



**HAL**  
open science

## Impact clinique d'une dystrophine résiduelle en immunohistochimie chez des patients DMD mutés

Yvan de Féraudy

► **To cite this version:**

Yvan de Féraudy. Impact clinique d'une dystrophine résiduelle en immunohistochimie chez des patients DMD mutés. Médecine humaine et pathologie. 2019. dumas-03142604

**HAL Id: dumas-03142604**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03142604>**

Submitted on 16 Feb 2021

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

## AVERTISSEMENT

Cette thèse d'exercice est le fruit d'un travail approuvé par le jury de soutenance et réalisé dans le but d'obtenir le diplôme d'Etat de docteur en médecine. Ce document est mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt toute poursuite pénale.

*Code de la Propriété Intellectuelle. Articles L 122.4*

*Code de la Propriété Intellectuelle. Articles L 335.2-L 335.10*

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES  
Faculté de Médecine PARIS DESCARTES

Année 2019

N° 199

**THÈSE**  
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT  
DE  
**DOCTEUR EN MÉDECINE**

Impact clinique d'une dystrophine résiduelle  
en immunohistochimie chez des patients DMD mutés

Présentée et soutenue publiquement  
le 14 octobre 2019

Par

***Yvan de FÉRAUDY***

Né le 12 septembre 1989 à Paris (75)

Dirigée par M. Le Professeur Helge Amthor, PU-PH

Jury :

Mme Le Professeur Odile Boespflug-Tanguy, PU-PH ..... Président

M. Le Professeur Karim Wahbi, PU-PH

Mme Le Docteur France Leturcq, PH

## Remerciements

Pour ce travail, je souhaiterais remercier en premier **Mme. le Professeur Odile Boespflug-Tanguy**, PU-PH et ancienne chef de service de Neurologie pédiatrique de l'Hôpital Robert Debré, nouvelle directrice de la plateforme d'essais cliniques I-Motion de l'Hôpital Trousseau et Présidente du Conseil Scientifique de l'AFM-Téléthon. Je la remercie de l'honneur qu'elle me fait en ayant accepté de présider le Jury de ma thèse de médecine. Je lui suis déjà très reconnaissant pour ses nombreux conseils apportés à plusieurs étapes de mon parcours. J'éprouve une très grande considération pour son travail scientifique et sa passion communicative dans l'art de concilier Médecine et Recherche.

Mes remerciements vont également à **M. le Professeur Karim Wahbi**, PU-PH du service de Cardiologie adulte de l'Hôpital Cochin. Je lui suis très reconnaissant d'avoir accepté d'être membre du Jury de ma thèse de médecine. Je le remercie vivement pour sa grande disponibilité et ses nombreux avis scientifiques dans la réalisation d'un précédent travail de recherche. Ce dernier et cet actuel projet doivent beaucoup à sa personne. Je le remercie de m'avoir ainsi accordé sa confiance.

Je remercie également **Mme. le Docteur France Leturcq**, PH du service de Génétique et Biologie moléculaire de l'Hôpital Cochin. Je lui exprime toute ma considération dans son acceptation d'être membre du Jury de ma thèse de médecine. Sans sa personne, ce projet n'aurait pas pu être possible. C'est son travail cumulé de plus de 20 années qui a permis de collecter l'ensemble des données moléculaires de la base UMD-DMD France, une formidable possibilité de recherche pour ce projet et les précédents. Je le remercie également de m'avoir accordé sa confiance.

Je remercie enfin et avant tout **M. le Professeur Helge Amthor**, PU-PH du service de Neurologie et réanimation pédiatrique de l'Hôpital Raymond Poincaré. Je le remercie d'avoir accepté d'être le Directeur de cette thèse de médecine. Je lui exprime toute ma considération pour cette confiance perpétuelle réciproque. Je lui suis très reconnaissant pour ses conseils scientifiques toujours très avisés, sa disponibilité lorsque parfois des barrières administratives pouvaient s'ériger et surtout pour la possibilité qu'il m'a donné de pouvoir conduire librement mon projet. Travailler avec lui fut pour moi une très grande source d'enrichissement personnel et professionnel.

A mes parents et mes sœurs, soutiens inconditionnels de toujours. Je ne vous remercierai jamais assez pour votre présence et vos encouragements perpétuels. Rien de tout ceci n'aurait pu être possible sans vous.

A Amaury, Amélie, Anastasia, Anh-Dao, Aude, Blandine, Camille, César, Claire, Diane, Edouard, Eloi, Emilien, Estelle, Etienne, France, Gauthier, Grégoire, Guillaume, Hélène, Jean-Baptiste, Jean-Sébastien, Julie, Julien, Laetitia, Louis-Gonzague, Manon, Marie, Marie-Caroline, Marina, Mathieu, Matthieu, Maxime, Nicolas, Philippe, Quitterie, Servane, Tiphaine, Yasmine, Yves mes plus proches amis, qui à force de me côtoyer sont devenus des spécialistes du Duchenne.

A Anna, Anne-Claire et Lucie, mes 3 dernières co-internes qui ont vécu l'écriture de cette thèse et que je remercie pour leur patience et leur soutien.

A tous et toutes, qui de près ou de loin, m'ont soutenu au cours de mon cursus. La médecine est une formidable aventure où la perpétuelle rencontre de personnalités passionnées est une source d'enrichissement ininterrompu.

*Je ne peux pas comprendre le tout si je ne comprends pas les parties et je ne peux pas comprendre les parties si je ne comprends pas le tout.*

Blaise Pascal

*It always seems impossible until it's done.*

Nelson Mandela

# Table des matières

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>2</b>
<b>TABLE DES MATIERES .....</b>	<b>5</b>
<b>I) INTRODUCTION .....</b>	<b>7</b>
<b>CHAPITRE 1 : LES DYSTROPHINOPATHIES .....</b>	<b>7</b>
1.1.1 LA DYSTROPHIE MUSCULAIRE DE DUCHENNE (DMD) .....	7
1.1.2 LA DYSTROPHIE MUSCULAIRE DE BECKER (BMD) .....	8
<b>CHAPITRE 2 : STRUCTURE ET FONCTION DU MUSCLE .....</b>	<b>8</b>
1.2.1 LE MUSCLE SQUELETTIQUE.....	8
1.2.2 LE MUSCLE CARDIAQUE ET LE MUSCLE LISSE.....	9
<b>CHAPITRE 3 : LA DYSTROPHINE.....</b>	<b>9</b>
1.3.1 LE GENE <i>DMD</i> .....	9
1.3.2 LA PROTEINE DYSTROPHINE .....	10
1.3.3 LES MUTATIONS DU GENE DMD .....	11
1.3.4 REGLE DE MONACO ET REGLE DE CHAMBERLAIN .....	11
1.3.5 EXCEPTIONS A LA REGLE DE MONACO .....	12
<b>CHAPITRE 4 : CONCEPT DE FIBRES REVERTANTES .....</b>	<b>13</b>
<b>CHAPITRE 5 : DIAGNOSTIC.....</b>	<b>13</b>
1.5.1 LA GENETIQUE .....	13
1.5.2 LA BIOPSIE MUSCULAIRE .....	13
1.5.3 LA BASE DE DONNEES UMD-DMD FRANCE .....	15
<b>CHAPITRE 6 : PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE.....</b>	<b>15</b>
1.6.1 THERAPEUTIQUES ET PRISES EN CHARGES ACTUELLES .....	15
<b>CHAPITRE 6 : RATIONNEL DU PROJET .....</b>	<b>16</b>
<b>II) MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>18</b>
<b>CHAPITRE 1 : PATIENTS .....</b>	<b>18</b>
2.1.1 RAPPEL DU MODE DE RECRUTEMENT DES PATIENTS DE LA PREMIERE ETUDE .....	18
2.1.2 PATIENTS DE NOTRE ETUDE .....	19
<b>CHAPITRE 2 : IMMUNOHISTOCHEMIE .....</b>	<b>20</b>
2.2.1 DESCRIPTION DES IMMUNOHISTOCHEMIES DEJA REALISEES .....	20
2.2.2 ANALYSE DE LA DYSTROPHINE EN IMMUNOHISTOCHEMIE .....	20
<b>CHAPITRE 3 : EVALUATION PHENOTYPIQUE DES PATIENTS .....</b>	<b>20</b>
2.3.1 CRITERE CLINIQUE EVALUE .....	20
2.3.2 METHODOLOGIE DE RECUEIL .....	21
<b>CHAPITRE 4 : ANALYSE STATISTIQUE.....</b>	<b>21</b>
<b>CHAPITRE 5 : ASPECTS ETHIQUE ET CONSENTEMENTS .....</b>	<b>21</b>
<b>III) RESULTATS.....</b>	<b>22</b>
<b>CHAPITRE 1 : PATIENTS INCLUS ET QUANTIFICATION DE LA DYSTROPHINE.....</b>	<b>22</b>
<b>CHAPITRE 2 : IMMUNOHISTOCHEMIE ET DYSTROPHINE POUR LES PATIENTS INCLUS.....</b>	<b>22</b>

3.2.1 IMMUNOHISTOCHEMIE ET WESTERN BLOT.....	22
3.2.2 ETUDE DE LA SPECIFICITE DES ANTICORPS EMPLOYES.....	23
3.2.3 IMPACT D'UNE DYSTROPHINE RESIDUELLE EN IMMUNOHISTOCHEMIE.....	25
3.2.4 QUESTION DES BIAIS DE CONFUSION .....	25
<b><u>IV) DISCUSSION.....</u></b>	<b><u>27</u></b>
<b><u>V) CONCLUSION .....</u></b>	<b><u>31</u></b>
<b><u>BIBLIOGRAPHIE.....</u></b>	<b><u>32</u></b>
<b><u>ANNEXES 1.....</u></b>	<b><u>38</u></b>



## I) Introduction

La dystrophine est une protéine qui structure la fibre musculaire en connectant le cytosquelette d'actine au complexe glycosarcolemmique. Les mutations du gène *DMD* modifient qualitativement ou quantitativement l'expression de cette protéine. En résulte un groupe de pathologies liées à l'X, les dystrophinopathies, avec un spectre variable de sévérité de signes fonctionnels : la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) et sa forme moins sévère, la dystrophie musculaire de Becker (BMD) en sont deux exemples.

De nombreux essais thérapeutiques ciblant la restauration de l'expression de la dystrophine sont en cours. Cet essor thérapeutique nécessite une connaissance précise des influences quantitatives ou qualitatives de la dystrophine exprimée pour guider les cliniciens dans les objectifs thérapeutiques à atteindre.

### Chapitre 1 : Les dystrophinopathies

#### 1.1.1 La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD)

La Myopathie de Duchenne (DMD; OMIM#310200) se caractérise par une fonte et une faiblesse musculaires progressives liées à une dégénérescence musculaire. Elle constitue la plus fréquente des dystrophies musculaires progressives de l'enfant, et est caractérisée par une atteinte musculaire progressive pouvant conduire jusqu'à la perte de la marche, une atteinte cardiaque et/ou respiratoire fréquente, un retard cognitif possible et un décès prématuré. Elle a été décrite pour la première fois en 1868 par Duchenne de Boulogne dans *Archives générales de médecine* sur une série de 13 cas garçons qui ont développé durant l'enfance une faiblesse musculaire ainsi qu'une hypertrophie de certains muscles et sont décédés prématurément vers 15 ans. Les biopsies musculaires retrouvaient une métaplasie adipofibreuse dans les stades les plus avancés. Pendant longtemps, la description restait clinique et son mode de transmission faisait suspecter une pathologie liée à l'X. Le gène impliqué fut identifié en 1986 comme étant *DMD*<sup>1,2</sup> et sa protéine caractérisée en 1987 : la dystrophine.<sup>3</sup> Ces informations permettent aujourd'hui un diagnostic de certitude.

L'incidence de cette maladie varie au niveau mondial entre 1/3500 à 1/10 000 de garçons et sa prévalence est de 5 garçons sur 100 000.<sup>4</sup> Dans le tableau clinique typique, les garçons ont leurs premiers symptômes vers 3-4 ans (ex : marche dandinante ou sur la pointe des pieds, chutes fréquentes, difficulté à monter les escaliers), apparition d'un signe de Gowers (difficulté à se relever sans appui du sol traduisant une faiblesse musculaire de la ceinture pelvienne), souvent une hypertrophie musculaire et parfois des rétractions musculo-tendineuses. L'atteinte débutante est surtout proximale. Les muscles de la face et oculomoteurs sont respectés longtemps. Il existe une élévation importante des créatine-phosphokinases (CPK). La perte de la marche survient sans traitement entre 7 et 12 ans.<sup>5</sup> L'atteinte de la musculature rachidienne entraîne une déformation de type cyphose puis scoliose pouvant nécessiter une arthrodeèse vertébrale dans l'adolescence. L'atteinte

des muscles respiratoires et la scoliose peuvent entraîner une insuffisance respiratoire restrictive<sup>6</sup> détectée par une décroissance progressive de la capacité vitale (CV) en explorations fonctionnelles respiratoires (EFR).<sup>7</sup> Des apnées obstructives par hypotonie des muscles pharyngés et macroglossie peuvent s'associer. Une atteinte du muscle cardiaque est aussi fréquente avec des troubles électriques et une cardiomyopathie le plus souvent pas avant 10 ans.<sup>8</sup> Une atteinte du système nerveux central est également possible sous forme notamment d'une déficience intellectuelle (Quotient Intellectuel – QI <75) ou de troubles du comportement.<sup>9</sup> Les décès aujourd'hui, sous prises en charge selon les recommandations nationales et internationales, ont majoritairement lieu à partir de la 3<sup>ème</sup> décennie par insuffisance cardiaque ou complications respiratoires.<sup>10,11</sup>

### 1.1.2 La dystrophie musculaire de Becker (BMD)

Des formes moins sévères de dystrophinopathies existent comme la BMD ou myopathie de Becker (BMD, OMIM#300376 ).<sup>12</sup> Les CPK sont également élevées. La forme typique est une myopathie des ceintures débutant à l'adolescence. La perte de marche, si présente, est plus tardive (souvent après 30 ans, mais possible après 16 ans), l'atteinte respiratoire est moins sévère et plus tardive et le décès également plus tardif. L'atteinte cardiaque est également plus tardive (73% de cardiomyopathie dilatée après 40 ans).<sup>13</sup>

Il existe un ensemble de patients qui perdent la marche entre 12 et 16 ans et sont dits « intermédiaires » entre les DMD et BMD (**Tableau 1**).

