

Université de Montréal

Caractérisation génétique d'un effet fondateur du sud-ouest du Québec: une
nouvelle forme de dystrophie musculaire des ceintures

par

Jonathan Jarry, B.Sc.

Programme de biologie moléculaire
Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du
grade de maîtrise en biologie moléculaire

Janvier, 2006

©, Jonathan Jarry, 2006



QH

506

U54

2006

v. 014

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
Caractérisation génétique d'un effet fondateur du sud-ouest du Québec: une
nouvelle forme de dystrophie musculaire des ceintures

présenté par :
Jonathan Jarry, B.Sc.

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Guy A. Rouleau
président-rapporteur

Dr. Bernard Brais
directeur de recherche

Dr. Michael Sinnreich
membre du jury

Les dystrophies musculaires des ceintures représentent un groupe hétérogène de maladies caractérisées par une atrophie des ceintures scapulaire et pelvienne. Nous avons identifié une cohorte de 14 patients provenant de huit familles canadiennes-françaises atteinte d'une nouvelle forme de dystrophie des ceintures avec atteinte des biceps et quadriceps. Les données cliniques suggèrent une très grande variabilité intra- et interfamiliale du phénotype de la maladie. Un criblage de l'ensemble du génome par homozygotie n'a pu révéler le locus de la maladie; un deuxième criblage par étude de liaison suivi d'une cartographie fine de la principale région d'intérêt a défini le locus de la maladie à un intervalle de moins de 3,3 cM sur le chromosome 11p13-p12. Quatre des huit gènes connus dans l'intervalle ont été séquencés sans qu'une mutation ne soit identifiée. Nous proposons d'appeler cette nouvelle dystrophie LGMD2L.

Mots-clés

Criblage du génome; liaison multipoint; haplotypes; myopathie; quadriceps; phénotype variable.

Limb-girdle muscular dystrophies (LGMD) are a heterogeneous group of diseases characterized by the atrophy of the scapular and pelvic girdles. We have identified 14 patients from eight French-Canadian families displaying a new form of LGMD with biceps and quadriceps atrophy. Clinical data suggest an extreme intra- and interfamilial phenotypic variability. A genome-wide scan by homozygosity mapping did not reveal the disease locus; a second scan by linkage analysis followed by fine mapping of the main region of interest uncovered a less-than-3.3-cM locus on chromosome 11p13-p12. Four of the eight genes known to be in the interval were excluded by sequencing. We propose to name this new form of the disease LGMD2L.

Keywords

Genome-wide scan; multipoint linkage; haplotypes; myopathy; quadriceps; variable phenotype.

Table des matières

Page titre	i
Identification du jury	ii
Résumé et mots-clés (français)	iii
Résumé et mots-clés (anglais)	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux	vii
Liste des figures	viii
Liste des abréviations	x
Dédicace	xi
Remerciements	xii
1 Introduction	1
1.1 Le complexe dystrophine-glycoprotéines	1
1.1.1 Dystroglycans	3
1.1.2 Sarcoglycans	5
1.1.3 Les autres protéines associées au DGC	8
1.2 Les dystrophies musculaires des ceintures	9
1.3 LGMD2A (calpaïnopathie): un effet fondateur sur l'Île de la Réunion	13
1.4 LGMD2B (dysferlinopathie): un gène, deux phénotypes	16
1.5 LGMD2C-F (sarcoglycanopathies): imitatrices de Duchenne	18
1.6 LGMD2G (téléthoninopathie): une pathogénèse fonctionnelle	22
1.7 LGMD2H (déficience en TRIM32): criblage par <i>pooling</i>	24
1.8 LGMD2I (déficience en FKRP): un mécanisme pathologique partagé	26
1.9 LGMD2J (titinopathie): un géant de 4 200 kD	28
1.10 LGMD2K (déficience en POMT1): dystrophie avec retard mental	30
1.11 Dystrophie des ceintures avec vacuoles bordées et expression réduite de laminine β 1	32
1.12 Les myopathies du quadriceps	32
1.13 Les effets fondateurs	35
1.14 Les études de liaison	37
2 Le recrutement d'une cohorte de patients	40
3 Premier criblage de l'ensemble du génome	48
3.1 Introduction	48
3.2 Un locus sur le chromosome 14	50
3.3 Conclusion	58
3.4 Matériels et méthodes	60
4 <i>A novel autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy with quadriceps atrophy maps to 11p13-p12 (second criblage de l'ensemble du génome)</i>	62
4.1 Introduction à l'article	62

4.2	Contribution des auteurs	64
4.3	Summary	65
4.4	Keywords	65
4.5	Abbreviations	65
4.6	Introduction	66
4.7	Patients and methods	68
4.7.1	Clinical assessment	68
4.7.2	Magnetic resonance imaging	68
4.7.3	Fluorescent and electron microscopy	69
4.7.4	Genome-wide scan and fine mapping	69
4.7.5	Linkage analysis	70
4.7.6	Sequencing of candidate genes (TRAF6 and LOC119710)	70
4.8	Results	70
4.8.1	Clinical phenotype	70
4.8.2	Magnetic resonance imaging (MRI)	75
4.8.3	Muscle histology	76
4.8.4	Mapping of the LGMD2L locus	77
4.8.5	Sequencing of the TRAF6 and LOC119710 genes	82
4.9	Discussion	83
4.10	Acknowledgements	87
5	Cartographie fine par SNPs	88
5.1	Un raffinement de l'intervalle par SNPs	88
5.2	En quête de recombinants observables	95
5.3	Des bornes conservatrices	97
5.4	COMMD9 et FLJ45212 séquencés	99
5.5	Matériels et méthodes	100
6	Discussion	101
6.1	Les dangers d'une cohorte hétérogène	101
6.2	Tous les chemins ne mènent pas à Rome: criblage par homozygotie vs. criblage par liaison	105
6.3	L'impact des boucles de consanguinité en étude de liaison	108
6.4	Les familles négatives	111
6.5	La composante immune	112
6.6	Un biais de sélection: des cas potentiels dans Charlevoix	115
	Bibliographie	120
	Appendice I	xvi
	Régions des chromosomes 6, 4 et X	xvi
	Les régions d'intérêt à un seul marqueur homozygote	xvii
	Une homozygotie trop petite pour être détectée	xix
	Une couverture incomplète	xxi
	Matériels et méthodes	xxii
	Appendice II	xxiv
	Appendice III	xxv

Liste des tableaux

I	Caractéristiques cliniques et génétiques des dystrophies musculaires des ceintures	10
II	Données cliniques, biochimiques, électromyographiques et pathologiques sur les patients de la cohorte de dystrophie des ceintures	44
III	Régions d'intérêt du premier criblage de l'ensemble du génome pour les individus testés des familles VIII et IX	49
IV	LOD scores obtenus en deux points sous MLINK pour les quatorze marqueurs microsatellites testés de la région d'intérêt	59
V	Clinical data on the LGMD2L cohort	74
VI	Données alléliques suivant le séquençage des sept SNPs pour les quatre individus sélectionnés	93
VII	Analyse de liaison en deux points sous MLINK pour la famille IX avec et sans la boucle de consanguinité pour une valeur θ de 0,0	110
VIII	Régions d'intérêt à un seul marqueur homozygote pour le premier criblage de l'ensemble du génome	xviii

Liste des figures

1	Le complexe dystrophine-glycoprotéines (tiré de Mathews KD, Moore SA. Limb-girdle muscular dystrophy. <i>Curr Neur Neurosc Rep</i> 2003; 3: 78-85)	2
2	Les cinq sarcoglycans connus et l'homologie entre eux (tiré de Hack AA, Groh ME, McNally EM. Sarcoglycans in Muscular Dystrophy. <i>Microscopy Research and Technique</i> 2000; 48: 167-180)	6
3	Arbres généalogiques des onze familles recrutées pour la dystrophie musculaire des ceintures avec atteinte des quadriceps	41
4	Illustration des muscles de la cuisse. (A) Coupe frontale; (B) Coupe transversale (tirée de Anderson JE. <i>Grant's Atlas of Anatomy</i> , Seventh Edition, Williams and Wilkins, Baltimore, 1978)	42
5	Illustration des muscles du bras (tirée de Anderson JE. <i>Grant's Atlas of Anatomy</i> , Seventh Edition, Williams and Wilkins, Baltimore, 1978)	43
6	Marqueurs microsatellites du chromosome 14 génotypés pour les individus recrutés	52
7	Haplotypes pour les individus atteints après le génotypage de six marqueurs microsatellites dans la région d'intérêt	53
8	Gel de polyacrylamide du marqueur <i>D14S587</i> (la flèche indique la hauteur des bandes non détectées lors du criblage de l'ensemble du génome)	54
9	Haplotypes pour les individus atteints après le génotypage de quatorze marqueurs microsatellites dans la région d'intérêt	56
10	Patients et frères et soeurs non atteints(es) partageant un haplotype pour les quatorze marqueurs testés de la région d'intérêt	57
11	Pedigrees of the LGMD2L families	72
12	Atrophy of the arm and thigh muscles as clinically assessed on patients IX-11 and IX-15 and for four patients on MRI	73
13	(A) HPS stain, x 200. Small groups of atrophic fibres admixed with hypertrophic fibres. (B) EM micro-photograph, x 7,100. Starburst-like organization of collagen protofilaments in perimysium. (C) EM micro-	78

	photograph, x 18,000. Reduplicated basement membrane associated with multifocal loss of sarcolemmal membrane. (D) EM micro-photograph, x 18,000. Strands of dense flocculent material adjacent to thickened basement membrane on left-hand side, and long spacing collagen, lower right. On micro-photographs B, C, and D, the bar indicates 10 microns.	
14	Multipoint LOD score distribution for the eight LGMD2L families at the 11p13-p12 locus.	80
15	Haplotypes for the affected individuals of the LGMD2L cohort at the 11p13-p12 locus	81
16	Intervalle candidat pour la cohorte LGMD2L tel que vu sur le UCSC <i>Genome Browser</i>	89
17	Position de l'intervalle candidat par rapport à la région du chromosome 11 ne contenant aucun gène connu	90
18	Position des SNPs testés dans l'intervalle candidat 11p13-p12	91
19	Haplotypes pour les individus atteints après le séquençage des SNPs dans l'intervalle candidat 11p13-p12	94
20	Recombinants observés chez les individus III-6 et VIII-3 après le séquençage des SNPs pour les individus atteints de la cohorte	96
21	Haplotypes des familles VIII et III après le séquençage des SNPs pour tous les individus recrutés de ces familles. (A) Famille VIII; (B) Famille III	98
22	Position des haplotypes conservés pour les familles VIII et IX en fonction des marqueurs testés lors des deux criblages et de la cartographie fine	107
23	Origine géographique des huit familles liées au locus LGMD2L	116
24	Régions génomiques où l'homozygotie des individus atteints de la famille IX révèle le partage possible d'un chromosome chez les individus atteints de la famille VIII	xx

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AOA2	Ataxie avec apraxie oculaire 2
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messager
bp	Paire de bases
CAPN3	Calpaïne 3
CHUM	Centre hospitalier de l'Université de Montréal
CK	Créatine kinase
cM	CentiMorgan
CSLSJ	Charlevoix-Saguenay-Lac-St-Jean
DAG	Dystrophin-associated glycoprotein
DAP	Dystrophin-associated protein
DGC	Complexe dystrophine-glycoprotéines
DMOP	Dystrophie musculaire oculopharyngée
EST	Expressed sequence tag
FCMD	Dystrophie musculaire de Fukuyama
FKRP	Fukutin-related protein
GNE	UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmanosamine kinase
GRB2	Growth factor receptor-bound protein 2
IBM	Myosite à corps d'inclusion
kB	Kilobase
kD	KiloDalton
LGMD	Dystrophie musculaire des ceintures
LGMD1	Dystrophie musculaire des ceintures dominante
LGMD2	Dystrophie musculaire des ceintures récessive
LOD	Logarithm of the odds
MB	Mégabase
MDC1C	Dystrophie musculaire congénitale 1C
MEB	Syndrome de muscle-oeil-cerveau de Santavuori
MYH2	Myosin heavy chain IIa
NFκB	Nuclear factor κB
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PCR	Polymerase chain reaction
POMT1	Protéine O-mannosyltransférase 1
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
SNP	Single nucleotide polymorphism
TMD	Tibial muscular dystrophy
TNF	Tumor necrosis factor
TRAF	Tumor necrosis factor receptor associated factor
UI	Unité internationale
WWS	Syndrome de Walker-Warburg
YAC	Chromosome artificiel de levure

Dédicace

Aux patients qui ont bien voulu participer à l'étude.

Et à Claire Labelle.

Remerciements

Un projet d'envergure tel que celui présenté dans ce mémoire n'est jamais l'oeuvre d'une seule personne. Ce travail de maîtrise m'a donné l'opportunité de côtoyer des gens qui, pour la plupart, ne se contentaient jamais du minimum demandé et qui m'ont donc poussé au-delà du seuil de la facilité.

J'aimerais remercier Lina Loisel, infirmière de recherche, pour qui les patients de l'étude ont toujours été plus que de simples noms sur une liste. Lina est passée maître dans l'art de défricher le terrain d'un nouveau projet et d'en cultiver de bonnes relations avec les patients. Sans son dévouement et sa bonne humeur, les numéros d'identification des patients seraient demeurés des numéros. Un gros merci au docteur Yves Robitaille pour son enthousiasme bien vivant et un désir de collaborer des plus impressionnants. Voilà bien un pathologiste qui n'a pas perdu son côté social et sympathique. Je me dois de remercier aussi le docteur Marie-France Rioux, sans qui le diagnostic d'une nouvelle dystrophie des ceintures ne serait demeuré qu'une autre élucubration du cerveau de mon patron, le docteur Vivianne Khoury, pour la rapidité et la minutie de son travail, et Marie-Pierre Dubé, pour m'avoir introduit au merveilleux (quoi qu'intimidant) monde de la biostatistique.

Trois assistants de recherche se méritent une place dans mes remerciements pour m'avoir aidé à quelque point que ce soit durant mes deux années de maîtrise: Josée Poirier, que je dois remercier pour m'avoir enseigné les techniques de base en génotypage, Marie-Josée Dicaire, que je dois remercier pour son aide avec les buvardages de Northern et les cDNAs et tout le tralala, tous des trucs qu'un (potentiellement) futur biologiste médico-légal n'en a apparemment rien à foutre, comme

dirait un de mes collègues à l'origine germanique nébuleuse, et Martin Pagé, que je dois remercier pour avoir été Martin Pagé.

La routine des extractions d'ADN et des *tanks à buffer* qui coulent n'est brisée bien souvent que par nos relations d'avec nos collègues. J'aimerais donc, pour diverses raisons, les remercier, un sourire en coin: Arnaud Klein, *a priori*, pour avoir relevé le défi de partager une chambre d'hôtel avec moi (à deux reprises!) et pour avoir offert pour la première fois une description exhaustive de mon sens de l'humour dans un resto-bar pseudo-irlandais du centre-ville de Toronto; Isabelle Gosselin, pour m'avoir prouvé qu'il y a toujours plus sarcastique que soi et pour avoir toujours remis en question les choses qui semblaient d'apparence évidentes («oui, mais, est-ce que... ?»); Katel Roddier, pour avoir incarné l'idéologie du 180 degrés sans avoir eu recours à la danse moderne; et, bien sûr, Martine Tétreault et Isabelle Thiffault, pour leur dévouement à leur travail, leur force de caractère, leurs opinions inébranlables, leur aide multiple au quotidien, leur impeccable sens de l'habillement en tant que chercheuses post-modernes et le fait qu'elles se soient déguisées en insectes à l'Halloween.

Bernard Brais, Bernard Brais... voilà arrivé à la partie difficile des remerciements. Les multiples sigles et initiales suivant son nom représentent autant d'idées et de points de vue que son cerveau est capable de générer. Sans lui, il va sans dire, les pages suivantes n'existeraient pas et mon cheminement de carrière aurait été bien différent. En ayant été son extrême polaire, j'ai appris beaucoup. J'ai été le Scully à son Mulder, construisant mon scepticisme sur les fondations parfois (je dis bien, parfois) chancelantes de ses édifices idéologiques. J'ai bien aimé appliquer un raisonnement clair et posé à ses instincts de chercheur. Cependant, un point sur lequel nous ne nous opposons pas est bien le sens de l'humour et il m'a fait grand plaisir d'avoir un patron capable de faire entrer dans son bureau une dizaine d'étudiants et d'employés costumés en cuissards noirs et T-shirts jaunes. Il m'a fait douter lorsque j'étais certain; il m'a convaincu lorsque j'étais hésitant. Pour toutes ces raisons, merci, Bernard.

J'aimerais embrasser mes parents (mais pas sur la bouche, quand même) pour leur support moral, financier et culinaire (très, très occasionnel). Sans eux, bien, je ne serais pas là, il en va sans dire.

Finalement, j'aimerais remercier Robin Williams pour être l'homme le plus drôle que je ne connaisse pas.

1

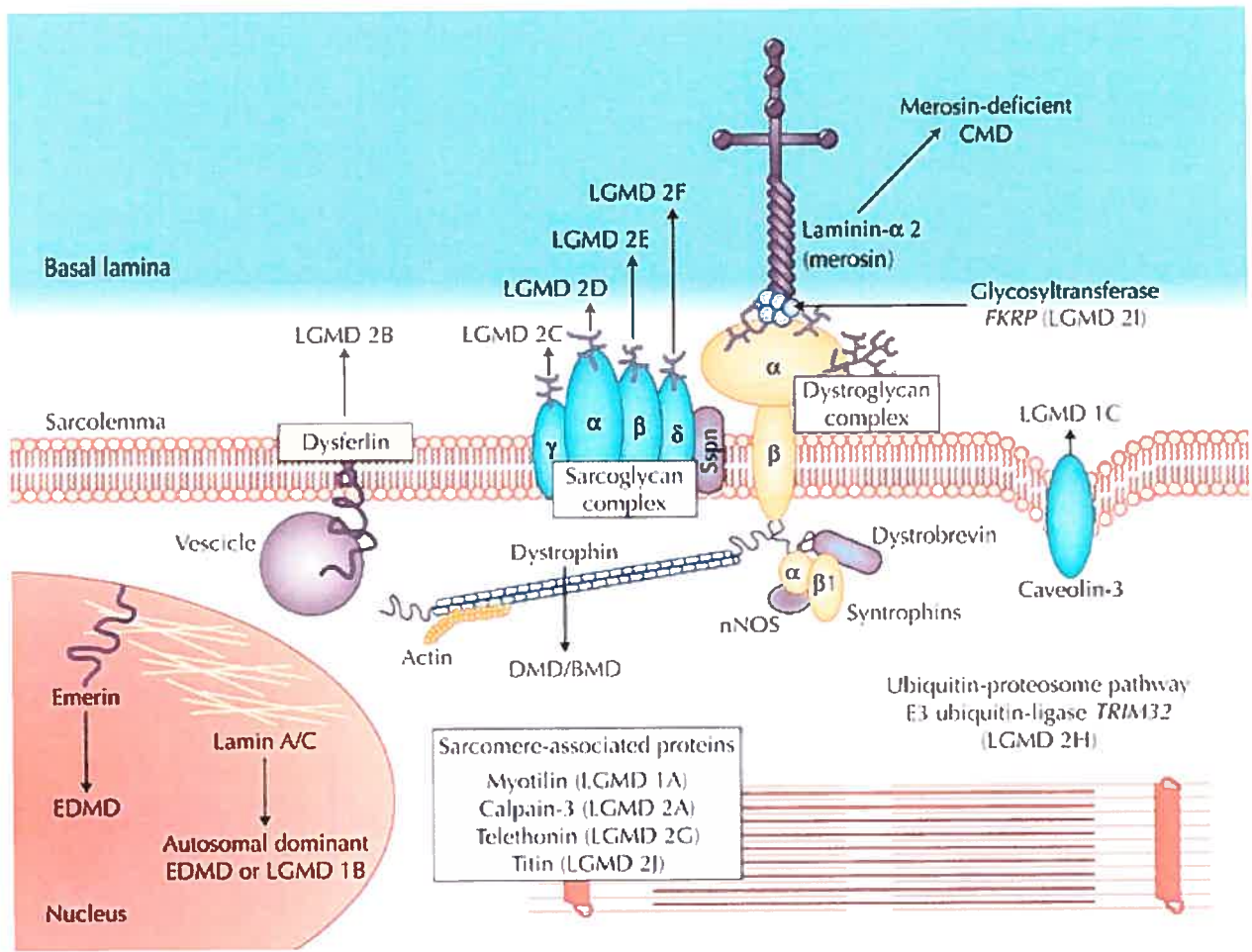
Introduction

Les dystrophies musculaires des ceintures représentent un groupe hétérogène de maladies dont la pathogénèse est liée à une atteinte du muscle squelettique. Avant d'entamer une étude approfondie de cette nouvelle forme de dystrophie musculaire des ceintures découverte dans la population canadienne-française, il importe de se pencher sur la structure de la fibre musculaire qui contribue à son intégrité, tout particulièrement le complexe dystrophine-glycoprotéines. Son importance au niveau des dystrophies musculaires ne peut plus être mise en doute: le gène de la dystrophine est muté chez les patients atteints de dystrophie musculaire de Duchenne et de Becker et le gène codant pour chacun des sarcoglycans α , β , γ et δ a été impliqué dans les sarcoglycanopathies, un sous-groupe important des dystrophies des ceintures. Une revue des différentes formes de dystrophies des ceintures suivra afin d'illustrer le spectre clinique de ces maladies ainsi que les techniques utilisées dans leur étude moléculaire.

