

Stratégie diagnostique des dystrophinopathies

S. NOUIOUA ⁽¹⁾, A. CHARALLAH ⁽²⁾,
L. ALI PACHA ⁽¹⁾, M. BENAHMED ⁽³⁾,
T. BENHASSINE ⁽²⁾, M. TAZIR ⁽¹⁾

(1) Service de Neurologie CHU Mustapha Bacha, Alger

(2) Laboratoire de Biologie Moléculaire Université de Bab Ezzouar

(3) Service d'Anatomopathologie CPMC Alger.

Résumé

Les dystrophinopathies représentent l'ensemble des affections musculaires liées à des mutations dans le gène de la dystrophine. Ce sont des pathologies récessives liées à l'X dont les formes les mieux connues sont les dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker, leur spectre clinique inclut actuellement les cardiomyopathies isolées, l'intolérance à l'effort, les femmes porteuses symptomatiques et hyperCKémie isolée. La myopathie de Duchenne se révèle dans la petite enfance par des chutes ou une marche dandinante traduisant un déficit musculaire proximal. L'évolution est rapidement progressive, avec une atteinte cardiaque et respiratoire quasi constantes ; le décès survient souvent avant 20 ans. La dystrophie musculaire de Becker se révèle à l'adolescence ou plus tardivement. Les créatines kinases sont toujours très élevées. La biopsie musculaire montre classiquement un processus dystrophique comportant de nombreuses nécroses et une involution fibroadipeuse du muscle. L'immunohistochimie, réalisée avec trois anticorps antidystrophine, permet d'établir le diagnostic en montrant une absence quasi totale de la dystrophine chez les patients de type Duchenne, tandis que chez les patients de type Becker, on observe soit une diminution de la quantité de dystrophine, soit une absence ou une diminution de marquage avec l'un des trois anticorps. Dans tous les cas, le diagnostic doit être confirmé par un western blot. Les altérations génétiques les plus fréquemment observées sont les délétions des exons. Il existe une bonne corrélation génotype/phénotype basée sur le respect ou non du cadre de lecture et le rôle structural de la région de la protéine concernée par la délétion. Les thérapeutiques actuelles sont pour l'instant essentiellement symptomatiques mais les thérapies génétiques et cellulaires offrent des perspectives prometteuses.

>>> Mots-clés :

Dystrophinopathies, Duchenne, Becker Immunohistochimie, western blot, délétion.

Abstract

The dystrophinopathies represent all the muscular affections linked to mutations in the dystrophin gene. These are X-linked recessive diseases whose best-known forms are Duchenne and Becker muscular dystrophies, their clinical spectrum currently includes isolated cardiomyopathies, exercise intolerance, symptomatic carrier women, and isolated hyperCKemia. Duchenne muscular dystrophy is revealed in infancy by falls or a waddling walk reflecting a proximal muscular deficit. The evolution is rapidly progressive, with almost constant cardiac and respiratory involvement; death often occurs before the age of 20. Becker's muscular dystrophy is revealed in adolescence or later. Creatine kinases are always very high. Muscle biopsy classically shows a dystrophic process with numerous necrosis and a fibroadipous involution of the muscle. Immunohistochemistry, carried out with three anti-dystrophin antibodies, makes it possible to establish the diagnosis by showing an almost total absence of dystrophin in Duchenne-type patients, whereas in Becker patients, an absence or a decrease in labeling with one of the three antibodies. In all cases, the diagnosis must be confirmed by western blot. The most frequently observed genetic alterations are exon deletions. There is a good genotype / phenotype correlation based on whether or not the reading frame is respected and the structural role of the region of the protein concerned by the deletion. Current therapies are currently mainly symptomatic but genetic and cellular therapies offer promising prospects.

>>> Key-words :

Dystrophinopathies, Duchenne, Becker Immunohistochemistry, western blot, deletion.

Introduction :

Les dystrophinopathies représentent l'ensemble des affections liées à des mutations dans le gène de la dystrophine. Les formes les plus connues sont les dystrophies musculaires de Duchenne (DMD) et de Becker (BMD), mais d'autres formes de présentations cliniques atypiques sont maintenant décrites telles que les cardiomyopathies isolées, l'intolérance à l'effort, les femmes porteuses symptomatiques et hyperCKémie isolée. La DMD, dans sa forme classique, a été décrite en 1868 par Duchenne de Boulogne, mais « l'histoire de la dystrophine » connaît un rebondissement majeur à la fin des années 1980 lorsque Monaco et Hoffman identifient en Xp21.2, par clonage positionnel, le gène impliqué dans cette affection^[1,2]. L'identification du gène leur permet de remonter vers la protéine, qu'ils nomment alors « dystrophine ». Il s'agit de pathologies de transmission récessive liée à l'X. La DMD est caractérisée par une absence quasi totale de dystrophine dans le muscle, tandis que la BMD est liée à une réduction de la quantité de dystrophine ou à la production d'une dystrophine de taille anormale.