**Tableau 1**

Âge (années)	Duchenne	Intermédiaire	Becker
Premiers symptômes	3 - 4		2 - 21
Perte de marche	< 12	12 – 16	> 16
Espérance de vie	20		Réduite (degré variable)

**Tableaux cliniques typiques des principaux phénotypes de dystrophinopathie.**

## Chapitre 2 : Structure et fonction du muscle

Les muscles sont des organes répartis dans l'ensemble du corps humain avec une capacité de contraction. Ils sont subdivisés en muscles lisses et muscles striés, ces derniers sont eux-mêmes subdivisés en muscles squelettiques et muscle cardiaque.

### 1.2.1 Le muscle squelettique

Le muscle squelettique est un muscle strié à contraction volontaire. Ses principales fonctions sont d'assurer le maintien de la posture, le mouvement et la respiration. Il s'organise en faisceaux musculaires cloisonnés par un réseau de fibres de collagène (perimysium) qui vient lui-même cloisonner au sein de chaque faisceau chacun des éléments contractiles (endomysium) : la fibre musculaire. Chaque fibre musculaire

est un syncytium multinucléé issu de la fusion de plusieurs myoblastes mononucléés. La fibre musculaire est post-mitotique et a un aspect strié provenant des « myofibrilles » contenues dans son sarcoplasme (cytoplasme des fibres musculaires), unités de contraction en grande partie composées de myosine et d'actine.

Des cellules souches musculaires, nommées cellules satellites, sont présentes à l'état quiescent, entre la membrane plasmique des fibres musculaires (sarcolemme) et la membrane basale.<sup>14</sup> Celles-ci ont un potentiel d'activation et de division permettant un maintien constant du réservoir de cellules souches et la production de progéniteurs musculaires. Elles sont responsables de la régénération musculaire du muscle strié squelettique lors de blessures et des processus pathologiques comme les dystrophies musculaires.<sup>15</sup>

### 1.2.2 Le muscle cardiaque et le muscle lisse

Le muscle cardiaque est un muscle strié à contraction involontaire. A la différence du muscle squelettique, les fibres musculaires qui le composent sont pour la plupart mononucléées et organisées en réseau fonctionnel par accroche aux extrémités les unes aux autres. Les myofibrilles qu'elles contiennent définissent également leurs striations. Le muscle cardiaque ne contient pas de cellules satellites donc n'a pas de capacité régénérative.

Le muscle lisse est un muscle à contraction involontaire, non strié : leurs éléments contractiles (myosine, actine) ne sont pas organisés en myofibrilles. Leurs fibres musculaires sont mononucléées, organisées en parallèle et liées les unes aux autres par des jonctions communicantes. Elles constituent la paroi de certains vaisseaux ou organes creux comme le tractus gastro-intestinal, l'utérus, la vessie...

## Chapitre 3 : La dystrophine

### 1.3.1 Le gène *DMD*

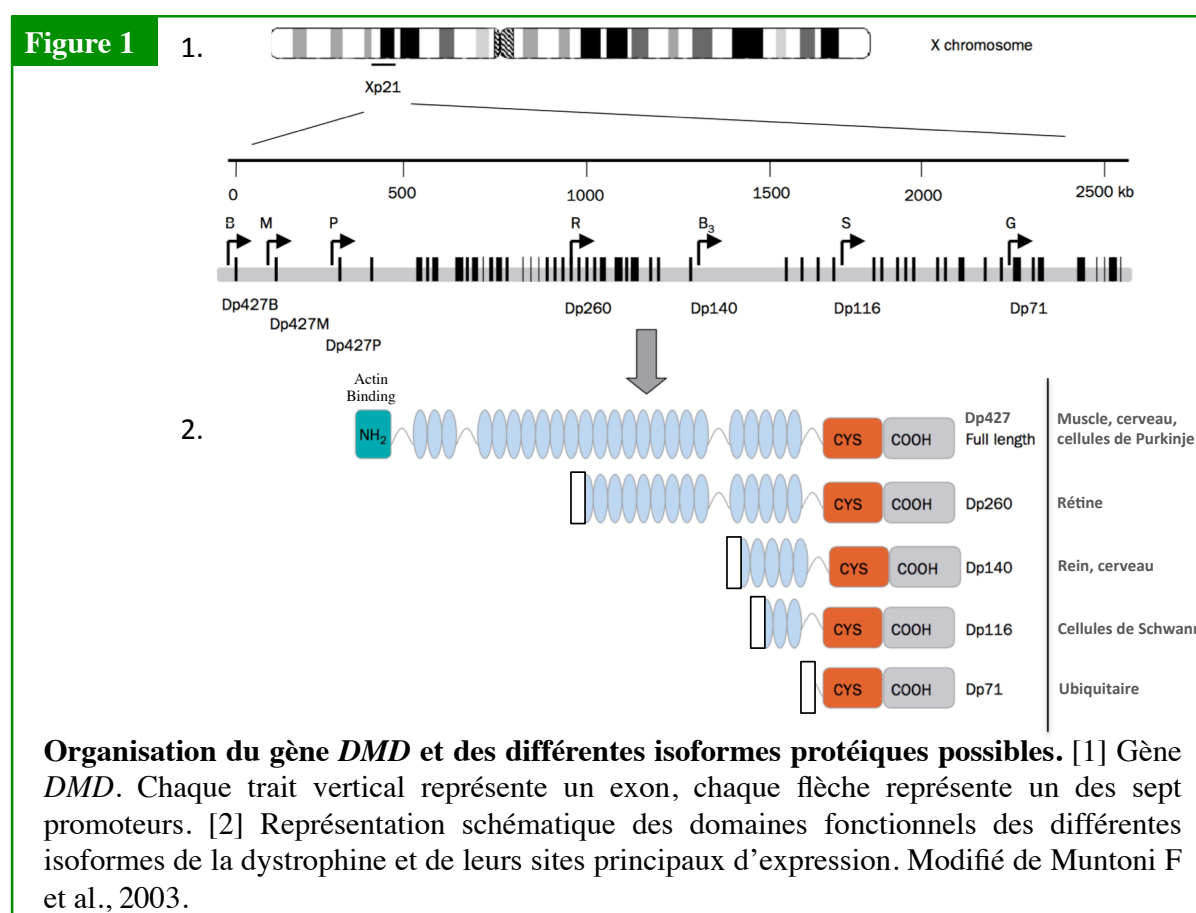
Le gène *DMD*, codant la dystrophine, est le gène dont les mutations sont responsables des dystrophinopathies.<sup>2,3</sup> Ce gène situé en Xp21.2 constitue avec ses 2,5 Mb le plus grand gène humain.<sup>16</sup> Celui-ci représente 0,1% du génome et 1,5% du chromosome X. 99% du gène est composé d'introns, souvent de très grande taille (> 200 kb). La séquence codante est composée de 85 exons dont 7 exons sont les premiers exons spécifiques de 7 promoteurs différents. Il y a une variabilité d'expression de ce gène par l'existence de promoteurs alternatifs tissu-spécifiques (**Figure 1**). Au moins 7 isoformes de la dystrophine peuvent être produites.

Trois d'entre elles sont codées par un ARN messager pleine longueur (79 exons) transcrit à partir d'un promoteur spécifique (appelé M pour Muscle, B pour Brain ou P pour Purkinje).<sup>17</sup> Ces 3 isoformes (Dp427 pour Dystrophin product 427) ont un poids moléculaire (PM) de 427 kDa. Le type de promoteur conditionne le site d'expression de la protéine : le promoteur M est actif dans le muscle squelettique, lisse et cardiaque ; le promoteur B est actif dans l'hippocampe et le cortex cérébral ;<sup>18</sup> le promoteur P est actif dans les cellules de Purkinje du cervelet.<sup>19</sup>

Il existe 4 autres promoteurs internes permettant l'expression de 4 isoformes plus courtes de dystrophine : soit Dp260 au niveau de la rétine (exons 30 à 79),<sup>20</sup> Dp140 au niveau du cervelet et du rein (exons 45 à 79),<sup>21</sup> Dp116 au niveau des cellules de Schwann (exons 56 à 79)<sup>22</sup> et Dp71 d'expression plus ubiquitaire (cérébrale comprise) mais absente du muscle squelettique (exons 63 à 79).<sup>23</sup>

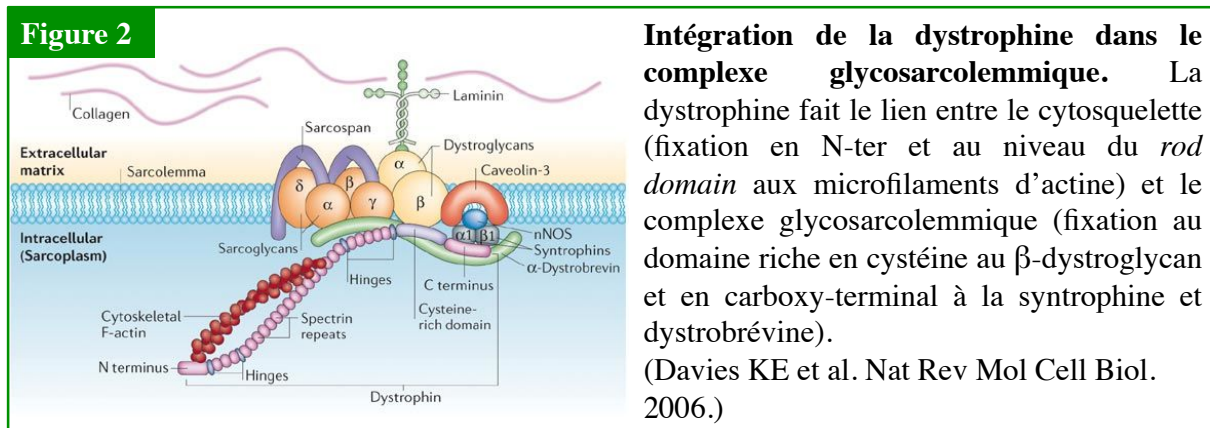
Un deuxième mécanisme générateur de variabilité est l'épissage alternatif.<sup>22,24</sup> Il existe par exemple un épissage alternatif de l'exon 71 et/ou 78 pour l'isoforme Dp71.<sup>25</sup>

### 1.3.2 La protéine dystrophine



L'isoforme longue de la dystrophine (Dp427) est constituée 3 685 acides aminés organisés en 4 domaines fonctionnels<sup>26</sup> : une région amino-terminale avec une affinité pour l' $\alpha$ -actinine (*actin binding domain* ou ABD1),<sup>27</sup> un domaine central (*rod domain*) constitué de la répétition de 24 séquences hélicoïdales homologues aux séquences répétées de la spectrine (site de liaison également à l'actine / ABD2), une région riche en cystéines contenant un *WW protein domain* avec site de liaison au  $\beta$ -dystroglycan et une région carboxy-terminale avec site de liaison à la syntrophine et dystrobrevine (**Figure 1**). Cette isoforme longue est notamment exprimée au niveau des muscles squelettiques, cardiaque et lisses. Elle se situe sous le sarcolemme<sup>28</sup> et interagit avec les autres protéines du complexe glycosarcolemmique ou *dystrophin-*

*associated glycoprotein complex* [DGC] (sarcoglycanes, dystroglycane, syntrophine, dystrobrevine) (**Figure 2**). Ce complexe effectue un pont entre le sarcolemme et les protéines de la matrice extra-cellulaire (MEC). La dystrophine effectue le lien entre le cytosquelette (actine) et ce DGC : sa première fonction est donc de transmettre les contractions cellulaires au sarcolemme. Son absence déstabilise ce complexe avec une diminution de l'expression de ses protéines partenaires. Ceci affaiblit la liaison entre le cytosquelette et la MEC et rend le sarcolemme susceptible aux dommages lors de la contraction des fibres.<sup>29</sup>



Les isoformes courtes (Dp 260, Dp140, Dp116 et Dp71) ne possèdent pas de domaine de liaison à l'actine en région amino-terminale mais conservent un domaine riche en cystéine et un domaine carboxy terminal (fixation au DGC).

### 1.3.3 Les mutations du gène DMD

Les mutations du gène *DMD* sont responsables des DMD, BMD et dystrophinopathies en général. Dans 1/3 des cas, la mutation survient *de novo*,<sup>30</sup> expliquant la forte incidence de la pathologie. Une grande étude multicentrique française sur 2405 patients a montré que la majorité des mutations sont de grands réarrangements à type de délétions ou duplications exoniques (de plus de 1 exon). Chez les patients avec DMD, les délétions sont majoritaires (> 60%). Les duplications sont plus rares (13% des patients).<sup>31,32</sup> Les régions des exons 2-19 et 45-55 sont deux sites préférentiels de délétions.<sup>17</sup> Des petites délétions/insertions ou des mutations ponctuelles (non-sens, faux-sens ou épissage) sont aussi observées chez 1/3 des patients DMD.<sup>31,32</sup> Chez les patients BMD, les délétions sont plus fréquentes (81%), les duplications plus rares (6%) et les mutations ponctuelles représentent 13% de toutes les mutations.<sup>32</sup>

### 1.3.4 Règle de Monaco et règle de Chamberlain

Dans le cas de réarrangement (duplications et délétions exoniques), la sévérité du phénotype dépend généralement plus du respect ou non du cadre de lecture du gène (règle de Monaco) que de la taille du réarrangement.<sup>33</sup>

- Soit le réarrangement ne respecte pas le cadre de lecture (le nombre de nucléotides exoniques concerné n'est pas un multiple de 3) : le cadre de lecture se décale (il est dit « hors phase ») et entraîne l'apparition d'un codon stop

prématuré. Le transcrit est alors dégradé par la voie NMD (*non-sens mediated decay*), processus de dégradation cellulaire spécifique des ARNs arborant un codon stop prématuré.<sup>34</sup> La quantité de dystrophine exprimée est alors nulle (ou très faible et tronquée) aboutissant à un phénotype Duchenne.

