAEPEFASRL  
 ETELKELNTQWDHMCQQVYARKEALKGGLEKTVSLQKDLSEMHEWMTQABEEYLERDFEYKTPDELQKAVEEMKRAKEEAQQKEAKVLLTESVNSVIAQAPPVAQE  
 ALKKELETLTNYQWLCTRLNGKCKTLEEVWACWHELLESYLEKANKWLNVEVFKLKTENIPGGAEEISEVLDLENLMRHSNDPNQIRILAQTLDGGVMDELIN  
 EELETFNSRWRELHEEAQRVRLLEEQSISQAQETEKSLHLIQESLTPIDKQLAAYIADKVDAAQMPQEAQKI QSDLTSHESISLEEMKHNQKKEAAQRVLSQIDVAQ  
 KKLQDVSMKFRFLQKPANFQRLQESKMI LDEVKMHLPALLETKSVEQEVVQSLNHCNVNLYKSLSEVKSEVEMV IKTGRQIVQKQKTENPKELDERV TALKLHYNEL  
 GAKVTERKQQLKCLKLSRMRKEMNVLTEWLAATDMELTKRSAVEGMPNSLDS EVAWGKATQKEIEKQKVHLKSI TEVGEALKTVLGKKEETLVEDKLSLNSNWI  
 VTSRAEELWLNLLLEEQKHMETFDDQNVHDITKWI IQADTLLEDESEKKKPPQKQEDVLLKRLKAEALNDIRPKVDSTRDQAANLMANRNGDHCRLKLEVPQISELNHRFAAISH  
 RIKTKGASIPLKELEQFNDSIQKLEPLEAEIQQGVNLKEEDFNKMDNEDNEGTVKELLRQGDNLQORITDERKREEIKIKQQLLQTKHNALKDLRSQRKKALES  
 HQWYQYKRQADLLKCLDDIEKLLASLPEPRDERKIEIDRELOKQKKEELNAVRRQAEGLSEDAAMA VEPTQIQLSKRWRREIESKFAQFRRLNFAQIHTVREETMM  
 VMTEDMPLLEISYVPSYTYLTIETHVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLQKQESLKNIKDLSLQSSGRIDI IHSKKTAAALQSATPVERVKLQEAALSQDFQ  
 WEKVNMYKDRQGRFDRSVEKWRFRHYDIKIFNQWLTEAEQFLRKTQIPENWEHAKYKYWLKELQDGI GQRQTVVTRTLNATGEEIIQQSSKTASILQEKLGSLNLRWQEVCK  
 QLSDRKRLLEEQKNILSEFQRDLNEFVWLWEADNIASIPLEPGKEQQLKLEKLEQVLLVEELPLRQGI LKQLNETGGPVLVSAIPSEEDQKLENKLDKQTLNQLWIK  
 VSRALPEKQGEIEAQLKDLGELQKLELLEEQNLHLLWLSPIRNLQIEIYNQPNQEGPFDVQETIEIAVQAKQPDVEEILSKGQHLYKEKPAQKLELLEDESKGAVK  
 AVNRLQELRAKQFDLAPGLTTIGASPTQTVTLVTPVVTKEIASKLEMPSSMLLEVPALADFNRAWTEITDWSLDDQVVKSRQVMVGDLEDINEMIKQKATMQ  
 DLEQRFPQLEELITAAQNLKNTSNQEAARTIITDRIERIQNQWDEVEHLLQNRQQNLEMLKDBSTQWLEAKEEAQVGLGQARAKLESWKEGFPYTVDAIKKIKETKQ  
 LAKDLRQAEVILKGSWQVGDLLIDSLQDHLKVKALRGEIAPLKENVSHVNDLARQLTTLGILQSLSPYNLSTLEDLNRWKLQVAVEDRVRQLHEAHRDFGPASQHTM  
 STSVQGPWERAI SPNKVPYIINHETQTTCDWHPKMTLEYQSLADLNNVRFSAYRTAMKLRRLQKALCLDLSLSAACDALDQHNLKQNDQPMDILQIINCLTTIYDR  
 LEQEHNNLVNPLCVDMLNWLNVYDTGRTRIRVLSFKGTGII SLCKAHLEKDYRYLQKQVASTGFCQDQRRLLGLLHDSIQIPRQLGEVASFSGSNI EPSSVRSK  
 QFANNKPEIEAALFLDWMRLPEQSMVWLPVLRHVAABETAKHQAKNICKECPIIGFRYRSLKHFNYDICQSCFFSGRVAKGHKMHYPMVEYCTPTTSGEDVRDFAK  
 VLKKNKFRKTRKYAFKHPRMGLPVQTVLEGDNMETPVTLINFWPVDSPASSQLSHDDTSHRIEHYASRLAEMENSNYSYLNDSISPNSIDDEHLLIQHYCQSLNQ  
 DSPLSQPRSPAQILISLESERGELERILADLEEENRNLQAEYDRLLKQQHEHKGSLSPSPPEMPTSPQSPRAELIAEAALLRQHKHGLPQLEARMQILEDHNKQLES  
 QLHRLRQLLEQPPQAEAKVNGTTVSSPSTSLQRSDSSQPMLLRVVGSQTSDSMGEEDLLSPPQDSTGLLEVMEQLNNSFPSSRGRNTPGKPMREDTM