Description clinique :

Dystrophie de Duchenne

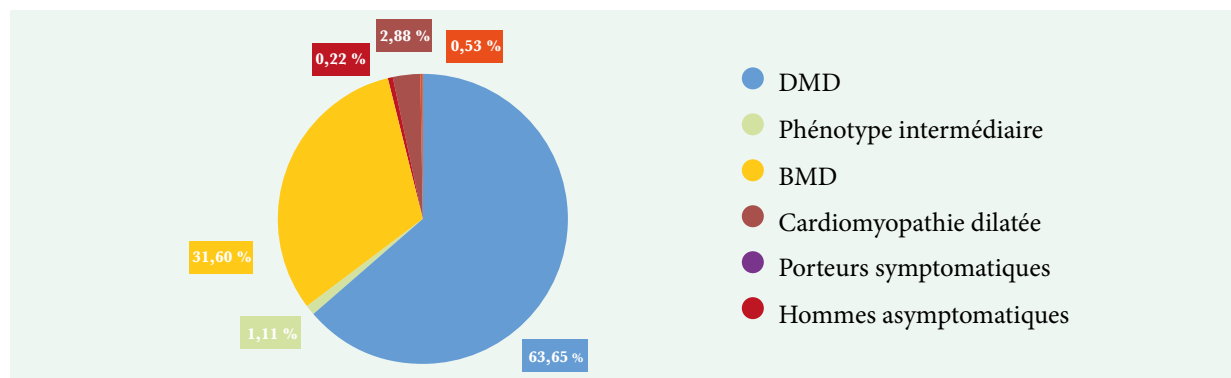
C'est la plus fréquente et la plus grave des myopathies de l'enfant, affectant 1 sur 3.500 à 6.000 garçons naissants par an, débutant classiquement vers 3-4 ans par des difficultés motrices aux membres inférieurs avec pseudohypertrophie des mollets, s'accroissant progressivement jusqu'à la perte de la marche autour de l'âge de 10 ans, avant 13 ans dans la grande majorité des cas. Apparaissent ensuite des atteintes musculaires axiales (cypho-scoliose), respiratoire (insuffisance respiratoire restrictive) et cardiaque (cardiomyopathie dilatée) évolutives qui font toute la gravité de la maladie et sont souvent responsables du décès en général au cours de la 3^{ème} décennie. Une atteinte cognitive de sévérité variable est plus fréquemment observée dans les DMD que dans les BMD.

Myopathie de Becker

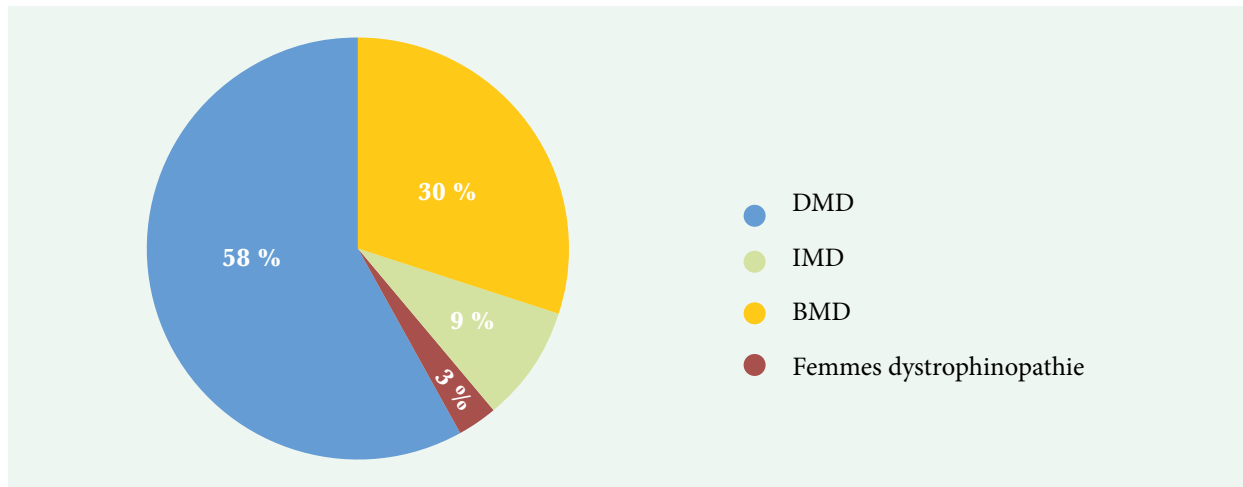
En 1955, Becker décrit une forme de gravité moindre, également liée à l'X débutant vers 10 ans, de début plus tardif à l'adolescence ou l'âge adulte, avec difficultés motrices et hypertrophie musculaire, mais moins évolutive avec parfois une impotence fonctionnelle pouvant être majeure et aller jusqu'à la perte de la marche, entre 40 et 60 ans. En revanche, une atteinte cardiaque est constante chez les BMD, devenant patente à partir de la 4^{ème} décennie de vie, de sévérité variable pouvant nécessiter parfois une transplantation cardiaque. L'atteinte respiratoire est aussi présente mais beaucoup moins sévère et plus tardive que dans la DMD.