1.1 Le complexe dystrophine-glycoprotéines

Les fibres musculaires striées sont liées à la matrice extracellulaire par le macro-complexe protéique dystrophine-glycoprotéines (en anglais, *dystrophin-glycoprotein complex* ou *DGC*, Figure 1, page 2). La dystrophine est une longue protéine du cytosquelette de forme allongée servant d'échaffaud auquel l'actine du muscle s'accroche. C'est en 1990 que la dystrophine a été purifiée, associée à un complexe oligomérique de protéines pouvant être séparé en deux: les DAP (*dystrophin-associated proteins*, de nouvelles protéines faisant partie du sarcolemme, la membrane externe de la fibre musculaire striée) et les DAG (*dystrophin-associated glycoproteins*) (Sunada and Campbell, 1995). La sous-classe des glycoprotéines associées à la dystrophine peut être elle-même divisée en deux: les dystroglycans et les sarcoglycans.

Figure 1: Le complexe dystrophine-glycoprotéines (tiré de Mathews KD, Moore SA. Limb-girdle muscular dystrophy. *Curr Neur Neurosc Rep* 2003; 3: 78-85)



1.1.1 Dystroglycans

Les dystroglycans, au nombre de deux, proviennent d'un unique brin d'ARNm qui donne lieu à un proto-peptide subséquemment coupé en deux pour former l' α -dystroglycan et le β -dystroglycan (Henry and Campbell, 1999). L' α -dystroglycan est une glycoprotéine extracellulaire de la membrane périphérique s'associant à plusieurs protéines extracellulaires, dont les laminines-1 et -2, le perlecan et l'agrine, et se liant de façon non-covalente au β -dystroglycan. Ce dernier, quant à lui, est une protéine transmembranaire se liant, à l'intérieur de la fibre musculaire, à la dystrophine (Jung et al., 1995). Ainsi, l'actine, par voie de la chaîne dystrophine/ β -dystroglycan/ α -dystroglycan, est reliée au milieu extracellulaire. La dystrophine n'est cependant pas l'unique partenaire intracellulaire du β -dystroglycan; ce dernier se lie aussi à GRB2 (*growth factor receptor-bound protein 2*) et à la rapsyne. Le lien β -dystroglycan/GRB2 demeure mal compris, mais un isolat de synaptosomes de cerveaux bovins contenant le dystroglycan, GRB2 et des kinases d'adhésion focales laisse penser que le β -dystroglycan pourrait avoir un rôle à jouer dans les voies de transduction signalétique étant donné que les kinases d'adhésion focales font partie d'une voie signalant la migration cellulaire et la différenciation cellulaire ancrage-dépendent (Cavaldesi et al., 1999). La rapsyne, de son côté, est importante lors de la formation de la synapse neuromusculaire pour le recrutement des récepteurs de l'acétylcholine (Gautam et al., 1995).

Du côté extracellulaire, les multiples ligands de l' α -dystroglycan suggèrent une fonction cruciale de cette glycoprotéine dans la conservation de la structure de la fibre musculaire et dans sa communication avec le milieu extracellulaire. Le premier partenaire d'interaction répertorié pour l' α -dystroglycan a été la laminine-1, une composante majeure de la lame basale dont les multiples fonctions incluent l'adhésion, la migration, la croissance et la différenciation cellulaires (Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1992). Le perlecan et l'agrine, deux protéines de la classe des protéoglycans héparane-sulfate, viennent s'ajouter à la liste des partenaires de liaison extracellulaires de l' α -dystroglycan: le perlecan est ubiquitaire dans tous les tissus, toujours localisé à la

membrane basale, alors que l'agrine est impliquée dans la formation de la jonction entre le nerf et le muscle (Henry and Campbell, 1999).

Devant l'apparente importance des α - et β -dystroglycans, il est surprenant d'apprendre qu'aucune mutation dans le gène DAG1, codant pour les deux dystroglycans, n'a été jusqu'à maintenant associée à une maladie chez l'humain. Il est intéressant de remarquer qu'une souris *dag1^{-/-}* meurt au stade embryonnaire, car la membrane de Reichert séparant l'embryon du tissu maternel est inexistante (Williamson et al., 1997). Le dystroglycan, dans sa forme sauvage, semble cependant agir comme médiateur pathologique dans les cas de la lèpre, expliquant l'entrée du *Mycobacterium leprae* dans les cellules de Schwann (Rambukkana et al., 1998). Plus pertinemment, des déficiences secondaires en dystroglycan ont été rapportées dans plusieurs formes de dystrophies musculaires. Un muscle déficient en dystrophine, tel le muscle d'un patient atteint de dystrophie musculaire de Duchenne, voit son β -dystroglycan désorganisé au niveau du sarcolemme (Williams and Bloch, 1999). Plusieurs sarcoglycanopathies sont caractérisées par une déficience secondaire en dystroglycan (Henry and Campbell, 1999). Cette déficience pourrait avoir un impact au niveau musculaire sur deux fronts. Premièrement, la maturation et l'entretien des fibres musculaires pourraient être débalancés dû à l'implication du dystroglycan et de la laminine au niveau des voies de signalisation favorisant la survie des myotubes (Vachon et al., 1996). Deuxièmement, le rôle structurel que joue le dystroglycan au niveau de l'organisation de la matrice extracellulaire pourrait être sévèrement perturbé par une réduction de la quantité de cette glycoprotéine.

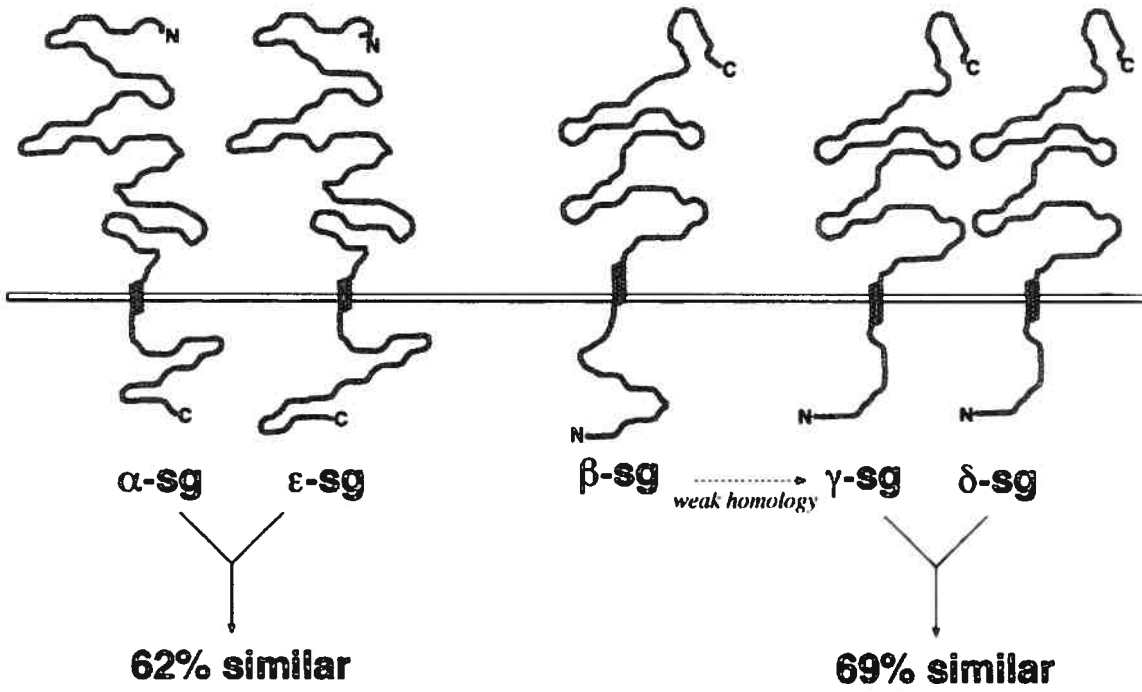
Bien que des mutations pré-traductionnelles n'aient pas été répertoriées dans l'homologue humain DAG1, la voie post-traductionnelle, notamment de glycosylation, du dystroglycan peut affecter la fonction de la protéine et conduire à une pathologie. La dystrophie musculaire congénitale de Fukuyama (FCMD), le syndrome de muscle-oeil-cerveau de Santavuori (MEB) et le syndrome de Walker-Warburg (WWS) constituent un ensemble de dystrophies musculaires congénitales avec atteinte du système nerveux étant reliées, de près ou de loin, à une modification de la glycosylation du dystroglycan

(Michele and Campbell, 2003). Des données préliminaires publiées en 2001 et 2002 rapportaient que l' α -dystroglycan était absent des sarcolemmes de patients atteints de FCMD et d'autres atteints de MEB. Cependant, en 2002, l'équipe de Michele a infirmé ces données, révélant que le dystroglycan (et, en fait, le complexe dystrophine-glycoprotéines au complet) n'était pas absent du sarcolemme pour ces dystrophies; le dystroglycan est en fait détectable 60 kDa plus bas que le dystroglycan normal, une perte de poids moléculaire expliquée par une hypoglycosylation de l' α -dystroglycan (Michele et al., 2002). Cette hypoglycosylation empêche le dystroglycan de jouer son rôle en tant que participant à la voie de signalisation extracellulaire dont la laminine fait partie, créant du coup la migration neuronale anormale expliquant le phénotype de retard mental et de lissencéphalie observé chez les patients. Cette explication semble aussi s'appliquer aux patients souffrant du syndrome de Walker-Warburg puisque le gène muté correspond à POMT1, une O-mannosyltransférase (OMIM 236670).

1.1.2 Sarcoglycans

Les sarcoglycans représentent le deuxième groupe de glycoprotéines liées à la dystrophine et faisant partie du DGC. Les sarcoglycans possèdent un court domaine intracellulaire glycosylé, une région transmembranaire unique et un long domaine extracellulaire caractérisé par la présence de plusieurs cystéines (Ervasti and Campbell, 1993). Les sarcoglycans sont présentement au nombre de six, mais seulement quatre sont présents dans le sarcolemme des cellules musculaires: l' α -, le β -, le γ - et le δ -sarcoglycan (Figure 2, page 6). L' ϵ -sarcoglycan est hautement exprimé dans plusieurs tissus lors de l'embryogénèse, mais son expression diminue à un niveau à peine détectable chez le muscle strié adulte; de plus, l' ϵ -sarcoglycan ne semble pas intégral au DGC (Straub et al., 1999). Ce sarcoglycan est cependant muté dans un type de dystonie avec myoclonie (Zimprich et al., 2001). Des études biochimiques ont révélé que les sarcoglycans forment un complexe unique dont l'intégrité peut être sévèrement compromise si l'un des membres est absent ou tronqué (Bushby, 1999b). La nature exacte de ces défauts et l'impact qu'ils ont sur le DGC et le phénotype clinique seront discutés plus en détails dans la section 1.5 réservée aux sarcoglycanopathies.

Figure 2: Les cinq sarcoglycans connus et l'homologie entre eux (tiré de Hack AA, Groh ME, McNally EM. Sarcoglycans in Muscular Dystrophy. *Microscopy Research and Technique* 2000; 48: 167-180)



L'équipe de Kathleen H. Holt et Kevin P. Campbell a été la première à démontrer que l'assemblage du complexe de sarcoglycans dépendait de la synthèse simultanée des quatre sarcoglycans (Holt and Campbell, 1998). Des vecteurs d'expression contenant les sarcoglycans de type sauvage ainsi que des constructions représentant les délétions majeures observées chez des patients atteints de sarcoglycanopathies ont été insérés dans des cellules CHO afin de mesurer le degré de glycosylation et la localisation de chaque sarcoglycan. De plus, de l'immunobuvardage a été effectué sur les complexes de sarcoglycans présents dans des cellules où seul le β -sarcoglycan était muté. Les résultats ont démontré que le complexe de sarcoglycans était complètement absent de la surface des cellules. Des lysats cellulaires ayant confirmé que des taux normaux de chaque sarcoglycan étaient synthétisés, l'équipe a dû conclure que les sarcoglycans sauvages (l' α , le γ et le δ) demeuraient pris dans des bassins membranaires internes. Des études d'immunofluorescence ont pu confirmer la présence de ces trois sarcoglycans en concentration autour du noyau et non au sarcolemme. Une mutation du β -sarcoglycan semble empêcher la migration du complexe vers le sarcolemme. Bien que l' ϵ -sarcoglycan ne fasse pas partie du complexe de sarcoglycans tel qu'il est maintenant défini, une perte de ce sarcoglycan est observée dans les muscles squelettiques et cardiaques déficients en β - et δ -sarcoglycans, laissant croire en la présence d'un second complexe de sarcoglycans dans ces muscles (Durbeej et al., 2000). L'hypothèse qui a été mise de l'avant afin d'expliquer le mécanisme pathogénétique de certaines sarcoglycanopathies où le gène β - ou δ -sarcoglycan est muté est la suivante: la mutation n'affecte pas seulement le complexe des sarcoglycans des muscles striés (composé de l' α -, du β -, du γ - et du δ -sarcoglycan), mais aussi un complexe propre aux muscles vasculaires, squelettiques et cardiaques où l' α -sarcoglycan se voit remplacé par l' ϵ -sarcoglycan. Ce second complexe serait alors déstabilisé, laissant place à des constrictions microvasculaires qui rendraient le muscle cardiaque plus susceptible à une ischémie intermittente, ce qui expliquerait les problèmes cardiaques souvent associés aux sarcoglycanopathies (Cohn and Campbell, 2000).

1.1.3 Les autres protéines associées au DGC

Trois autres groupes de protéines sont connus comme étant fortement liés au complexe dystrophine-glycoprotéines: il s'agit du sarcospan, des syntrophines et des dystrobrevines.

La protéine sarcospan a été caractérisée chez l'humain pour la première fois par Crosbie en 1997 (Crosbie et al., 1997). Le gène KRAG code pour une protéine de 25 kD contenant quatre domaines transmembranaires et que des analyses immunohistochimiques ont démontré s'associait avec le DGC. Ce sarcospan est absent chez les patients atteints de sarcoglycanopathies, particulièrement ceux dont la mutation se trouve dans le gène du γ -sarcoglycan (Crosbie et al., 2000). Il se pourrait que l'assemblage du complexe des sarcoglycans soit un prérequis pour la migration et l'intégration du sarcospan à la membrane sarcolemmale. Jusqu'à ce jour, aucune maladie n'a été associée à une mutation dans le gène KRAG. Des souris déficientes en sarcospan ne développent pas de myopathie (Lebakken et al., 2000).

Les syntrophines représentent un groupe hétérogène de protéines phosphorylées présentes du côté cytoplasmique du sarcolemme (OMIM 601017). Cinq syntrophines sont connues: les syntrophines $\alpha 1$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$ et $\gamma 2$. L'intérêt porté aux syntrophines s'explique par le fait qu'elles sont directement liées à la dystrophine. De plus, il semblerait que la syntrophine $\alpha 1$ soit impliquée dans le processus de synaptogénèse.

Les dystrobrevines ont été identifiées pour la première fois chez *Torpedo californica*, le poisson-torpille. La dystrophine a été isolée comme faisant partie d'un complexe de trois protéines, l'une d'entre elle se révélant être la dystrobrevine (Butler et al., 1992). Chez l'humain, l' α -dystrobrevine démontre une homologie de 50% d'avec les domaines C-terminal et riche en cystéines de la dystrophine pour ce qui est du plus grand cadre de lecture. Une réduction de la coloration de la dystrobrevine est remarquée chez les patients atteints de dystrophie musculaire de Duchenne ou d'une sarcoglycanopathie (Metzinger et al., 1997). Une autre forme de la dystrobrevine, appelée β -dystrobrevine, est observée dans les neurones corticaux, mais pas dans les muscles, ce qui pourrait

potentiellement expliquer les troubles cognitifs démontrés par plusieurs patients souffrant de dystrophie de Duchenne ou de Becker où la dystrophine, à laquelle la β -dystrobrevine se lie, est absente ou diminuée, respectivement (Blake et al., 1998). Une étude récente a démontré que l'expression des syntrophines et des dystrobrevines serait en fait beaucoup plus compliquée: les multiples isoformes de ces phosphoprotéines auraient des taux d'expression variables à travers le développement des muscles squelettiques et réagiraient de manière distincte à l'absence de dystrophine et à la dénervation (Compton et al., 2005). De plus amples recherches sont nécessaires afin de mettre en lumière le rôle précis de ces protéines cytoplasmiques dans la conservation de la structure du complexe dystrophine-glycoprotéines.

1.2 Les dystrophies musculaires des ceintures

La catégorie clinique appelée «dystrophie musculaire des ceintures» a été proprement établie lors de la publication de l'article «On the classification, natural history and treatment of the myopathies» de Walton et Nattrass, publié en 1954 dans la revue *Brain* (Wicklund, 2003). Ce rassemblement sous un même nom d'un certain nombre de myopathies a permis une clarification de celles-ci, qui apparaissaient pour le moins ecclésiastiques dû à l'emploi de désignations non-standardisées (la dystrophie juvénile d'Erb et la dystrophie pelvifémorale de Leyden-Mobius, pour n'en nommer que deux).

Les dystrophies musculaires des ceintures (en anglais, *limb-girdle muscular dystrophies*, ou *LGMD*) sont définies comme étant un groupe de maladies caractérisées par une atrophie des muscles des ceintures scapulaire et pelvienne servant à rattacher les bras et les jambes au tronc, respectivement. Une atteinte subséquente des muscles proximaux (c'est-à-dire les muscles des bras et des cuisses) est fréquemment observée, mais les muscles faciaux sont généralement épargnés, distinguant ainsi les dystrophies des ceintures des dystrophies facioscapulohumérales.

Les dystrophies musculaires des ceintures, qui comprennent à ce jour 18 formes distinctes, sont un groupe relativement hétérogène de myopathies (Tableau I, page 10). Certaines des formes se caractérisent par des taux sériques de l'enzyme créatine

Tableau I: Caractéristiques cliniques et génétiques des dystrophies musculaires des ceintures

Maladie	Locus	Protéine	Caractéristique
<i>Autosomique dominante</i>			
LGMD1A	5q22,3-q31,3	Myotiline	Dysarthrie
LGMD1B	1q11-q21	Lamine A/C	Contractures
LGMD1C	3p25	Cavéoline-3	<i>Mounding/Rippling</i>
LGMD1D	6q23	Inconnue	Cardiomyopathie
LGMD1E	7q	Inconnue	Aucune
LGMD1F	7q32,1-q32,2	Inconnue	Aucune
LGMD1G	4p21	Inconnue	Flexion des doigts et orteils limitée
<i>Autosomique récessive</i>			
LGMD2A	15q15,1	Calpaïne 3	Faiblesse des adducteurs
LGMD2B	2p13	Dysferline	Atrophie distale des jambes
LGMD2C-F	13q, 17q, 4q, 5q	γ , α -, β -, δ -sarcoglycan	Aucune
LGMD2G	17q11-q12	Téléthonine	Brésilienne
LGMD2H	9q31-q34	TRIM32	Huttérite
LGMD2I	19q13,3	Fukutin-related protein	Atteinte du système respiratoire
LGMD2J	2q31	Titine	Finlandaise
LGMD2K	9q34,1	POMT1	Retard mental

Adapte et mis a jour a partir d'un tableau de Wicklund & Hilton-Jones, *Neurology* 2003 60, pp. 1230-1231.

kinase (CK) très élevés, alors que d'autres ont des taux normaux. Une hypertrophie des mollets est un signe clinique caractéristique de quelques unes des dystrophies des ceintures alors que, pour d'autres, elle ne l'est pas. Certaines formes sont accompagnées d'une cardiomyopathie; plusieurs ne le sont pas.

Les dystrophies musculaires des ceintures se divisent en deux catégories distinctes selon leur mode de transmission génétique. Les dystrophies à transmission autosomique dominante (désignées LGMD1) sont au nombre de sept, alors que les dystrophies à transmission autosomique récessive (recensées sous l'abréviation LGMD2) existent sous dix formes différentes. Une brève revue des LGMD1 suivra, alors que les LGMD2, desquelles la nouvelle forme décrite dans ce mémoire fait partie, feront l'objet d'une discussion plus détaillée.

LGMD1A (OMIM 159000) est une forme relativement rare de la maladie qui s'explique par une mutation dans le gène encodant la protéine myotiline (Wicklund, 2003). Une faiblesse musculaire des membres inférieurs proximaux tend à s'établir avant l'atrophie des muscles des membres supérieurs; la caractéristique clinique principale de la maladie, cependant, est la présence de dysarthrie ou une difficulté d'articulation qui peut, dans certains cas, être le seul indice d'affection d'un individu.

Des mutations dans le gène codant pour la lamine A/C (1q11-q21) peuvent causer jusqu'à six phénotypes différents, dont LGMD1B (OMIM 159001). Un génotype identique à même une famille peut se révéler à travers de multiples phénotypes: Brodsky *et al.*, 2000, rapportent que la délétion d'un nucléotide dans l'exon 6 du gène lamine A/C est présente chez tous les individus atteints d'une même famille, mais leur phénotype varie de cardiomyopathie sans atteinte musculaire à cardiomyopathie couplée à une atrophie des ceintures musculaires, avec quelques individus démontrant une atteinte des muscles cardiaques et un phénotype semblable à la dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss. Le phénotype LGMD1B se déclare lors de l'enfance dans la majorité des cas et des arythmies cardiaques prononcées forcent souvent

l'implantation d'un stimulateur cardiaque (Bushby, 1999a). Une transplantation cardiaque est parfois nécessaire si la faiblesse des muscles du coeur persiste.