### Protéine dystrophine mutée générée après délétion des exons 46 à 47 (2220 acides aminés, 258.29 kDa)

MLWVEEDCYEREDVQKKTFTKWNVAQFSKFGKQHIENLFSDLQDGRRLDLEGLTGQKLPKEKGS TRVHALNPNVNAKRLVQLNNDVLDVNI GSTDIVDGNHKL  
 LGLIWNIIILHWQVKNVMKNMAGLQQTNSEKILLSWRVQSTRNYPQVNVINFTTWSWDGLALNALIHSRHPDLFDWNVSVVQQSATSRLQLEHAFNIRARVQLGIEKLLD  
 PEDVDITPYDKKSIIMLYIETSLQVQLPQQVSI EAIQEVEMVLRPPKVKTEHEFQLVHQMQHYSQQITVSLAQGYERTSSPKPRFKSYAYTQAAYVTTSDPTSPFPFSQH  
 LEAPEDKFSFGSSLMSEVNLDRYQTALAEVLSWLLSABDTLQAQGEISNDVEVKDQFHTHEGYMMDLTAHQGRVGNILQSGKLI GTGKLSSEDETEVQEQMNLN  
 SRWECLRVASMEKQSNLHRLVMDLQNKLELNDWLTKEERTKMEEEPLGPDLEDLKRQVQKHVLEQEDLEQEQVRVNSLTHMNVVDESSGDHATAALEEQKLV  
 LGRDWANICRWTEEDRWVLLQDILLLKQRLTEEQCLFSAWLESEKEDAVNKIHTTGFKQDNEMLSLQKLAVALKADLEKQKQSMGKLYSLKQDLSLTKNKSVTQKTEA  
 WLDNFARCDWNLVQKLEKSTAQISQAVTTTQPSLTQTTVMETVTTVTTREQILVKHAQEELPPPPQKRRQITVDSEIRKRLDVIDTELHSHVTRSEAVLQSPFAI  
 FRKEGNFSDLEKVNAIEREAKEKFRKLDASRAQALVEQMNVNADSIKQASQELNSRWIEFCQLLSERLNLWLEYQNNIIAFYNLQQLQEQMTTAAENWLKIQ  
 PTPPSEPTAIKSQLKICKDEVNRLSGLQPQIERLKIQSIALKEKQKQGMPLDADFVAFTNHFKQVSDVQAREKELQTI FDTLPPMR YQETMSAIRTVWQQSETKLS  
 IPQLSVTDYEIMEQLRGLGELQALQSSSLQEQSSGLYLLSTTVKEMSKKAPSEISRKYQSFEFEEIEGRWKLLSSQLVEHCQKLEEQMNLKRLKI QNH IQTLLKKNMAEVDVFLKEEWPALGDSE  
 LKEEWPALGDSEILKQKQLKQCRLLVSDIQT IQPSLNSVNEGGQK IKNBAEPEFASRL ETELEKELNTQWDHMCQQVYARKEALKGGLEKTVSLQKDLSEMHEWMTQAE  
 EYLERDFEYKTPDELQKAVEEMKRAKEEAQQKEAKVLLTESVNSVIAQAPPVAQEAALKELETLTNYQWLCTRLNGKCKTLEEVWACWHELLESYLEKANKWLNVEVFKLKTENIPGGAEEISEVLDLENLMRHSNDPNQIRILAQTLDGGVMDELIN  
 VEFKLTENIPGGAEEISEVLDLENLMRHSNDPNQIRILAQTLDGGVMDELIN ELETTFNSRWRELHEEAQRVRLLEEQSISQAQETEKSLHLIQESLTPIDKQLAAYIADKVDAAQMPQEAQKI QSDLTSHESISLEEMKHNQKKEAAQRVLSQIDVAQ  
 QLAAYIADKVDAAQMPQEAQKI QSDLTSHESISLEEMKHNQKKEAAQRVLSQIDVAQKKLQDVSMKFRFLQKPANFQRLQESKMI LDEVKMHLPALLETKSVEQEVV  
 QSLNHCNVNLYKSLSEVKSEVEMV IKTGRQIVQKQKTENPKELDERV TALKLHYNELGAKVTERKQQLKCLKLSRMRKEMNVLTEWLAATDMELTKRSAVEGMPNSLDS  
 NLDSEVAWGKATQKEIEKQKVHLKSI TEVGEALKTVLGKKEETLVEDKLSLNSNWI VTSRAEELWLNLLLEEQKHMETFDDQNVHDITKWI IQADTLLEDESEKKKPPQKQEDVLLKRLKAEALNDIRPKVDSTRDQAANLMANRNGDHCRLKLEVPQISELNHRFAAISH  
 RIKTKGASIPLKELEQFNDSIQKLEPLEAEIQQGVNLKEEDFNKMDNEDNEGTVKELLRQGDNLQORITDERKREEIKIKQQLLQTKHNALKDLRSQRKKALES  
 HQWYQYKRQADLLKCLDDIEKLLASLPEPRDERKIEIDRELOKQKKEELNAVRRQAEGLSEDAAMA VEPTQIQLSKRWRREIESKFAQFRRLNFAQIHTVREETMM  
 VMTEDMPLLEISYVPSYTYLTIETHVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLQKQESLKNIKDLSLQSSGRIDI IHSKKTAAALQSATPVERVKLQEAALSQDFQ  
 WEKVNMYKDRQGRFDRSVEKWRFRHYDIKIFNQWLTEAEQFLRKTQIPENWEHAKYKYWLKELQDGI GQRQTVVTRTLNATGEEIIQQSSKTASILQEKLGSLNLRWQEVCK  
 QLSDRKRLLEEQKNILSEFQRDLNEFVWLWEADNIASIPLEPGKEQQLKLEKLEQVLLVEELPLRQGI LKQLNETGGPVLVSAIPSEEDQKLENKLDKQTLNQLWIK  
 VSRALPEKQGEIEAQLKDLGELQKLELLEEQNLHLLWLSPIRNLQIEIYNQPNQEGPFDVQETIEIAVQAKQPDVEEILSKGQHLYKEKPAQKLELLEDESKGAVK  
 AVNRLQELRAKQFDLAPGLTTIGASPTQTVTLVTPVVTKEIASKLEMPSSMLLEVPALADFNRAWTEITDWSLDDQVVKSRQVMVGDLEDINEMIKQKATMQ  
 DLEQRFPQLEELITAAQNLKNTSNQEAARTIITDRIERIQNQWDEVEHLLQNRQQNLEMLKDBSTQWLEAKEEAQVGLGQARAKLESWKEGFPYTVDAIKKIKETKQ  
 LAKDLRQAEVILKGSWQVGDLLIDSLQDHLKVKALRGEIAPLKENVSHVNDLARQLTTLGILQSLSPYNLSTLEDLNRWKLQVAVEDRVRQLHEAHRDFGPASQHTM  
 STSVQGPWERAI SPNKVPYIINHETQTTCDWHPKMTLEYQSLADLNNVRFSAYRTAMKLRRLQKALCLDLSLSAACDALDQHNLKQNDQPMDILQIINCLTTIYDR  
 LEQEHNNLVNPLCVDMLNWLNVYDTGRTRIRVLSFKGTGII SLCKAHLEKDYRYLQKQVASTGFCQDQRRLLGLLHDSIQIPRQLGEVASFSGSNI EPSSVRSK  
 QFANNKPEIEAALFLDWMRLPEQSMVWLPVLRHVAABETAKHQAKNICKECPIIGFRYRSLKHFNYDICQSCFFSGRVAKGHKMHYPMVEYCTPTTSGEDVRDFAK  
 VLKKNKFRKTRKYAFKHPRMGLPVQTVLEGDNMETPVTLINFWPVDSPASSQLSHDDTSHRIEHYASRLAEMENSNYSYLNDSISPNSIDDEHLLIQHYCQSLNQ  
 DSPLSQPRSPAQILISLESERGELERILADLEEENRNLQAEYDRLLKQQHEHKGSLSPSPPEMPTSPQSPRAELIAEAALLRQHKHGLPQLEARMQILEDHNKQLES  
 QLHRLRQLLEQPPQAEAKVNGTTVSSPSTSLQRSDSSQPMLLRVVGSQTSDSMGEEDLLSPPQDSTGLLEVMEQLNNSFPSSRGRNTPGKPMREDTM