Formes particulières

La DMD et la BMD apparaissent ainsi comme les deux extrêmes du spectre phénotypique des dystrophinopathies. Entre ces deux entités, se retrouvent un certain nombre de patients dits « intermédiaires », perdant souvent la marche après 13 ans et avant 16 ans^[3]. Exceptionnellement, certains patients, porteurs de certaines mutations, développent une cardiomyopathie dilatée sans atteinte musculaire squelettique associée, avec cependant une élévation des CPK. D'autres développent une forme « pseudométabolique » avec intolérance à l'effort, rhabdomyolyse et hypertrophie musculaire ou élévation isolée des CPK (graphe 1, 2). Enfin, bien qu'affectant théoriquement les garçons, certaines femmes porteuses hétérozygotes pour la mutation DMD peuvent manifester des symptômes en cas de translocation équilibrée impliquant le chromosome X ou d'inactivation réciproque non équilibrée des chromosomes X. Dans ces cas, peut être observée une atteinte cardiaque isolée ou musculo-cardiaque ressemblant souvent à celle observée dans la BMD et plus rarement de la DMD (on parle alors de « Duchenne féminin »).



Graphique 1 : Différents phénotypes des dystrophinopathies dans la banque UMD DMD Mise à jour 2009 (Tuffery-Giraud et al. 2009)



Graphique 1 : Différents phénotypes des dystrophinopathies dans notre cohorte hospitalière de 100 patients.

Bilan paraclinique :

1. Taux sérique de la créatine kinase (CK) : Le taux de CK peut être extrêmement élevé (50 fois la normale), en raison de la lyse musculaire massive. Cependant, en fin d'évolution, lorsque le nombre de fibres musculaires restantes est faible le taux de CK peut être beaucoup plus faible. Classiquement, on ne retrouve jamais de taux de CK normal dans les examens antérieurs du patient.

2. L'électromyogramme (EMG) : L'électromyogramme est très utilisé chez l'adulte à la recherche d'anomalies myogènes dans les muscles proximaux. Il est très intéressant pour le diagnostic différentiel avec les affections neurogènes et en particulier les formes adultes d'amyotrophie spinale. Aux stades précoces, on observe des potentiels polyphasiques, tandis que l'aspect franchement myogène apparaît plus tardivement. La présence d'une activité spontanée est fréquente.

3. Imagerie musculaire (scanner ou IRM) : Également plus utilisée chez l'adulte où les tableaux cliniques sont moins évocateurs. Le scanner musculaire confirme que l'on est face à une pathologie dystrophique, en montrant une hypodensité sélective de certains muscles, en particulier le grand fessier et le quadriceps qui sont précocement et sévèrement touchés. L'IRM musculaire est préférentiellement utilisée chez l'enfant. Si elle n'est pas vraiment utile pour le diagnostic, elle a l'avantage de permettre de suivre l'évolution de la maladie. Aux stades précoces, elle est le plus souvent normale. Progressivement, on observe une involution adipeuse des muscles [4].

4. Autres examens : Bilan cardiaque avec échocardiographie annuelle à partir de 10 ans, explorations fonctionnelles respiratoires, ostéodensitométrie, radio de la colonne vertébrale.

5. Biopsie musculaire :

L'étude de la biopsie musculaire apparaît comme l'étape essentielle permettant dans un premier temps de cibler efficacement l'analyse moléculaire. Idéalement plusieurs techniques doivent être utilisées parallèlement :

- Étude histologique : non spécifique au début de l'atteinte, avec une variation de taille des fibres, des foyers de nécrose et de fibres en régénération puis apparition de dépôts graisseux et de tissu conjonctif ;
- Étude par immunodétection à l'aide d'anticorps ciblant différents domaines de la protéine (figure 1) ;
- Méthode histopathologique avec marquage immunohistochimique (fluorescence ou peroxydase) sur des coupes transversales pour bien visualiser la taille des fibres et le sarcolemme. Cette méthode ne permet d'étudier qu'un anticorps à la fois [5] ;
- Méthode biochimique par immunotransfert (*Western blot*) à partir d'un extrait musculaire et utilisant simultanément un mélange d'anticorps dirigés contre différents épitopes de la dystrophine mais aussi contre des partenaires secondairement impliqués (figure 2). La quantification précise aussi bien par immunohistochimie que par *Western Blot* reste délicate mais indispensable [6] pour : établir une corrélation entre l'impact de l'anomalie moléculaire sur le taux résiduel de dystrophine, présageant d'une évolution clinique plus ou moins rapide ;
- Connaître l'état de base du muscle du patient avant tout essai thérapeutique, la dystrophine servant alors de biomarqueur.

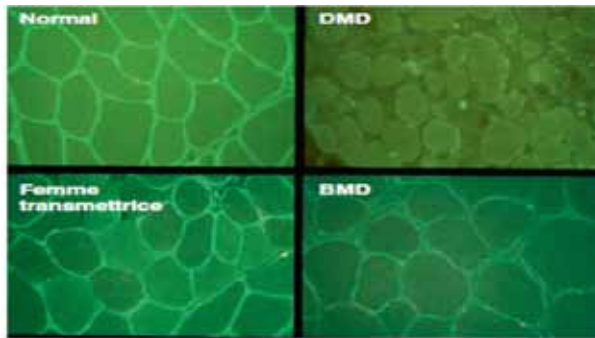


Figure 1 : Immunohistochimie

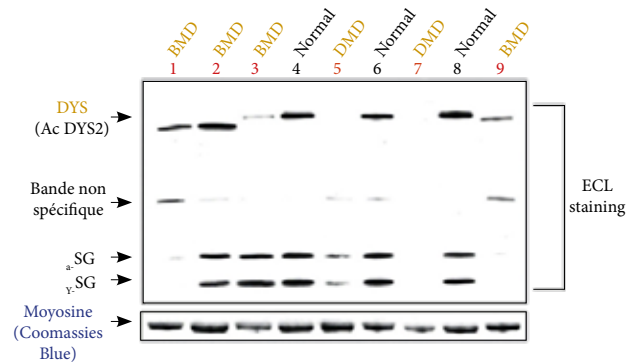


Figure 2 : Western blot : absence de la dystrophine

Aspects génétiques des dystrophinopathies :