LGMD1C (OMIM 607801) est aussi l'un des multiples phénotypes découlant d'un même génotype. Une mutation dans le gène encodant la cavéoline-3, l'isotype musculaire des protéines intégrales à la membrane cavéolaire, peut résulter en une expression clinique de type LGMD, mais aussi en un *rippling muscle disease*, une élévation asymptomatique des taux sériques de créatine kinase et une myopathie distale (Wicklund, 2003). LGMD1C est une forme rare de la maladie aux symptômes allant de faibles à modérés. Le diagnostic moléculaire peut s'effectuer par séquençage, mais d'autres techniques sont aussi disponibles. Un buvardage de Western démontre une réduction de plus de 95% des niveaux protéiques de la cavéoline-3 et une étude par microscopie électronique permet de remarquer une diminution notable du nombre de cavéoles (Minetti et al., 2002).

Les quatre autres formes autosomiques dominantes de la maladie ont été liées à des loci, mais les gènes mutés demeurent inconnus. LGMD1D (OMIM 603511) a été rapportée par Messina *et al.* en 1997 comme étant une cardiomyopathie dilatée familiale accompagnée de défauts de conduction et de dystrophie musculaire (Messina et al., 1997). L'atteinte cardiaque est particulièrement prononcée chez les individus atteints. Aucun article n'a été publié depuis que la maladie ait été liée à un locus de 3 centiMorgans (cM) sur le chromosome 6q23.

LGMD1E n'ayant aucune caractéristique clinique particulière, comme la présence de dysarthrie ou de cardiomyopathie, cette forme de la maladie a été identifiée tout d'abord par exclusion génétique par le groupe de Speer (Speer et al., 1995), puis par liaison de deux familles à un locus de 9 cM sur le long bras du chromosome 7 (Speer et al., 1999).

Une nouvelle forme de la maladie à transmission autosomique dominante, LGMD1F (OMIM 608423), a été rapportée pour la première fois en 2001 par l'équipe de Gamez.

La dystrophie s'était manifestée au sein d'une même famille espagnole au cours de cinq générations successives. Une exclusion génétique des loci des cinq LGMD dominantes a été publiée (Gamez et al., 2001), suite à laquelle un criblage de l'ensemble du génome a démontré une liaison génétique au locus 7q32,1-q32,2 (Palenzuela, 2003). Le gène codant pour la filamine C, hautement exprimée dans les muscles, se trouvant dans l'intervalle de liaison, les auteurs l'ont testé: l'absence de mutation a forcé le rejet de la candidature du gène.

Finalement, la dernière forme à transmission dominante à être entrée dans la littérature médicale est LGMD1G liée au chromosome 4p21 (Starling et al., 2004). Une famille brésilienne-caucasienne s'est présentée avec 12 patients atteints d'une dystrophie musculaire des ceintures accompagnée d'une flexion limitée des doigts et orteils. Les 16 loci LGMD déjà connus ayant été exclus par analyse de liaison, un criblage de l'ensemble du génome a révélé un locus d'intérêt de 9 cM sur le chromosome 4 avec un LOD score de 6,62.

1.3 LGMD2A (calpaïnopathie): un effet fondateur sur l'Île de la Réunion

C'est en 1988 que Michel Fardeau a décrit, pour la première fois, une dystrophie des ceintures à transmission autosomique récessive faisant partie du bassin génétique d'une sous-population du sud de l'Île de la Réunion, l'une des Mascareignes de l'océan Indien (Fardeau, 1989). Les familles atteintes comportaient un haut taux de consanguinité et une étude généalogique exhaustive a permis d'isoler un effet fondateur aux environs de 1660, soit de 12 à 13 générations en amont des individus recrutés pour l'étude de Fardeau.

Vingt-cinq patients ont été retenus pour l'étude génétique qui s'ensuivit (Beckmann et al., 1991). Les critères de sélection des patients étaient cliniques, biochimiques, électromyographiques et pathologiques. Les individus atteints devaient être symptomatiques avant l'âge de 20 ans; une atrophie musculaire symétrique des muscles du tronc et du cou devaient être observée; les muscles faciaux et cardiaques devaient être respectés; une élévation des taux sériques de créatine kinase de deux à

plus de dix fois la norme devait être confirmée; des potentiels réduits et polyphasiques aux électromyogrammes devaient être observés, et une nécrose et régénération des fibres musculaires devaient être présentes lors de l'étude pathologique de la biopsie musculaire.

Le criblage du génome des individus retenus pour l'étude s'est effectué à l'aide de 85 sondes RFLP (*restriction-fragment length polymorphism*) ne couvrant que 30% de l'ensemble du génome humain tel que connu en 1991. En dépit de la faible couverture du génome, l'ampleur de la cohorte assemblée par Fardeau a permis de détecter une liaison en deux points de la maladie au marqueur *D15S25* avec un LOD score total de 5,52.

L'équipe de Maria-Rita Passos-Bueno a par la suite confirmé, en 1993, que deux familles brésiliennes atteintes d'une forme autosomique récessive de dystrophie musculaire des ceintures étaient elles aussi liées au locus du chromosome 15 identifié par Fardeau (Passos-Bueno et al., 1993). Non seulement cette étude a-t-elle pu confirmer le locus génétique associé aux atteints de l'Île de la Réunion, mais elle a aussi révélé pour la première fois que plus d'une forme récessive des dystrophies des ceintures existait, étant donné que six autres familles de leur cohorte brésilienne n'étaient pas liées à *D15S25*.

Une collaboration entre les deux équipes de recherche a permis l'identification, en 1995, du gène causant LGMD2A: il s'agissait de la calpaïne 3 (Richard et al., 1995). L'étude de chromosomes artificiels de levure (YACs) avait mené à une liste de 15 gènes d'intérêt pour l'intervalle candidat du chromosome 15: des buvardages de Northern avaient limité la liste à deux transcrits spécifiques aux muscles, dont le transcrit de la calpaïne 3. Loin d'être une protéine structurelle, cette *calcium-activated neutral protease 3* (CAPN3), spécifique aux muscles, est plutôt une enzyme. Suite à la caractérisation génétique exhaustive du gène, 38 familles atteintes de LGMD2A ont été criblées dans le but d'isoler les mutations causatives. Quinze mutations ont pu être répertoriées pour

l'ensemble de la cohorte, qui incluait les familles réunionnaises et brésiliennes, de même que des familles françaises et amish.

Un élément de discussion s'est présenté à l'équipe sous la forme du paradoxe de la Réunion (Richard et al., 1995). Ce paradoxe peut se formuler de la façon suivante: comment expliquer la présence de six mutations dans l'isolat réunionnais alors que celui-ci est présumément issu d'un seul ancêtre fondateur et que les générations subséquentes font foi de multiples boucles de consanguinité? De plus, la maladie étant relativement rare, la présence de plusieurs effets fondateurs à même cette petite population est difficile à accepter. Les auteurs ont proposé un modèle digénique. Comme la présence simultanée de mutations à deux loci indépendants serait nécessaire, la prévalence de la maladie dans la population mondiale resterait faible, ce qui resterait en accord avec les données démographiques. La dérive génétique ayant conduit vers une haute fréquence l'allèle permissif du second locus, la pression de sélection a pu être moindre pour l'apparition de mutations distinctes dans le gène de la calpaïne 3. Une autre hypothèse avancée par le groupe est que l'expression des mutations de la calpaïne 3 est directement dépendante de l'ADN mitochondrial. Cette hypothèse, semblable à la première, se départit du contexte nucléaire pour adopter, plutôt, un contexte mitochondrial. Une étude publiée par le groupe en 1999 révèle qu'une mutation prédominante est en fait observée chez les patients réunionnais: la mutation IVS6-1G→A est présente chez 25 cas sur 39, soit 64% de la cohorte réunionnaise (Richard et al., 1999).

Cette même étude rapporte un total de 97 mutations dans le gène CAPN3, incluant des mutations nonsense, antisens, des délétions, insertions, ainsi que des mutations dans les sites d'épissage (Richard et al., 1999). Le nombre de mutations dans ce gène continu de s'élever, mais aucune région particulièrement riche en mutations (ou *hot spot*) n'a été détectée jusqu'à maintenant. LGMD2A est, jusqu'à ce jour, la dystrophie des ceintures la plus commune au niveau mondial (Zatz et al., 2000).

La pathogénèse de la maladie demeure obscure. Des essais avec des souris transgéniques ont révélé qu'une absence de calpaïne 3 mène à un taux anormalement élevé de noyaux apoptotiques dans les cellules musculaires. Un déséquilibre entre les taux de $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ et de $\text{NF}\kappa\text{B}$ serait à blâmer (Baghdiguian et al., 1999).

1.4 LGMD2B (dysferlinopathie): un gène, deux phénotypes

En 1992, une équipe de recherche italienne menée par Mahjneh a publié une étude comprenant 19 patients provenant tous d'une famille palestinienne à forte consanguinité (Mahjneh et al., 1992). Dix patients démontraient une forme congénitale de dystrophie musculaire, alors que neuf individus avaient pour diagnostic une forme récessive de dystrophie musculaire des ceintures. L'atrophie de la ceinture pelvienne se produisait vers la fin de la deuxième décennie, alors que l'atrophie de la ceinture scapulaire était remarquée une dizaine d'années plus tard. Des données biochimiques, électromyographiques et pathologiques avaient confirmé le diagnostic de LGMD pour ces neuf patients.

La liaison de cette nouvelle forme de LGMD à un locus du chromosome 2p a été confirmée en 1995 par l'équipe de Passos-Bueno (Passos-Bueno et al., 1995). L'équipe canadienne de Tracey Weiler a par la suite identifié neuf patients issus d'une famille amérindienne du Manitoba, deux d'entre eux atteints de la myopathie distale de Miyoshi, les sept autres individus atteints pour leur part d'une forme récessive de dystrophie des ceintures {Weiler, 1996 #164}. Après une exclusion génétique d'un certain nombre de loci d'intérêt, Weiler *et al.* ont pu établir une liaison au locus précédemment décrit pour LGMD2B. De plus, les deux patients atteints de la myopathie de Miyoshi ainsi que quatre des patients atteints de la dystrophie proximale partageaient le même haplotype, avec une homozygotie partagée sur trois marqueurs microsatellites consécutifs. Les trois autres patients de l'étude, tous atteints de la forme proximale de la maladie, partageaient l'haplotype paternel.

Après que le gène de la dysferline ait été isolé dans l'intervalle candidat et confirmé comme étant responsable de LGMD2B et de la myopathie distale de Miyoshi, il a été

séquencé chez les neuf patients de la famille manitobaine. Une seule et unique mutation antisens, présente en homozygotie, a été rapportée, confirmant que les deux phénotypes émergeaient en fait d'une même mutation (Illarioshkin et al., 2000).

Les patients atteints de LGMD2B démontrent souvent une faiblesse des muscles inférieurs distaux, mais l'atrophie de la masse musculaire inférieure proximale devient notable et plus importante très rapidement (Wicklund, 2003). Chez certains patients, c'est le mollet qui démontre l'atrophie la plus poussée; chez d'autres, ce sont les quadriceps. Les taux sériques de CK peuvent atteindre jusqu'à 150 fois la norme. Les électromyogrammes démontrent souvent de petites et brèves unités motrices, alors que l'étude des biopsies musculaires peut révéler un éventail de trouvailles: les muscles peu atteints démontrent une faible variabilité dans la taille des fibres musculaires, mais les muscles très atrophiés de certains patients peuvent être pauvres en fibres musculaires, étant majoritairement constitués de fibres et de tissus adipeux.

La dysferline appartient à une classe de protéines appelées ferlines contenant plusieurs domaines C2 and un domaine transmembranaire au C-terminus (Bansal and Campbell, 2004). Comme la dysferline ressemble structurellement aux synaptotagmines, une fonction potentielle de la dysferline dans la fusion des vésicules à la membrane cytoplasmique a été proposée. Des études *in vitro* ont pu démontrer qu'une mutation dans l'un des domaines C2 de la protéine affectait la liaison de la protéine aux phospholipides (Davis et al., 2002). Cette mutation a été observée chez des patients atteints de LGMD2B et le phénotype résultant varie d'un patient à l'autre. Bien que la pathogénèse de la maladie n'ait pas encore été expliquée, il semblerait que la dysferline soit impliquée dans la réparation du muscle plutôt que dans sa structure (Bansal et al., 2003). En effet, des souris n'exprimant pas la dysferline ont un DGC intact mais développent un phénotype progressif de dystrophie musculaire suite à un défaut de réparation de la membrane cellulaire du muscle. Il a été observé que, chez des patients atteints de dysferlinopathie et chez un groupe de souris n'exprimant pas la dysferline, les vésicules nécessaires à la régénération de la membrane cytoplasmique s'accumulent et sont incapables de se fusionner à la membrane (Reddy et al., 2001).

Ceci suggère que le rôle de la dysferline se joue dans la fusion des vésicules et non dans leur transport à la membrane. Une équipe japonaise a rapporté en 2001 que la dysferline co-immunoprécipitait avec la cavéoline-3, le gène de laquelle est muté chez les patients atteints de LGMD1C (Matsuda et al., 2001). De plus, l'immunocoloration de la protéine dysferline sur des coupes de biopsies musculaires de patients LGMD1C est anormale. La séquence protéique de la dysferline révèle plusieurs sites de liaison à la cavéoline-3, établissant un lien mécanistique possible entre la dysferline et les cavéoles musculaires. De plus amples travaux demeurent à être entrepris afin de connaître l'ampleur de cette interaction.

1.5 LGMD2C-F (sarcoglycanopathies): imitatrices de Duchenne

Les LGMD2C, 2D, 2E et 2F sont fréquemment rassemblées sous le nom «sarcoglycanopathies» étant donné qu'elles résultent toutes d'une mutation dans l'un des gènes codant pour un sarcoglycan.

Tel que rapporté plus haut, les sarcoglycans sont des protéines transmembranaires glycosylées en N-terminal et comprenant un long domaine C-terminal extracellulaire riche en cystéines (Ettinger et al., 1997). Ces sarcoglycans forment un lien entre le cytosquelette et la lame basale en se liant, à l'extérieur de la cellule, à l' α -dystroglycan et, à l'intérieur de la cellule, au β -dystroglycan qui, lui-même, établit un lien direct avec la dystrophine, protéine absente chez les patients atteints de dystrophie musculaire de Duchenne.

LGMD2C a été la première des sarcoglycanopathies à être associée à un locus sur le chromosome 13q12 (Ben Othmane et al., 1992). Ce locus a été étudié plus à fond au début des années 90 et le groupe de Noguchi a été le premier à identifier le gène muté comme codant pour la protéine γ -sarcoglycan (Noguchi et al., 1995). L'immunocoloration du muscle d'un patient a démontré que, non seulement le γ -sarcoglycan n'était pas présent dans le muscle, mais les deux autres sarcoglycans connus à cette période (l' α et le β) ne l'étaient pas non plus, laissant croire pour la première fois qu'un sarcoglycan

tronqué pouvait avoir un impact sur ses voisins et, ainsi, détruire la structure sarcoglycane en tant que telle.

Un an après la publication de l'article de Noguchi *et al.*, l'équipe de McNally rapportait qu'une même mutation dans le gène encodant le γ -sarcoglycan pouvait provoquer deux phénotypes, l'un bénin, l'autre sévère. En testant une cohorte de 19 patients brésiliens, le groupe de McNally a pu isoler quatre patients qui démontraient la même mutation rapportée par Noguchi *et al.* (McNally et al., 1996). Des quatre patients, cependant, seuls trois étaient phénotypiquement semblables aux atteints de la dystrophie de Duchenne: l'expression de la maladie était sévère et débilitante, tel qu'attendu. Le quatrième patient, de même que ses frères et soeurs atteints, démontrait un phénotype beaucoup plus bénin, trahi seulement par une hypertrophie des mollets et des taux sériques de CK 40 fois la norme. Les auteurs ont donc suggéré qu'un facteur environnemental ou génétique devait agir comme modulateur de la sévérité de la maladie, étant donné qu'une même mutation dans un même gène pouvait conduire à deux phénotypes de sévérité différente. Comme cette mutation a été observée à la fois chez une cohorte tunisienne et chez quatre familles brésiliennes négroïdes, les auteurs avancent l'hypothèse selon laquelle la mutation du gène γ -sarcoglycan serait issue d'un effet fondateur africain.

Bien que le locus LGMD2C ait été identifié avant celui de la LGMD2D, c'est le gène muté chez cette dernière qui a été publié avant l'article de Noguchi *et al.* (1995) sur le γ -sarcoglycan. Une équipe majoritairement française sous l'égide de Michel Fardeau a cloné et séquencé l'ADNc du gène encodant l'adhaline, nom premier de l' α -sarcoglycan, le cartographiant au locus 17q en 1994 (Roberds et al., 1994). Des buvardages de Northern sont venus confirmer que l'expression du gène était limitée aux muscles squelettiques et cardiaques, ainsi qu'aux poumons (dû, présumément, aux muscles lisses des capillaires pulmonaires). Avant de pouvoir procéder à des études de liaison avec la grande famille française recrutée, l'équipe a dû répertorier des marqueurs microsatellites dans le gène de l'adhaline, un buvardage de Southern révélant une répétition de CA dans le sixième intron du gène. La famille recrutée avait déjà été testée

pour la présence de sarcoglycans et une absence d'adhaline avait été documentée. Les marqueurs définis aux abords du gène adhaline et la répétition de CA présente à même le gène ont permis de confirmer la liaison de cette maladie au locus de l'adhaline. Le séquençage de l'ADNc a identifié deux mutations faux-sens, la première influençant possiblement une structure en superhélice (*coiled-coil*) prédite, la deuxième prévenant probablement la glycosylation d'une région de la protéine.

Un autre phénotype semblable à celui de la dystrophie de Duchenne a été découvert par la suite chez une jeune fille (Bonnemann et al., 1995). À peine âgée d'un an, elle démontrait des taux sériques de CK très élevés (41 891 unités internationales par litre; norme 37-217 U/L). Ces taux se sont maintenus durant sa deuxième année de vie en dépit d'une absence de symptômes. Une biopsie musculaire a pu révéler les signes pathologiques classiques d'une dystrophie musculaire: une variation dans la taille des fibres, régénération et dégénération de fibres et une augmentation notable du tissu périnysial. Des analyses d'immunofluorescence ciblant la protéine dystrophine ont montré une certaine déficience de celle-ci, mais aucune fibre ne pouvait être identifiée comme ne contenant aucune trace de la protéine. L'immunocoloration pour les trois sarcoglycans connus a cependant révélé l'absence de ceux-ci des fibres musculaires de la jeune patiente.

Le clonage du β -sarcoglycan par la même équipe a permis de tester cette patiente pour des mutations à même le gène. L'équipe venait, en fait, tout juste de cloner un sarcoglycan connu pour avoir un poids moléculaire de 43 kD et d'en assigner la position génétique au locus 4q12. Étant le deuxième sarcoglycan cloné, l'équipe a proposé de nommer la protéine « β -sarcoglycan» et de renommer l'adhaline « α -sarcoglycan». La patiente était hétérozygote pour des mutations créant toutes deux un codon stop prématuré: le domaine extracellulaire du β -sarcoglycan était donc tronqué et l'assemblage des sarcoglycans était perturbé. Le phénotype sévère de cette sarcoglycanopathie (LGMD2E) tel qu'observé chez la patiente âgée de trois ans en date de la publication de l'article semble corrélérer avec une double mutation provoquant un

arrêt subit de la traduction du transcrit; une cohorte amish au phénotype moindre était associée, quant à elle, à une simple mutation faux-sens.

Finalement, la dernière sarcoglycanopathie rapportée dans la littérature (LGMD2F) est causée par une mutation du gène du δ -sarcoglycan (Nigro et al., 1996). L'équipe brésilienne de Passos-Bueno, ayant déjà fait sa marque dans l'identification du locus de plusieurs dystrophies des ceintures, a ajouté le locus 5q33-34 au nombre de régions génétiques liées à des dystrophies musculaires lorsqu'elle a recruté deux familles brésiennes négroïdes consanguines pour un criblage de l'ensemble du génome. Deux autres familles brésiennes n'ayant aucun lien de parenté avec les deux premières ont par la suite été liées au locus situé entre les marqueurs *D5S487* et *D5S412*. Une déficience secondaire en α -sarcoglycan des fibres musculaires des patients a fait penché l'équipe vers la thèse qu'un autre sarcoglycan serait possiblement muté dans ces familles. Un ADNc a été isolé dans la région et cet ADNc codait pour une nouvelle composante de la structure sarcoglycane, le δ -sarcoglycan, une protéine de 35 kD ressemblant au γ -sarcoglycan en taille et en séquence. La délétion d'un résidu C dans un des exons du gène a été identifiée comme causant la maladie chez ces patients. Des études d'immunocoloration sur le complexe de la dystrophine et des glycoprotéines associées a confirmé que le δ -sarcoglycan était complètement absent des coupes musculaires obtenues. Les trois autres sarcoglycans étaient eux aussi en déficience nette et la dystrophine, bien que présente, voyait son expression réduite de façon notable, créant du même coup un phénotype musculaire assez sévère.