### Protéine dystrophine mutée générée après délétion des exons 6 à 8 (3527 acides aminés, 408.42 kDa)

MLWVEEDCYEREDVQKKTFTKWNVAQFSKFGKQHIENLFSDLQDGRRLDLEGLTGQKLPKEKGS TRVHALNPNVNAKRLVQLNNDVLDVNI GSTDIVDGNHKL  
 LGLIWNIIILHWQITVSLAQGYERTSSPKPRFKSYAYTQAAYVTTSDPTSPFPFSQHLEAPEDKFSFGSSLMSEVNLDRYQTALAEVLSWLLSABDTLQAQGEISNDVEVKDQFHTHEGYMMDLTAHQGRVGNILQSGKLI GTGKLSSEDETEVQEQMNLN  
 SRWECLRVASMEKQSNLHRLVMDLQNKLELNDWLTKEERTKMEEEPLGPDLEDLKRQVQKHVLEQEDLEQEQVRVNSLTHMNVVDESSGDHATAALEEQKLV  
 LGRDWANICRWTEEDRWVLLQDILLLKQRLTEEQCLFSAWLESEKEDAVNKIHTTGFKQDNEMLSLQKLAVALKADLEKQKQSMGKLYSLKQDLSLTKNKSVTQKTEA  
 WLDNFARCDWNLVQKLEKSTAQISQAVTTTQPSLTQTTVMETVTTVTTREQILVKHAQEELPPPPQKRRQITVDSEIRKRLDVIDTELHSHVTRSEAVLQSPFAI  
 FRKEGNFSDLEKVNAIEREAKEKFRKLDASRAQALVEQMNVNADSIKQASQELNSRWIEFCQLLSERLNLWLEYQNNIIAFYNLQQLQEQMTTAAENWLKIQ  
 PTPPSEPTAIKSQLKICKDEVNRLSGLQPQIERLKIQSIALKEKQKQGMPLDADFVAFTNHFKQVSDVQAREKELQTI FDTLPPMR YQETMSAIRTVWQQSETKLS  
 IPQLSVTDYEIMEQLRGLGELQALQSSSLQEQSSGLYLLSTTVKEMSKKAPSEISRKYQSFEFEEIEGRWKLLSSQLVEHCQKLEEQMNLKRLKI QNH IQTLLKKNMAEVDVFLKEEWPALGDSE  
 LKEEWPALGDSEILKQKQLKQCRLLVSDIQT IQPSLNSVNEGGQK IKNBAEPEFASRL ETELEKELNTQWDHMCQQVYARKEALKGGLEKTVSLQKDLSEMHEWMTQAE  
 EYLERDFEYKTPDELQKAVEEMKRAKEEAQQKEAKVLLTESVNSVIAQAPPVAQEAALKELETLTNYQWLCTRLNGKCKTLEEVWACWHELLESYLEKANKWLNVEVFKLKTENIPGGAEEISEVLDLENLMRHSNDPNQIRILAQTLDGGVMDELIN  
 VEFKLTENIPGGAEEISEVLDLENLMRHSNDPNQIRILAQTLDGGVMDELIN ELETTFNSRWRELHEEAQRVRLLEEQSISQAQETEKSLHLIQESLTPIDKQLAAYIADKVDAAQMPQEAQKI QSDLTSHESISLEEMKHNQKKEAAQRVLSQIDVAQ  
 QLAAYIADKVDAAQMPQEAQKI QSDLTSHESISLEEMKHNQKKEAAQRVLSQIDVAQKKLQDVSMKFRFLQKPANFQRLQESKMI LDEVKMHLPALLETKSVEQEVV  
 QSLNHCNVNLYKSLSEVKSEVEMV IKTGRQIVQKQKTENPKELDERV TALKLHYNELGAKVTERKQQLKCLKLSRMRKEMNVLTEWLAATDMELTKRSAVEGMPNSLDS  
 NLDSEVAWGKATQKEIEKQKVHLKSI TEVGEALKTVLGKKEETLVEDKLSLNSNWI VTSRAEELWLNLLLEEQKHMETFDDQNVHDITKWI IQADTLLEDESEKKKPPQKQEDVLLKRLKAEALNDIRPKVDSTRDQAANLMANRNGDHCRLKLEVPQISELNHRFAAISH  
 RIKTKGASIPLKELEQFNDSIQKLEPLEAEIQQGVNLKEEDFNKMDNEDNEGTVKELLRQGDNLQORITDERKREEIKIKQQLLQTKHNALKDLRSQRKKALES  
 HQWYQYKRQADLLKCLDDIEKLLASLPEPRDERKIEIDRELOKQKKEELNAVRRQAEGLSEDAAMA VEPTQIQLSKRWRREIESKFAQFRRLNFAQIHTVREETMM  
 VMTEDMPLLEISYVPSYTYLTIETHVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLQKQESLKNIKDLSLQSSGRIDI IHSKKTAAALQSATPVERVKLQEAALSQDFQ  
 WEKVNMYKDRQGRFDRSVEKWRFRHYDIKIFNQWLTEAEQFLRKTQIPENWEHAKYKYWLKELQDGI GQRQTVVTRTLNATGEEIIQQSSKTASILQEKLGSLNLRWQEVCK  
 QLSDRKRLLEEQKNILSEFQRDLNEFVWLWEADNIASIPLEPGKEQQLKLEKLEQVLLVEELPLRQGI LKQLNETGGPVLVSAIPSEEDQKLENKLDKQTLNQLWIK  
 VSRALPEKQGEIEAQLKDLGELQKLELLEEQNLHLLWLSPIRNLQIEIYNQPNQEGPFDVQETIEIAVQAKQPDVEEILSKGQHLYKEKPAQKLELLEDESKGAVK  
 AVNRLQELRAKQFDLAPGLTTIGASPTQTVTLVTPVVTKEIASKLEMPSSMLLEVPALADFNRAWTEITDWSLDDQVVKSRQVMVGDLEDINEMIKQKATMQ  
 DLEQRFPQLEELITAAQNLKNTSNQEAARTIITDRIERIQNQWDEVEHLLQNRQQNLEMLKDBSTQWLEAKEEAQVGLGQARAKLESWKEGFPYTVDAIKKIKETKQ  
 LAKDLRQAEVILKGSWQVGDLLIDSLQDHLKVKALRGEIAPLKENVSHVNDLARQLTTLGILQSLSPYNLSTLEDLNRWKLQVAVEDRVRQLHEAHRDFGPASQHTM  
 STSVQGPWERAI SPNKVPYIINHETQTTCDWHPKMTLEYQSLADLNNVRFSAYRTAMKLRRLQKALCLDLSLSAACDALDQHNLKQNDQPMDILQIINCLTTIYDR  
 LEQEHNNLVNPLCVDMLNWLNVYDTGRTRIRVLSFKGTGII SLCKAHLEKDYRYLQKQVASTGFCQDQRRLLGLLHDSIQIPRQLGEVASFSGSNI EPSSVRSK  
 QFANNKPEIEAALFLDWMRLPEQSMVWLPVLRHVAABETAKHQAKNICKECPIIGFRYRSLKHFNYDICQSCFFSGRVAKGHKMHYPMVEYCTPTTSGEDVRDFAK  
 VLKKNKFRKTRKYAFKHPRMGLPVQTVLEGDNMETPVTLINFWPVDSPASSQLSHDDTSHRIEHYASRLAEMENSNYSYLNDSISPNSIDDEHLLIQHYCQSLNQ  
 DSPLSQPRSPAQILISLESERGELERILADLEEENRNLQAEYDRLLKQQHEHKGSLSPSPPEMPTSPQSPRAELIAEAALLRQHKHGLPQLEARMQILEDHNKQLES  
 QLHRLRQLLEQPPQAEAKVNGTTVSSPSTSLQRSDSSQPMLLRVVGSQTSDSMGEEDLLSPPQDSTGLLEVMEQLNNSFPSSRGRNTPGKPMREDTM