Du gène DMD à la protéine dystrophine

1. Le gène DMD :

Le gène DMD (OMIM*300377) localisé sur le bras court du chromosome X (Xp21.2-p21.1), est le plus grand gène humain connu à ce jour. Avec une taille de 2,2 millions de paires de base, il occupe 0,1 % du génome humain et 1,5 % de la séquence du chromosome X.

L'ARN messager long de 14 kilobases (kb) est composé de 79 exons, qui ne constituent que 0,6 % de la séquence globale du gène [7]. Ainsi, plus de 99 % du gène est constitué d'introns, souvent de très grande taille (> 200 kb). La taille et la structure exceptionnelle du gène

DMD contribuent au taux particulièrement élevé de mutations rapportées (1/10.000 gamètes). Un tiers des cas sporadiques de DMD correspondent à des mutations de novo. L'expression du gène est sous le contrôle de sept promoteurs de tissus spécifiques. L'isoforme cérébrale (promoteur Dp427B) dans les neurones du cortex et de l'hippocampe, l'isoforme musculaire (promoteur Dp427M) exprimée majoritairement dans les muscles squelettiques et cardiaques, et l'isoforme spécifique des cellules de Purkinje (promoteur Dp427P). Des isoformes plus courtes nommées en fonction de leur masse moléculaire : Dp260 (rétine), Dp140 (cerveau), Dp116 (cellules de Schwann) et Dp71 (général) sont sous le contrôle de quatre promoteurs internes situés respectivement dans les introns 29, 44, 55 et 62.

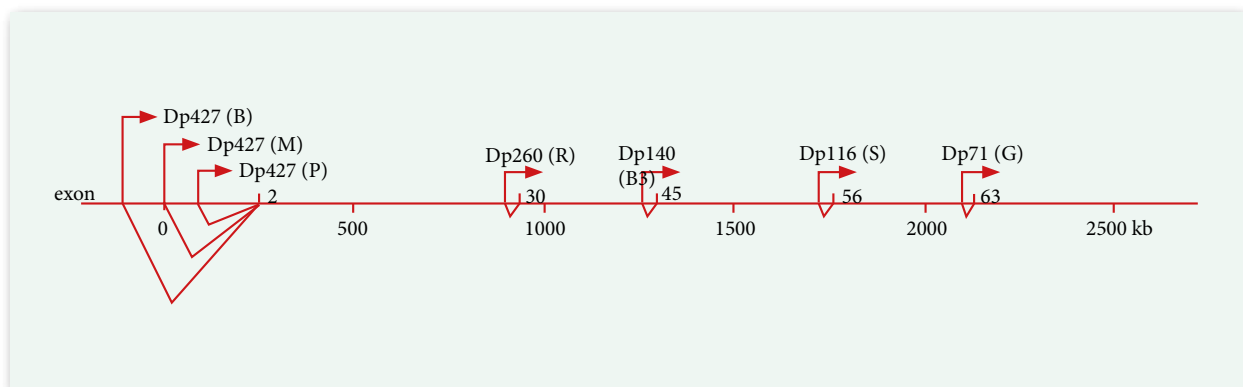


Figure 3 : Organisation du gène de la dystrophine humaine.

Ce schéma représente le gène DMD humain de 2,5 megabases. Les promoteurs connus sont symbolisés par des flèches ; et les exons auxquels les transcrits correspondants se raboutent sont marqués en bleu. Les sept promoteurs (B : brain, M : muscle, P : Purkinje, R : retina, B3 : brain3, S : Schwann cells, G : general). Les promoteurs B, M et P produisent les isoformes longues de la dystrophine, respectivement Dp427b, Dp427m et Dp427p. Les promoteurs R, B3, S et G produisent les isoformes courtes de la dystrophine, respectivement Dp260, Dp140, Dp116 et Dp71. (Blake et al, 2007)

2. La protéine : la dystrophine musculaire

La dystrophine est une grande protéine de 3.685 acides aminés (427kDa) en forme de bâtonnet qui possède

une grande analogie structurale avec la spectrine et l'alpha-actinine. Elle est composée de quatre domaines distincts (figure 4). La dystrophine est localisée à la face interne du sarcolemme. Elle fait partie d'un large complexe de protéines et de glycoprotéines (DGC) qui forment un pont entre le cytosquelette (filaments d'actine) et la matrice extracellulaire, assurant un rôle structural important dans le maintien de l'intégrité membranaire durant les cycles répétés de contraction musculaire. En dehors de ce rôle mécanique, le DGC est également impliqué dans la signalisation cellulaire via l'interaction de plusieurs de ses composants, notamment la dystrophine, avec des protéines de signalisation telles que l'oxyde nitrique synthétase neuronale (nNOS), la Grb2 et la caveoline-3.