- Soit le réarrangement respecte le cadre de lecture (le nombre de nucléotides exoniques concernés est un multiple de 3) : le cadre de lecture est conservé (il est alors dit « en phase »), le transcrit est alors raccourci, en quantité diminuée mais non dégradé prématurément. Une protéine dystrophine est exprimée, plus courte mais fonctionnelle. On a un phénotype atténué type « Becker ». L'aspect répété de la région du *Rod Domain* explique en partie cette règle dans la mesure où elle constitue une sorte de pont entre les domaines fonctionnels importants amino et carboxy-terminal : de larges délétions en phase de ce domaine peuvent avoir des conséquences fonctionnelles faibles.<sup>35,36</sup>

Une deuxième règle importante est celle de Chamberlain : la sévérité du phénotype dépend du respect ou non de la fonctionnalité de la dystrophine et donc de la conservation ou non de certaines régions importantes du gène.<sup>37</sup> Ainsi par exemple, dans le cas de délétions en phase chez des patients Becker, la sévérité du phénotype n'est pas la même suivant la région concernée : les délétions en phase de la partie amino-terminale (site de fixation à l'actine) ont généralement un phénotype plus sévère (avec un faible taux de dystrophine) alors que les délétions en phase de la partie *rod domain* sont de phénotype variable.<sup>38</sup>

### 1.3.5 Exceptions à la règle de Monaco

La règle de Monaco est vérifiée entre 92 et 96% des cas.<sup>32,39</sup> Il existe donc des exceptions. En effet, certains patients avec des phénotypes prédits selon cette règle comme sévère ont en réalité des phénotypes atténués (type Becker). Plusieurs cas sont exposés ci-dessous.

Dans le cas des mutations ponctuelles, les mutations non-sens, prédites pour donner un phénotype Duchenne, peuvent constituer ce genre d'exceptions. En effet, en cas de survenue d'une de ces mutations dans un exon dont la délétion théorique serait en phase, on peut observer un épissage alternatif spontané de l'exon concerné dans une partie des transcrits produits : ceci permet l'expression d'une isoforme de dystrophine raccourcie, en proportion variable, mais fonctionnelle (phénotype Becker car transcrit en phase).<sup>32,40</sup> Ceci constitue un saut d'exon spontané. Il existe d'autres situations où les mutations non-sens peuvent donner un phénotype atténué : *i*) si elles sont situées dans l'exon 1 par utilisation d'un site alterne d'initiation de la traduction présent dans l'exon 6<sup>41</sup> ; *ii*) si elles sont situées en aval de l'exon 70 dans la mesure où le transcrit muté peut ne pas être reconnu par la voie NMD et donc conduire à la traduction d'une isoforme de dystrophine tronquée en Carboxy-terminal mais ancrée à la membrane (conservation du site de fixation au  $\beta$ -dystroglycane).<sup>42</sup>

Les mutations de sites consensus d'épissage peuvent aussi constituer des exceptions à la règle de Monaco. Leur proportion chez les patients Becker représente 56% des 13% de mutations ponctuelles.<sup>32</sup> Ces mutations n'ont pas toujours d'effet *on/off* dans la mesure où certains transcrits mutés peuvent conserver, en proportion variable, un épissage correct et donc moduler le phénotype.<sup>43</sup> De même des mutations introniques profondes peuvent par exemple en créant un site

cryptique d'épissage activé, en proportion variable, l'inclusion séquences introniques (dites pseudo-exons) dans le transcrit mûre.<sup>44,45</sup> La coexistence de transcrits avec/sans pseudo-exon est possible en fonction de la force du site cryptique d'épissage activé.<sup>46</sup>

## Chapitre 4 : Concept de fibres révertantes

Chez des patients DMD ou dans son modèle murin (souris *mdx*), il a été décrit en immunohistochimie une réexpression de dystrophine au niveau de quelques fibres musculaires regroupées parmi une majorité de fibres sans dystrophine.<sup>47,48</sup> Ces quelques fibres positives, dites « fibres révertantes », expriment une dystrophine tronquée en interne.<sup>49</sup> L'hypothèse est qu'elles subissent un deuxième événement (saut d'exon spontané ou nouvelle mutation) permettant la remise en phase de l'ARN transcrit.<sup>50,51</sup> Cette révertance pourrait se produire au niveau du progéniteur musculaire lors de son activation au cours des processus dystrophiques et expliquer ce regroupement en clusters.

## Chapitre 5 : Diagnostic

### 1.5.1 La génétique

En cas de diagnostic DMD suspecté, la recherche d'une mutation de *DMD* sur sang périphérique est toujours nécessaire même si une biopsie musculaire a déjà été réalisée.<sup>52</sup> Cette information génétique permet la confirmation diagnostique mais également un conseil génétique, un diagnostic prénatal pour les grossesses ultérieures et une indication pour les thérapies mutation-spécifiques actuellement en essai ou déjà commercialisées.

### 1.5.2 La biopsie musculaire

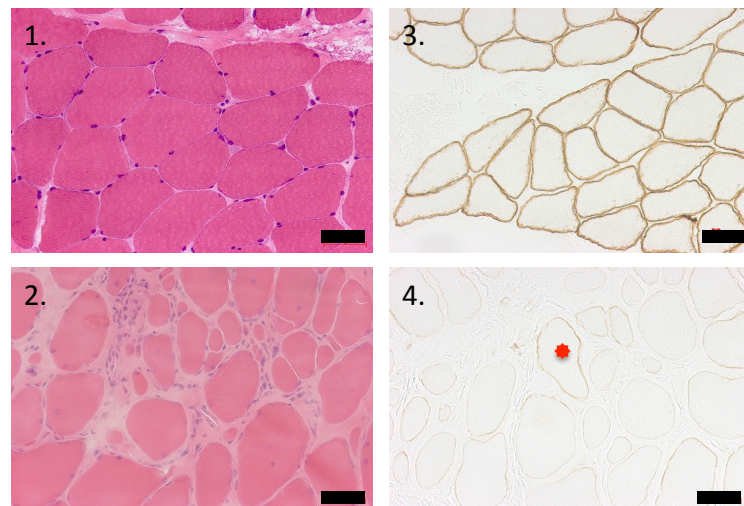
Une biopsie musculaire (deltoïde ou quadriceps) peut être également réalisée, sa réalisation est parfois encore discutée.<sup>53</sup> Elle reste néanmoins indispensable pour confirmer l'absence de dystrophine en cas de génétique non contributive et de CPK anormalement élevés/signes cliniques évocateurs.<sup>52</sup> Plusieurs techniques peuvent être utilisées en parallèle.

Une description histopathologique musculaire détaillée permet de confirmer la présence d'une dystrophie musculaire avec la mise en évidence de signes histologiques typiques (fibres musculaires en nécrose/régénération, infiltrat inflammatoire, métaplasie adipo-fibreuse). La coloration habituellement utilisée est l'Hématoxyline Eosine (HE) (**Figure 3**). Desguerre et al. ont pu montrer que la recherche de marqueurs de sévérité tels qu'une fibrose endomysiale renseignait sur le pronostic des patients.<sup>54</sup>

L'immunodétection sur sections musculaires et le Western blot permettent une évaluation qualitative et quantitative de la dystrophine exprimée. L'altération d'au moins un de ces deux paramètres témoigne d'une dystrophinopathie. Une biopsie musculaire avec absence complète de dystrophine est très évocatrice de DMD.

- L'immunodétection sur section musculaire avec des anticorps spécifiques de la dystrophine (peroxydase ou immunofluorescence) permet *i)* de confirmer spécifiquement la localisation sub-sarcolemmique de la protéine exprimée et donc son probable maintien de fonction (**Figure 3**). Elle renseigne également sur *ii)* son uniformité ou non d'expression. La possibilité de répéter les immunodétections avec des anticorps spécifiques d'épitopes protéiques différents permet *iii)* une étude précise, qualitative, de l'expression de dystrophine. Elle permet enfin *iv)* une quantification précise de cette expression protéique par la mesure des intensités de marquage de chaque anticorps.<sup>55-57</sup>
- Le Western blot permet de *i)* connaître le poids moléculaire de la dystrophine (si exprimée) et peut ainsi donner des indices sur la nature de la mutation causale (ex : délétion, duplication), la vitesse de migration protéique sur le gel étant fonction du poids moléculaire. Au plan quantitatif, au moyen de protocoles validés, le Western blot permet *ii)* une évaluation semi-quantitative de la dystrophine par la mesure d'une intensité de bande de marquage spécifique.<sup>56</sup> L'utilisation actuelle de protocoles standardisés validés garantit une bonne concordance entre les quantifications fournies par Western blot et immunohistochimie ainsi qu'une bonne comparabilité inter- et intra-laboratoire.<sup>58</sup>

**Figure 3**



**Comparaison de biopsies musculaires entre un patient sain [1 et 3] et un patient Duchenne [2 et 4].** Analyse histologique en HE : [1] aspect sain ; [2] calibre de fibres irréguliers, épaissement du tissu conjonctif interstitiel, internalisations nucléaires, infiltrat inflammatoire modéré. Immunohistochimique (Anticorps DYS1 – peroxydase) : [3] aspect sain ; [4] marquage très diminué et irrégulier du pourtour des fibres. Rares fibres révertantes (étoile rouge). Barre d'échelle, 50  $\mu$ M.

La biopsie musculaire permet enfin une étude des transcrits exprimés. Cette étude est nécessaire lorsque l'atteinte du gène DMD est confirmé par le statut anormal de la dystrophine exprimée et qu'aucune anomalie dans les séquences codantes n'a pu être mise en évidence par les techniques habituelles de génétique.<sup>31</sup> On recherchera alors des mutations ponctuelles pouvant avoir des conséquences sur l'épissage : mutations des sites consensus d'épissage ou des régions introniques profondes.



### 1.5.3 La base de données UMD-DMD France

Les *Locus Specific DataBase* (LSDBs), en collectant un ensemble de données génétiques, jouent un rôle essentiel pour l'amélioration de la prise en charge clinique et de la recherche. Ainsi pour la DMD, la *Leiden Duchenne muscular dystrophy database* (<http://www.dmd.nl/>) est une base de données internationale qui collecte l'ensemble des mutations de *DMD* inscrites dans la littérature. Les scientifiques peuvent également y contribuer en soumettant directement leurs mutations à l'organisme.<sup>59</sup>

La base de données UMD-DMD France (<http://www.umd.be/DMD/>) présente la particularité d'être une base de données nationale. Elle a été créée le 17/09/2008. Elle répond à un besoin de collection de ces données qui pour partie ne sont ni publiées, ni stockées dans des bases de données pré existantes. Les données inscrites dans cette base sont homogènes puisque rentrées uniquement par deux curateurs moléculaires spécifiques (à Cochin, Paris et Montpellier). Elles sont également exhaustives (et donc non biaisées) car elles représentent la totalité des mutations de *DMD* diagnostiquées en France.<sup>32</sup> Cette base de données nationale constitue une source d'informations unique pour mieux comprendre l'histoire naturelle des patients avec dystrophinopathie.

## Chapitre 6 : Prise en charge thérapeutique

### 1.6.1 Thérapeutiques et prises en charges actuelles

Sur le plan neuromusculaire, la kinésithérapie motrice et les corticoïdes au long cours restent les Gold Standard de la prise en charge clinique. Brooke MH, et al. ont montré en 1987 une amélioration motrice et respiratoire des patients sous prednisone haute-dose.<sup>60</sup> Ils permettent de reculer l'âge de perte de marche de 2 à 4 ans et accroissent l'espérance de vie.<sup>61-63</sup> Ils sont habituellement maintenus après l'âge de perte de marche en raison de bénéfices également sur la fonction respiratoire<sup>64</sup>, cardiaque<sup>63</sup> et sur l'installation de la scoliose.<sup>65,66</sup> Les sociétés savantes américaines et la Cochrane recommandent une dose quotidienne de prednisone de 0,75 mg/kg/j.<sup>65,67-69</sup> Peuvent notamment être associés une prise de poids, un hirsutisme, un aspect cushingoïde, une déminéralisation osseuse. La corticothérapie peut être abaissée en cas d'effet indésirable important.<sup>68,70</sup> Le deflazacort 0,9 mg/kg/j peut être utilisé en alternative à la prednisone<sup>70</sup>, la prise de poids serait moins importante sous ce traitement.<sup>71</sup> Ce traitement n'est néanmoins pas commercialisé en France.

Pour prévenir/lutter contre les rétractions tendineuses, des orthèses ou ténotomies peuvent être proposées. La prise en charge chirurgicale de la scoliose permet un allongement de la durée de vie et une amélioration de la fonction respiratoire.<sup>72</sup> Celle-ci est cependant de moins en moins réalisée grâce aux corticoïdes prescrits qui limitent les risques de déformation rachidienne en période pubertaire.

Sur le plan respiratoire, la mise en place de la VNI a considérablement amélioré la survie des patients DMD (de 19 à 27 ans).<sup>10,11</sup> Cette augmentation de survie est majorée en combinant ventilation mécanique et arthrolyse vertébrale.<sup>72</sup> La VNI doit être mise en place en cas d'hypoventilation alvéolaire. Une CV < 680 mL est un

marqueur très sensible d'hypercapnie nocturne et fait discuter sa mise en place.<sup>73</sup> Une trachéotomie peut être discutée en cas d'échec d'une VNI.<sup>74</sup>

Sur le plan cardiaque, un traitement préventif par inhibiteur de l'enzyme de conversion (IEC) est recommandé chez les patients DMD de plus de 10 ans : il permet une diminution du risque de survenue de cardiomyopathie dilatée à 5 ans et un meilleur pronostic vital à 10 ans (diminution du risque de décès cardiaque).<sup>75,76</sup> Pour les patients Becker, la mise sous traitement sera discutée dès les premiers signes de diminution de la fonction cardiaque (fraction d'éjection du ventricule gauche ou FEVG < 50-55%).<sup>77</sup> L'étude Nebydis étudie l'effet d'un traitement préventif par Nebivolol sur l'apparition et la progression d'une dysfonction cardiaque chez les patients DMD en association ou non aux IEC. Ses résultats sont en cours d'interprétation. L'éplérénone et la spironolactone sont des diurétiques anti-aldostérone utilisés dans le traitement de l'hypertension artérielle ou de l'insuffisance cardiaque. Un essai de phase III avec l'éplérénone et la spironolactone pour les patients DMD est actuellement terminé et en cours d'analyse.

Un grand effort de recherche est fourni pour les dystrophinopathies avec un nombre important d'essais en cours. Certaines thérapies, dites mutation-spécifiques, sont déjà disponibles. *i)* L'ataluren, vise à faire de la translecture de codon stop ; autrement dit, il permet la traduction d'un transcrit pleine longueur malgré la présence d'un codon stop prématuré.<sup>78</sup> Il peut être prescrit pour les garçons de plus de 5 ans avec mutation non-sens depuis le 31 juillet 2014 (Autorisation de Mise sur le Marché [AMM] de l'Agence Européenne du Médicament [EMA]). *ii)* L'eteplirsén a été approuvé en septembre 2016 par la *Food and Drug Administration* (FDA) et peut être prescrit pour les 13% de garçons avec mutations de *DMD* pour lesquelles une délétion de l'exon 51 permettrait une restauration du cadre de lecture.<sup>79</sup> Ce traitement ne dispose pas encore d'AMM européenne.