**Protéine dystrophine mutée générée après délétion des exons 45 à 47 (3527 acides aminés, 408.66 kDa)**

MLWWEVEDCYEREDVQKKTFTTKVWNAQFSKFGKQH IENLFSDLQDGRRLDLLEGLTGQKLPKEKGS TRVHALNNVNKAALRVLQNNVNDLVNI GSTDIVDGNHKL T  
LGLIWN IILHWQVKNVMKNI MAGLQQTNSEK ILLSWVRQSTRNY PQVNVINFTT SWS DGLALNALI HSHR PDLFDWNSVVCQS SATQRLEHAFNIARYQLGIEKLLD  
PEDVDTTY PDKKSI LMYI TSLFQVLPQQVS IEA IQEVEMLPRPPKVTK EEHFQLHHQMHSYQQI TVSLAQGYERTSSPKPRFKSYAYTQAAYVTTSDPTRSPFP SQH  
LEAPEDKSFSSLMSEVNLD RYQTALEEVLSWLLSAEDTLQAQGEI SNDVVEVKDQFHTHEGYMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLIGTGKLS EDEETEVEQEMNLLN  
SRWECLRVASMEKQSNLHRVLM DLQNK LKELNDWLTKTEERTRKME EEP L GPDLEDLKRQVQHKV LQEDLEQE QVRVNSLTHM VVVVDESSGDHATAALEEQ LKV  
LGRDWANICRWTE DRWVLLQDI LLLKWRQLTEEQCLFSAWLS EKEDAVNKIHTTGFKDQNEMLSSQLK LAVLKADLEKKKQSMGKLYSLKQD LLS TLKNKSVTQKTEA  
WLDNFARCDWNLVQKLEKSTAQISQAVTTTQP SLTQTVMETVTVTVTREQLV KHQAQEE LPPPPQK KROI TVDSEIRKRLD VDI TELHSWITRSEAVLQSEPF AI  
FRKEGNFSDLKEKVNAIEREKA EKFRKLQDASRSAQALVEQMVNEGVNADSIKQASEQLNSRWIEFCQLL SERLNLWLEYQNNII AFYNLQQLQE QMTTTAENWLKIQ  
PTTPSEPTAIKSQLKICKDEVNRLSGLQPQIERLKIQSIALKEKGQGPMPFLDADFVAFTHNFHKQVFSVQAREKELQTFIDTFLPMRYQETMSAIRTWVQQSETKLS  
IPQLSVTDYEIMEQRLGELQALQSSLQEQQSGLYLLSTTVKEMSKAPSEISRKYQSEFEEIEGRWKKLSQLVEHCQKLEEQMNLKRKIQNHITQLKKWMAEVDV F  
LKEEWPALGDSEILKKQLKQCRLLVSDIQTIPSLNSVNEGGQKIKNEAEP EFASRLETELKELNTQWDHMCQQVYARKEALKGLEKTVSLQKDLSEMHEWMTQAE  
EYLERDFEYKTPDELQKAVEEMKRAKEEAQKQEKAVKLLTESVNSVIAQAPPVAQEALKELETLTNTYQWLCTRLNGKCKTLEEVWACWHELLSYLEKANKWNE  
VEFKLKTENIPGGAEEISEVLSLENLMRHS EDNPNQIRLLAQTLDGGVMDELINEELET FNSRWRLEHEAVRRQKLEQS IQSAQETKSLHLLEQSLTFIDK  
QLAAYIADKVDAAQMPQEAQKIQSDLTSHEISLEEMKHNQKGEAAQRVLSQIDVAQKQLQDVSMKFRFLQK PANFEQRLQESKMI LDEVKMHLPAL ETKSVQEVEV  
QSQNLNHCVNLYKSLSEVKSEVMV IKTGRQIVQKQK TENPKELDERV TALKLHYNELGAKVTERKQQL EKCLKLSRKRKEMNVLTEWLAATDMELTKRS AVEGMP S  
NLDSEVAWGKATQDLEIKQKVHLKSI TEVGEALKTVLGKKTIVLDEKLSLNSNWI AVTSRAEAWLNLLEEQKHMETFQDQNV DHI TKWII QADTLLEDESEK KFPQ  
KEDVLRKRLKAE LNDIRPKVDSTRDQAANLMANRGDHCRLKVEPQISELNHRFAAISHRIKTGKASIPLKELEQFNSDIQKLEPLEAEIQQGVNLKEEDFNKDMNED  
NEGTVKELLQRGDNLQQRITDERKREI KIKQQLLQTKHNALKDLRSQRKKALEISHQWYQKRQADDLKCLDDIEKKLASLEPEPRDERKIKEIDRELQKKKEEL  
NAVRRQAEG LSE DGAAMAVEPTQIQLSKRWREIESKFAQFRRLNFAQIHTVREETMMVTEDMPLEISYVPS TYLTEITHVSYQALLEVEQLLNA PDLC AKDFEDLFK  
QEESLKNIKDSLQSSGRIDI IHSKKTAAALQSATPVERVKLQEA LSQ LDFQWEKVNMYKDRQGRFDRSVEKWRRFHYDIKIFNQWLTEAEQFLRKTQIPENWEHAK  
YKWLKVSRALPEKQGEIEAQIKDLGQLEKLEDELEQLNHLLWLSPIRNQLEIYNQPNQEGPFDVQETEIAVQAKQPDVEEISLKGQHLYKEKPATQPVKRKLED  
LSSEWKA VNRLLQELRAKQPD LAPGLTTIGASPTQVTTLVTPQVVTKETAISKLEMPSSLMLEVPALADFNRAWTELTDWLSLLDQV IKSQRVMVGDLEDINEMI K  
QKATMQDLEQRRPQLEELITAAQN LKNKTSNQEARTITDRIERIQNQWDEVQEHQNRRLQNLNEMLKDSTQWLEAKEEAEQVLGQARAKLESWKEGPTVDAIQK I  
ITETKQLAKDLRQWQTNV D VANDLALKLLRDYSADDTRK VHMITENINASWRSIHKRVSERA ALEETHRLLQFPDLLEKFLAWL TEAETTANVLQDATR KERLE  
DSKGVKELMQWDLQGEIEAHTDVYHNLDENSQKILRSLEGSDDALDQHNLKDLRRLDNMNFKWSLEPRLKSLNIRSHLEASSDQKRLHSLQEBLLVQLKDELEDFL  
IGDFFPAVQKQNDVHRFAKRELKTEPVMINSTLETVRIFLTEQPLEGLEKLYQEPRELPPEERAQNVTRLLRQKAE EVNTWEKLNHLSADWQRKIDETLERLQELQ  
EATDEL DLKLRQAEVIKGSWQPVGDLLIDSLQDHLEKVKALRGEIAPLKENVSHVNDLARQLTTLGIQLS PYNLSTLEDLNTRWKLQVAVEDRVRLQEAHRDFGP  
ASQHF LSTSVQGPWERAISPNKVPYIINHETQTTCDWHPKMETYQLKADLN NVRFSAYRTAMKLRRLQKALCLDLSLAAACDADLQDQPHMELQIINCLTTIYDRLEQEHNNLVNVP  
LVDMLNVLNVDYDTRGTRIRVLSFKTGIISLCKAHLEDKRYLFFKQVASTGFCDQRRLLGLLHDSIQIPRQLGEVASFGGNSIEP SVRS CFQFANNKPEIEAAL  
FLDWMRLPEQSMVWLPVLRVAAAE TAKHQAKNCICECPIIGFPRYRSLKHFNYDICQSCFFSGRVAKGHKMHYPMVEYCTPTTSGEDVDRDFAKVLKKNFR  
TKRYFAKHPRMGYLPVQTVLEGDNMETPVTLINFWPVD SAPASSQLSHDDTHSR IEHYASRLAEMENSNGSYLNSISPNESIDDEHL LIQHY  
CQSLNQD SPSLQSPRSPAQILISLESEERGERLILADLEENRNLQAEYDR LKQ QHEHKGLSPLSPPEMPTSPQSPRDAELIAEAKLLRQHKGRLEARMQILEDH  
NKQLESQLHRLRQLLEQQA EAKVNGTTVSSPSTSLQRSDSSQPM LRRVGSQTSDSMGEEDLLSPQDTSTGLEEVMEQLNNSFPSSRGRNTPGKPMREDTM