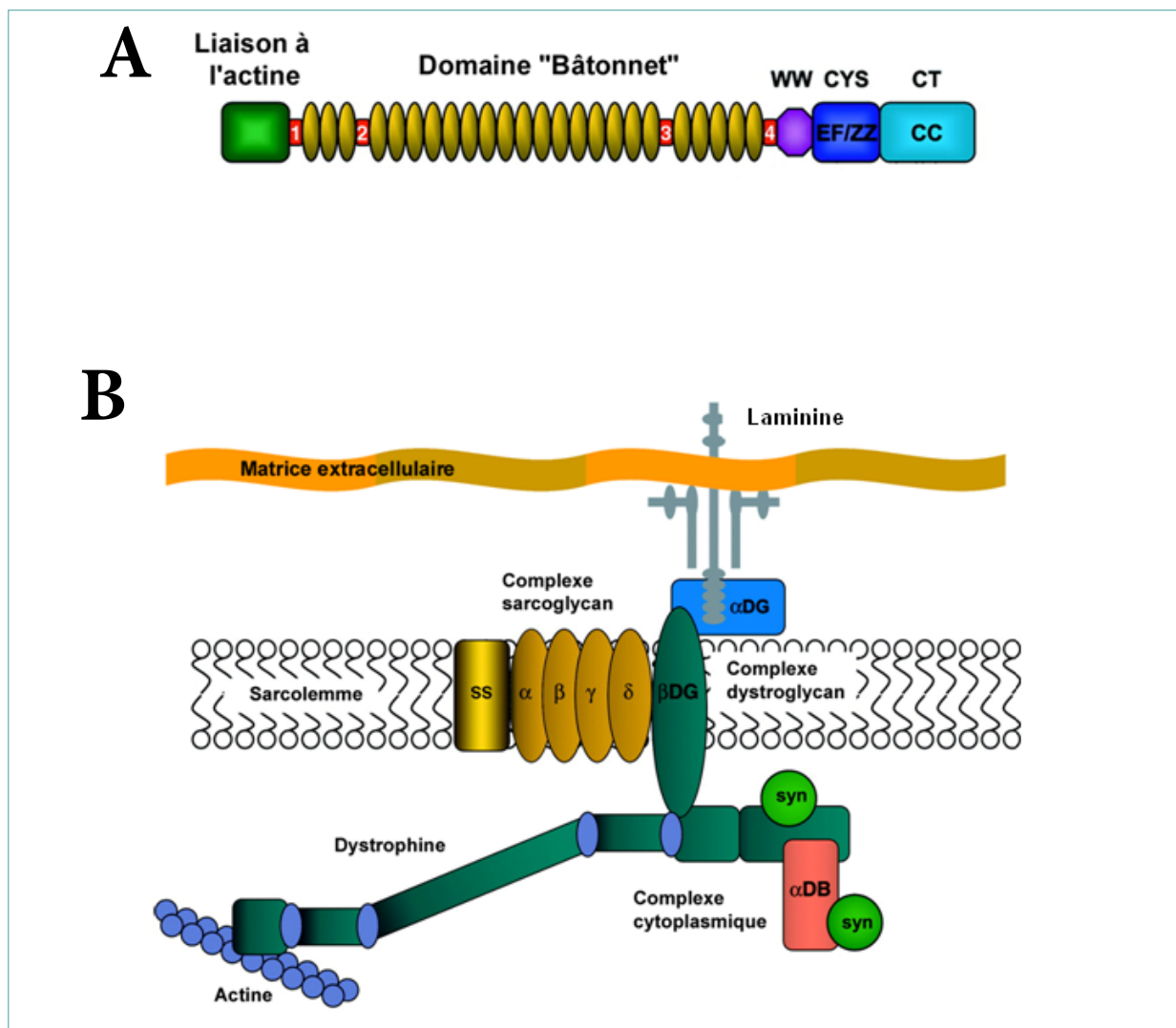


Figure 4 : Structure de la dystrophine avec ses différents domaines. En A, les différents domaines de la dystrophine sont montrés. Le domaine de liaison à l'actine se situe en N-terminale. Il est suivi de répétitions spectrines qui donnent une structure en «bâtonnet» à la molécule. Quatre domaines «hinge» interrompent ces répétitions. Par la suite, les domaines WW et EF/ZZ fournissent un site de liaison à la β -dystroglycane. La partie C-terminale (CT) est constituée d'un domaine parfois nommé «Coil-Coil» (CC). En B, le complexe de la dystrophine et ses divers constituants. (Blake et al., 2002). À l'extrémité C-terminale, la dystrophine est associée à des protéines cytoplasmiques et membranaires, formant ainsi le complexe dystrophine-glycoprotéines. (D'après Wells et al., 2002).

Diagnostic moléculaire :

Techniques actuelles et recommandations

La confirmation moléculaire du diagnostic est indispensable pour permettre un conseil génétique adapté. Une caractérisation complète de la mutation du gène (bornes de la délétion ou de la duplication, position exacte de la mutation ponctuelle, détermination de l'impact des mutations d'épissage sur les transcrits) est nécessaire pour prédire l'effet sur le cadre de lecture et la synthèse de dystrophine, facteur déterminant de la variabilité phénotypique dans les dystrophinopathies.