Des mutations dans le gène du δ -sarcoglycan peuvent causer LGMD2F, certes, mais aussi des cardiomyopathies dilatées de type familial et sporadique, se rajoutant donc au nombre impressionnant de mutations dans des gènes encodant des protéines du cytosquelette musculaire causant des cardiomyopathies dilatées. Les auteurs de l'article rapportant cette trouvaille écrivent que cela vient appuyer leur hypothèse de «*final common pathway*»: les cardiomyopathies dilatées seraient donc en fait des cytosquelettalopathies (Tsubata et al., 2000). Ces cardiomyopathies dilatées ont une forte association avec les sarcoglycanopathies en général (30%). Une équipe italienne a

par la suite investigué la corrélation possible entre les sarcoglycanopathies et les atteintes au coeur et aux poumons (Politano et al., 2001). Quatorze familles ont fait l'objet de cette étude. Douze patients étaient atteints de LGMD2C, un de LGMD2D, deux de LGMD2E et deux autres de LGMD2F. Tous ces patients étaient asymptomatiques au plan cardiaque. Bien que les électrocardiogrammes de sept d'entre eux étaient normaux, deux patients ont par la suite démontré une échocardiographie pathologique révélant une cardiomyopathie dilatée précoce. En tout, 31,3% de leurs patients étaient normaux au plan cardiaque, 43,7% étaient atteints d'une cardiomyopathie diagnostiquée avant l'étude, 6,3% démontraient une cardiomyopathie arrhythmogène et 18,7% montraient des signes d'une cardiomyopathie dilatée précoce. Une atteinte du système respiratoire a été observée chez des patients atteints de chacune des quatre formes de sarcoglycanopathies; cependant, aucune corrélation entre l'atteinte cardiaque et l'atteinte des muscles squelettiques n'a pu être établie par les auteurs.

1.6 LGMD2G (téléthoninopathie): une pathogénèse fonctionnelle

Une forme rare de dystrophie des ceintures récessive a été détectée chez une famille brésilienne en 1997 (Moreira et al., 1997). Le groupe de Moreira *et al.* étant incapable de lier cette famille aux loci LGMD existants, un criblage de l'ensemble du génome a été entrepris. Les patients souffrant de cette nouvelle forme de LGMD démontraient une atteinte assez majeure des muscles distaux de même qu'une cardiomyopathie dans certains cas. Leur phénotype ressemblait à la présentation clinique des patients atteints d'une amyotrophie spinale de type III, une maladie de dégénérescence des neurones moteurs. Le criblage a permis l'identification d'un intervalle candidat de 3 cM sur le chromosome 17q11-q12. Le raffinement de la région s'est effectué grâce à l'étude de sa carte physique contenant trois contigs (Moreira et al., 2000). Le premier contig a dû être rejeté grâce à des recombinaisons-clés chez des individus atteints et non-atteints. Une homozygotie pour les marqueurs subséquents chez les individus atteints de deux familles (de même que la présence de cet haplotype en hétérozygotie chez les patients d'une troisième famille) a permis d'encadrer la région candidate par les marqueurs *D17S1851* et *D17S1814*. Comme le gène codant pour la téléthonine, une

protéine exclusivement exprimée dans les muscles striés et cardiaques, se trouvait dans l'intervalle critique, il a été séquencé par le groupe. Les atteints des deux familles démontrant une forte homozygotie au locus de la maladie, appelée LGMD2G, étaient homozygotes pour une mutation 157C→T dont l'effet était de créer un codon stop prématuré. Les atteints de la troisième famille avait cette mutation sur un des chromosomes, alors que l'autre chromosome a révélé une délétion de deux guanines à la jonction exon-intron 1. Cette délétion créait, elle aussi, un codon stop prématuré.

Des analyses immunohistochimiques sont venues confirmer ces résultats: en effet, chez les patients LGMD2G des trois familles, aucune téléthonine n'a pu être détectée au niveau des sarcomères des muscles; des buvardages de Western ont appuyé ces résultats.

La téléthonine est l'une des multiples composantes de l'immense échaffaud sarcomérique érigé sur la protéine titine. Des analyses ultrastructurelles ont pu confirmer que cette architecture sarcomérique était préservée chez les patients atteints de LGMD2G, suggérant que le phénotype de la maladie est possiblement causé par une déficience plutôt fonctionnelle (Vainzof et al., 2002). D'un autre côté, l'observation de vacuoles bordées dans les fibres musculaires de ces patients pourrait s'expliquer par une dégénération focale, et non généralisée, de cette architecture des sarcomères. L'expression de la dystrophine, des sarcoglycans α , β , γ et δ , de la calpaïne 3 et de la dysferline, tous des composantes majeures du DGC, est normale chez les patients atteints de LGMD2G; de façon réciproque, la localisation sarcomérique de la téléthonine est normale chez les patients atteints de dystrophie musculaire de Duchenne, de sarcoglycanopathies, de LGMD2A et de LGMD2B. Ce phénomène tend à isoler LGMD2G de la majorité des dystrophies des ceintures précédemment étudiées: la pathogénèse de la maladie, apparemment non liée au DGC et à l'architecture des sarcomères, demeure à être élucidée.

1.7 LGMD2H (déficience en TRIM32): criblage par *pooling*

C'est en 1976 que Shokeir et Kobrinsky ont décrit pour la première fois la dystrophie des ceintures qui porte la désignation LGMD2H (Shokeir and Kobrinsky, 1976). Il s'agissait d'une atrophie de la ceinture pelvienne et des quadriceps qui s'étendait, au fil des ans, à certains muscles distaux et aux muscles faciaux, résultant en un phénotype semblable aux dystrophies facioscapulohumérales elles aussi caractérisée par un déplacement des épaules vers l'avant. Les taux sériques de CK étaient au-dessus de la normale mais ne correlaient pas avec la sévérité observée chez un sous-groupe de patients. Les électromyogrammes et études pathologiques ont confirmé le diagnostic de dystrophie musculaire.

La cohorte assemblée par Shokeir et Kobrinsky était constituée de sept familles appartenant toutes au même pedigree. Il s'agissait, en fait, de plusieurs colonies huttérites du Manitoba, les Huttérites étant des descendants d'un groupe d'anabaptistes suisses ayant établi une première colonie en Europe de l'Est en 1528 et prêchant la vie en communauté et le partage des biens. En 1997, l'équipe canadienne de Tracey Weiler avait assemblé une cohorte de 21 patients huttérites dont le diagnostic de LGMD était sans équivoque (Weiler et al., 1997). De cette cohorte, seul un patient faisait partie de la cohorte initiale de Shokeir et Kobrinsky. La description clinique de la nouvelle cohorte était exhaustive. Plusieurs individus avaient une élévation de CK sériques notable mais aucun autre symptôme. Les patients franchement atteints avaient une atrophie proximale qui se déclarait entre le début de l'enfance et le milieu de la trentaine. Il y avait absence de contracture, de même que d'atrophie des muscles faciaux. Aucune cardiomyopathie n'avait été observée.

Quatre familles appartenant à la cohorte ont été testées pour les sept loci LGMD connus en 1997 (LGMD1A et LGMD2A-F), ainsi que pour les locis contenant les gènes candidats DAG1, SNT2B1 et SNT2B2, encodant des protéines associées à la dystrophine. Le lot de programmes LINKAGE a été utilisé pour exclure la liaison de cette nouvelle forme de dystrophie des ceintures aux dix loci connus, laissant la porte ouverte à un nouveau locus LGMD.

Afin d'identifier la région du génome contenant le gène muté chez ces patients atteints de LGMD2H, l'équipe de Weiler a procédé à un criblage de l'ensemble du génome par *pooling*: l'ADN de neuf individus au diagnostic certain a été combiné dans un même tube, alors que l'ADN de quatorze frères et soeurs non-atteints ou au diagnostic incertain a été combiné dans un autre tube (Weiler et al., 1998). Deux cents marqueurs ont été testés et un excès d'homozygotie dans le bassin des patients par rapport à celui des individus non-atteints a été noté pour cinq marqueurs. Après le génotypage individuel des patients pour ces cinq marqueurs, une liaison génétique a pu être établie entre LGMD2H et le marqueur *D9S302* présent sur le chromosome 9q31-q33. L'addition d'autres familles en cartographie fine a, par la suite, permis de restreindre l'intervalle candidat à 560 kb (Frosk et al., 2002). Un des gènes candidats, TRIM32, a été séquencé chez un patient et une mutation, D487N, a pu être isolée comme étant la cause probable de la maladie, étant donné sa présence en homozygotie chez tous les individus atteints de la cohorte et son absence chez 100 individus-contrôles.

En se basant sur les données protéiques publiées, TRIM32 semble être une E3-ubiquitine ligase dont le rôle est de catalyser le transfert de l'ubiquitine vers la protéine sélectionnée pour être détruite dans le complexe du protéasome. Les auteurs comparent le mécanisme d'action possible de TRIM32 à celui de la parkine, une E3-ubiquitine ligase contenant, elle aussi, un domain RING et responsable, pour sa part, d'une forme de la maladie de Parkinson. Comme il a été suggéré que la maladie serait causée par une accumulation de protéines non-dégradées suite à l'inefficacité de la ligase parkine, il pourrait en être de même pour TRIM32 qui, mutée, ne parviendrait plus à catalyser l'ubiquitination de certaines protéines musculaires, entraînant le phénotype dystrophique. Une étude sur l'implication de TRIM32 dans la survie des cellules cancéreuses semble appuyer le rôle de cette protéine dans le processus d'ubiquitination, supportant ainsi la thèse de Weiler *et al.* (Horn et al., 2004).

1.8 LGMD2I (déficience en FKRП): un mécanisme pathologique partagé

Un nouveau locus pour une dystrophie musculaire des ceintures à transmission récessive a été identifié en 2000 grâce à un effort similaire à celui de l'équipe de Weiler pour les Huttérites du Manitoba. Une femme tunisienne de 55 ans confinée à sa chaise roulante se présentait avec une forte atrophie de la ceinture pelvienne et des muscles inférieurs proximaux, associée à une atrophie secondaire de la ceinture scapulaire et des muscles supérieurs proximaux (Driss et al., 2000). Douze autres membres de sa famille étendue ont par la suite été diagnostiqués comme étant atteints de la même forme de dystrophie des ceintures. Étant donné le haut taux de consanguinité à même la famille, un criblage de l'ensemble du génome par *pooling* a été effectué suite à l'exclusion des loci connus. Un LOD score en deux points de 4,36 au marqueur *D19S606* a permis de confirmer la liaison de cette LGMD2I au chromosome 19q13,3. Un ensemble de recombinaisons chez des individus clairement atteints a mené à l'attribution de l'intervalle candidat à une région de 9 cM; une recombinaison chez un membre de la famille jusqu'à maintenant non atteint aurait rétréci l'intervalle d'environ 6,3 cM.

L'un des gènes présents dans l'intervalle était le gène codant pour FKRП ou *fukutin-related protein*. Ce gène a été impliqué dans une forme très sévère de dystrophie musculaire congénitale, MDC1C (Brockington et al., 2001a). La fukutine, une *phosphoryl-ligand transferase*, est responsable de la dystrophie musculaire congénitale de type Fukuyama (FCMD); la *fukutin-related protein*, quant à elle, voit son gène muté chez les patients atteints de MDC1C. Ces individus, dont le cerveau est relativement normal en comparaison aux patients atteints de FCMD, sont incapables de marcher, développent une hypertrophie musculaire et ont des niveaux sériques de CK élevés.

Le séquençage du gène FKRП chez une cohorte de patients LGMD2I est venu confirmer le fait suivant: LGMD2I est en fait une variante allélique moins sévère de MDC1C (Brockington et al., 2001b). Les cas extrêmes de la cohorte LGMD2I faisaient état d'un phénotype remarquablement similaire aux individus MDC1C: de l'hypotonie avant l'âge de deux ans, de l'hypertrophie musculaire et une perte de locomotion en

début d'adolescence. La majorité des patients, cependant, présentait un portrait clinique largement compatible avec celui de la famille tunisienne initialement décrite. Il est intéressant de noter que, à la différence de LGMD2B et de la myopathie de Miyoshi, les mutations causant LGMD2I étaient différentes de celles répertoriées dans le cas de l'étude de la MDC1C.

L'équipe de Driss, qui avait initialement décrit la maladie chez la famille tunisienne, a confirmé, en 2003, que le gène FKRP était bel et bien muté chez cette famille (Driss et al., 2003). Cette étude est venue confirmer des résultats secondaires précédemment publiés: les patients atteints de LGMD2I démontrent une expression anormale d' α -dystroglycan et de laminine- α 2. Brockington *et al.* avaient rapporté une déficience en laminine- α 2 lors de tests immunohistochimiques pour les patients au phénotype sévère; bien que les patients témoignant d'un phénotype plus léger semblaient ne pas être déficients en laminine- α 2 aux tests immunohistochimiques, des buvardages de Western ont démontré une déficience importante ou une absence totale de la protéine (Brockington et al., 2001b). Ces résultats suggèrent un mauvais repliement de la protéine, la dissimulation d'un épitope ou un processus de transformation altéré. Quant à l' α -dystroglycan, tous les patients testés en étaient déficients.

Une protéine de la membrane périphérique hautement glycosylée, l' α -dystroglycan forme un pont entre le cytosquelette associé à l'actine et la laminine- α 2, elle-même liée à la matrice extracellulaire (Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1992) (Ervasti and Campbell, 1993). La glycosylation de l' α -dystroglycan diffère entre les tissus et même, parfois, à travers un même tissu, changeant du même coup les partenaires d'interaction de la protéine. Brockington *et al.* ont, par la suite, établi une corrélation solide entre la sévérité phénotypique des maladies causées par une mutation dans le gène FKRP et les niveaux d' α -dystroglycan (Brown et al., 2004). Les patients MDC1C, qui n'ont jamais acquis l'habileté de marcher, ont démontré une forte déplétion en α -dystroglycan; les patients LGMD2I au phénotype sévère ont démontré des taux réduits d' α -dystroglycan; les individus atteints d'une forme plus modérée de LGMD2I ont montré des niveaux d' α -

dystroglycan légèrement plus faibles que la normale. Les taux protéiques d' α -dystroglycan semblent donc jouer un rôle important dans la pathogénèse de cette forme de dystrophie des ceintures, ainsi que dans la sévérité de la maladie allélique, MDC1C.

En 2005, l'équipe canadienne responsable de l'identification du locus LGMD2H a pu tester cinq familles huttérites du Manitoba qui, bien que démontrant un phénotype de dystrophie des ceintures, n'étaient pas liées au locus du gène TRIM32. Celles-ci se sont révélées être en fait liées au locus LGMD2I (Frosk et al., 2005). Suite à l'identification génétique de ce sous-groupe, des distinctions cliniques ont pu être établies entre les Huttérites atteints de LGMD2H et ceux atteints de LGMD2I: ces derniers avaient été diagnostiqués plus jeunes, leur atrophie musculaire était nettement plus marquée et certains d'entre eux démontraient une hypertrophie des mollets et des symptômes cardiaques. Les auteurs ont constaté que l'haplotype partagé par tous leurs patients LGMD2I huttérites était le même que celui identifié chez près d'une vingtaine d'autres patients LGMD2I provenant d'Europe, du Canada et du Brésil. La mutation du gène FKRP trouvée au centre de cet haplotype commun serait donc possiblement un ancien effet fondateur du continent européen.

Des mutations dans le gène FKRP ont aussi été rapportées comme causant un retard mental et des anomalies du système nerveux central à la naissance (Louhichi et al., 2004), ainsi que le syndrome de muscle-oeil-cerveau de Santavuori et le syndrome de Walker-Warburg (Beltran-Valero de Bernabe et al., 2004).

1.9 LGMD2J (titinopathie): un géant de 4 200 kD

La présence en hétérozygotie ou en homozygotie d'un allèle muté peut être reflétée dans le phénotype de la cohorte, comme l'a observée l'équipe d'Udd en Finlande pour LGMD2J. Leur famille consanguine étendue de 23 patients pouvait être divisée en deux sous-groupes, le premier souffrant d'une forme de dystrophie des ceintures apparaissant avant l'adolescence et résultant en une perte complète de locomotion avant la trentaine, le deuxième démontrant les signes cliniques d'une faiblesse des muscles du tibia à l'âge adulte (Udd et al., 1991). La possibilité que deux gènes soient

mutés dans la famille n'était pas à exclure, mais le fort taux de consanguinité à même la famille pouvait faire croire en des mutations dans un même gène. De plus, la forme distale semblait transmise de façon autosomique dominante; la forme proximale, quant à elle, suivait une transmission autosomique récessive. Un effet de dosage allélique pouvait donc expliquer le double phénotype: un allèle muté provoquerait l'apparition du phénotype distal moins sévère alors que deux allèles mutés seraient responsables du phénotype proximal débilant.

Une étude histopathologique est venue renforcer l'hypothèse de deux phénotypes issus de mutations dans un seul gène. Les coupes histologiques des patients atteints du phénotype LGMD et celles des patients atteints de la myopathie distale affectant les muscles des tibias étaient semblables et ne permettaient pas de distinction entre les deux groupes (Udd et al., 1992). Des changements dans la restructuration des muscles et le remplacement de la masse musculaire par du tissu adipeux étaient communs aux deux types de patients. De plus, contrairement à la vaste majorité des dystrophies distales à apparition tardive, les muscles des patients atteints de la forme distale ne démontraient pas de vacuoles bordées autophagiques, laissant croire à une nouvelle maladie. Cette étude pathologique a donc appuyé l'hypothèse de deux nouvelles dystrophies, l'une distale, l'autre proximale, liées à un même gène.

Un criblage de l'ensemble du génome a par la suite été effectué pour onze individus atteints de cette nouvelle forme de dystrophie musculaire affectant les muscles des tibias (*tibial muscular dystrophy* ou *TMD*). La maladie a pu être liée à un locus initial de 43 cM sur le long bras du chromosome 2 (Haravuori et al., 1998). L'inclusion de trois autres familles finlandaises lors de la cartographie fine a permis d'établir une forte liaison au marqueur *D2S364* avec un LOD score de 10,14. La construction d'haplotypes, l'analyse des recombinants et une étude de liaison en multipoint ont tous restreint le locus à une région d'un centiMorgan, avec un haplotype partagé chez tous les atteints testés laissant croire à une très vieille mutation fondatrice dans la population finlandaise. Le gène encodant la protéine structurelle titine avait été recensé à ce locus 2q31: une indel à même le gène a par la suite été identifiée comme ségrégant parfaitement avec

l'haplotype chez 81 patients atteints de TMD (Udd et al., 1998) (Hackman et al., 2002). Plus de vingt SNPs (*single-nucleotide polymorphisms*) ont été détectés lors du séquençage du gène TTN codant pour la titine, mais aucun de ces polymorphismes ne semblaient pathologiques. Le séquençage du dernier exon connu, le 363^e, aussi appelé Mex6, a cependant révélé une mutation altérant une séquence d'onze paires de bases, résultant en un changement de quatre acides aminés pour une modification globale vers une séquence protéique plus basique. Mex6 était connu pour être un déterminant du site de liaison de la calpaïne 3 à la titine dans le sarcomère des muscles. D'autres mutations dans le gène TTN avait été rapportées quelques mois auparavant dans le cadre d'une étude sur une forme familiale de cardiomyopathie dilatée (Gerull et al., 2002). Les auteurs avaient prédit que la protéine titine tronquée perdrait le domaine kinase et les sites de liaison des filaments épais, de la protéine de classe C liant la myosine, de la myoméline et de la calpaïne 3.

Il est maintenant connu que la forme 2J des dystrophies musculaires des ceintures est elle aussi causée par des mutations dans le gène TTN encodant la titine (Wicklund, 2003). Ces mutations sont héritées de façon autosomique récessive, à la différence des mutations causant la TMD. Certains individus atteints de LGMD2J ont une cardiomyopathie. Bien qu'aucun patient TMD n'ait d'atteinte cardiaque, la cardiomyopathie dilatée de type familial se transmet de façon autosomique dominante.

La titine, un géant structurel constituant 10% de la masse protéique cardiaque, a plusieurs rôles connus (Hein and Schaper, 2002). Elle est directement responsable de la stabilisation du filament de myosine et de l'entretien de l'intégrité structurelle du sarcomère. Elle joue un rôle dans la génèse du sarcomère, car un manque de titine lors de la sarcomérogénèse semble être la cause de la forme familiale de cardiomyopathie dilatée. Elle donne aussi au sarcomère une certaine élasticité, en même temps qu'elle semble altérer la contractilité des muscles cardiaques de façon calcium dépendante.

1.10 LGMD2K (déficiency en POMT1): dystrophie avec retard mental

En 2003, un article de Dinçer *et al.* décrivait, pour la première fois, une nouvelle forme autosomique récessive de dystrophie des ceintures accompagnée d'un retard mental et d'une expression anormale d' α -dystroglycan (Dincer et al., 2003). L' α -dystroglycan musculaire est un récepteur se liant à une grande variété de protéines: l'agrine, les chaînes de laminine α , le biglycan et le perlecan. La cohorte de Dinçer *et al.* est particulièrement intéressante puisqu'aucune maladie connue n'est due à une mutation primaire dans le dystroglycan. Des expressions anormales d' α -dystroglycan sont observées de façon secondaire dans plusieurs maladies, telles que certaines formes de dystrophies musculaires congénitales. Un génotypage a pu exclure par absence de liaison les loci de dystrophies musculaires connus pour cette cohorte de sept familles au phénotype homogène.