**Protéine dystrophine mutée générée après délétion des exons 17 à 48 (1983 acides aminés, 228.57 kDa)**

MLWWEVEDCYEREDVQKKTFTTKVWNAQFSKFGKQH IENLFSDLQDGRRLDLLEGLTGQKLPKEKGS TRVHALNNVNKAALRVLQNNVNDLVNI GSTDIVDGNHKL T  
LGLIWN IILHWQVKNVMKNI MAGLQQTNSEK ILLSWVRQSTRNY PQVNVINFTT SWS DGLALNALI HSHR PDLFDWNSVVCQS SATQRLEHAFNIARYQLGIEKLLD  
PEDVDTTY PDKKSI LMYI TSLFQVLPQQVS IEA IQEVEMLPRPPKVTK EEHFQLHHQMHSYQQI TVSLAQGYERTSSPKPRFKSYAYTQAAYVTTSDPTRSPFP SQH  
LEAPEDKSFSSLMSEVNLD RYQTALEEVLSWLLSAEDTLQAQGEI SNDVVEVKDQFHTHEGYMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLIGTGKLS EDEETEVEQEMNLLN  
SRWECLRVASMEKQSNLHRVLM DLQNK LKELNDWLTKTEERTRKME EEP L GPDLEDLKRQVQHKV LQEDLEQE QVRVNSLTHM VVVVDESSGDHATAALEEQ LKV  
LGRDWANICRWTE DRWVLLQDI LLLKWRQLTEEQCLFSAWLS EKEDAVNKIHTTGFKDQNEMLSSQLK LAVLKADLEKKKQSMGKLYSLKQD LLS TLKNKSVTQKTEA  
WLDNFARCDWNLVQKLEKSTAQETIEIAVQAKQPDVEEISLKGQHLYKEKPATQPVKRKLEDLSSEWKA VNRLLQELRAKQPD LAPGLTTIGASPTQVTTLVTPQVV T  
KETAISKLEMPSSLMLEVPALADFNRAWTELTDWLSLLDQV IKSQRVMVGDLEDINEMI KQKATMQDLEQRRPQLEELITAAQN LKNKTSNQEARTITDRIERIQ  
NQWDEVQEHQNRRLQNLNEMLKDSTQWLEAKEEAEQVLGQARAKLESWKEGPTVDAIQK IITETKQLAKDLRQWQTNV D VANDLALKLLRDYSADDTRK VHMITEN  
INASWRSIHKRVSERA ALEETHRLLQFPDLLEKFLAWL TEAETTANVLQDATR KERLEDSKGVKELMQWDLQGEIEAHTDVYHNLDENSQKILRSLEGSDDA  
VLLQRLDNMNFKSELNRKSLNIRSHLEASSDQKRLHSLQEBLLVQLKDELEDFLIGDFFPAVQKQNDVHRFAKRELKTEPVMINSTLETVRIFLTEQPLEGLEKLYQEPRELP  
PEERAQNVTRLLRQKAE EVNTWEKLNHLSADWQRKIDETLERLQELQEATDEL DLKLRQAEVIKGSWQPVGDLLIDSLQDHLEKVKALRGEIAPLKENVSHVNDLARQ  
LTTLGIQLS PYNLSTLEDLNTRWKLQVAVEDRVRLQEAHRDFGPASQHF LSTSVQGPWERAISPNKVPYIINHETQTTCDWHPKMETYQLKADLN NVRFSAYRTAM  
KLRRLQKALCLDLSLAAACDADLQDQPHMELQIINCLTTIYDRLEQEHNNLVNVP LVDMLNVLNVDYDTRGTRIRVLSFKTGIISLCKAHLEDKRYLFFKQVASTGFCD  
QRRLLGLLHDSIQIPRQLGEVASFGGNSIEP SVRS CFQFANNKPEIEAALFLDWMRLPEQSMVWLPVLRVAAAE TAKHQAKNCICECPIIGFPRYRSLKHFNYDICQSC  
FFSGRVAKGHKMHYPMVEYCTPTTSGEDVDRDFAKVLKKNFR TKRYFAKHPRMGYLPVQTVLEGDNMETPVTLINFWPVD SAPASSQLSHDDTHSR IEHYASRLAEMENS  
NGSYLNSISPNESIDDEHL LIQHYCQSLNQD SPSLQSPRSPAQILISLESEERGERLILADLEENRNLQAEYDR LKQ QHEHKGLSPLSPPEMPTSPQSPRDAELIAEAKLLR  
QHKGRLEARMQILEDH NKQLESQLHRLRQLLEQQA EAKVNGTTVSSPSTSLQRSDSSQPM LRRVGSQTSDSMGEEDLLSPQDTSTGLEEVMEQLNNSFPSSRGRNTPGKPMREDTM