## Chapitre 6 : Rationnel du projet

Au cours d'un précédent travail de Master 2,<sup>80</sup> nous avons étudié l'histoire naturelle de patients avec des capacités d'expression faible de dystrophine. Nous savions que l'épissage alternatif pouvait permettre d'atténuer le phénotype clinique de patients *DMD* mutés par l'expression de transcrits tronqués « en phase » ou pleine longueur dans des proportions variables. Ce mécanisme (cf. supra) intervient *i)* dans l'exclusion spontanée d'exons « en phase » comportant des mutations non sens et *ii)* dans l'expression de transcrits alternes (pleine longueur ou tronqués) pour les mutations de sites consensus d'épissage ou *iii)* les mutations introniques profondes. Nous avons fait l'hypothèse que plusieurs des patients avec ce type de mutations pourraient exprimer des quantités faibles ou nulles de dystrophine.

Via la base UMD-DMD France, j'ai identifié 76 patients, avec ces mutations d'intérêt, exprimant soit pas de dystrophine (groupe A ; n=42), soit <5% de dystrophine par rapport à un témoin (groupe B ; n=34). Pour déterminer si l'expression de faible taux (<5%) pouvait atténuer la sévérité de la pathologie, nous avons comparé pour ces deux groupes les âges de survenue de différents critères représentatifs de l'histoire naturelle des dystrophinopathies. Nos résultats montraient que les patients avec <5% de dystrophine avaient une atteinte globalement moins sévère que les patients sans

dystrophine. Ainsi, ils marchaient par exemple plus longtemps que les patients sans dystrophine (HR 0,17 ; IC95% 0,09-0,32 ;  $P < ,001$ ).

Nous disposons pour la plupart des patients inclus de leurs comptes rendus d'immunohistochimie sur biopsie musculaire initiale. De façon intéressante, plusieurs patients du groupe A présentaient des marquages positifs de dystrophine en immunohistochimie. Ceci contrastait avec des marquages nuls en Western blot. On sait, en immunohistochimie, que les patients DMD peuvent produire de la dystrophine au niveau de fibres dites « révertantes » mais aussi sous forme de « trace » dans des fibres non révertantes. Ainsi certains patients présentaient des marquages positifs faibles, plus ou moins diffus, non organisés en cluster ; ceci s'apparentait à ces « traces » de dystrophine. Ceci questionne sur la fonctionnalité et sur l'impact clinique de cette dystrophine résiduelle. L'objectif de mon étude est de mieux caractériser cette expression résiduelle de dystrophine en immunohistochimie chez ces patients sans dystrophine en Western blot et de déterminer si elle est associée à un recul de l'âge de perte de marche comparé aux patients sans.

## II) Matériel et méthodes

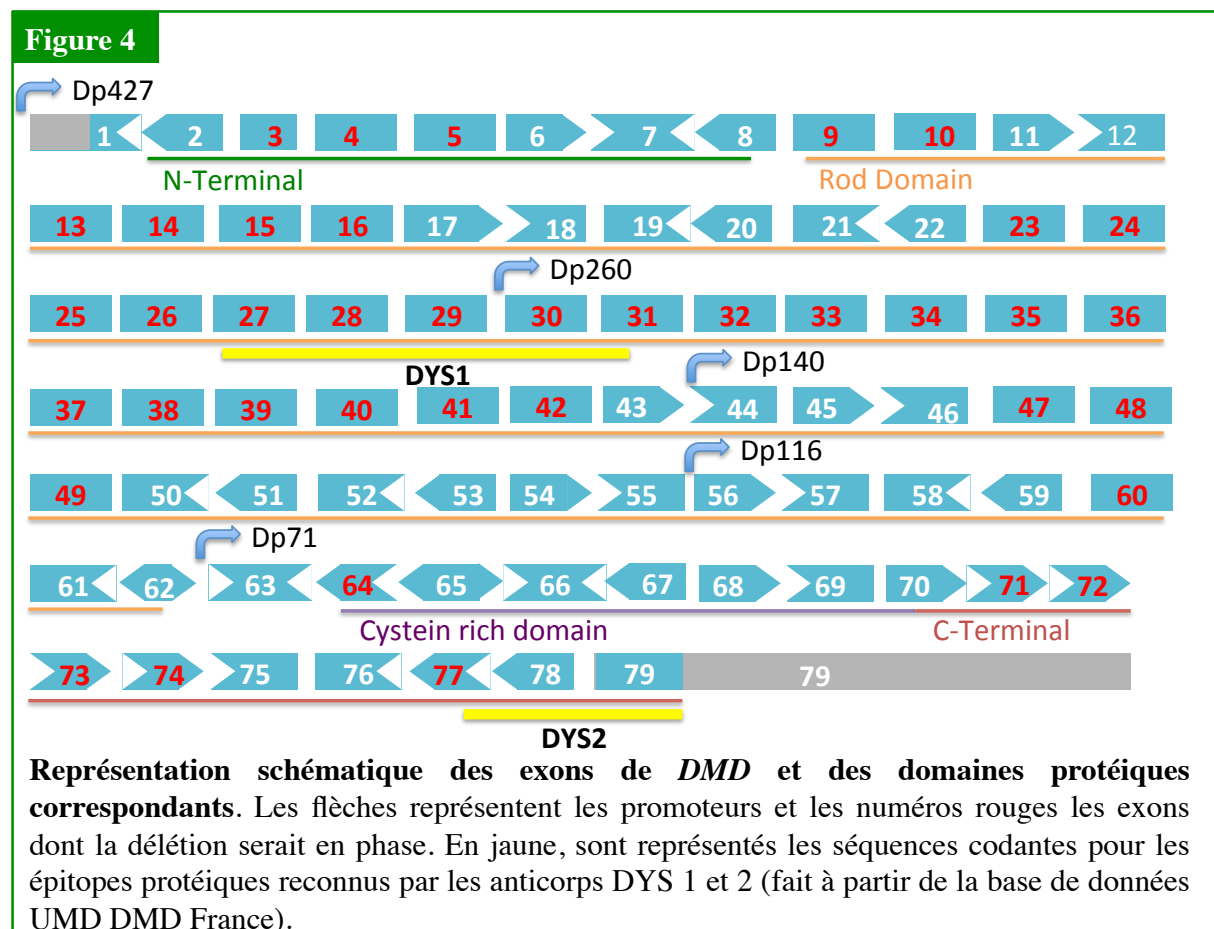
### Chapitre 1 : Patients

Les patients inclus dans notre étude sont ceux sans dystrophine en Western blot et inclus dans notre première étude<sup>80</sup> (soit les patients du groupe A ; n=42).

#### 2.1.1 Rappel du mode de recrutement des patients de la première étude

Étaient éligibles les patients inscrits dans la base UMD-DMD France. Les critères d'inclusion étaient : *i*) un diagnostic moléculaire réalisé dans le laboratoire de Biochimie et Génétique moléculaire de l'hôpital universitaire Cochin (Paris, France), *ii*) une mutation de *DMD* type site consensus d'épissage ou intronique profonde ou non-sens dans un exon dont la délétion théorique résulterait en l'obtention d'un transcrit en phase (exon dit « en phase ») (**Figure 4**).

Les critères d'exclusion étaient : *i*) une absence de Western blot multiplex antérieur avec d'anticorps anti dystrophine (NCL-DYS2) et absence d'anticorps anti dysferline, *ii*) un marquage positif en Western blot avec NCL-DYS1 mais négatif avec NCL-DYS2, *iii*) une expression de dystrophine  $\geq 5\%$  en Western blot, *iv*) un âge au dernier suivi  $< 7$  ans.

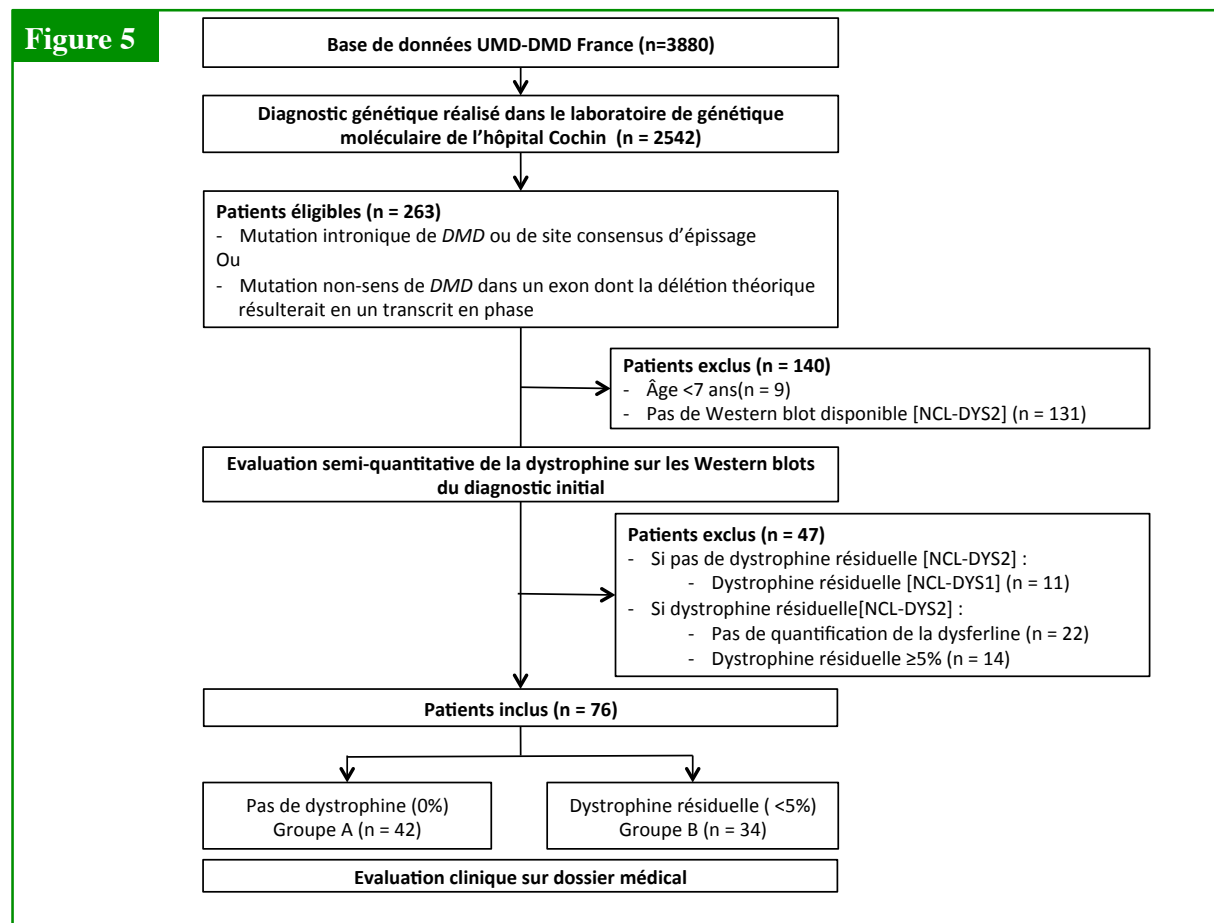


Seuls les patients ayant eu l'étude en Western blot multiplex de la dystrophine (NCL-DYS2) et de la dysferline avaient été inclus. En effet, la dysferline avait été choisie comme protéine de normalisation en l'absence des autres protéines habituellement choisies (ex : vinculine). De même, les patients de moins de 7 ans avaient été exclus puisque le critère de jugement choisi (perte de marche – cf. infra) n'était habituellement pas présent à cet âge.<sup>81</sup>

En appliquant ces critères, 76 patients avaient été inclus dans cette étude dont 42 patients avec absence de dystrophine quantifiable en Western blot (groupe A). La recherche de dystrophine était réalisée grâce à deux anticorps différents :

- Le premier, NCL-DYS1, dirigé contre un épitope situé dans le *rod domain* (acides aminés 1181 à 1388) (clone Dy4/6D3).
- Le second, NCL-DYS2, dirigé contre un épitope situé en Carboxy-terminal (acides aminés 3669 à 3685) (clone Dy8/6C5) (**Figure 4**).

Le Flow Chart de cette précédente étude<sup>80</sup> est présenté en **figure 5**.



## 2.1.2 Patients de notre étude

Pour rappel, les 42 patients sans dystrophine en Western blot (NCL-DYS 1 et 2) de notre précédente étude<sup>80</sup> constituent les patients inclus dans notre nouvelle étude.

## **Chapitre 2 : Immunohistochimie**

### **2.2.1 Description des immunohistochimies déjà réalisées**

Sur la biopsie musculaire du diagnostic, une analyse par immunohistochimie a été réalisée pour chaque patient inclus. Cette analyse a été procédée dans différents centres cliniques (généralement dans le service d'anatomopathologie rattaché au centre hospitalier où la biopsie a été réalisée).

Classiquement, chaque centre réalise plusieurs sections sur la biopsie d'intérêt au moyen d'un cryostat. Les anticorps ensuite utilisés pour révéler la dystrophine diffèrent suivant les centres. Nous avons fait le choix de ne retenir que les sections marquées par les anticorps NCL-DYS1, NCL-DYS2 ou MANDRA1. En effet, les deux premiers anticorps sont *i)* ceux les plus souvent utilisés entre les différents centres et *ii)* sont les mêmes que ceux utilisés en Western blot à l'hôpital Cochin (et donc dans notre précédente étude)<sup>80</sup>. Le troisième, MANDRA1 est celui utilisé par l'Institut de Myologie (Paris, France) à la place de NCL-DYS2. Leurs épitopes sont très similaires : les 17 derniers acides aminés carboxy terminaux pour NCL-DYS2 vs. les 128 derniers pour MANDRA1. Les résultats fournis par MANDRA1 devraient donc être équivalents à ceux fournis par NCL-DYS2. Tous ces anticorps primaires sont révélés par un anticorps secondaire couplé une activité peroxydase permettant un marquage enzymatique stable.

### **2.2.2 Analyse de la dystrophine en immunohistochimie**

Pour chaque immunohistochimie réalisée, un compte-rendu détaillé était disponible dans le dossier médical du patient. Celui-ci précisait la topographie de la dystrophine révélée vis à vis des différentes fibres musculaires mais aussi son intensité de marquage.

Nous avons considéré :

- qu'ils n'y avait pas de dystrophine en immunohistochimie si le compte-rendu mentionnait un marquage nul ou limité à des fibres révertantes.
- dans tous les autres cas (marquage léger à intense), nous avons considéré que l'immunohistochimie était positive.