La première étape du diagnostic moléculaire repose sur la recherche d'une délétion, type de mutation le plus fréquent (graphes 3 et 4). La méthode la plus utilisée jusqu'à ces dernières années était la PCR (polymerase chain reaction) multiplex permettant de détecter près de 98% des délétions du gène DMD grâce à l'analyse de 18 exons répartis dans les 2 points chauds délétionnels (Chamberlain et al. 1988 ; Beggs et al. 1990). Cependant, elle ne permet pas toujours de caractériser les bornes des délétions car elle ne teste pas tous les exons. Cette technique a été progressivement remplacée par les nouvelles techniques de dosage génique notamment la technique MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*)^[8].

Recherche des lésions les plus fréquentes et les plus « faciles » à mettre en évidence : les délétions et duplications

d'exons MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*)

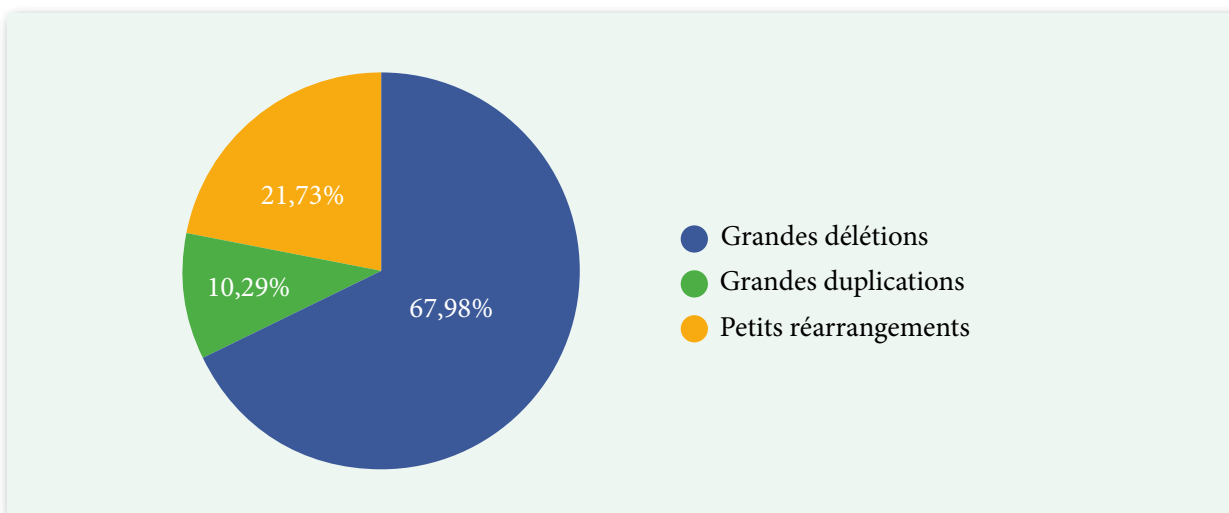
Cette technique permet d'évaluer le nombre de copies pour chacun des 79 exons en utilisant des sondes standardisées mettant en évidence aussi bien les délétions que les duplications qui représentent 80% des anomalies génétiques observées, ceci a été rapporté dans la banque française de données des mutations du gène DMD. Dans notre série hospitalière nous notons les mêmes résultats. Cette technique, rapide et fiable est l'une des plus utilisées en routine, aussi bien pour les cas index, que pour la recherche de statut des femmes à risque mais ne permet pas de détecter les mutations ponctuelles.

Recherche des mutations ponctuelles : Séquençage des 79 exons par la technique « classique » de PCR puis séquençage Sanger

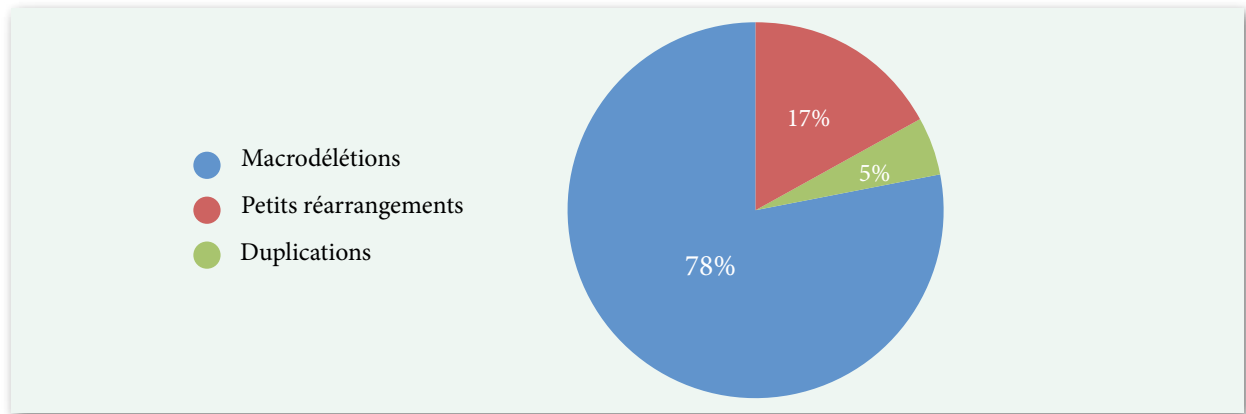
Technique longue et coûteuse mais efficace, servant de technique de référence pour valider des résultats fournis par les nouvelles techniques de séquençage à haut débit.