**Protéine dystrophine mutée générée après délétion des exons 3 à 17 (34 acides aminés, 4.21 kDa)**

MLWWEVEDCYEREDVQKKTFTTKVWNAQFSKVGK

**Protéine dystrophine mutée générée après délétion des exons 3 à 18 (2952 acides aminés, 342.55 kDa)**

MLWWEVEDCYEREDVQKKTFTTKVWNAQFSKAIEREA EKAEKFRKLQDASRSAQALVEQMVNEGVNADSIKQASEQLNSRWIEFCQLL SERLNLWLEYQNNII AFYNLQ  
LQE QMTTTAENWLKIQPTPSEPTAIKSQLKICKDEVNRLSGLQPQIERLKIQSIALKEKGQGPMPFLDADFVAFTHNFHKQVFSVQAREKELQTFIDTFLPMRYQET  
MSAIRTWVQQSETKLSIPQLSVTDYEIMEQRLGELQALQSSLQEQQSGLYLLSTTVKEMSKAPSEISRKYQSEFEEIEGRWKKLSQLVEHCQKLEEQMNLKRKIQ  
NHITQLKKWMAEVDVFLKEEWPALGDSEILKKQLKQCRLLVSDIQTIPSLNSVNEGGQKIKNEAEP EFASRLETELKELNTQWDHMCQQVYARKEALKGLEKTVS  
LQKDLSEMHEWMTQAE EYLERDFEYKTPDELQKAVEEMKRAKEEAQKQEKAVKLLTESVNSVIAQAPPVAQEALKELETLTNTYQWLCTRLNGKCKTLEEVWACWHEL  
LSYLEKANKWNEVEFKLKTENIPGGAEEISEVLSLENLMRHS EDNPNQIRLLAQTLDGGVMDELINEELET FNSRWRLEHEAVRRQKLEQS IQSAQETKSLHLLEQSLTF  
IDKQLAAYIADKVDAAQMPQEAQKIQSDLTSHEISLEEMKHNQKGEAAQRVLSQIDVAQKQLQDVSMKFRFLQK PANFEQRLQESKMI LDEVKMHLPAL ETKSVQEVEV  
QSQNLNHCVNLYKSLSEVKSEVMV IKTGRQIVQKQK TENPKELDERV TALKLHYNELGAKVTERKQQL EKCLKLSRKRKEMNVLTEWLAATDMELTKRS AVEGMP S  
NLDSEVAWGKATQDLEIKQKVHLKSI TEVGEALKTVLGKKTIVLDEKLSLNSNWI AVTSRAEAWLNLLEEQKHMETFQDQNV DHI TKWII QADTLLEDESEK KFPQ  
KEDVLRKRLKAE LNDIRPKVDSTRDQAANLMANRGDHCRLKVEPQISELNHRFAAISHRIKTGKASIPLKELEQFNSDIQKLEPLEAEIQQGVNLKEEDFNKDMNED  
NEGTVKELLQRGDNLQQRITDERKREI KIKQQLLQTKHNALKDLRSQRKKALEISHQWYQKRQADDLKCLDDIEKKLASLEPEPRDERKIKEIDRELQKKKEEL  
NAVRRQAEG LSE DGAAMAVEPTQIQLSKRWREIESKFAQFRRLNFAQIHTVREETMMVTEDMPLEISYVPS TYLTEITHVSYQALLEVEQLLNA PDLC AKDFEDLFK  
QEESLKNIKDSLQSSGRIDI IHSKKTAAALQSATPVERVKLQEA LSQ LDFQWEKVNMYKDRQGRFDRSVEKWRRFHYDIKIFNQWLTEAEQFLRKTQIPENWEHAK  
YKWLKVSRALPEKQGEIEAQIKDLGQLEKLEDELEQLNHLLWLSPIRNQLEIYNQPNQEGPFDVQETEIAVQAKQPDVEEISLKGQHLYKEKPATQPVKRKLEDLSSEWKA  
VNRLLQELRAKQPD LAPGLTTIGASPTQVTTLVTPQVVTKETAISKLEMPSSLMLEVPALADFNRAWTELTDWLSLLDQV IKSQRVMVGDLEDINEMI KQKATMQDLEQRRP  
QLEELITAAQN LKNKTSNQEARTITDRIERIQNQWDEVQEHQNRRLQNLNEMLKDSTQWLEAKEEAEQVLGQARAKLESWKEGPTVDAIQK IITETKQLAKDLRQWQTNV  