## **Chapitre 3 : Evaluation phénotypique des patients**

### **2.3.1 Critère clinique évalué**

Notre critère de jugement principal est l'âge de perte de marche car les capacités de déplacements constituent un critère de jugement principal souvent utilisé dans les essais cliniques (ex : test de marche de 6 minutes). De plus ce critère est facilement mesurable rétrospectivement et traduit un niveau d'atteinte musculaire et de perte de qualité de vie significatif pour le patient. Nous avons défini l'âge de perte de marche comme celui rapporté (au mois près) de l'utilisation continue d'un fauteuil roulant.

Par ailleurs, les patients ont été classés comme dans l'étude Nicholson LV, et al. en fonction de leur âge de perte de marche en :

- Duchenne sévère si âge de perte de marche < 9ans,
- Duchenne modéré si  $9 \leq$  âge de perte de marche < 12 ans,
- Intermédiaire si  $12 \leq$  âge de perte de marche < 16 ans,
- Becker sévère si  $16 \leq$  âge de perte de marche < 40 ans,
- Becker modéré si au delà.

### **2.3.2 Méthodologie de recueil**

Notre étude est rétrospective. A partir de la liste fournie par les curateurs de la base de données UMD-DMD-France, j'ai contacté le lieu de prise en charge clinique de chaque patient et m'y suis déplacé. J'y ai recueilli dans leurs dossiers cliniques les différentes informations cliniques nécessaires à l'étude ainsi que leurs résultats d'immunohistochimie (si réalisée). Tout ceci s'est fait de façon anonymisée avec l'identifiant fourni lors de l'inclusion de ces patients.

## **Chapitre 4 : Analyse statistique**

Les données catégorielles ont été indiquées sous forme de fréquences et de pourcentages. Des diagrammes de Kaplan-Meier et des tests du Log-rank ont été utilisés pour comparer les âges de perte de marche entre les différents groupes. Des modèles de Cox, univariés et multivariés, ont été utilisés pour identifier les différents facteurs associés à la survie des patients. Ont été calculés les Hazard Ratios (HRs) et intervalles de confiance (IC) à 95 % correspondants. Des modèles à plusieurs variables ont été utilisés pour évaluer l'influence de covariables telles qu'un traitement par corticoïdes et/ou une immunohistochimie positive. Ces données ont été analysées avec GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., San Deigo, CA, USA) et StatPlus 6.5.1.0 (AnalystSoft Inc. Walnut, CA, USA). La significativité statistique a été fixée à  $P \leq .05$ .

## **Chapitre 5 : Aspects éthique et consentements**

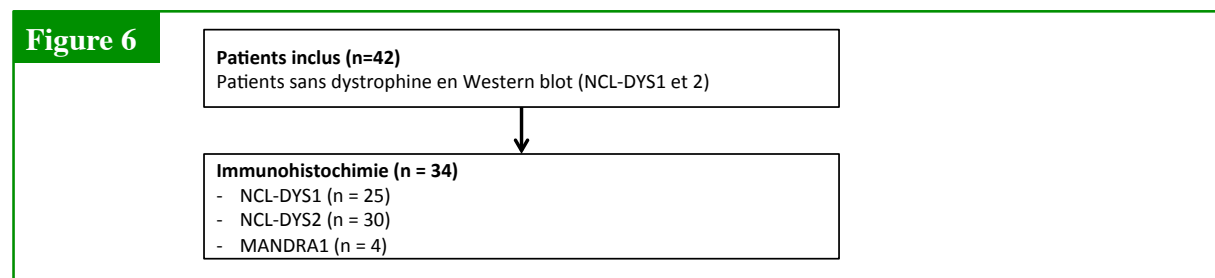
Notre étude rétrospective concerne des données issues de dossiers médicaux et des analyses de Western Blot précédemment réalisés. L'ensemble s'est fait de façon anonymisée. A aucun moment de l'étude nous avons eu besoin de retourner au patient. Dans ce contexte, ce projet a fait l'objet d'une autorisation du « Comité d'Expertise pour les Recherches, les Etudes et les Evaluations dans le domaine de la Santé » (CEREES) [TPS 35038] et d'une autorisation de la Commission Nationale Informatique et Libertés (CNIL) [Décision DR-2018-093]. Les patients ont signé des consentements d'utilisation de leurs données médicales lors de la réalisation de leurs biopsies musculaires initiales avec examens moléculaires et lors de leurs inclusions dans la base de données UMD-DMD-France.

## III) Résultats

### Chapitre 1 : Patients inclus et quantification de la dystrophine

Les 42 patients n'ayant pas de dystrophine marquée en Western blot (NCL-DYS1 et 2) de notre première étude ont été inclus.

34/42 (81%) de ces patients avaient un compte rendu d'immunohistochimie disponible. Le Flow Chart de notre nouvelle étude est présenté en **Figure 6**.



Parmi les 42 patients inclus, 23 (55%) avaient une mutation intronique profonde ou de site consensus d'épissage, 19 (45%) avaient une mutation non-sens dans un exon en phase. Aucun n'avait de dystrophine exprimée en Western blot. 40 patients étaient suivi au travers de 14 centres de France métropolitaine, 1 patients à l'île de la Martinique et 1 patients à l'île de la Réunion. Les immunohistochimies ont été réalisées dans 14 centres différents de France métropolitaine.

### Chapitre 2 : Immunohistochimie et dystrophine pour les patients inclus

#### 3.2.1 Immunohistochimie et Western blot

Tous les patients inclus ont une quantité nulle de dystrophine en Western blot avec NCL-DYS1 et 2. Parmi ces 42 patients, 34 (80%) ont eu une étude par immunohistochimie avec NCL-DYS2 (n = 30) ou MANDRA1 (n = 4) ; 25 (63%) avec NCL-DYS1 (**Figure 6**).

De façon intéressante, 8 patients sur 34 (24%) avaient un marquage positif en immunohistochimie avec NCL-DYS2/MANDRA1 (autre que des fibres révertantes) vs. négatif en Western blot. Egalement 7 patients sur 25 (28%) avaient un marquage discordants pour NCL-DYS1 (**Tableau 1**). Les marquages retrouvés étaient de faible intensité pour les 3 anticorps étudiés. L'immunohistochimie semble donc plus sensible ici pour évaluer les quantités faibles de dystrophine.



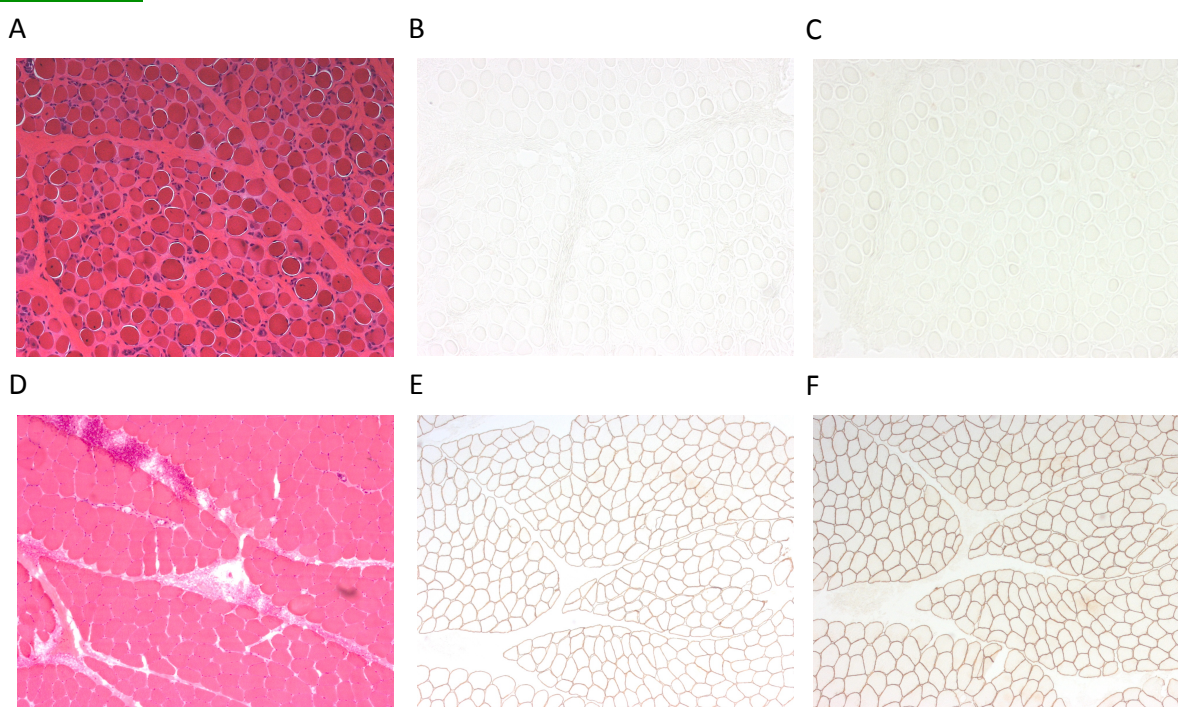
**Tableau 1**

Patients du groupe A avec immunohistochimie disponible (n = 34)	No. (%)
Dystrophine négative <sup>a</sup> en immunohistochimie	
- NCL-DYS1	18 (53)
- NCL-DYS2	23 (68)
- MANDRA1	4 (12)
Dystrophine positive en immunohistochimie	
- NCL-DYS1	7 (21)
- NCL-DYS2	7 (21)
- MANDRA1	1 (3)

**Caractéristiques immunohistochimiques des patients du groupe A (dystrophine nulle en Western blot – NCL-DYS1 et 2).**

<sup>a</sup>Quantité nulle ou exclusivement sous forme de fibres révertantes

### 3.2.2 Etude de la spécificité des anticorps employés

**Figure 7**

**Immunohistochimie d'un patient avec délétion des 1 à 63 de *DMD* [A, B et C] comparé à un patient contrôle [D, E et F].**

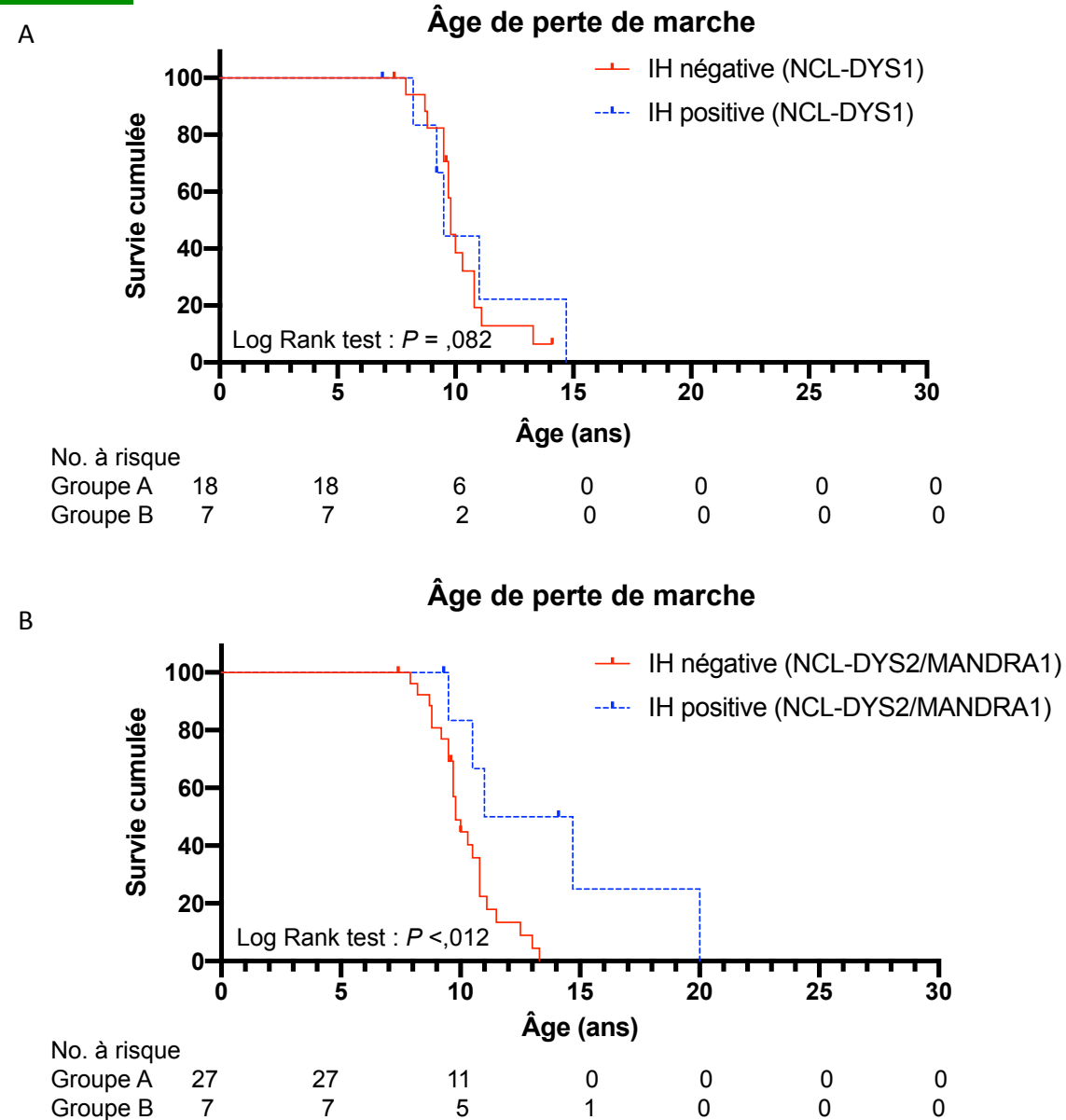
[A et D] Hématoxyline éosine. [B et E] Marquage avec anticorps NCL-DYS1. [C et F] Marquage avec anticorps MANDRA1.

Pour authentifier la spécificité des anticorps employés vis à vis de la dystrophine, nous avons récupéré le compte rendu et les lames d'un patient avec délétion quasi complète de *DMD*. Ce patient présente une délétion emportant les 63 premiers exons de *DMD*. Cette délétion emportant la majorité de la séquence codante de

DMD ainsi que l'ensemble des promoteurs alternatifs, aucune expression de dystrophine n'est attendue.

Les résultats d'immunohistochimie de ce patient sont présentés en **figure 7**. La coloration HE confirme la présence de fibres musculaires. Les immunomarquages par NCL-DYS1 et MANDRA1 sont totalement négatifs, confirmant l'absence de la dystrophine recherchée. Aucun marquage aspécifique n'est retrouvé. Ces anticorps semblent donc bien spécifiques de la protéine dystrophine.