NGS (*New generation sequencing*)

Séquençage massif en parallèle des 79 exons du gène DMD. Cette analyse permet de mettre en évidence les mutations ponctuelles, les petites insertions /délétions mais aussi les défauts quantitatifs tels que les délétions ou duplications d'un ou plusieurs exons.



Graphique 3 : Distribution des grands réarrangements (Délétions et duplications) dans la banque UMD DMD. Mise-à-jour 2009 (Tuffery-Giraud et al. 2009)



Graphique 4 : Profil mutationnel dans notre série hospitalière

Corrélations génotype-phénotype : la règle dite du cadre de lecture

Le modèle proposé par Anthony Monaco en 1988^[9] basé sur la conservation ou non d'un cadre ouvert de lecture dans le transcrit muté dystrophine reste la référence pour expliquer la différence phénotypique entre les deux formes alléliques, DMD et BMD. Ainsi, les mutations responsables de l'apparition d'un codon stop conduisant à l'absence de dystrophine dans le muscle des patients et un phénotype sévère de type Duchenne. En revanche, les mutations qui maintiennent un cadre ouvert de lecture dans le transcrit muté permettent la synthèse en quantité normale ou réduite, d'une dystrophine tronquée partiellement fonctionnelle, conduisant à un phénotype plus modéré de type Becker. Bien qu'il existe des exceptions, ce modèle s'applique à 96 % des mutations DMD et 92 % des mutations BMD^[10].

Conseil génétique :

Lorsqu'un cas index de dystrophinopathie est découvert dans une famille, il est important dans un premier temps de définir le statut de la mère (conductrice ou non) car dans 1/3 des cas il s'agit d'une néo mutation (mutation de novo) ce qui permet de préciser le conseil génétique pour elle-même et le reste de la famille. Si l'altération génétique découverte chez le cas index n'est pas portée par sa mère, il s'agit d'une néo mutation, le reste de la famille est a priori indemne de la mutation mais la mère du cas index présente quand même un faible risque de récurrence en raison de la possibilité d'une mosaïque germinale. Dans les autres cas, il est important de dépister les autres garçons atteints ainsi que les femmes conductrices, avec leur accord et dans le respect des lois de bioéthique.

Le dépistage des femmes conductrices permet outre le suivi cardiologique, de leur proposer un diagnostic préna-

tal. Sans recourir aux techniques de biologie moléculaire, le dosage des CK est un bon moyen de dépister les garçons atteints et une grande partie des femmes conductrices.

Stratégie diagnostique :

La démarche diagnostique établie depuis de nombreuses années s'est progressivement modifiée avec les nouvelles techniques d'analyse du muscle et du gène⁽¹²⁾. Des recommandations ont été récemment publiées par des experts internationaux dans l'objectif d'aider les professionnels de santé à fournir aux patients et à leur famille un diagnostic rapide et fiable, à faciliter l'information et l'éducation des familles et à proposer des prises en charge adaptées⁽¹³⁾. Le diagnostic de DMD doit être suspecté dans trois circonstances :

- Le plus souvent la présence d'une fonction musculaire anormale chez un garçon,
- La découverte d'une augmentation des CK sériques ou celle d'une augmentation des transaminases hépatiques produites par le muscle comme par le foie,
- Des signes cliniques non musculaires, comme un retard de langage ou des troubles cognitifs.

Devant tout signe clinique évocateur ou devant une augmentation des transaminases hépatiques, un dosage de CK sérique, test simple, sensible et peu onéreux, doit être réalisé.

Une augmentation signe l'origine musculaire des troubles, l'importance de l'élévation à 50-200 fois la normale étant fortement évocatrice d'une DMD. La confirmation du diagnostic repose sur 2 examens (figure 5) : la biopsie musculaire et l'analyse moléculaire du gène DMD qui permettent d'éliminer les diagnostics différentiels tels que les dystrophies musculaires autosomiques récessives notamment la gamma sarcoglycanopathie fréquente au Maghreb et surtout la maladie de pompe qui peut simuler un tableau de myopathie de Duchenne et pour laquelle il existe un traitement enzymatique substitutif.