D VANDLALKLLRDYSADDTRK VHMITENINASWRSIHKRVSERA ALEETHRLLQFPDLLEKFLAWL TEAETTANVLQDATR KERLEDSKGVKELMQWDLQGEIEAHTDVY  
HNLDENSQKILRSLEGSDDALDQHNLKDLRRLDNMNFKWSLEPRLKSLNIRSHLEASSDQKRLHSLQEBLLVQLKDELEDFLIGDFFPAVQKQNDVHRFAKRELKTEPVM  
INSTLETVRIFLTEQPLEGLEKLYQEPRELPPEERAQNVTRLLRQKAE EVNTWEKLNHLSADWQRKIDETLERLQELQEATDEL DLKLRQAEVIKGSWQPVGDLLIDSLQ  
DHLEKVKALRGEIAPLKENVSHVNDLARQLTTLGIQLS PYNLSTLEDLNTRWKLQVAVEDRVRLQEAHRDFGPASQHF LSTSVQGPWERAISPNKVPYIINHETQTTCDW  
HPKMETYQLKADLN NVRFSAYRTAMKLRRLQKALCLDLSLAAACDADLQDQPHMELQIINCLTTIYDRLEQEHNNLVNVP LVDMLNVLNVDYDTRGTRIRVLSFKTGI  
ISLCKAHLEDKRYLFFKQVASTGFCDQRRLLGLLHDSIQIPRQLGEVASFGGNSIEP SVRS CFQFANNKPEIEAALFLDWMRLPEQSMVWLPVLRVAAAE TAKHQAKNCI  
CECPIIGFPRYRSLKHFNYDICQSCFFSGRVAKGHKMHYPMVEYCTPTTSGEDVDRDFAKVLKKNFR TKRYFAKHPRMGYLPVQTVLEGDNMETPVTLINFWPVD  
SAPASSQLSHDDTHSR IEHYASRLAEMENSNGSYLNSISPNESIDDEHL LIQHYCQSLNQD SPSLQSPRSPAQILISLESEERGERLILADLEENRNLQAEYDR LKQ QHE  
HKGLSPLSPPEMPTSPQSPRDAELIAEAKLLRQHKGRLEARMQILEDH NKQLESQLHRLRQLLEQQA EAKVNGTTVSSPSTSLQRSDSSQPM LRRVGSQTSDSMGEEDLL  
SPQDTSTGLEEVMEQLNNSFPSSRGRNTPGKPMREDTM

EGSDDAVLLQRRLDNMFNFKWSELRKKSLNIRSHLEASSDQWKRLHLSQELLVWLQQLKDDLELSRQAPIGGDFPAVQKQNDVHRAFKRELKTKPEVIMSTLETVRIFL  
TEQPLEGLEKLYQEPRELPPERAQNVTRLLRKAQAEVNTFEWEKLNLSADWQRKI DETLERLQELQEADELDLKLRAEVIKGSWQPVGDLLIDSLQDHLEKVK  
LRGEIAPLKENVSHVNDLARQLTTLGIQLSPYNLSTLEDLNRWKLQVAVEDRVRQLHEAHRDFGPASQHFLLSTSVQGPWERAISPKNVPIYINHETQTTCDWHPK  
MTELYQSLADLNNVRFSAYRTAMKLRRLQKALCLDLSLSAACDALDQHNLKQNDQPMDI LQI INCLTTI YDRLEQEHNNLVNPLCVDMCLNWLNNVYDTGRTGRI  
RVLSFKTGI I SLCKAHLEDK YRYL FKQVASTGFCQRRLLGLLHDSIQIPRQLGEVASFGGSI EP SVRSCFQFANNKPEIEAALFLDWMRLEPQSMVWLPVLRHV  
AAEATAKHQAACNICKECPIIGFRYRSLKHFNYDICQSCFFSGRVAKGHMKHYPMEVYCTPTTSGEDVRDFAKVLKKNFRTKRYFAKHPRMGYLPVQTVLEGNMET  
PVTLINFWPVDSPASSPQLSHDDTHSRIEHYASRLAEMENSNGSYLNDISPNESIDDEHLLIQHYCQSLNQDSPLSQPRSPAQLIISLESEERGELERILADLEE  
ENRNLQAEYDRLKQHEHKLGLSPLSPPEMMPTSPQSPRDAELIAEAKLLRQHKGRLEARMQIILEDHKNQLESQHLRLRQLLEQPQAEAKVNGTTVSSPSTSLQRSD  
SSQPMLLRVVGSTSDSMGEEDLLSPQDSTGLLEEVMEQLNNSFPSSRGRNTPGKPMREDTM