En 2005, cette nouvelle forme de dystrophie des ceintures a été démontrée comme étant causée par une mutation dans le gène POMT1, un gène muté dans une forme de dystrophie musculaire congénitale appelée maladie de Walker-Warburg (Balci et al., 2005). L'hypoglycosylation de l' α -dystroglycan observée a mené l'équipe de recherche à émettre l'hypothèse selon laquelle une protéine de type glycosyltransférase serait responsable du phénotype. Des quatre gènes candidats retenus (POMT1, POMT2, SDF2 et SDF2L1), seul POMT1 a pu générer une liaison intéressante. Les séquences du gène chez les individus atteints ont toutes démontré une mutation 598G→C, devenant A200P dans la séquence protéique.

L'éditorial de deux pages devant l'article paru dans *Neuromuscular Disorders* fait état de certains problèmes de nomenclature quant à cette nouvelle forme de dystrophie musculaire. Étant donné l'allélisme d'avec une dystrophie congénitale et le très bas âge des patients recrutés pour l'étude, certains pourraient argumenter qu'il ne s'agit pas d'une véritable dystrophie des ceintures, mais bien d'une forme de dystrophie congénitale. Cependant, l'âge au diagnostic (d'un à trois ans pour la présente étude) représente aussi un argument pour l'identification de cette maladie au canon des dystrophies des ceintures. L'éditeur propose de nommer cette forme LGMD2M, attirant

l'attention sur le retard mental (*Mental retardation*) accompagnant la maladie mais faisant fi de la logique intrinsèque à cette nomenclature où les lettres sont accordées aux maladies en ordre chronologique d'association à un locus génétique (Bushby and Beckmann, 1995). La maladie a finalement été recensée par OMIM sous la désignation LGMD2K (OMIM 609308).

1.11 Dystrophie des ceintures avec vacuoles bordées et expression réduite de laminine β 1

Une équipe japonaise a publié une étude de cas en 2003 rapportant une nouvelle forme de dystrophie musculaire des ceintures à apparition tardive caractérisée au niveau pathologique par des vacuoles bordées et une expression réduite en laminine β 1 (Nakamura et al., 2004). Le premier patient décrit dans l'étude était âgé de 61 ans lors du diagnostic; la deuxième patiente, sa soeur, était âgée de 52 ans. Les signes cliniques remarqués chez ces deux individus ont été une atrophie modeste des muscles des ceintures scapulaire et pelvienne, une hyporéflexie et un dandinement. Un scan tomographique des muscles squelettiques chez les deux patients a démontré une forte perte de la masse musculaire remplacée par de la matière grasse, surtout au niveau de des biceps, des muscles paravertébraux, des muscles fléchisseurs des cuisses et des mollets.

L'étude de biopsies musculaires a révélé les signes classiques d'une myopathie: une variation dans la taille des fibres, des fibres musculaires divisées, d'autres nécrotiques et un amas exagéré de tissu conjonctif interstitiel. La trouvaille pathologique d'intérêt, cependant, a été la présence accrue de vacuoles bordées, tout spécialement dans les fibres atrophiées. L'immunoréactivité des chaînes de laminine β 1 au niveau du sarcolemme était réduite comparée à des tissus contrôles. Le séquençage des gènes de la calpaïne 3, de la téléthonine et de la GNE (*UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmanosamine kinase*) a permis d'exclure ces gènes candidats. Une plus grande cohorte de patients pourrait mener à une meilleure caractérisation clinique et génétique de cette nouvelle forme de dystrophie des ceintures.

1.12 Les myopathies du quadriceps

Des atrophies exclusives aux quadriceps ont été publiées de façon sporadique depuis 1891. La description d'un nouveau cas, couplée à une revue de la littérature portant sur les myopathies du quadriceps et publiée en 1974 par Boddie et Stewart-Wynne, a clarifié pour la première fois le fait que ces myopathies isolées semblaient être la manifestation d'une pléthore de causes (Boddie and Stewart-Wynne, 1974). En ce sens, la myopathie du quadriceps n'est pas une entité médicale en soi. Les auteurs identifient plusieurs causes sous-jacentes au phénotype d'atrophie des quadriceps. Les cas décrits par Walton en 1956 semblent représenter des formes frustes (donc phénotypiquement incomplètes) d'une dystrophie musculaire des ceintures: en effet, un suivi de ces patients à long terme a révélé une atteinte éventuelle des muscles des ceintures pelvienne et scapulaire ainsi que de certains muscles proximaux. Une polymyosite chronique se déclarant à la cinquantaine s'exprime souvent par une atteinte majeure et isolée des quadriceps; des signes cliniques additionnels peuvent confirmer le diagnostic, tel qu'une myalgie et une dysphagie. Une amyotrophie due à un diabète mal contrôlé peut aussi conduire à une atteinte souvent asymétrique des quadriceps. Finalement, une amyotrophie spinale proximale et chronique se manifestant à l'âge adulte se révèle souvent par une faiblesse et une atrophie des muscles des cuisses, de même que par des taux sériques de CK élevés et des changements myopathiques observés en histopathologie.

La plupart des cas de myopathie des quadriceps recensés dans la littérature sont sporadiques. Cependant, Espir et Matthews ont publié une étude de cas d'une telle myopathie limitée aux quadriceps à transmission autosomique dominante ou liée à l'X chez une famille où un père et ses trois filles étaient atteints, de même que l'un des frères du père (Espir and Matthews, 1973). Une myalgie au niveau du muscle des cuisses a précédé la manifestation d'atrophie de plusieurs années. Au fil des ans, une atteinte de la ceinture pelvienne et des muscles des mains s'est déclarée.

Une autre cause possible des myopathies des quadriceps est la dystrophie musculaire de Becker. En effet, une expression clinique partielle (ou forme fruste) de cette

dystrophie peut se limiter aux quadriceps, tel qu'observé par l'équipe de Sunohara (Sunohara et al., 1990). Des biopsies musculaires de quatre patients atteints de myopathie des quadriceps ont été étudiées par le groupe. Le diagnostic préliminaire de myopathie a été confirmé par une variation notable de la taille des fibres musculaires, une augmentation du nombre de noyaux internes, une régénération occasionnelle de fibres groupées, un réseau myofibrillaire anormal et une augmentation de la masse tissulaire endomysiale et pérимysiale. Une analyse en immunofluorescence de la dystrophine a démontré un schéma compatible avec une dystrophie de Becker: l'immunoréaction était discontinue, faible et inégale. L'immunobuvardage a pu doublement détecter une masse moléculaire anormale pour la dystrophine, de même que des taux anormalement bas de la protéine; des délétions dans le gène codant ont par la suite été répertoriées chez ces patients. Lorsque confrontés au phénotype relativement bénin de ces patients atteints de dystrophie musculaire de Becker, les auteurs proposent l'explication suivante: les taux de dystrophine pour cette cohorte étant relativement élevés (de 50 à 90% la norme), il se peut que la progression de la maladie soit moindre pour ces individus. Cependant, une cardiomyopathie a quand même été rapportée pour deux des quatre individus: les auteurs recommandent donc de tester tout patient se présentant avec une myopathie des quadriceps pour une déficience en dystrophine.

Toutefois, les myopathies des quadriceps associées à une cardiomyopathie ne s'expliquent pas toutes par une délétion du gène encodant la dystrophine. Le gène LMNA, codant pour les lamines A et C, est muté dans la forme autosomique dominante de la dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss, la LGMD1B, ainsi qu'une cardiomyopathie dilatée. Sébillon *et al.* ont rapporté qu'une mutation R377H dans le gène LMNA pouvait causer une cardiomyopathie dilatée associée à une atrophie des quadriceps (Sebillon et al., 2003). Les lamines A et C sont des filaments intermédiaires localisés à la face interne de la membrane nucléaire et responsables de l'intégrité structurelle du noyau et de la chromatine. La raison pour laquelle ces protéines ubiquitaires, lorsque défectueuses, causent des anomalies dans des tissus aussi spécifiques que ceux des muscles squelettiques et cardiaques demeure inconnue.

L'atrophie des quadriceps reste associée majoritairement à la forme sporadique de la myosite à corps d'inclusion, une myopathie inflammatoire touchant majoritairement des hommes passés la cinquantaine (OMIM 147421). La progression de la maladie est souvent lente, s'attaquant aux quadriceps, mais aussi aux muscles des avant-bras et aux dorsiflexeurs des chevilles. Le diagnostic de myosite à corps d'inclusion sporadique est fréquemment confirmé par la présence d'inflammation et de vacuoles bordées à la microscopie électronique pour des coupes de tissu musculaire. Il existe deux formes héréditaires de la myosite à corps d'inclusion. IBM2, à transmission autosomique récessive, est mieux connue sous le nom de *quadriceps-sparing inclusion body myositis*: les quadriceps ne sont donc pas touchés (OMIM 600737). Le gène muté, UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase (GNE), a été lié au locus 9p12-p11. IBM3, à transmission autosomique dominante, est caractérisée par une atteinte marquée des quadriceps, mais aussi par des contractures articulaires congénitales, de l'ophtalmoplégie et une atrophie des muscles proximaux (Darin et al., 1998). La maladie est liée au gène encodant la *myosin heavy chain IIa* (MYH2) au locus 17p13,1 (Martinsson et al., 2000).

1.13 Les effets fondateurs

Chacun des types de dystrophies musculaires des ceintures à transmission récessive a une prévalance dépendant fortement de la population étudiée. Il n'est donc pas surprenant de découvrir qu'une nouvelle forme de dystrophie musculaire soit plus présente *a priori* dans la population canadienne-française, d'autant plus que cette population soit bien connue pour l'existence d'un certain nombre de maladies héréditaires rares. Les quelques six millions d'habitants canadiens-français du Québec d'aujourd'hui sont les descendants des 5000 colons français ayant peuplé la Nouvelle-France entre les années 1608 et 1759 (Scriver, 2001). L'isolement géographique et linguistique relatif de la Nouvelle-France a contribué à une plus grande homogénéité de son bassin génétique, homogénéité qui ne sera brisée qu'à l'arrivée de peuples autres que Français depuis 1760. Le bassin génétique canadien-français s'est agrandi de façon dramatique entre 1750 et 1875, la population doublant à tous les 30 ans

(l'immigration n'était pas pour cause, ici; il s'agit plutôt du haut taux de fécondité des femmes de la colonie).

Plusieurs maladies rares sont observées au Québec, entre autre dans les régions voisines de Charlevoix-Saguenay-Lac-St-Jean (CSLSJ). Scriver propose deux explications à ce regroupement particulier de maladies rares au CSLSJ: la consanguinité lointaine et les effets fondateurs. La consanguinité proximale n'est pas un facteur dans cette population, comme l'a démontré une étude de De Braekeeler qui établit que, sur 567 propositi canadiens-français affectés d'une de 17 maladies à transmission mendélienne, seuls 13% d'eux provenaient de parents démontrant un lien de consanguinité connu, ce qui est insuffisant pour expliquer la vaste majorité des maladies rares présentes au CSLSJ (De Braekeeler and Gauthier, 1996). L'hypothèse d'effets fondateurs, par contre, semble beaucoup plus valide. En effet, de l'ordre de 12 000 colons ont formé le bassin génétique canadien-français. Scriver rapporte qu'une étude de la base de données généalogiques BALSAC effectuée par Heyer a pu démontrer que les colons migrant vers la région du Saguenay-Lac-St-Jean depuis Charlevoix avant 1870 représentent 45% des contributions au bassin génétique de la région du nord-est du Québec. Ces quelques colons, dont l'importance au niveau génétique ne peut être ignorée, n'étaient que 3000 individus sur les 20 000 dont les descendants sont nés dans la région entre 1950 et 1971. Heyer va même jusqu'à affirmer dans un article de 1995 que 15% de la population fondatrice de la Nouvelle-France a contribué jusqu'à 90% de son bassin génétique (Heyer and Tremblay, 1995). Les effets fondateurs représentent donc une partie importante du patrimoine génétique canadien-français.

Plusieurs maladies se prêtent bien à des études de prévalence de certains allèles au sein de gènes mutés dans le but d'isoler des effets fondateurs. La mucoviscidose (fibrose kistique) en est une: plus de 18 allèles pathogènes sont en présence dans le bassin québécois, mais une seule mutation, la $\Delta F508$, peut expliquer 70% des cas du Canada français, rapporte R. Rozen à Scriver dans une communication personnelle citée dans l'article de synthèse de ce dernier (Scriver, 2001).

Le laboratoire de neurogénétique du docteur Brais est extrêmement familier avec ces maladies rares à prévalence élevée dans la population canadienne-française. Les 42 familles canadiennes-françaises ayant fait partie de l'étude initiale sur la dystrophie musculaire oculo-pharyngée (DMOP) se sont révélées partager toutes un même haplotype de part et d'autre de la mutation dans le gène PABP2 (Brais, 1998). Des études ont même permis de remonter au sommet de l'arbre généalogique partagé par les 42 familles et d'isoler trois soeurs qui auraient introduit l'allèle pathogène dans la population de la Nouvelle-France au 17^e siècle.

Les effets fondateurs au sein de la population canadienne-française au grand complet sont bel et bien réels, mais il demeure important de noter qu'il existe quand même des différences au niveau régional dans la prévalence de certaines de ces maladies. En effet, des micro-effets fondateurs régionaux ont aussi été observés dans la province de Québec. Un exemple de ces différences régionales est illustré dans l'étude de Duquette *et al.* portant sur l'ataxie avec apraxie oculaire de type 2 (AOA2) qui démontre qu'un haut taux de porteurs gaspésiens de la mutation commune dans le gène sénataxine, causant la maladie, explique la plus grande prévalence des cas d'AOA2 dans cette région du Québec (Duquette et al., 2005).

1.14 Les études de liaison

L'étude de maladies héréditaires fait souvent appel à deux concepts importants: celui de liaison génétique et celui de déséquilibre de liaison. Deux loci génétiques sont dits être liés s'ils sont transmis ensembles d'une génération à l'autre plus souvent qu'on ne s'y attendrait s'ils étaient transmis de manière indépendante (Dawn Teare and Barrett, 2005). De manière plus concrète, ces locis sont liés si une recombinaison méiotique entre ceux-ci a moins de 50% de chance de se produire. Ces mêmes locis sont dits en déséquilibre de liaison s'ils se retrouvent, à même une population, sur le même haplotype plus souvent qu'on ne s'y attendrait. Deux loci en déséquilibre de liaison sont donc nécessairement liés, mais deux loci liés ne sont pas nécessairement en déséquilibre de liaison dans une population donnée.

Une analyse de liaison paramétrique étudie la coségrégation de loci génétiques dans des pedigrees donnés. Des locis rapprochés sur un chromosome ont plus de chances de ségréger ensemble que des locis se retrouvant sur des chromosomes différents qui, eux, ne ségréguent ensemble purement que par chance. Plus la distance entre deux loci augmente, plus fortes sont les chances qu'une recombinaison à la méiose les sépare: la fraction de recombinaison θ (c'est-à-dire la probabilité de recombinaison entre deux loci à la méiose) devient donc une valeur importante dans l'analyse de liaison paramétrique. Le mode de transmission de la maladie et la fréquence des allèles étudiées sont tous deux connus pour une analyse paramétrique, à la différence de l'analyse de liaison non-paramétrique où ces données sont inconnues. L'analyse paramétrique sert donc à étudier les maladies mendéliennes à transmission connue; l'analyse non-paramétrique se révèle utile lors de l'étude de maladies multi-factorielles.

La liaison entre deux loci est souvent exprimée par le LOD score. Le LOD score est une fonction mathématique qui dépend de la fraction de recombinaison (θ) ou de la position chromosomique mesurée en centiMorgans (Morton, 1955). Une analyse de liaison en deux points tente d'établir la fraction de recombinaison entre des marqueurs individuels et le locus de la maladie, alors qu'une analyse de liaison multipoint essaie d'estimer la position du locus de la maladie par rapport à une carte génétique de marqueurs aux distances connues. Un LOD score franchement négatif tend à indiquer qu'une recombinaison a eu lieu entre les marqueurs et le locus de la maladie. Un LOD score supérieur à 3 révèle une liaison significative entre la maladie et un marqueur, alors qu'un LOD score inférieur à -2 est suffisant pour démontrer l'absence de liaison (Dawn Teare and Barrett, 2005). La barrière significative du «3» a été établie afin de filtrer un nombre maximal de faux positifs en affectant le moins possible les chances d'isoler correctement le locus de la maladie.

Une analyse de liaison multipoint permet donc de déterminer le locus d'une maladie dans un intervalle génétique donné: la précision avec laquelle la localisation de la maladie est obtenue dépend directement du nombre et de l'informativité des marqueurs

typés dans l'intervalle génétique. Lorsque les individus de plusieurs familles sont génotypés pour ces marqueurs, l'information est entrée dans un algorithme qui calcule le LOD score pour chacune des familles, et ce pour de nombreuses positions tout au long de l'intervalle génétique. Une représentation du LOD score en fonction de la position génétique sur l'intervalle sert à délimiter une région candidate pour le locus de la maladie. Si les individus atteints de toutes les familles typées ont une mutation causatrice dans un même gène, le LOD score devrait être inférieur à -2 tout au long du bras chromosomique comportant le gène jusqu'en périphérie de celui-ci, où le LOD score devrait atteindre une valeur significative supérieure à 3. Passé la région candidate, le LOD score devrait redescendre en-dessous de -2.

Le logiciel MAXPROB de la suite GENEHUNTER permet d'exécuter une analyse de liaison en multipoint en se basant sur l'algorithme de Lander-Green. Le nombre de marqueurs génotypés dont le logiciel peut faire l'analyse n'a pas de limite; par contre, GENEHUNTER est limité au niveau de la taille des pedigrees étudiés.

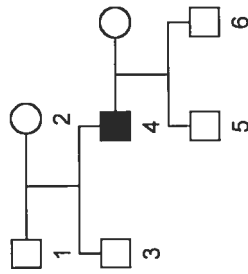
2 Le recrutement d'une cohorte de patients

Bien que le chapitre 4 élaborera beaucoup plus sur les détails cliniques, biochimiques, électromyographiques et pathologiques de la cohorte de patients canadiens-français recrutée pour la présente étude, une introduction aux onze familles rassemblées pour cette recherche est de mise avant d'entreprendre une description exhaustive du criblage effectué.

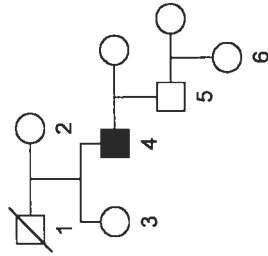
Les patients ainsi que leur famille ont été évalués par le docteur Brais lors de ses cliniques neuromusculaires aux hôpitaux Notre-Dame et Hôtel-Dieu du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) et au centre de réhabilitation Lucie-Bruneau et recrutés au CHUM (Figure 3, page 41). Ces patients souffraient tous d'une forme de dystrophie musculaire affectant les muscles des ceintures scapulaire et pelvienne, ainsi que certains muscles proximaux dont, notamment, le muscle vaste médian du quadriceps (*vastus medialis* sur la figure 4, page 42) et le biceps (Figure 5, page 43). Le muscle vaste médian, l'un des quatre faisant partie du quadriceps et situé sur la face intérieure de la cuisse, était particulièrement atrophié par rapport aux autres, dénotant une fonte musculaire notable à l'inspection.