**Figure 8**



**Âge de perte de marche.** Analyse par courbes de Kaplan-Meier étudiant la relation entre âge de perte de marche et dystrophine résiduelle en immunohistochimie. Anticorps utilisés : [A] NCL-DYS1 et [B] NCL-DYS2 et MANDRA1.

IH, immunohistochimie

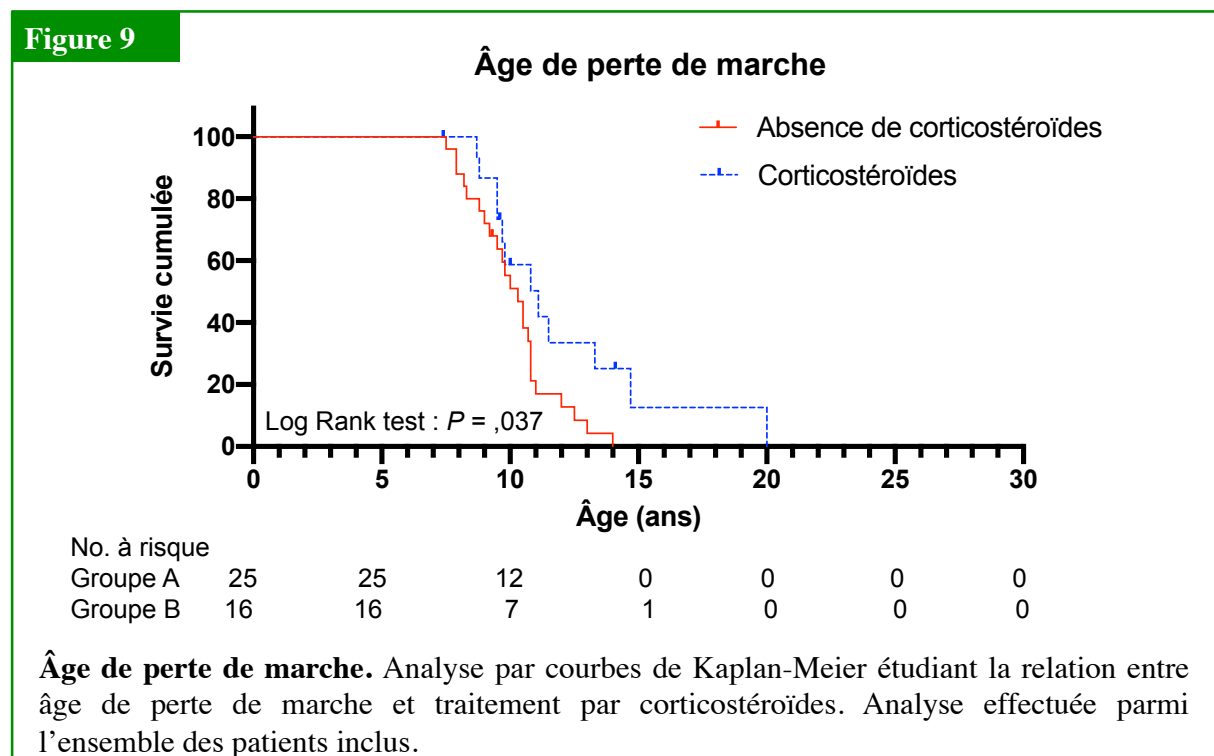
IH négative : absence de marquage ou limité sous forme de fibres révertantes ; IH positive : marquage autre que sous formes de fibres révertantes.

### 3.2.3 Impact d'une dystrophine résiduelle en immunohistochimie

Pour les 25 patients inclus avec recherche de dystrophine en immunohistochimie avec NCL-DYS1, nous disposons d'une information sur le critère perte de marche pour chacun des patients (100%). Une étude par courbes de Kaplan-Meier sur le critère âge de perte de marche en fonction de la dystrophine exprimée en immunohistochimie est représentée pour NCL-DYS1 en **figure 8.A**. Les patients avec dystrophine résiduelle marquée par NCL-DYS1 (domaine central) n'ont pas d'âge de perte de marche significativement différent des patients sans dystrophine résiduelle ( $P = ,082$ ). Les médianes de perte de marche étaient de 9,8 ans pour les patients sans dystrophine / 9,5 ans pour les patients avec dystrophine résiduelle.

Le statut ambulatoire était disponible pour la totalité des 34 patients inclus avec recherche de dystrophine en immunohistochimie par NCL-DYS2 ou MANDRA1 (100%). De façon intéressante, les courbes de Kaplan Meier représentant la perte de marche en fonction de la dystrophine exprimée sont significativement différentes pour ces anticorps ( $P < ,012$ ) (**figure 8.B**). La médiane d'âge de perte de marche est de 9,8 ans pour les patients sans dystrophine versus 12,9 ans pour ceux avec (NCL-DYS2/MANDRA1).

### 3.2.4 Question des biais de confusion



Comme expliqué en introduction, nous savons qu'une corticothérapie en traitement de fond peut reculer l'âge de perte de marche chez un patient DMD. 17 patients des patients inclus (40%) sont sous corticothérapie. Pour les 14/17 patients dont nous disposons de la date exacte de début des corticoïdes, la médiane d'âge de mise sous corticoïdes était de 9,0 ans (Déviation Standard [DS], 5,6 ans). De façon

attendue, les patients inclus sous corticoïdes perdent la marche de façon significative plus tardivement que les patients sans traitement ( $P = ,037$ ) (**figure 9**). Les médianes d'âge de perte de marche avec/sans corticoïdes étaient respectivement de 11,1 et 10,3 ans.

Pour prendre en compte le biais de confusion que peut constituer une corticothérapie, nous avons réalisé une régression multivariée par modèle de Cox. Nous avons également intégré dans cette régression l'ataluren qui peut également influencer l'âge de perte de marche. Pour étudier simultanément les marquages par NCL-DYS1 et NCL-DYS2/MANDRA1, nous avons réalisé cette sous-analyse sur les 25/34 patients (74%) inclus qui ont eu cette recherche par double marquage (**tableau 2**). De façon intéressante, la présence en immunohistochimie d'une dystrophine résiduelle marquée par NCL-DYS2/MANDRA1 était indépendamment et significativement associée à un âge de marche plus tardif (HR 0,05 ; 95% CI : 0,00-0,53 ;  $P = 0,013$ ). En revanche, ceci n'a toujours pas été retrouvé pour NCL-DYS1 (HR 1,80 ; 95% CI : 0,48-6,69 ;  $P = 0,379$ ).

**Tableau 2**

Facteurs en régression de Cox	No. (%)	HR (95% IC)	P
Corticostéroïdes	14 (56)	0,66 (0,24-1,84)	,425
Ataluren	3 (12)	0,11 (0,01-1,23)	,073
IH positive (NCL-DYS1)	7 (28)	1,80 (0,48-6,69)	,379
IH positive (NCL-DYS2/MANDRA1)	5 (20)	0,05 (0,00-0,53)	,013

**Analyse multivariée par régression de Cox des facteurs associés à la perte de marche parmi les patients inclus.**

HR, Hazard Ratio ; IC, Intervalle de confiance

## IV) Discussion

Dans cette étude, nous avons caractérisé et investigué l'impact de quantités faibles de dystrophine en immunohistochimie sur le phénotype clinique de patients *DMD* mutés. Tous les patients inclus avaient un marquage nul de dystrophine en Western blot.

Nos résultats ont montré que des quantités faibles de dystrophine en immunohistochimie étaient associées à une perte de marche plus tardive pour les anticorps NCL-DYS2 et MANDRA1. Ainsi la médiane d'âge de perte de marche des patients avec cette dystrophine résiduelle était de 12,9 ans, soit 3,1 années de plus que celle des patients sans. Ce recul de perte de marche n'a pas été observé pour l'anticorps NCL-DYS1. Ces résultats ont été confirmés en prenant en compte les biais de confusions potentiels tels qu'une corticothérapie ou une prise d'ataluren.

Plus particulièrement, les résultats d'immunohistochimie confirment que les patients *DMD*, en plus de fibres révertantes, peuvent exprimer de la dystrophine sous forme d'un marquage peu intense, au niveau de fibres non-révertantes. En effet, au côté de fibres fortement positives, organisées seules ou en cluster (dites « fibres révertantes »), peuvent coexister des zones de fibres positives, d'intensité inférieure à la normale. Ces marquages avaient déjà été décrit comme « trace » dans la littérature.<sup>82</sup> Les sections du patient avec délétion des 63 premiers exons de *DMD* confirment que ces marquages faibles ne résultent pas d'un marquage non spécifique de nos anticorps anti dystrophine. Nous avons fait le choix de séparer les fibres révertantes dans notre analyse des « traces » de dystrophine.

Certaines études s'intéressaient déjà à ces « traces » de dystrophine. Arechavala-Gomez, et al. n'avaient pas retrouvé de différence au MAS (*Motrice Ability Score*) en fonction de la dystrophine exprimée. Néanmoins, les patients avec trace de dystrophine n'avaient pas été analysés séparément des patients avec fibres révertantes isolées. Inversement, Nicholson et al. avaient montré une perte de marche décalée de 2,0 années en cas de trace de dystrophine<sup>83</sup>. Fanin M, et al. n'ont pas montré d'impact pour les faibles révertantes mais un possible décalage de 2 ans dans la perte de marche pour les patients avec marquage peu intense diffus.<sup>84</sup> Dans notre étude, les résultats sur l'impact positif d'une dystrophine sous forme de trace en immunohistochimie ont été retrouvés pour NCL-DYS2/MANDRA1 mais pas pour NCL-DYS1. Ceci pourrait s'expliquer par la localisation carboxy-terminale des épitopes des deux premiers anticorps. La présence de ces domaines, riches en sites de liaison pour d'autres protéines, pourrait garantir la fonctionnalité et pourrait traduire une quasi pleine longueur de la dystrophine exprimée. Nos résultats semblent donc aller dans le sens de ceux que nous avons dans notre précédente étude : toute dystrophine résiduelle pourrait compter au plan clinique, pourvu qu'elle soit fonctionnelle.<sup>80</sup>

Ces résultats présentent plusieurs forces. *i)* Le mode de recrutement est un avantage puisque nous avons pu avoir accès à la base de données UMD-DMD France pour l'inclusion de notre première étude. Ceci nous a permis de produire ces résultats au travers d'une cohorte, multicentrique et nationale. *ii)* Le critère de jugement principal, l'âge de perte de marche, constituait un marqueur représentatif

intuitif et lourd de l'histoire naturelle de ces pathologies neuromusculaires. Les capacités de marche évaluées au moyen de différents examens (ex : test de marche de 6 min) constituent un critère de jugement principal très souvent utilisé dans les essais thérapeutiques.<sup>85,86</sup> L'âge de perte de marche présentait l'avantage d'être une mesure facile et non opérateur-dépendant. *iii*) Pour l'ensemble des résultats, nous avons pris en compte plusieurs biais de confusion potentiels tels qu'une prescription de corticoïdes ou celle d'ataluren. Nous savons que les corticoïdes peuvent influencer sur l'âge de perte de marche.<sup>62</sup> Les résultats de notre étude n'ont pas été modifiés par la prise en compte de ces biais. Il est à noter que nous n'avons pas retrouvé d'effets propres aux corticoïdes dans l'analyse multivariée par modèle de Cox pour les inclus (**tableau 2**). Ceci peut s'expliquer par l'âge élevé de certains patients (le plus vieux est né en 1940) et le caractère récent des recommandations sur la corticothérapie. Ainsi, la moyenne d'âge de mise sous corticothérapie était de 9,0 ans pour ces patients (DS, 5,6 ans). Cet âge moyen tardif pourrait expliquer l'absence d'efficacité retrouvée pour ce traitement même si ceci reste discuté.<sup>87</sup> Par ailleurs, nous ne disposons pas d'informations exhaustives sur le schéma de corticothérapie choisie, la dose administrée et la durée choisie. La corticothérapie peut être allégée ou raccourcie, principalement en raison d'effets indésirables.<sup>88</sup>

Notre étude a cependant plusieurs limites importantes à prendre en compte. D'abord, il y a déjà celles inhérentes à son schéma rétrospectif. *i*) Les patients inclus sont nés entre 1940 et 2009 ; durant cette vaste période, les techniques de prises en charge ont évoluées (ex : introduction de la VNI, mise en place de la corticothérapie, réalisation d'arthrodèses). Par ailleurs, certaines techniques peuvent varier suivant les centres (ex : cas de la trachéotomie). Ces changements peuvent avoir modifier l'histoire naturelle des patients étudiés et constituer des biais. Nous avons essayé de prendre en compte tous-ceux pouvant influencer notre critère de jugement principal en les intégrant dans nos analyses multivariées par modèle de Cox. *ii*) Notre étude comporte de nombreux patients perdus de vue : beaucoup de patients sont encore trop jeunes pour le critère de jugement étudié. Pour ne pas fausser l'interprétation de nos courbes de survie et le calcul des médianes, nous avons donc fait le choix de limiter notre analyse de 0 à 30 ans. *iii*) Les données proviennent de la base de données UMD-DMD France ou des dossiers médicaux. Les patients n'ont donc pas été évalués à intervalles réguliers prédéfinis pour notre critère de jugement principal. Ceci introduit un biais de mesure puisque pour deux patients à histoire naturelle identique, l'âge de perte de marche serait faussement plus précoce chez le patient suivi plus régulièrement que le second.

Le second groupe de limites concerne la réalisation des immunohistochimies analysés. Ces examens ont en effet été réalisés à des fins cliniques et non de recherche. *i*) Les immunohistochimies n'ont pas été réalisées pour la totalité des patients inclus (81%) ce qui peut constituer un biais de sélection. *ii*) Elles ont été réalisées dans des centres différents, par des équipes différentes, selon des protocoles différents (variabilité des anticorps utilisés) et interprétées par des personnes différentes. Nous n'avons pas eu accès à l'ensemble des lames à postériori. Certaines expressions résiduelles de dystrophine peuvent ou non avoir été considérées comme étant des « fibres révertantes » suivant les équipes (biais de mesure).