### Protéine dystrophine mutée générée après délétion de l'exon 46 (2220 acides aminés, 258.20 kDa)

MLWEEVEDCYEREDVQKKTFTKWNVAQFSKFGKQH IENLFSDLQDGRRLDLEGLTGQKLPKEKSTRVHALNNVNKAALRVLQNNVNDLVNIGSTDIVDGNHKL  
LGLIWNII LHWQKVNVMKNI MAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNY PQVNVINFTT SWS DGLALNALI HSHR PDLFDWNSVVCQASATQRLEHAFNIARYQLGIEKLLD  
PEDVDTTYPDKKSILMYITSLFQVLPQQVSI EAIQEVEMLPRPKVTKEEHFQLHHQMHSYQQITVSLAQGYERTSSPKPRFKSYAYTQAAYVTTSDPTRSPFPQ  
LEAPEDKSFSSLMSEVNLDRYQTAL EEVLSWLLSAEDTLQAQGEISNDVEVVKDQFHTHEGYMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLIGTGKLESEDEETEVEQEMNLLN  
SRWECRLVASMESQSNLHRVLMDLQNKLELNDWLTKTEERTKMEEEP LGPDELDLKRQVQKHVLEQEDLEQEVVRVNSLTHMNVVVDSESSGHATAALEEQKLV  
LGRWANICRWTEDRWLLQDILLKWQLTEEQCLFSAWLESEKEDAVNKIHTTGFKDQNEMLSSQLKAVLKADEKKSQMSGKLYSLKQDLSLTKNKSVTQKTEA  
WLDNFARCDNLVQKLEKSTAQISQAVTTTQPSTLQTTVMETVTVTTTREQIILVKAHQEELPPPPQKRRQITVDSEIRKRLDVIDTELHSWITRSEAVLQSPFAI  
FRKEGNFSDLKEKVNAIEREKA EKFRKLQDASRAQALVEQMVNEGVNADSIKQASEQLNSRWIEFCQLLSERLNWLEYQNNIIAFYNQLQLEQMTTTAENWLKIQ  
PTTPSEPTAIKSQLKICKDEVNRLSGLQPQIERLKIQSI ALKEKGGQPMFLDADFVAFTNHFKQVSDVQAREKELQTFDTPPMRYQETMSAIRTWVQOSETKLS  
IPQLSVTDYEIMEQRLGELQALQSSLEQQSGLYYLSTTVKEMSKKAPSEISRKYQSEFEIEGRWKKLSQLVEHCQKLEEQMNLKRIQNHITLKKWMAEVDVF  
LKEEWPALGDSEILKKQLKQCRLLVSDIQTIPSLNSVNEGGQKIKNEAEPEFASRLETELKELNQWDMCQQVYARKEALKGGLEKTVSLQKDLSEMHEWMTQAE  
EYLERDFEYKTPDELQKAVEEMKRAKEEAQQKEAKVKLLTESVNSVIAQAPPVAQEALKELETLTNYQWLCTRLNGCKTLEEVWACWHELLESYLEKANKWLNE  
VEFKLKTENIPGGAEEISEVLDSENLMRHSEDNPNQIRILAQTLTDGGVMDLINEELETFNSRWRELHEEAVRRQKLEEQS IQSAQETEKSLHLIQESLTFIDK  
QLAAYIADKVDAQMPQEAQKIQS DLT SHEISLEEMKHNQKGEAAQRVLSQIDVAQKQLQDVSMKFRFLFKPANFEQRLQESKMI LDEVKMHLPALETKSVEQEVV  
QSQNLHCVNLYKSLSEVKSEVEMVIKTGRQIVQKQ TENPKELDERVTALKLHYNELGAKVTERKQLEKCLKLSRMRKEMNVLTEWLAATDMELTKRSAVEGMPS  
NLDSEVAWGKATQKIEKQKVHLKSI TEVGEALKTVLGKKE TLVEDKLSLNSNWI AVTSRAEELNLLLEYQKHMETFQNDVHI TKWI IQADTLDESEKPKPQ  
KEDVLKRLKAELNDIRPKVDSTRDQAANLMANRGDHCRKLVPEQISELNHRFAAISHR IKTGKASIPLKELEQFNSDIQKLEPLEAEIQQGVNLEKEDFNKDMNED  
NEGTVKELLQRGDNLQRIITDERKREIKIQQLLQTKHNALKDLRSQRKKALEISHQWYQYKQADDDLLKCLDDIEKKLASLPEPRDERKIKEIDRELQKKKEEL  
NAVRRQAEGLSEDGAAMAVEPTQIQLSKRWREIESKFAQFRRLNFAQIHTVREE TMMVMTE DMPL EISYVPSYLTETI THVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLFK  
QEESLKNIKDSLQSSGRIDIIHSSKTAALQSATPVERVKLQEALSQDFQWEKVNMYKDRQGRFDRSVEKWRRFHYDIKIFNQWLTEAEQFLRKTQIPENWEHAK  
KYWYLKELQDGIQRQTVVRTL NATGEEIIQSSKTDASILQEKLSLNLRWQEVCKQLSDRKKSYWWSKCP CAREFSNN