Le recrutement des patients s'est effectué sur une période d'un peu plus d'un an, résultant en l'addition de nouvelles familles tout au long de la première phase expérimentale du projet (le premier criblage de l'ensemble du génome et la cartographie fine des loci positifs). Au total, 11 familles, soit 17 patients, ont formé notre cohorte initiale d'individus atteints (Tableau II, page 44). Un aussi grand nombre d'hommes que de femmes semble affecté: des 17 patients, neuf sont de sexe masculin, huit de sexe féminin. Leur âge varie entre 27 et 68 ans; l'âge au diagnostic est plus variable, allant de 11 à 67 ans (âge moyen: 34,5 ans). La vaste majorité des familles (neuf sur 11, soit

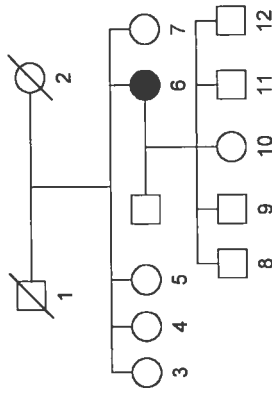
Figure 3: Arbres généalogiques des onze familles recrutées pour la dystrophie musculaire des ceintures avec atteinte des quadriceps



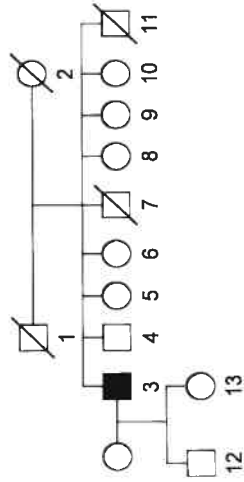
I



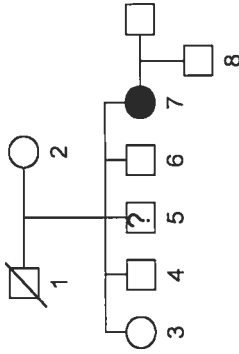
II



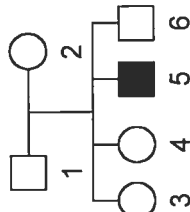
III



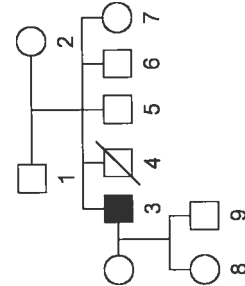
IV



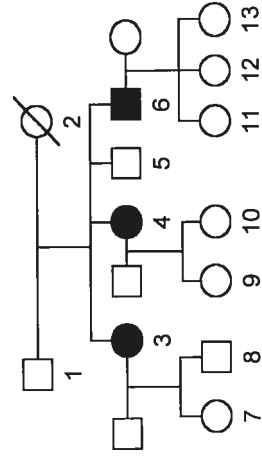
V



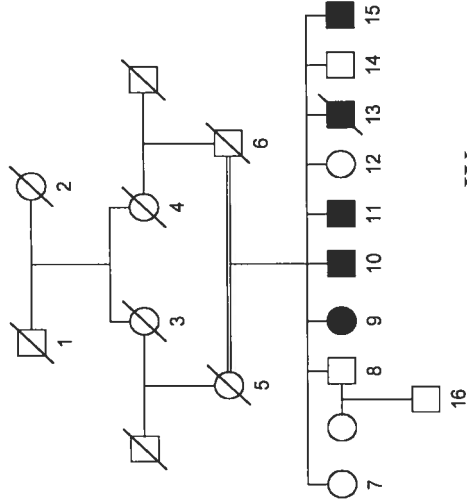
VI



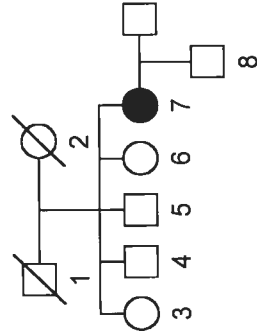
VII



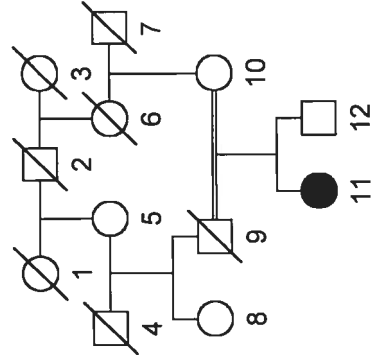
VIII



IX

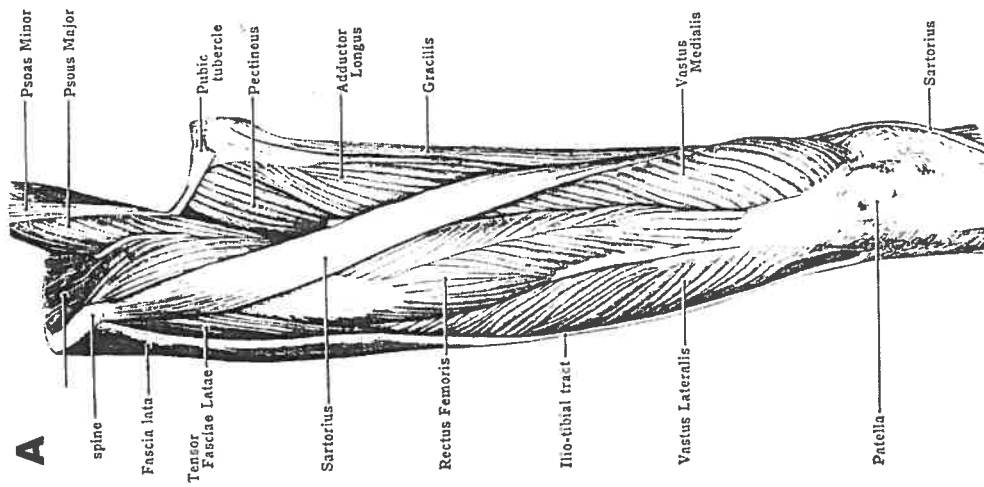


X

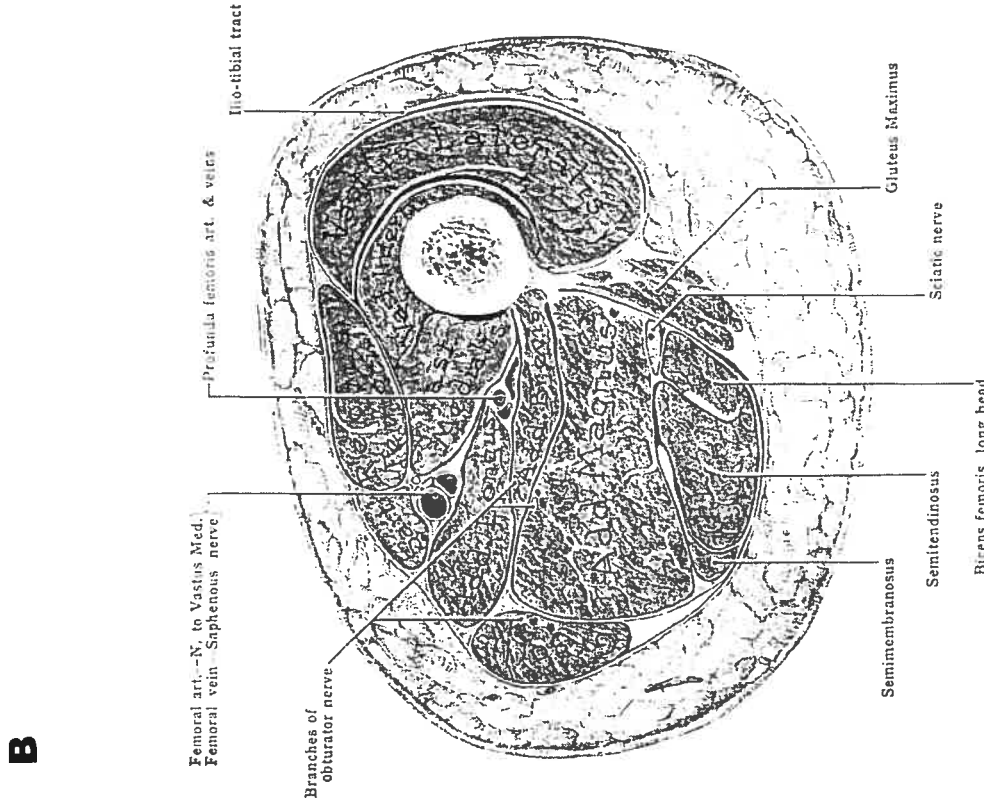


XI

Figure 4: Illustration des muscles de la cuisse (tirée de Anderson JE. Grant's Atlas of Anatomy, Seventh Edition, Williams and Wilkins, Baltimore, 1978)

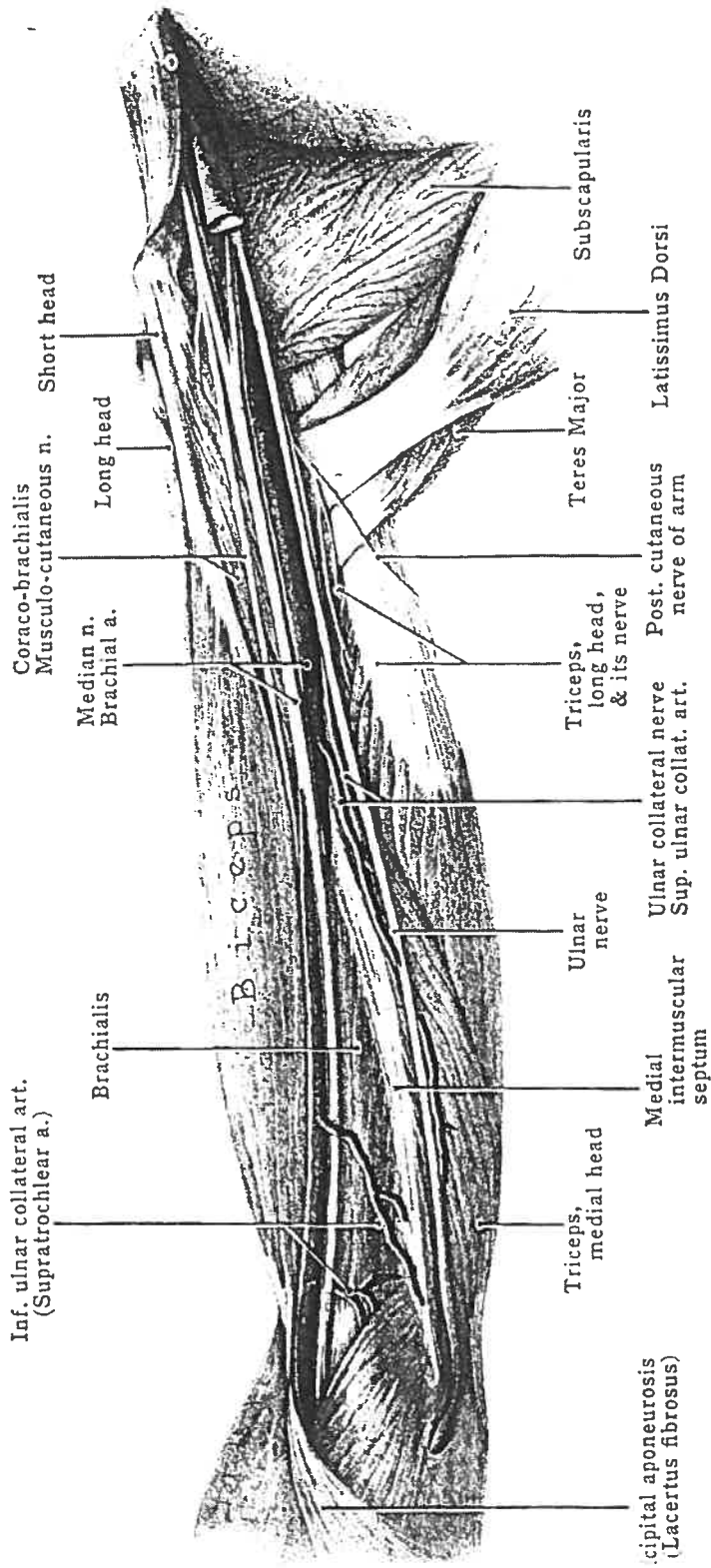


4-28 MUSCLES, FRONT OF THIGH - I



4-26 CROSS-SECTION THROUGH THE THIGH, FEMALE

Figure 5: Illustration des muscles du bras (tirée de Anderson JE. Grant's Atlas of Anatomy, Seventh Edition, Williams and Wilkins, Baltimore, 1978)



6-25 BRACHIUM OR ARM, MEDIAL VIEW

Tableau II: Données cliniques, biochimiques, électromyographiques et pathologiques sur les patients de la cohorte de dystrophie des ceintures

Fam-ID	Sexe	Age en 2005	Age du début de la maladie	Contractures	Atrophie du quadriceps	Myalgie	Hypertrophie des mollets	Atteinte faciale	Scoliose	Cardiomyopathie	Age de début d'utilisation du fauteuil roulant	CK	EMG	Biopsie musculaire
I-4	M	46	16	poignets, chevilles	oui	non	non	non	oui	non	29	394	myopathie	myopathie non spécifique avec faibles changements neurogènes
II-4	M	59	42	non	oui	non	non	non	non	non	n/a	500-2500	myopathie	myopathie
III-6	F	65	54	non	oui	diffuse	oui	non	oui	non	60	332-899	myopathie avec activité insertionnelle accrue	dystrophie
IV-3	M	64	40	non	oui	articulaire	oui	faible	non	non	58	751	myopathie	atrophie musculaire neurogénique
V-7	F	44	32	coudes, poignets, doigts, mollets, chevilles	oui	post-exercice	non	non	non	non	39	48	myopathie avec activité spontanée	atrophie musculaire neurogénique
VI-5	M	34	21	non	oui	post-exercice	oui	non	non	non	n/a	1851	myopathie	dystrophie
VII-3	M	58	16	non	oui	articulaire	oui	modérée	non	oui, FEVG 20%	46	202	n/a	dystrophie
VIII-3	F	48	44	non	oui	douleur lombaire	non	non	non	non	n/a	99	n/a	n/a
VIII-4	F	46	33	non	oui	douleur lombaire et aux jambes	non	non	non	non	n/a	69	n/a	n/a
VIII-6	M	37	30	non	oui	douleur lombaire	non	non	non	non	n/a	254	myopathie	myopathie avec vacuoles bordées
IX-9	F	68	n/a	non	oui	non	non	non	non	non	n/a	1649	n/a	n/a
IX-10	M	67	50	non	oui	à l'exercice	non	non	non	non	n/a	1000-3000	myopathie	dystrophie
IX-11	M	65	37	non	oui	à l'exercice	non	non	non	non	n/a	700-3000	myopathie	normale
IX-13	M	mort à 54	30	non	oui	à l'exercice	non	non	non	non	34	3000	n/a	dystrophie
IX-15	M	47	39	non	oui	à l'exercice	non	non	non	non	n/a	3000-6000	myopathie	dystrophie
X-7	F	45	20	chevilles	oui	diffuse	non	non	non	non	31	77	n/a	dystrophie
XI-11	F	27	11	non	oui	après exercice	oui	non	non	non	n/a	258	n/a	dystrophie

FEVG: fraction d'éjection du ventricule gauche

81,8%) ne contiennent qu'un cas de dystrophie des ceintures; la famille VIII compte trois atteints (75% des enfants du couple) et la famille IX en compte cinq (55,5% des enfants du couple). L'ensemble des pedigrees sont en accord avec une transmission de type autosomique récessive, à l'exception des familles VIII et IX qui comptent un nombre d'atteints suffisant pour laisser croire, en l'absence de données cliniques sur les parents, à une transmission de forme dominante. Cependant, les parents de ces familles n'ont pas d'histoire connue de dystrophie musculaire.

L'atrophie des quadriceps est aussi accompagnée d'une myalgie chez 14 patients (Tableau II, page 44). Cette douleur musculaire se déclare souvent suite à l'exercice. Le phénotype de cette maladie est moindre lorsque comparé à celui des sarcoglycanopathies ou d'une dystrophie musculaire sévère comme celle de Duchenne: en effet, six patients sont encore capables de marcher après 40 ans. Trois autres patients peuvent déambuler à l'aide d'une canne et huit sont confinés à une chaise roulante. L'âge moyen d'utilisation d'une chaise roulante pour ces huit patients est de 40,4 ans soit, en moyenne, 11,9 ans après leur diagnostic. Aucune cardiomyopathie ne semble associée à la maladie; le patient VII-3 est l'exception notable avec une fraction d'éjection ventriculaire gauche de 20% mais dont l'étiologie est probablement vasculaire. Quelques rares traits cliniques ont été répertoriés pour notre cohorte, tels qu'une faible atrophie des muscles faciaux (11,1%), une hypertrophie des mollets (27,8%), une scoliose (16,7%) et des contractures (27,8%).

Pour 12 de nos patients, les taux sériques de créatine kinase (CK) sont élevés, couvrant une plage de 258 à 6000 U/L (la normale se situant entre 37 et 217; Tableau II, page 44). Cinq patients (29,4%) ont des taux normaux de CK. Des électromyogrammes antérieurs et des études pathologiques de tissus provenant de biopsies musculaires ont été réalisés pour plusieurs cas, confirmant le phénotype de dystrophie musculaire à composante myopathique primaire, mais dans plusieurs cas associé à une composante neuropathique. Des déficiences en dystrophine, dysferline et sarcoglycans ont pu être

exclues par immunohistochimie et buvardages de Western sur la biopsie musculaire de IX-15.

Le grand intérêt de cette cohorte provient du fait que la majorité des patients ont une origine géographique restreinte au sud-ouest de la province de Québec. Cette distribution des cas dans le bassin Outaouais-Montréal laisse présager la présence d'un micro-effet fondateur au sein de cette région. Celle-ci est associée à un effet fondateur pour la neuropathie optique de Leber (Laberge et al., 2005).

Les patients ont fait l'objet d'un recrutement général et conservateur: le phénotype clinique devait correspondre à une dystrophie musculaire des ceintures et une atteinte des quadriceps devait être observée à l'examen. Des onze familles recrutées, huit ont pu être liées au locus du chromosome 11p13-p12 identifié à la suite du deuxième criblage de l'ensemble du génome. Les données sur les trois autres familles résultent en un LOD score négatif pour l'intervalle causé par un frère ou une soeur non atteint(e) au génotype identique. Une autre famille récemment recrutée pour l'étude s'est avérée être liée au locus de la dystrophine. Ainsi, un exercice d'épuration de la cohorte initiale a eu lieu suite à la découverte du locus, résultant en l'élimination d'un certain nombre de familles de la cohorte de patients finale.

Le but primaire du projet était de caractériser la maladie moléculairement en identifiant le locus puis le gène associés au phénotype clinique. À cet effet, un criblage de l'ensemble du génome a été choisi comme l'approche moléculaire la plus efficace, étant donné son usage courant et son haut taux de succès dans l'identification de nouveaux loci pour les dystrophies musculaires des ceintures. Quelques individus des familles les plus informatives ont été sélectionnés pour faire partie de ce criblage; une fois le locus identifié, tous les individus recrutés (atteints et non atteints) seraient testés pour les marqueurs microsatellites délimitant le locus et une cartographie fine de l'intervalle suivrait afin d'en rapetisser la taille. L'ADN d'individus-clés, choisis afin de représenter tous les haplotypes répertoriés, serait par la suite séquencé pour des gènes candidats d'un intérêt particulier, soit des gènes dont l'ARNm est très exprimé dans les muscles

squelettiques ou dont la protéine est connue comme jouant un rôle structurel ou enzymatique dans le mécanisme contractile musculaire ou à l'interface de la fibre musculaire et de la matrice extracellulaire. L'identification du gène muté permettrait non seulement des études protéiques dans le but de mieux comprendre cette nouvelle forme de dystrophie des ceintures, mais aussi une meilleure définition de la pathogénèse musculaire partagée par toutes les formes d'affection musculaire.

3

Premier criblage de l'ensemble du génome

3.1 Introduction

Dans le but de caractériser la maladie d'un point de vue génétique, un criblage de l'ensemble du génome par homozygotie a été fait au Centre d'Innovation Génome Québec et Université McGill. Trois cent quatre-vingt douze marqueurs microsatellites ont été utilisés afin d'offrir une couverture complète du génome humain. L'ADN de six individus atteints (VIII-3, VIII-4, VIII-6, IX-10, IX-11 et IX-15) a été employé pour le criblage.

Les génotypes générés par le Centre ont été importés dans Microsoft Excel pour être analysés par homozygotie. Un tableau résumant les régions d'intérêt dans la famille VIII, dans la famille IX et pour les deux familles combinées a été bâti (Tableau III, page 49).

Les régions d'intérêt de ce premier criblage de l'ensemble du génome se résument ainsi. Une région intéressante est apparue sur le chromosome 14 entre les marqueurs *D14S587* (position sur la carte Marshfield: 55,8 cM) et *D14S592* (66,8 cM). Les individus atteints de la famille VIII étaient homozygotes pour l'allèle 263 du marqueur *D14S587* et pour l'allèle 234 du marqueur *D14S592*. Les individus atteints de la famille IX étaient non seulement homozygotes pour ces deux marqueurs (allèle 249 pour *D14S587* et allèle 231 pour *D14S592*), mais aussi pour les deux marqueurs subséquents, soit *D14S588* et *D14S71*. Il demeure intéressant de constater que, bien que les individus atteints de la famille VIII n'aient pas été homozygotes pour le marqueur *D14S588*, ils partageaient d'avec les patients de la famille IX l'allèle 121. Il s'agissait donc d'une région d'au moins 11 cM chez la famille VIII et d'une d'au moins 26,7 cM chez la famille IX. Les différents haplotypes chez les deux familles semblaient indiquer la présence de deux mutations différentes, ce qui n'était pas totalement inattendu.