Une dernière attention doit être prêtée aux modulateurs génétiques. En fonction de l'allèle présent, ils peuvent moduler la sévérité du phénotype. Ainsi une combinaison de 4 *single nucleotide polymorphism* (SNPs) – haplotype IAAM – au niveau du gène LTBP4 est associée à une marche prolongée chez des patients Duchenne. L'hypothèse est que cet haplotype réduise la signalisation du TGF- $\beta$  via une diminution de sa fixation ou de son relâchement par cette protéine.<sup>89</sup> D'autres polymorphismes dans différents modulateurs génétiques sont également associés à des phénotypes atténués : MYF6, JAGGED1 ou ACTN3.<sup>90-92</sup> L'ensemble de ces polymorphismes constitue donc des biais de confusion potentiels. Nous n'avons pas pu les prendre en compte dans notre étude mais il conviendrait de les rechercher pour préciser nos résultats.

Ce que nous pouvons voir avec ces discordances entre Western blot et immunohistochimie, c'est que c'est la combinaison ces deux examens qui est importante pour préciser au mieux les pronostics des patients étudiés.

Ainsi l'immunohistochimie pour > 25% des patients inclus est plus sensible pour détecter la dystrophine (NCL-DYS1 et 2/MANDRA1). Ceci avait déjà été observé pour certains laboratoires dans l'étude d'Anthony, et al.<sup>58</sup> Une hypothèse serait les conditions plus stringents de réalisation du Western blot et la possible dégradation de peptides en trop faibles quantités. A noter d'ailleurs qu'en regardant l'ensemble des immunohistochimies des patients de notre précédente étude, aucune discordance Western blot positif – Immunohistochimie négative n'avait été retrouvée. Une autre hypothèse serait l'expression de micro-peptides de dystrophine de poids moléculaires trop faibles pour rester sur le gel de Western blot lors de la migration. Ces micro-peptides seraient en revanche correctement localisés en immunohistochimie. Ceci-pourrait par exemple être lié à des sites alternes d'initiation de la traduction (ex : cas de l'exon 6)<sup>41</sup>. A noter que les données de séquençage ARN étaient disponibles pour les 7 et 8 patients inclus avec immunohistochimie positive pour respectivement NCL-DYS1 et NCL-DYS2/MANDRA1. Exceptés pour 2 patients, les transcrits retrouvés étaient tous « hors-phase ». L'expression de dystrophine résiduelle pourrait être expliquée par les mécanismes post-transcriptionnels évoqués ci-dessus.

Cette combinaison immunohistochimie-Western blot aurait également pu être intéressante pour mieux analyser les patients du groupe B. En effet, on ne sait pas encore si avoir de la dystrophine sur la totalité des fibres d'une section équivaut à avoir cette même quantité de dystrophine répartie en plus grande concentration sur un nombre réduit de fibres.

Nos résultats d'immunohistochimie semblent appuyer l'idée que toute dystrophine résiduelle peut compter : plus il y a de dystrophine, moins sévère est le phénotype. Ceci semble se vérifier sous réserve que la dystrophine exprimée soit fonctionnelle (marquage avec un anticorps carboxy terminal soit NCL-DYS2 ou MANDRA1). Nos résultats suggèrent l'efficacité de toute molécule permettant une restauration de dystrophine (y compris pour de faibles quantités). Deux points doivent cependant être soulevés. Le premier est celui de l'importance de la fonctionnalité de la dystrophine restaurée. Nicholson, et al. avaient déjà décrit en 1993 le cas d'un patient qui était DMD malgré une quantité importante de dystrophine, correctement localisée en immunohistochimie.<sup>93</sup> Sa délétion, certes en phase, des exons 3-25 se localisait dans le domaine N-terminal, un domaine fonctionnel riche. Une dystrophine en faible quantité peut donc suffire à atténuer un phénotype clinique, mais pourvu

qu'elle soit fonctionnelle. Le deuxième point est celui de la temporalité d'expression. Tous les patients décrits ici ont leur dystrophine résiduelle exprimée avant la naissance. A l'inverse, les patients sous ces nouvelles thérapeutiques ont leur dystrophine résiduelle à partir de la mise sous traitement. Du fait du processus dystrophique, leurs tissus musculaires ont eu le temps de s'atrophier et d'être substitués par du tissu fibro-adiposé. Ainsi plus le traitement sera initié précocément, plus il devrait être efficace en ciblant une quantité musculaire restante plus importante. Ceci a déjà été montré chez la souris double-KO (*Knock-Out*) pour la dystrophine et l'utrophine : l'administration d'une thérapie anti-sens permettant un exon-skipping de *DMD* est moins efficace lorsque débutée chez une souris plus âgée.<sup>94</sup>

Il conviendrait à présent de confirmer ces résultats par des techniques de quantification conformes aux dernières recommandations pour guider au mieux les prochains essais cliniques. En effet, la question de l'impact phénotypique d'une dystrophine sous forme de trace en immunohistochimie pose par exemple la question de sa prise en compte dans les futurs essais thérapeutiques. Ceci est d'autant plus important que ce résultat diffère de celui de l'étude récente de Arechavala-Gomez, et al.<sup>82</sup> Pour confirmer ces résultats, il conviendrait de refaire pour l'ensemble de ces patients un couple Western blot et immunohistochimie à partir des biopsies musculaires initiales. *i)* Les futures immunohistochimies devront être réalisées avec des anticorps communs (NCL-DYS1 et 2). Plus qu'une description topographique, la méthode de Arechavala-Gomez, et al. pourrait être utilisée afin d'y réaliser une quantification de dystrophine opérateur-indépendant (mesure d'intensité de marquage d'un anticorps donné, au moyen d'un nombre prédéfini de zones sélectionnées aléatoirement depuis la section musculaire étudiée).<sup>55</sup> Des masques utilisant la spectrine, une protéine sarcolemmique, pourraient permettre de cibler la quantification de dystrophine directement sur les régions attendues d'expression et donc affiner l'estimation<sup>56,57</sup>. De nouvelles techniques émergentes pourraient être utilisées en alternative, bien que non-encore employées en routine dans les essais cliniques. La spectrométrie de masse a pour le moment une limite de détection de 5% ce qui limiterait son emploi pour notre problématique.<sup>95</sup> Le *capillary Western immunoassay* pourrait en revanche constituer une alternative efficace puisqu'il permet la détection rapide de quantité protéiques aussi basses que 0,5% de celles d'un contrôle.<sup>96</sup>



## V) Conclusion

Au total, les résultats préliminaires fournis par cette étude, en dépit des limites déjà énoncées, soutiennent l'idée qu'une quantité résiduelle très faible de dystrophine en immunohistochimie pourrait permettre de préserver une marche plus longtemps qu'en l'absence de dystrophine chez un patient *DMD* muté. Un point important reste cependant la fonctionnalité de la dystrophine exprimée. Ces résultats encouragent toute thérapie permettant une restauration de dystrophine.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Monaco, A. P. *et al.* Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature* 323, 646–650 (1986).
2. Koenig, M. *et al.* Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 50, 509–517 (1987).
3. Hoffman, E. P., Brown, R. H. & Kunkel, L. M. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51, 919–928 (1987).
4. Mah, J. K. *et al.* A systematic review and meta-analysis on the epidemiology of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord. NMD* 24, 482–491 (2014).
5. Nicholson, L. V. *et al.* Integrated study of 100 patients with Xp21 linked muscular dystrophy using clinical, genetic, immunochemical, and histopathological data. Part 1. Trends across the clinical groups. *J. Med. Genet.* 30, 728–736 (1993).
6. Smith, A. D., Koreska, J. & Moseley, C. F. Progression of scoliosis in Duchenne muscular dystrophy. *J. Bone Joint Surg. Am.* 71, 1066–1074 (1989).
7. Khirani, S. *et al.* Respiratory muscle decline in Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr. Pulmonol.* 49, 473–481 (2014).
8. Nigro, G., Comi, L. I., Politano, L. & Bain, R. J. The incidence and evolution of cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy. *Int. J. Cardiol.* 26, 271–277 (1990).
9. Bresolin, N. *et al.* Cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord. NMD* 4, 359–369 (1994).
10. Passamano, L. *et al.* Improvement of survival in Duchenne Muscular Dystrophy: retrospective analysis of 835 patients. *Acta Myol. Myopathies Cardiomyopathies Off. J. Mediterr. Soc. Myol.* 31, 121–125 (2012).
11. Rall, S. & Grimm, T. Survival in Duchenne muscular dystrophy. *Acta Myol. Myopathies Cardiomyopathies Off. J. Mediterr. Soc. Myol.* 31, 117–120 (2012).
12. Becker, P. E. & Kiener, F. [A new x-chromosomal muscular dystrophy]. *Arch. Psychiatr. Nervenkrankh. Ver. Mit Z. Gesamte Neurol. Psychiatr.* 193, 427–448 (1955).
13. Nigro, G. *et al.* Evaluation of the cardiomyopathy in Becker muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 18, 283–291 (1995).
14. Mauro, A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9, 493–495 (1961).
15. Motohashi, N. & Asakura, A. Muscle satellite cell heterogeneity and self-renewal. *Front. Cell Dev. Biol.* 2, 1 (2014).
16. Mandel, J. L. Dystrophin. The gene and its product. *Nature* 339, 584–586 (1989).
17. Muntoni, F., Torelli, S. & Ferlini, A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol.* 2, 731–740 (2003).
18. Nudel, U. *et al.* Duchenne muscular dystrophy gene product is not identical in muscle and brain. *Nature* 337, 76–78 (1989).
19. Górecki, D. C. *et al.* Expression of four alternative dystrophin transcripts in brain regions regulated by different promoters. *Hum. Mol. Genet.* 1, 505–510 (1992).
20. D'Souza, V. N. *et al.* A novel dystrophin isoform is required for normal retinal electrophysiology. *Hum. Mol. Genet.* 4, 837–842 (1995).
21. Lidov, H. G., Selig, S. & Kunkel, L. M. Dp140: a novel 140 kDa CNS transcript

- from the dystrophin locus. *Hum. Mol. Genet.* 4, 329–335 (1995).
22. Byers, T. J., Lidov, H. G. & Kunkel, L. M. An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve. *Nat. Genet.* 4, 77–81 (1993).
  23. Bar, S. *et al.* A novel product of the Duchenne muscular dystrophy gene which greatly differs from the known isoforms in its structure and tissue distribution. *Biochem. J.* 272, 557–560 (1990).
  24. Sironi, M. *et al.* The dystrophin gene is alternatively spliced throughout its coding sequence. *FEBS Lett.* 517, 163–166 (2002).
  25. Austin, R. C., Howard, P. L., D'Souza, V. N., Klamut, H. J. & Ray, P. N. Cloning and characterization of alternatively spliced isoforms of Dp71. *Hum. Mol. Genet.* 4, 1475–1483 (1995).
  26. Koenig, M., Monaco, A. P. & Kunkel, L. M. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 53, 219–228 (1988).
  27. Norwood, F. L., Sutherland-Smith, A. J., Keep, N. H. & Kendrick-Jones, J. The structure of the N-terminal actin-binding domain of human dystrophin and how mutations in this domain may cause Duchenne or Becker muscular dystrophy. *Struct. Lond. Engl.* 1993 8, 481–491 (2000).
  28. Watkins, S. C., Hoffman, E. P., Slayter, H. S. & Kunkel, L. M. Immunoelectron microscopic localization of dystrophin in myofibres. *Nature* 333, 863–866 (1988).
  29. Pasternak, C., Wong, S. & Elson, E. L. Mechanical function of dystrophin in muscle cells. *J. Cell Biol.* 128, 355–361 (1995).
  30. Aartsma-Rus, A., Ginjaar, I. B. & Bushby, K. The importance of genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy. *J. Med. Genet.* 53, 145–151 (2016).
  31. Leturcq, F. & Tuffery-Giraud, S. [Genetics and molecular aspects of dystrophinopathies]. *Arch. Pediatr. Organe Off. Soc. Francaise Pediatr.* 22, 12S3-11 (2015).
  32. Tuffery-Giraud, S. *et al.* 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 (2009).
  33. Monaco, A. P., Bertelson, C. J., Liechti-Gallati, S., Moser, H. & Kunkel, L. M. An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics* 2, 90–95 (1988).
  34. Chang, Y.-F., Imam, J. S. & Wilkinson, M. F. The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 51–74 (2007).
  35. England, S. B. *et al.* Very mild muscular dystrophy associated with the deletion of 46% of dystrophin. *Nature* 343, 180–182 (1990).
  36. Melis, M. A. *et al.* Elevation of serum creatine kinase as the only manifestation of an intragenic deletion of the dystrophin gene in three unrelated families. *Eur. J. Paediatr. Neurol. EJPN Off. J. Eur. Paediatr. Neurol. Soc.* 2, 255–261 (1998).
  37. Harper, S. Q. *et al.* Modular flexibility of dystrophin: implications for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Nat. Med.* 8, 253–261 (2002).
  38. Beggs, A. H. *et al.* Exploring the molecular basis for variability among patients with Becker muscular dystrophy: dystrophin gene and protein studies. *Am. J. Hum. Genet.* 49, 54–67 (1991).
  39. Koenig, M. *et al.* The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am. J. Hum. Genet.* 45, 498–506 (1989).
  40. Disset, A. *et al.* An exon skipping-associated nonsense mutation in the dystrophin gene uncovers a complex interplay between multiple antagonistic splicing elements. *Hum. Mol. Genet.* 15, 999–1013 (2006).