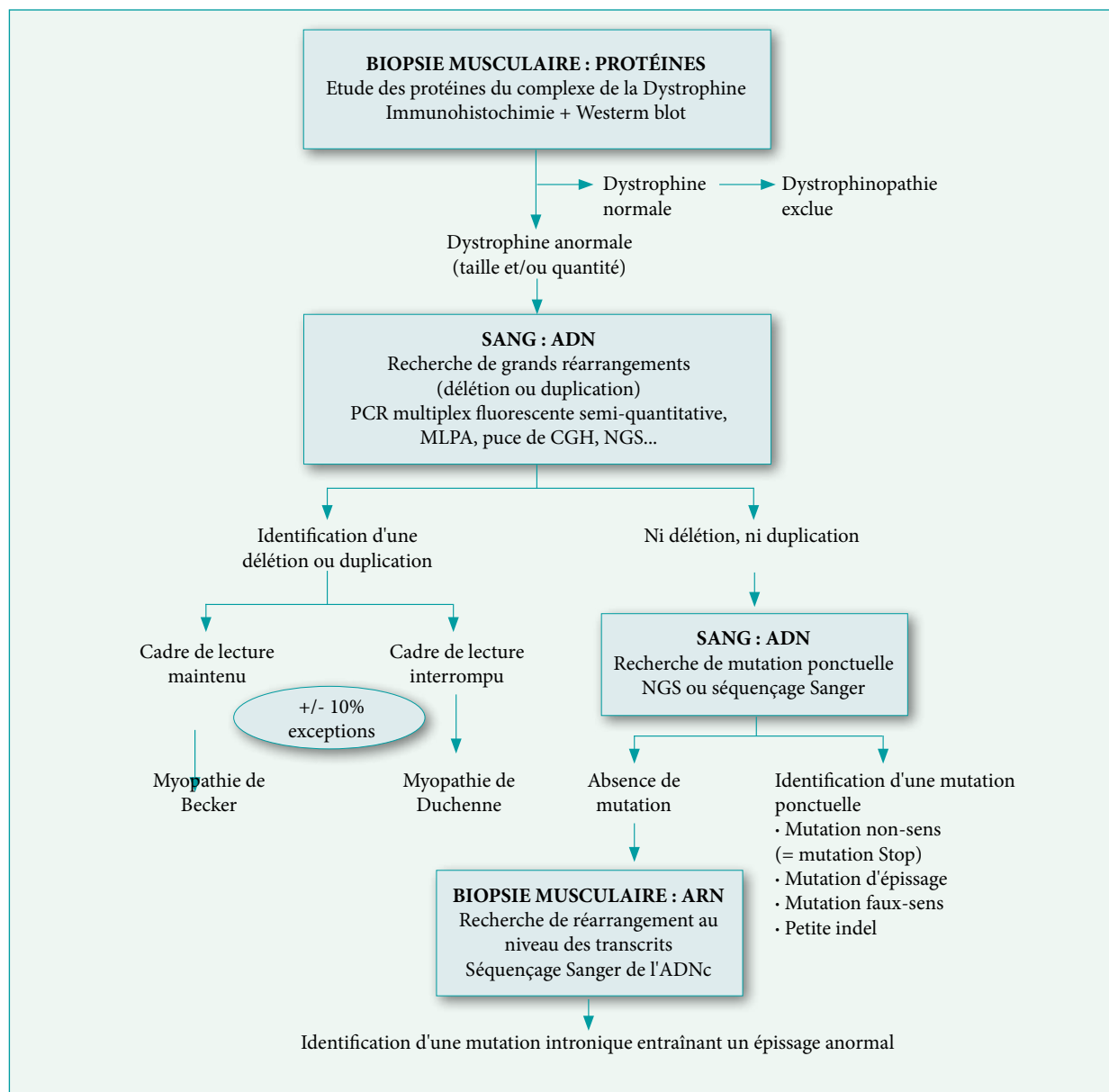


Figure 5 : Arbre décisionnel du diagnostic moléculaire chez un cas index.

Date de soumission :

22 Novembre 2017

Références :

- Hoffman EP, Brown RH, Kunkel LM. Dystrophin -The protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. Cell 1987 Dec; 51 (6):919-928.
- Monaco AP, Bertelson CJ, Middlesworth W, Colletti CA, Aldridge J, Fischbeck KH, Bartlett R, Pericak-Vance MA, Roses AD, Kunkel LM. Detection of deletions spanning the Duchenne muscular dystrophy locus using a tightly linked DNA segment. Nature. 1985 Aug 29-Sep 4;316(6031):842-5.
- Emery AE. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases a world survey. Neuromuscul Disord. 1991; 1 (1):19-29.
- Mercuri E, Pichiecchio A, Allsop J, Messina S, Pane M, Muntoni F. Muscle MRI in inherited neuromuscular disorders: past, present, and future. J Magn Reson Imaging. 2007 Feb; 25 (2):433-40.
- Campbell KP, Kahl SD. Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein.

Nature. 1989 Mar 16;338(6212):259-62. PubMed PMID: 2493582.

6. Koenig M, Kunkel LM. Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals 4 potential hinge segments that may confer flexibility. Journal of Biological Chemistry. 1990 Mar; 265(8).

7. Muntoni E, Torelli S, Ferlini A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. Lancet 2003;44:731-40.

8. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. Nucleic Acids Res. 2002 Jun 15;30 (12):e57.

9. Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, et al. An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. Genomics 1988;2:90-5.

10. Tuffery-Giraud S, Saquet C, Chambert S, et al. Pseudoexon activation in the DMD gene as a novel mechanism for Becker muscular dystrophy. Hum Mutat 2003;21:608-14.

11. Beggs AH, Hoffman EP, Snyder JR, Exploring the molecular basis for variability among patients with Becker muscular dystrophy: dystrophin gene and protein studies. Am J Hum Genet. 1991 Jul;49(1):54-67. PubMed PMID: 2063877; PubMed Central PMCID: PMC1683222.

12. Emery AEH. The muscular dystrophies. Lancet. 2002 Feb; 359(9307):68795.

13. Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: implementation of multidisciplinary care. Lancet Neurology. 2010 Feb; 9 (2):177- 89.