Tableau III: Régions d'intérêt du premier criblage de l'ensemble du génome pour les individus testés des familles VIII et IX

	Chr.	Marshfield (cM)	Marqueur	VIII-3	VIII-4	VIII-6	IX-10	IX-11	IX-15
Région d'intérêt pour VIII et IX	14	44,1	D14S306	204 196	204 204	204 196	204 196	204 196	208 204
		55,8	D14S587	263 263	263 263	263 263	249 249	249 249	249 249
		66,8	D14S592	234 234	234 234	234 234	231 231	0 0	231 231
		75,6	D14S588	129 121	129 121	129 121	121 121	121 121	121 121
		82,6	D14S71				191 191	191 191	191 191
		91,6	D14S606				266 262	274 262	274 262
Région d'intérêt pour VIII	6	128,9	D6S1040	277 277	277 277	277 265			
		137,8	D6S1009	240 240	240 240	240 240			
		153,0	D6S476	182 182	182 182	182 182			
		166,4	D6S305	231 225	231 217	225 217			
Régions d'intérêt pour IX	4	146,0	D4S1625				196 192	196 192	200 196
		158,0	D4S1629				146 146	146 146	146 146
		167,6	D4S2368				317 317	317 317	317 317
		176,2	D4S2431				235 235	243 243	243 243
	X	39,5	DXS9896				208	204	208
		52,6	DXS1068				257	257	257
		63,6	DXS6810				217	217	217
		71,3	GATA144D04				246	246	246
		83,3	DXS7132				293	293	293
		93,2	DXS6800				205	0	205
103,6	DXS6789				136	148	148		

Des régions d'intérêt non partagées entre les familles ont aussi été répertoriées. En effet, la différence notable des taux sériques d'enzyme créatine kinase a toujours semé le doute quant à la possibilité d'être en fait confronté à deux maladies différentes: il importait donc de faire le suivi des régions d'intérêt confinées à une seule famille. Une région d'au moins 15,2 cM sur le chromosome 6 des individus atteints de la famille VIII s'est révélée intéressante: les trois patients étaient homozygotes pour l'allèle 240 du marqueur *D6S1009* (137,8 cM) et pour l'allèle 182 du marqueur subséquent, le *D6S476* (153,0 cM). Deux régions similaires se sont dessinées pour les individus de la famille IX. Une homozygotie pour les marqueurs adjacents *D4S1629* (158,0 cM) et *D4S2368* (167,8 cM) a été observée, de même qu'une homozygotie s'étendant du marqueur *DXS1068* (52,6 cM) au marqueur *DXS6800* (93,2 cM). Cette région semblait particulièrement pertinente car, au moment de cette analyse, l'individu IX-9 n'avait pas encore été diagnostiqué, laissant ouverte la possibilité que la maladie propagée au sein de la famille IX était en fait liée au chromosome X puisque seuls des hommes étaient atteints.

Quatre autres régions d'intérêt secondaire ont aussi été répertoriées. Celles-ci se caractérisaient par de l'homozygotie partagée par les deux familles mais pour un seul marqueur. Les individus atteints des deux familles étaient homozygotes pour le même allèle à chacun des trois marqueurs suivants: *D4S1629*, *D12S1052* et *D20S477*. De plus, il y avait homozygotie pour deux allèles distincts du marqueur *D11S4949*. L'étude de ces régions, ainsi que des régions d'intérêt exclusives à une seule des deux familles, sera décrite en détails dans l'appendice I.

3.2 Un locus sur le chromosome 14

Une région prometteuse s'était dessinée sur le chromosome 14q22,2-q23,1, entre les marqueurs *D14S587* et *D14S592*. Les individus atteints et non-atteints des familles VII, VIII, IX et XI (les seules familles faisant partie de l'étude à ce moment) ont été testés pour ces marqueurs du criblage et pour d'autres marqueurs commerciaux localisés

entre *D14S587* et *D14S592* avec un espacement moyen de 2 cM (*D14S276*, *D14S1064*, *D14S980* et *D14S274*) (Figure 6, page 52).

Les résultats étaient encourageants (Figure 7, page 53). Bien que l'homozygotie observée dans les résultats du criblage pour les deux marqueurs-clés *D14S587* et *D14S592* n'ait pas été conservée tout au long de l'intervalle, un îlot d'homozygotie a pu être observé pour les marqueurs consécutifs *D14S276* et *D14S1064* à l'intérieur de l'intervalle testé. En effet, les individus atteints de la famille VIII sont homozygotes pour l'allèle 4 alors que les individus atteints de la famille IX le sont pour l'allèle 3 de *D14S276*; de même, les patients des deux familles sont homozygotes pour l'allèle 3 de *D14S1064*. Il est intéressant de noter que l'individu VII-3 était aussi homozygote pour les deux marqueurs mais ne partageait pas les allèles des familles VIII et IX, laissant croire à une mutation différente.

Il demeure important de mentionner une contradiction apparente entre les résultats du criblage de l'ensemble du génome pour la région étudiée et les résultats de la cartographie fine. Les individus IX-10, -11 et -15 étaient homozygotes pour l'allèle 10 du marqueur *D14S587* dans les fichiers de résultats du criblage; la reprise de ce marqueur lors de la cartographie fine a cependant révélé une seconde bande pour ces individus d'un poids moléculaire de 286 paires de base (Figure 8, page 54). Lorsque le marqueur a été retesté avec la cohorte complète suite à la fin du recrutement des familles, il s'est avéré que d'autres bandes apparaissaient dans cette région pour certains des nouveaux individus; l'intensité de ces bandes étant légèrement moindre que celle des bandes de plus bas poids moléculaire, le marqueur a été refait afin de trancher entre la présence d'artéfacts d'amplification et la présence de véritables bandes. Les résultats du second essai étant identiques à ceux du premier, la ségrégation des allèles dans les familles avec et sans ces bandes présumées artéfactuelles a été testée. La ségrégation des allèles avec ces bandes s'effectuait parfaitement dans chacune des familles, laissant croire que ces bandes étaient bien réelles.

Figure 6: Marqueurs microsatellites du chromosome 14 génotypés pour les individus recrutés

Marshfield (cM)

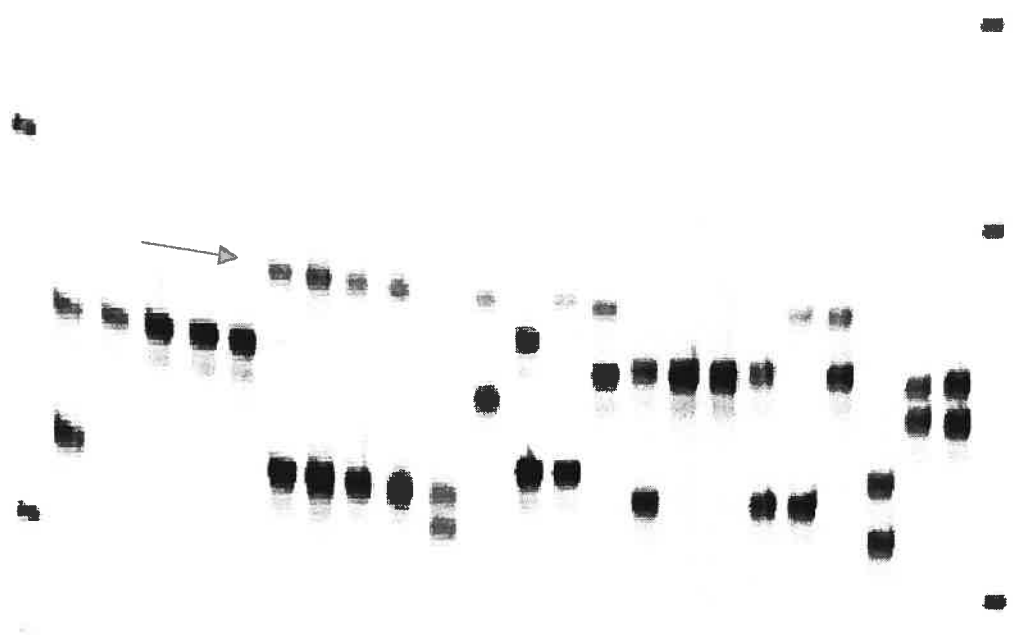
53,2	D14S978
55,8	D14S587, D14S281, D14S991, D14S1057
56,4	D14S276
57,4	D14S1064, D14S745
58,0	D14S282, D14S1056
60,4	D14S980
63,3	D14S274
66,8	D14S1038, D14S592

Figure 7: Haplotypes pour les individus atteints après le génotypage de six marqueurs microsatellites dans la région d'intérêt

	D14S587	D14S276	D14S1064	D14S980	D14S274	D14S592
Généthon	-	47	48,1	50,9	53,8	-
deCODE	-	-	-	56,8	58,2	60,5
Marshfield	55,8	56,4	57,4	60,4	63,3	66,8
I-4	7 10	4 2	4 1	0 0	0 0	0 0
II-4 non phasé	1 10	1 4	3 4	0 0	0 0	0 0
III-6	3 10	3 3	2 4	0 0	0 0	0 0
IV-3	5 10	3 3	3 2	0 0	0 0	0 0
V-7 non phasé	3 10	1 3	4 6	0 0	0 0	0 0
VI-5	10 10	2 5	3 2	0 0	0 0	0 0
VII-3	5 5	1 1	4 4	5 8	2 5	4 2
VIII-6	6 6	4 4	3 3	5 8	5 5	3 3
VIII-3	6 6	4 4	3 3	5 8	5 5	3 3
VIII-4	6 6	4 4	3 3	5 8	5 5	3 3
IX-15	10 2	3 3	3 3	5 8	5 5	4 4
IX-10	10 2	3 3	3 3	5 2	5 4	4 4
IX-11	10 2	3 3	3 3	5 2	5 4	4 4
X-7	10 10	3 3	0 2	0 0	0 0	0 0
XI-11 non phasé	5 7	5 2	2 1	3 4	4 2	0 0

Les allèles **gras** dénotent de l'homozygotie

Figure 8: Gel de polyacrylamide du marqueur *D14S587* (la flèche indique la hauteur des bandes non détectées lors du criblage de l'ensemble du génome)



De nouveaux marqueurs microsatellites, flanquant la région d'intérêt *D14S276-D14S1064*, ont été commandés puis testés (*D14S281*, *D14S1057*, *D14S745*, *D14S282* et *D14S1056*). Le recrutement des onze familles faisant partie de la présente étude s'étant terminé, tous les individus recrutés ont pu être testés pour ces nouveaux marqueurs, de même que pour *D14S276* et *D14S1064*. Les haplotypes ont été reconstitués à partir des données de génotypage et une synthèse des résultats pour les individus atteints est disponible en Figure 9 (page 56).

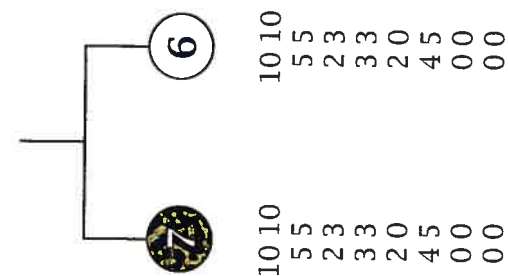
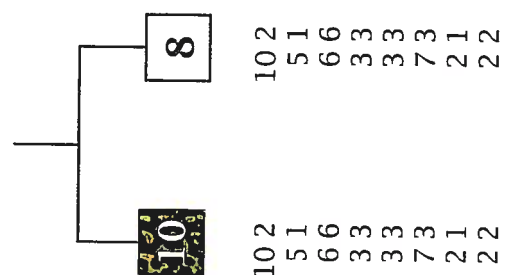
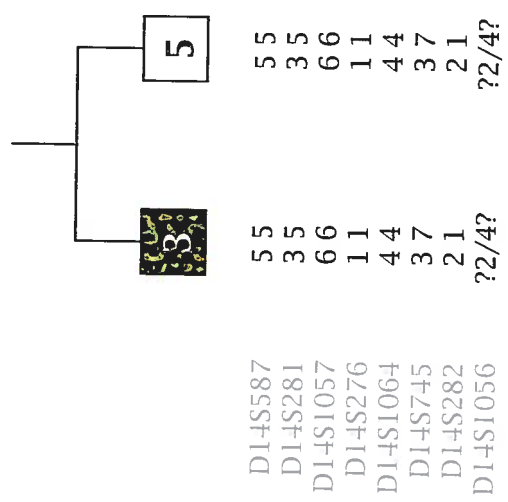
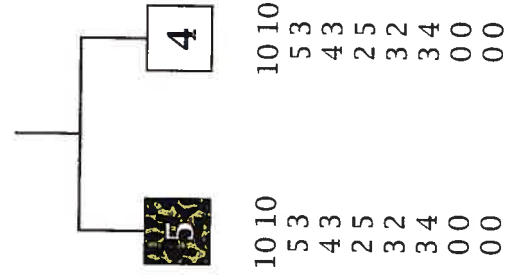
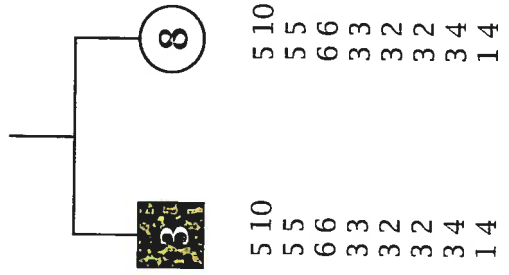
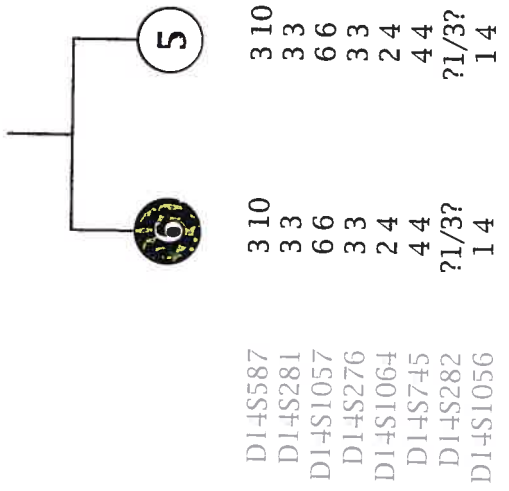
Quatorze marqueurs microsatellites ont été testés au total, couvrant une région d'environ 13,6 cM (9484 kb). L'espacement moyen entre les marqueurs a été évalué à 1,6 cM sur la carte génétique Marshfield et l'indice d'hétérozygotie des marqueurs est relativement élevé, étant en moyenne de 0,74 (un seul marqueur a un indice inférieur à 0,65). Les haplotypes ont pu être reconstruits pour toutes les familles. L'ADN de l'individu IX-7 a dû être retiré de l'étude à ce moment pour des raisons confidentielles.

Les haplotypes des atteints pour l'ensemble des onze familles montrent plusieurs îlots d'homozygotie, mais rien de partagé entre toutes ou presque toutes les familles (Figure 9, page 56). De plus, lorsqu'il y a une homozygotie notable partagée par plusieurs atteints, ce n'est jamais le même allèle qui est partagé. Pour les quelques marqueurs où un même allèle est partagé à travers plusieurs familles de façon homozygote, il s'agit toujours de l'allèle le plus commun du marqueur avec une fréquence oscillant toujours près de 50% (les fréquences alléliques ayant été calculées à partir des chromosomes non-porteurs pour la cohorte entière, faute d'individus-contrôles). L'argument-clé pour l'élimination de la région du chromosome 14 réside cependant dans le fait que plusieurs individus atteints partagent leur haplotype complet avec un frère ou une soeur non atteint(e): III-6 avec III-5; IV-3 avec IV-8; VI-5 avec VI-4 et VI-6; VII-3 avec VII-5; IX-10 et IX-11 (de même que IX-15 pour l'intervalle allant de *D14S978* à *D14S971*) avec IX-8, et X-7 avec X-4 (si la mutation de *D14S745* est acceptée) et X-6 (Figure 10, page 57). Ainsi, pour 6 des onze familles testées (54,5% de la cohorte), un individu atteint est génotypiquement identique à un frère ou une soeur non atteint(e). Les chances qu'un

Figure 9: Haplotypes pour les individus atteints après le génotypage de quatorze marqueurs microsatellites dans la région d'intérêt

	D14S978	D14S587	D14S281	D14S991	D14S1057	D14S276	D14S1064	D14S745	D14S282	D14S1056	D14S980	D14S274	D14S1038	D14S592
Généthon	44,2	-	46,8	46,9	46,9	47,0	48,1	-	48,6	50,0	50,9	53,8	56,7	-
deCODE	-	-	-	53,5	54,1	-	-	55,4	-	55,6	56,8	58,2	60,1	60,5
Marshfield	53,2	55,8	55,8	55,8	55,8	56,4	57,4	57,4	58,0	58,0	60,4	63,3	66,8	66,8
I-4	0	7	3	0	6	4	4	5	3	3	0	0	0	0
	0	10	5	0	8	2	1	5	1	2	0	0	0	0
II-4	0	1	3	0	1	1	3	4	0	1	0	0	0	0
non phasé	0	10	3	0	8	4	4	7	0	5	0	0	0	0
III-6	0	3	3	0	6	3	2	4	1	1	0	0	0	0
	0	10	3	0	6	3	4	4	3	4	0	0	0	0
IV-3	0	5	5	0	6	3	3	3	3	1	0	0	0	0
	0	10	5	0	6	3	2	2	4	4	0	0	0	0
V-7	0	3	5	0	6	1	4	7	2	2	0	0	0	0
non phasé	0	10	3	0	6	3	6	7	5	3	0	0	0	0
VI-5	0	10	5	0	4	2	3	3	0	0	0	0	0	0
	0	10	3	0	3	5	2	4	0	0	0	0	0	0
VII-3	5	5	5	5	6	1	4	3	2	2	5	2	2	4
	6	5	5	4	6	1	4	7	1	4	8	5	1	2
VIII-6	1	6	2	5	7	4	3	8	2	2	5	5	4	3
	4	6	2	2	3	4	3	7	3	3	8	5	4	3
VIII-3	1	6	2	5	7	4	3	8	2	2	5	5	4	3
	4	6	2	2	3	4	3	7	3	3	8	5	4	3
VIII-4	1	6	2	5	7	4	3	8	2	2	5	5	4	3
	4	6	2	2	3	4	3	7	3	3	8	5	4	3
IX-15	6	10	5	2	6	3	3	7	2	2	5	5	4	4
	6	2	1	3	8	3	3	7	3	2	8	5	3	4
IX-10	6	10	5	2	6	3	3	7	2	2	5	5	4	4
	6	2	1	3	6	3	3	3	1	2	2	4	1	4
IX-11	6	10	5	2	6	3	3	7	2	2	5	5	4	4
	6	2	1	3	6	3	3	3	1	2	2	4	1	4
X-7	0	10	5	0	3	3	0	5	0	0	0	0	0	0
	0	10	2	0	2	3	2	4	0	0	0	0	0	0
XI-11	2	5	2	0	2	5	2	5	3	2	3	4	0	0
non phasé	1	7	2	1	6	2	1	5	3	2	4	2	0	0

Figure 10: Patients et frères et soeurs non atteints(es) partageant un haplotype pour les quatorze marqueurs testés de la région d'intérêt



individu considéré comme sain soit en fait atteint de la maladie ne sont pas nulles: en effet, l'individu IX-9 n'a été diagnostiqué que suite au deuxième criblage de l'ensemble du génome, après une accumulation d'indices en faveur d'un diagnostic positif (haplotypes concordant avec ceux des frères atteints et taux sériques de créatine kinase très élevés). Cependant, la probabilité d'être face à huit nouveaux cas de dystrophie non diagnostiqués dû à l'absence de symptômes et de signes cliniques et à des taux sériques de CK normaux est pratiquement nulle.

Les génotypes des individus des onze familles ont été entrés dans le programme MLINK du lot LINKAGE dans le cadre d'une étude de liaison en deux points afin d'éliminer définitivement la région candidate. Le LOD score cumulatif pour les onze familles a été calculé comme étant «- infini» pour une valeur $\theta = 0,0$, et ce pour tous les marqueurs testés (Tableau IV, page 59). Le LOD score cumulé le plus haut obtenu a été de 0,75 pour le marqueur *D14S587* ($\theta = 0,1$). À des fins de comparaison, des données fictives, illustrant la puissance théorique des familles, ont généré un LOD score maximal de 6,41 pour le même marqueur, et ce pour une valeur $\theta = 0,0$; pour $\theta = 0,1$, la valeur du LOD était de 4,59.

Pour toutes ces raisons, il apparaît que la région du chromosome 14 étudiée en cartographie fine ne correspond pas au locus de la maladie.

L'étude de régions candidates à l'intérêt moindre issues de ce premier criblage est disponible en appendice I. La cartographie de ces régions n'a pas permis l'identification du locus de la maladie.

3.3 Conclusion

Les données du premier criblage de l'ensemble du génome ont dû être abandonnées après un travail exhaustif sur des régions positives avec la cohorte entière. La faible quantité d'allèles des marqueurs utilisés a contribué grandement au nombre impressionnant de faux positifs. De plus, la méthode d'analyse choisie, soit un criblage

Tableau IV: LOD scores obtenus en deux points sous MLINK pour les quatorze marqueurs microsatellites testés de la région d'intérêt

Famille / θ	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
I	0,12	0,06	0,02	0,00	0,00	0,00
II	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
III	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
IV	<i>-infini</i>	-0,21	-0,07	-0,02	-0,00	0,00
V	0,12	0,07	0,03	0,01	0,00	0,00
VI	-0,23	-0,14	-0,07	-0,03	-0,01	0,00
VII	0,07	0,05	0,03	0,01	0,00	0,00
VIII	0,43	0,33	0,22	0,12	0,03	0,00
IX	<i>-infini</i>	0,62	0,52	0,30	0,09	0,00
X	-0,10	-0,06	-0,04	-0,02	-0,00	0,00
XI	0,12	0,06	0,02	0,01	0,00	0,00
I-XI	<i>-infini</i>	0,75	0,66	0,38	0,11	0,00

par homozygotie, a été abandonnée de même, puisque la densité de marqueurs utilisés ne semblait pas suffisante à la détection de la région en déséquilibre de liaison.

Un second criblage de l'ensemble du génome a été effectué et les génotypes ont été analysés grâce au logiciel MAXPROB de GENEHUNTER. Une critique plus exhaustive des différences entre ces deux méthodes d'analyse et les avantages et inconvénients à utiliser l'une ou l'autre seront discutés davantage dans le chapitre 6.