41. Gurvich, O. L. *et al.* DMD exon 1 truncating point mutations: amelioration of phenotype by alternative translation initiation in exon 6. *Hum. Mutat.* 30, 633–640 (2009).
42. Tuffery-Giraud, S. *et al.* Mutation spectrum leading to an attenuated phenotype in dystrophinopathies. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 13, 1254–1260 (2005).
43. Todeschini, A. *et al.* Becker muscular dystrophy due to an intronic splicing mutation inducing a dual dystrophin transcript. *Neuromuscul. Disord. NMD* 26, 662–665 (2016).
44. Trabelsi, M. *et al.* When a mid-intronic variation of DMD gene creates an ESE site. *Neuromuscul. Disord.* 24, 1111–1117 (2014).
45. Bérout, C. *et al.* Dystrophinopathy caused by mid-intronic substitutions activating cryptic exons in the DMD gene. *Neuromuscul. Disord. NMD* 14, 10–18 (2004).
46. Tuffery-Giraud, S., Saquet, C., Chambert, S. & Claustres, M. Pseudoexon activation in the DMD gene as a novel mechanism for Becker muscular dystrophy. *Hum. Mutat.* 21, 608–614 (2003).
47. Klein, C. J. *et al.* Somatic reversion/suppression in Duchenne muscular dystrophy (DMD): evidence supporting a frame-restoring mechanism in rare dystrophin-positive fibers. *Am. J. Hum. Genet.* 50, 950–959 (1992).
48. Hoffman, E. P., Morgan, J. E., Watkins, S. C. & Partridge, T. A. Somatic reversion/suppression of the mouse mdx phenotype in vivo. *J. Neurol. Sci.* 99, 9–25 (1990).
49. Thanh, L. T., Nguyen, T. M., Helliwell, T. R. & Morris, G. E. Characterization of revertant muscle fibers in Duchenne muscular dystrophy, using exon-specific monoclonal antibodies against dystrophin. *Am. J. Hum. Genet.* 56, 725–731 (1995).
50. Sherratt, T. G., Vulliamy, T., Dubowitz, V., Sewry, C. A. & Strong, P. N. Exon skipping and translation in patients with frameshift deletions in the dystrophin gene. *Am. J. Hum. Genet.* 53, 1007–1015 (1993).
51. Lu, Q. L. *et al.* 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 (2000).
52. Bushby, K. *et al.* Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol.* 9, 77–93 (2010).
53. Muntoni, F. Is a muscle biopsy in Duchenne dystrophy really necessary? *Neurology* 57, 574–575 (2001).
54. Desguerre, I. *et al.* Endomysial fibrosis in Duchenne muscular dystrophy: a marker of poor outcome associated with macrophage alternative activation. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 68, 762–773 (2009).
55. Arechavala-Gomez, V. *et al.* Immunohistological intensity measurements as a tool to assess sarcolemma-associated protein expression. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 36, 265–274 (2010).
56. Taylor, L. E., Kaminoh, Y. J., Rodesch, C. K. & Flanigan, K. M. Quantification of dystrophin immunofluorescence in dystrophinopathy muscle specimens. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 38, 591–601 (2012).
57. Beekman, C. *et al.* A sensitive, reproducible and objective immunofluorescence analysis method of dystrophin in individual fibers in samples from patients with duchenne muscular dystrophy. *PLoS One* 9, e107494 (2014).
58. Anthony, K. *et al.* Dystrophin quantification: Biological and translational research implications. *Neurology* 83, 2062–2069 (2014).

59. Aartsma-Rus, A., Van Deutekom, J. C. T., Fokkema, I. F., Van Ommen, G.-J. B. & Den Dunnen, J. T. Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. *Muscle Nerve* 34, 135–144 (2006).
60. Brooke, M. H. *et al.* Clinical Investigation of Duchenne Muscular Dystrophy: Interesting Results in a Trial of Prednisone. *Arch. Neurol.* 44, 812–817 (1987).
61. Ricotti, V. *et al.* Long-term benefits and adverse effects of intermittent versus daily glucocorticoids in boys with Duchenne muscular dystrophy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 84, 698–705 (2013).
62. McDonald, C. M. *et al.* Long-term effects of glucocorticoids on function, quality of life, and survival in patients with Duchenne muscular dystrophy: a prospective cohort study. *Lancet Lond. Engl.* (2017). doi:10.1016/S0140-6736(17)32160-8
63. Schram, G. *et al.* All-cause mortality and cardiovascular outcomes with prophylactic steroid therapy in Duchenne muscular dystrophy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 61, 948–954 (2013).
64. Daftary, A. S., Crisanti, M., Kalra, M., Wong, B. & Amin, R. Effect of long-term steroids on cough efficiency and respiratory muscle strength in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Pediatrics* 119, e320-324 (2007).
65. Gloss, D., Moxley, R. T., Ashwal, S. & Oskoui, M. Practice guideline update summary: Corticosteroid treatment of Duchenne muscular dystrophy: Report of the Guideline Development Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 86, 465–472 (2016).
66. Lebel, D. E., Corston, J. A., McAdam, L. C., Biggar, W. D. & Alman, B. A. Glucocorticoid treatment for the prevention of scoliosis in children with Duchenne muscular dystrophy: long-term follow-up. *J. Bone Joint Surg. Am.* 95, 1057–1061 (2013).
67. Manzur, A. Y., Kuntzer, T., Pike, M. & Swan, A. Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD003725 (2008). doi:10.1002/14651858.CD003725.pub3
68. Moxley, R. T. *et al.* Practice parameter: corticosteroid treatment of Duchenne dystrophy: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology* 64, 13–20 (2005).
69. Birnkrant, D. J. *et al.* Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and neuromuscular, rehabilitation, endocrine, and gastrointestinal and nutritional management. *Lancet Neurol.* 17, 251–267 (2018).
70. Birnkrant, D. J. *et al.* Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and neuromuscular, rehabilitation, endocrine, and gastrointestinal and nutritional management. *Lancet Neurol.* 17, 251–267 (2018).
71. Griggs, R. C. *et al.* Efficacy and safety of deflazacort vs prednisone and placebo for Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 87, 2123–2131 (2016).
72. Eagle, M. *et al.* Managing Duchenne muscular dystrophy--the additive effect of spinal surgery and home nocturnal ventilation in improving survival. *Neuromuscul. Disord. NMD* 17, 470–475 (2007).
73. Toussaint, M., Steens, M. & Soudon, P. Lung function accurately predicts hypercapnia in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Chest* 131, 368–375 (2007).
74. Boussaïd, G. *et al.* Impact of invasive ventilation on survival when non-invasive ventilation is ineffective in patients with Duchenne muscular dystrophy: A prospective cohort. *Respir. Med.* 115, 26–32 (2016).

75. Duboc, D. *et al.* Effect of perindopril on the onset and progression of left ventricular dysfunction in Duchenne muscular dystrophy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 45, 855–857 (2005).
76. Duboc, D. *et al.* Perindopril preventive treatment on mortality in Duchenne muscular dystrophy: 10 years' follow-up. *Am. Heart J.* 154, 596–602 (2007).
77. Wahbi, K. [Cardiac involvement in dystrophinopathies]. *Arch. Pediatr. Organe Off. Soc. Francaise Pediatr.* 22, 12S37-41 (2015).
78. Bushby, K. *et al.* Ataluren treatment of patients with nonsense mutation dystrophinopathy. *Muscle Nerve* 50, 477–487 (2014).
79. Aartsma-Rus, A. *et al.* Theoretic applicability of antisense-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy mutations. *Hum. Mutat.* 30, 293–299 (2009).
80. de Feraudy, Y. *Corrélation phénotype-génotype chez des patients avec mutation du gène DMD et l'expression d'une dystrophine résiduelle* sous la direction du Pr Helge Amthor : Université Paris Diderot, 2017. Master 2 : Génétique : Paris : 2017.
81. Arora, H. *et al.* Longitudinal timed function tests in Duchenne muscular dystrophy: ImagingDMD cohort natural history. *Muscle Nerve* 58, 631–638 (2018).
82. Arechavala-Gomez, V. *et al.* Revertant fibres and dystrophin traces in Duchenne muscular dystrophy: implication for clinical trials. *Neuromuscul. Disord. NMD* 20, 295–301 (2010).
83. Nicholson, L. V., Johnson, M. A., Bushby, K. M. & Gardner-Medwin, D. Functional significance of dystrophin positive fibres in Duchenne muscular dystrophy. *Arch. Dis. Child.* 68, 632–636 (1993).
84. Fanin, M. *et al.* Dystrophin-positive fibers in Duchenne dystrophy: origin and correlation to clinical course. *Muscle Nerve* 18, 1115–1120 (1995).
85. Govoni, A. *et al.* Ongoing therapeutic trials and outcome measures for Duchenne muscular dystrophy. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 4585–4602 (2013).
86. McDonald, C. M. *et al.* The 6-minute walk test as a new outcome measure in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 41, 500–510 (2010).
87. Kim, S. *et al.* Associations between timing of corticosteroid treatment initiation and clinical outcomes in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord. NMD* 27, 730–737 (2017).
88. Cowen, L., Mancini, M., Martin, A., Lucas, A. & Donovan, J. M. Variability and trends in corticosteroid use by male United States participants with Duchenne muscular dystrophy in the Duchenne Registry. *BMC Neurol.* 19, 84 (2019).
89. van den Bergen, J. C. *et al.* Validation of genetic modifiers for Duchenne muscular dystrophy: a multicentre study assessing SPP1 and LTBP4 variants. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 86, 1060–1065 (2015).
90. Kerst, B. *et al.* Heterozygous myogenic factor 6 mutation associated with myopathy and severe course of Becker muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord. NMD* 10, 572–577 (2000).
91. Vieira, N. M. *et al.* Jagged 1 Rescues the Duchenne Muscular Dystrophy Phenotype. *Cell* 163, 1204–1213 (2015).
92. Hogarth, M. W. *et al.* Evidence for ACTN3 as a genetic modifier of Duchenne muscular dystrophy. *Nat. Commun.* 8, 14143 (2017).
93. Nicholson, L. V., Bushby, K. M., Johnson, M. A., Gardner-Medwin, D. & Ginjaar, I. B. Dystrophin expression in Duchenne patients with 'in-frame' gene deletions. *Neuropediatrics* 24, 93–97 (1993).
94. Wu, B. *et al.* Exon skipping restores dystrophin expression, but fails to prevent

disease progression in later stage dystrophic dko mice. *Gene Ther.* 21, 785–793 (2014).

95. Brown, K. J. *et al.* Accurate Quantitation of Dystrophin Protein in Human Skeletal Muscle Using Mass Spectrometry. *J. Bioanal. Biomed. Suppl* 7, (2012).

96. Beekman, C., Janson, A. A., Baghat, A., van Deutekom, J. C. & Datson, N. A. Use of capillary Western immunoassay (Wes) for quantification of dystrophin levels in skeletal muscle of healthy controls and individuals with Becker and Duchenne muscular dystrophy. *PloS One* 13, e0195850 (2018).

# Annexes 1

## Abréviations :

AAV	Virus adéno associé
ABD	<i>Actin binding domain</i>
AMM	Autorisation de mise sur le marché
AO	Oligonucléotide anti-sens
BMD	Dystrophie musculaire de Becker
CEREES	Comité d'expertise pour les recherches, les études et les évaluations dans le domaine de la santé
CGH	<i>Comparative genomic hybridization</i>
CNIL	Commission Nationale Informatique et Libertés
CPK	Créatine phosphokinase
CV	Capacité vitale
DCM	Cardiomyopathie liée à l'X
DGC	<i>Dystrophin-associated glycoprotein complex</i>
DMD	Dystrophie musculaire de Duchenne
Dp	<i>Dystrophin product</i>
EFR	Explorations fonctionnelles respiratoires
EMA	Agence européenne du médicament
ESE	<i>Exonic splicing enhancer</i>
ESS	<i>Exonic splicing suppressor</i>
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FEVG	Fraction d'éjection du ventricule gauche
HE	Hématoxyline éosine
HR	<i>Hazard ratio</i>
IEC	Inhibiteur de l'enzyme de conversion
KO	<i>Knock-out</i>
LSDB	<i>Locus specific dataBase</i>
LTBP	<i>Latent transforming growth factor-<math>\beta</math> binding protein</i>
MEC	Matrice extra-cellulaire
MLPA	<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
NGS	Séquençage de nouvelle génération
NMD	<i>Nonsense mediated decay</i>
PM	Poids moléculaire
QI	Quotient intellectuel
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
VNI	Ventilation non invasive



Titre en français

## **Impact clinique d'une dystrophine résiduelle en immunohistochimie chez des patients *DMD* mutés**

Résumé (français) :

Le Western blot et l'immunohistochimie sont deux techniques de routine clinique pour caractériser la dystrophine exprimée de patients avec dystrophinopathie. Des discordances peuvent exister. Certains patients peuvent avoir un marquage immunohistochimique faiblement positifs, d'aspect non révertant (traces), contrastant avec des résultats négatifs en Western blot. L'impact clinique de cette dystrophine résiduelle pose question.

Pour mieux caractériser et déterminer si cette expression faible peut atténuer la sévérité de la pathologie, nous nous sommes intéressés à des patients sans dystrophine en Western blot. Nous avons comparé les âges de perte de marche en fonction des quantités de dystrophine retrouvées en immunohistochimie. Les données cliniques sont issues des dossiers médicaux de leurs centres respectifs. Des analyses de survie ont été réalisées pour les âges de perte de marche.

Les patients inclus sont issus d'une précédente étude et aucun n'avait de dystrophine en Western blot (n=42). Parmi ces patients, ceux avec trace de dystrophine en immunohistochimie étaient ambulants plus longtemps que ceux avec dystrophine nulle ou uniquement révertante (HR 0,05 ; IC95% 0,00-0,53 ; P=0,013). Ces résultats ont été obtenus avec des anticorps spécifiques du domaine carboxy terminal de la dystrophine. Ces résultats n'ont pas été confirmés pour ceux ciblant le domaine central.

En conclusion, toute dystrophine en immunohistochimie semble utile à l'atténuation de la sévérité du phénotype. Celle-ci doit en revanche comporter les sites fonctionnels nécessaires à son action. Nos résultats doivent être interprétés à la lumière des limites inhérentes à la méthodologie de notre étude.

Mots clés (français) :

Duchenne, Becker, dystrophine, immunohistochimie, quantité

Titre en anglais :

## **Clinical impact of residual dystrophin in immunohistochemistry in patients with mutations of *DMD*.**

Abstract :

Western blot and immunohistochemistry are two routine clinical techniques to characterize the expression of dystrophin in patients with dystrophinopathy. Discrepancies may exist. Some patients may have weakly positive immunohistochemical staining, of non-reverting appearance (traces), contrasting with negative Western blot results. The clinical impact of this residual dystrophin is questionable.

To better characterize and determine if this weak expression can mitigate disease severity, we focused on patients with null dystrophin on Western blot. Residual dystrophin expression on immunohistochemistry was correlated with age at loss of ambulation of patients included. Clinical data were obtained from medical care centres. Time-to-event analysis was performed for age of loss-of-ambulation.

The patients included were from a previous study and none had dystrophin on Western blot (n=42). Patients with trace of dystrophin on immunohistochemistry, despite the absence of dystrophin on Western blots, ambulated longer than patients without dystrophin or with

isolated revertant fibers (HR 0.05; 95% CI 0.00-0.53; P=0.013). These results were obtained with antibodies specific to the terminal carboxy domain of dystrophin. These results were not confirmed for those targeting the central domain.

**In conclusion, any dystrophin in immunohistochemistry seems useful in reducing the severity of the phenotype. On the other hand, dystrophin expressed must include the functional sites necessary for its action. Our results must be interpreted in light of the limitations inherent in the methodology of our study.**

Keywords (english) :

Duchenne, Becher, Dystrophin, immunochemistry, quantity

**Université Paris Descartes  
Faculté de Médecine Paris Descartes  
15, rue de l'École de Médecine  
75270 Paris cedex 06**