3.4 Matériels et méthodes

L'ADN génomique des individus VIII-3, VIII-4 et VIII-6, de même que celui des individus IX-10, IX-11 et IX-15, a été envoyé au Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill pour un criblage de l'ensemble du génome. Les échantillons ont été reçus au Centre à une concentration de 10 ng/μL; une nouvelle plaque a été générée par le Centre à une concentration de 3 ng/μL comprenant non seulement les six échantillons de dystrophie des ceintures mais aussi 22 autres ADN utilisés dans le cadre d'autres projets. L'ensemble Weber 8 de 392 marqueurs microsatellites a été utilisé. Les plaques 384 puits contenant le mélange à PCR et l'ADN ont été roulées sur un ABI 9700 Thermocycler. Les amplicons ont par la suite été chargés automatiquement sur une machine ABI 3700 dotée de GeneScan. L'analyse des données a été effectuée grâce à Genotyper. Les erreurs mendéliennes ont été vérifiées par le programme gsh. Tous les marqueurs dont l'efficacité d'amplification avait été inférieure à 50% ont été reroulés. 95% des marqueurs roulés ont amplifié pour au moins 70% des échantillons de la plaque.

Le génotypage par cartographie fine s'est effectué sur un appareil LI-COR Gene ReadIR 4200. La réaction d'amplification par PCR a été faite en préparant un mélange selon les proportions suivantes: 4,62 μL d'eau de qualité HPLC, 1,60 μL de dNTP (1,25 mM), 1,00 μL de tampon à PCR 10X additionné de magnésium (15 mM), 0,60 μL de magnésium (25 mM), 0,14 μL d'enzyme AmpliTaq (1000 u, Applied Biosystems), 0,14 μL de fluorochrome m13 *forward* à émission dans le 800 nm ou le 700 nm (1 pM/μL, LI-COR Biosciences), 0,20 μL d'amorce *forward* dotée d'une queue pour la liaison de la

molécule de m13 (20 μ M) et 0,20 μ L d'amorce *reverse* (20 μ M) (AlphaDNA et Invitrogen). Chaque puits a reçu 8,5 μ L de mélange et 1,5 μ L d'ADN à 40 ng/ μ L, pour un total de 10,0 μ L par puits. Les plaques ont été roulées sur une machine GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) suivant le programme standard suivant: 5 minutes à 92°C, suivi de 35 cycles d'amplification (30 secondes à 94°C, 30 secondes à 55°C, 30 secondes à 72°C), suivi de 5 minutes à 72°C, puis d'une mise à 4°C. Les marqueurs faisant preuve d'une plus grande résistance à l'amplification ont été amplifiés selon le programme MyhCAG doté d'un *hot start*: 5 minutes à 95°C, suivi de cinq cycles de *hot start* (30 secondes à 95°C, 30 secondes à 68°C, 30 secondes à 74°C), suivi de 30 cycles d'amplification (30 secondes à 95°C, 30 secondes à 58°C, 30 secondes à 74°C), puis 7 minutes à 74°C, suivi d'une mise à 4°C.

Cinq μ L d'une solution de charge non-commerciale (19 mL de formamide 100%, 800 μ L d'EDTA 500 mM pH 8,0, 333 μ L de bleu de bromophénol 3%) ont été ajoutés à chacun des puits, suivi d'une dénaturation de dix minutes à 95°C dans un appareil GeneAmp PCR System 9700. Les échantillons ont été conservés sur glace jusqu'à leur dépôt sur un gel de polyacrylamide par des seringues à dépôt sur gel multicanaux Hamilton. Les amplicons ont migré dans le gel à 1500 V, 40 mA, 35 W et 46°C. Les paramètres ont été entrés dans Quick SequencIR et l'analyse allélique a été effectuée grâce au logiciel Base ImagIR.

4

A novel autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy with quadriceps atrophy maps to 11p13-p12 (second criblage de l'ensemble du génome)

4.1 Introduction à l'article

Dans le but d'identifier le locus génétique lié à cette nouvelle forme de dystrophie musculaire des ceintures et devant le barrage de faux positifs qu'avait légué le premier criblage de l'ensemble du génome effectué au Centre d'Innovation Génome Québec et Université McGill, un second criblage de l'ensemble du génome a été fait dans des conditions différentes afin d'augmenter les chances que le véritable locus ressorte de l'analyse préliminaire.

Le criblage a été réalisé en Islande chez deCODE genetics, la compagnie responsable de la carte génétique deCODE. Une densité de marqueurs supérieure au premier criblage a été employée, pour un total de 500 marqueurs polymorphiques couvrant le génome entier et séparés, en moyenne, par 8 cM selon la carte deCODE.

Le locus génétique n'ayant pas été détecté lors du premier criblage, une nouvelle approche a été utilisée pour ce second exercice. Une analyse de liaison pure est venue remplacer l'observation d'homozygotie, les données alléliques générées par deCODE genetics étant transmises au programme MAXPROB de GENEHUNTER capable d'opérer une analyse de liaison multipoint et de calculer pour chaque marqueur, en tenant compte de l'espace entre les marqueurs, le LOD score, c'est-à-dire le logarithme en base 10 de la probabilité que la maladie soit liée au locus étudié par rapport à la probabilité que la maladie soit indépendante de ce locus. L'informativité et la puissance

des familles a encore une fois influencé le choix des individus à tester pour le criblage. À cette fin, l'ADN de quatre individus non-atteints (soit deux par famille testée) a été envoyé à deCODE genetics, de même que l'ADN des individus VIII-3, VIII-4, VIII-6, IX-10, IX-11 et IX-15 qui avaient constitué l'ensemble des ADN testés lors du premier criblage.

La liaison de la maladie au marqueur du criblage *D11S1360*, de même que la cartographie fine de la région par marqueurs microsatellites, a fait l'objet d'un article scientifique soumis à la revue *Brain*. Une présentation clinique de la maladie constitue la première moitié de cet article, incluant les caractéristiques cliniques, biochimiques, électromyographiques et pathologiques de la maladie, de même que de l'imagerie par résonance magnétique aidant à mieux définir les muscles atteints par la dystrophie et la progression possible de la maladie. La deuxième moitié de l'article explique le travail de criblage et de cartographie fine du locus génétique. Un raffinement de l'intervalle candidat par voie de séquençage de régions contenant des SNPs (*single-nucleotide polymorphisms*) connus fera l'objet du chapitre 5.

4.2 Contribution des auteurs

J. Jarry¹: Revue de la littérature, analyse du criblage de l'ensemble du génome, cartographie fine de la région candidate, séquençage des gènes candidats, rédaction du manuscrit.

M.-F. Rioux²: Examen neurologique de la cohorte de patients et confirmation du phénotype.

Y. Robitaille³: Préparation et analyse des biopsies musculaires.

V. Khoury⁴: Imagerie par résonance magnétique.

I. Thiffault¹: Aide avec le logiciel GENEHUNTER pour l'analyse de liaison génétique multipoint.

M. Tétreault¹: Aide avec le logiciel GENEHUNTER pour l'analyse de liaison génétique multipoint.

L. Loisel¹: Recrutement des patients et compilation des données généalogiques.

J.P. Bouchard⁵: Participation au recrutement des familles.

B. Brais¹: Identification des cas, recrutement des familles, évaluation clinique, supervision lors des études de liaison, correction du manuscrit.

¹ Centre for the Study of Brain Diseases, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Québec, Canada.

² CHUS, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada.

³ Hôpital Ste-Justine, Montréal, Québec, Canada.

⁴ Département de radiologie, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

⁵ CHA-Hôpital Enfant-Jésus, Université Laval, Québec, Canada.

4.3 Summary

Limb-girdle muscular dystrophies (LGMD) are a heterogeneous group of pathologies. We have identified a cohort of 14 French-Canadian patients from eight different families displaying a novel form of LGMD with an autosomal recessive inheritance. These patients share some features with previously described cases of “quadriceps myopathy” that evolved into an LGMD. All demonstrate preponderant and asymmetrical atrophy of the biceps brachii and quadriceps femoris. The majority complains of myalgia (85.7%). EMG studies often revealed neurogenic changes (62.5%). CK values were variable from normal to 6000 U/l. Clinical evaluations and MRI studies demonstrate a variable intrafamilial and interfamilial phenotype. Asymmetrical muscle involvement was clinically observed and confirmed by imaging. MRI studies suggest that the hamstrings and the adductor magnus are the first limb muscles to demonstrate fatty infiltration. Muscle pathology shows no sign of active inflammation but increased endomysial connective tissue associated with basal lamina duplication and collagen disorganisation. A genome-wide scan using the two largest families uncovered linkage to marker *D11S1360* on chromosome 11p12 (multipoint LOD score of 2.78). Further genotyping for the eight families confirmed linkage to this new LGMD locus (multipoint LOD score of 4.56). Fine mapping subsequently defined a less-than-3.3-cM candidate interval on 11p13-p12. Haplotype analysis of carrier chromosomes suggests that the most frequent mutation may account for up to 81.3% of French-Canadian mutations. In this study we describe the chromosomal locus of a new form of recessive LGMD with prominent quadriceps femoris atrophy.

4.4 Keywords

autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy; quadriceps atrophy; genome-wide scan; linkage analysis.

4.5 Abbreviations

AD-LGMD = autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy; AR-LGMD = autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy; CK = creatine kinase; cM = centiMorgan; EMG = electromyogram; FSHMD1A = facioscapulohumeral muscular

dystrophy type 1A; IBM = inclusion body myositis; kb = kilobase; LGMD = limb-girdle muscular dystrophy; LOD = logarithm of the odds; Mb = megabase; MRI = magnetic resonance imaging.

4.6 Introduction

Limb-girdle muscular dystrophies (LGMD) are defined as a weakness and wasting of the limb-girdle muscles, with typical sparing of the facial muscles (Wicklund, 2003). The various forms of LGMD have been classified based on their mode of transmission, their mutated gene or chromosomal locus. To date, seven autosomal dominant forms (LGMD1A-G) and 11 autosomal recessive forms (LGMD2A-K) have been characterised. The different autosomal recessive LGMDs (AR-LGMDs) display some epidemiological or clinical differences that may help their clinical distinction (Bushby, 1999b). Three AR-LGMDs have been found to exist more in specific populations: LGMD2G in Brazil, LGMD2H in the Manitoba Hutterites of Canada, and LGMD2J in Finland (Zatz et al., 2003). Variable muscle involvement is present in the different forms, with inconsistent mild quadriceps femoris atrophy being observed in LGMD2A, LGMD2B, LGMD2D, LGMD2H, and LGMD2I (Fischer et al., 2005).

Cases of quadriceps myopathy have been described in the literature at least since 1922 (Bramwell, 1922). In the oldest reports, the disease seems to have been restricted to the quadriceps muscles with weakness and atrophy not spreading to other muscle groups (Denny-Brown, 1939), (Walton, 1956), (Mümenthaler, 1970), (Turner and Heathfield, 1961), and (Boddie and Stewart-Wynne, 1974). Later observations suggested that in some cases it evolved into an LGMD (Walton, 1956). In 1974, Boddie and Stewart-Wynne suggested that quadriceps myopathies represent a clinical syndrome with heterogeneous pathological bases rather than a specific entity (Boddie and Stewart-Wynne, 1974). Strikingly, many of the cases described presented biopsy and EMG findings suggesting both active dystrophic and neurogenic processes (Serratrice and Munsat, 1995). While most of these early described cases appear to be sporadic, some familial cases have been described. In 1970, Mümenthaler described two brothers with a shared quadriceps myopathy (Mümenthaler, 1970) and Furukawa et al. described a

case whose parents were first-degree cousins (Furukawa et al., 1977). In 1973, Espir and Matthews published a study of a dominant quadriceps myopathy affecting a father, his three daughters, and one of his brothers (Espir and Matthews, 1973). Sunohara et al. in 1990 described four male patients with quadriceps myopathy, all of whom showed a mild and slowly progressive myopathy clinically confined to the quadriceps muscles but who, on careful EMG and histological examinations, had more widespread muscle involvement (Sunohara et al., 1990). Dystrophin testing by immunofluorescence studies and immunoblotting were compatible with a diagnosis of Becker muscular dystrophy. The authors concluded that although the "quadriceps syndrome" may result from a variety of heterogeneous diseases, at least a subset of these patients in fact have Becker muscular dystrophy. The observation that the majority of cases of quadriceps myopathy are men was underlined by Munsat and Serratrice (Serratrice and Munsat, 1995). In 2003, Charniot et al. described the autosomal dominant segregation in a French family of a quadriceps atrophy associated with a severe dilated cardiomyopathy with conduction defects or atrial/ventricular arrhythmias (Charniot et al., 2003). Cardiac involvement preceded neuromuscular disease in all affected patients. They detected an Arg377-to-His mutation in the lamin A/C protein (LMNA). This mutation had been reported in limb-girdle muscular dystrophy type 1B, a slowly progressive LGMD with age-related cardiac conduction disturbances and the absence of early contractures. These latter two families further support the conclusion that quadriceps atrophy can indeed be found in different genetic conditions. In fact, quadriceps atrophy has been mostly associated with sporadic inclusion body myositis (IBM) (Phillips et al., 2001). This sporadic inflammatory myopathy presents with an insidious onset of slowly progressive proximal and distal weakness and atrophy, particularly affecting the quadriceps and forearm muscles (wrists and finger flexors) and ankle dorsiflexors. Unlike this sporadic form, hereditary IBM, which links to 9p12-p11 and is caused by mutations in UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase (GNE), is known to spare the quadriceps entirely (Eisenberg et al., 2001). On the other hand, in autosomal dominant IBM3, caused by mutations in the MYHC2A gene, quadriceps atrophy is a prominent feature (Darin et al., 1998). In conclusion, most authors believe that quadriceps myopathy is not a single entity but may be found in different disorders. This

study is the first to describe a group of patients affected by a recessive LGMD associated with prominent and asymmetrical quadriceps femoris atrophy linked to 11p13-p12.

4.7 Patients and methods

4.7.1 Clinical assessment

Familial cases were recruited at the Notre-Dame and Hôtel-Dieu hospitals of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM). We identified 14 patients (nine males and five females) aged 27-68 years old and belonging to eight families. Neurological examination was performed by two neurologists experienced in neuromuscular disorders (M.F.R., B.B.). First-degree relatives were examined when possible, and genealogical and geographical data were collected by a research nurse (L.L.). Patients were included in our cohort if they presented with weakness of limb-girdle muscles and atrophy of the medial part of the quadriceps femoris. Serum creatine kinase levels were measured in all affected individuals and most of their first-degree relatives. Previous electromyogram (EMG) results were reviewed and histopathological data was gathered on muscle biopsies on 11 cases. Patients signed an informed consent approved by the CHUM's ethics committee.

4.7.2 Magnetic resonance imaging

Muscle MRI was performed on a 1.5-tesla Siemens Avanto system (Pennsylvania, USA). Axial and coronal planes of the thighs and upper arms were obtained, positioned to include part of the pelvic and shoulder girdles, respectively, using conventional T1-weighted spin echo (repetition time TR of 500 msec, echo time TE of 13 msec, with slight variations) and short tau inversion recovery (STIR) sequences. Fat-saturated T1-weighted images post-intravenous gadolinium injection were obtained for some patients only. The slices were 10 mm thick for the lower extremities and 6 to 10 mm thick for the upper extremities, with an interslice gap of 6 to 10 mm. The T1-weighted images were evaluated with regard to degree of muscle atrophy (volume loss) and intramuscular fatty infiltration.

4.7.3 Fluorescent and electron microscopy

A muscle biopsy on case IX-15's quadriceps femoris was obtained for diagnostic purposes in 1999. He signed an informed consent to allow us to review the sample in the context of this project. The biopsied muscle was frozen in liquid nitrogen after removal and stored at -70°C until use. Routine histological and histochemical procedures were done, with staining for H&E, HPS, Gomori trichrome, PAS, ATPase 9.5, ATPase 4.6, ATPase 4.3, NADH, glycerol phosphate dehydrogenase, and acidic phosphatases. Isoforms 1, 2 and 3 of dystrophin, γ -sarcoglycan (Novocastra, Newcastle-upon-Tyne, UK) were processed according to the indirect immunoperoxidase technique of Sternberger (Sternberger, 1969). DAB was used as a chromogen. Case IX-15's muscle biopsy was processed according to usually prescribed techniques, which involved inserting a portion of the specimen on a pair of forceps for gluteraldehyde fixation. After fixation in 3% gluteraldehyde in cacodylate buffer, specimens were stained with saturated uranyl acetate and embedded in Epon. Numerous semi-thin sections stained by paraphenylene diamine were screened by the Nomarski method (Schindl and Rueker, 1973). Representative thin sections were examined with a Phillips EM 208 S electron microscope (Fei Electron Optics BV, Eindhoven, Netherlands). No other biopsy was examined in the context of this study, only available reports were reviewed.

4.7.4 Genome-wide scan and fine mapping

Genomic DNA was extracted from blood samples according to previously-described methods (Zelinski, 1991). A genome-wide scan was performed on six affected cases (VIII-3, VIII-4, VIII-6, IX-10, IX-11, and IX-15) and four unaffected relatives (VIII-1, VIII-5, IX-12, and IX-14) at deCODE genetics (Reykjavik, Iceland). Genotypes were generated for 500 polymorphic microsatellite markers separated by an average of 8 cM. The main region of interest was fine mapped using known microsatellite markers and markers designed based on the genomic sequence of the region (<http://genome.ucsc.edu>, May 2004 assembly). Three oligo pairs were designed using Primer3 (Rozen S, 2000), based on the genomic sequence (<http://genome.ucsc.edu>, May 2004 assembly): *EEJ11AC19* (forward primer: TTG CTT TCA TAT GGA TGC TGT; reverse primer: TTG CTG CAT

TCA CCA ATA GC), *FFJ11TA27* (forward primer: TCC ATG ACC TCT GGG AAG G; reverse primer: CAC CAG CTG GAC CTG TCT TA) and *GGJ11GA24* (forward primer: GCA AAA ACA TGC TGG TGG T; reverse primer: CAC ACA TCT AGG GCT GGT GA). Oligonucleotide primers were synthesised at Invitrogen (California, USA). Fragment analysis was performed on a LI-COR Gene Reader 4200 (Nebraska, USA).

4.7.5 Linkage analysis

Multipoint autosomal recessive parametric linkage was computed using GENEHUNTER v.2.1 (Kruglyak et al., 1996). Phenocopy number was set to zero. Six liability classes were defined based on the reported age of onset: 0-19 years (18%), 20-29 (29%), 30-39 (65%), 40-49 (82%), 50-59 (94%) and 60 and over (100%). Allele frequencies were considered equal for most markers. Allele frequencies provided by deCODE genetics and based on genotypes of 186 chromosomes from French-Canadian individuals not participating in this study were used for the markers of the genome scan. One cM was assumed to be equivalent to 1 Mb. Two-point linkage analysis of X-chromosome markers was computed using MLINK of LINKAGE (Lathrop et al., 1984), (Lathrop and Lalouel, 1984), and (Lathrop et al., 1986). The haplotypes were reconstructed using the MAXPROB method of GENEHUNTER.

4.7.6 Sequencing of candidate genes (TRAF6 and LOC119710)

The entire coding and 30-bp flanking intronic sequences were amplified for mutation analysis. Primers flanking exons to be sequenced were designed using Primer3 (Rozen S, 2000). The last exon of TRAF6 was divided into three overlapping fragments due to its size. The PCR products and primer pairs were sent to the McGill University and Génome Québec Innovation Centre for forward and reverse sequencing. Sequences were aligned using SeqMan 4.03 (DNASStar, Wisconsin, USA) and analysed using Chromas 1.62 (Technelysium Pty Ltd, Australia).

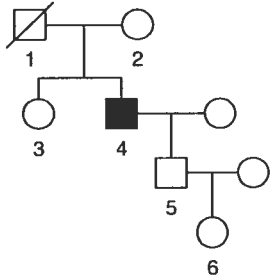
4.8 Results

4.8.1 Clinical phenotype

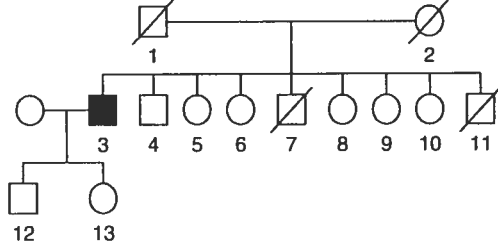
Fourteen patients aged between 27 and 68 and belonging to eight families were examined (Figure 11, page 72). All eight families are of French-Canadian descent. The percentage of affected cases in these families is compatible with a recessive mode of inheritance (36%, 14 cases/39 siblings, nine males/five females), though we observed a larger number of expected cases in our two largest families (three out of four in family VIII and five out of eight in family IX). In all families, there is no history of a similar condition in parents. All cases show a limb-girdle type of muscular dystrophy with prominent biceps brachii and quadriceps femoris atrophy (Figure 12A and F, page 73). The latter is particularly prominent at the level of the medial distal thigh (Figure 12F, page 73). There is a wide range of age of onset (mean 32.7 years, 11 to 50). Case IX-9 even claimed to be asymptomatic at the age of 68 despite observed weakness on examination and elevated CK of 1649 U/l (Table V, page 74). Contractures are seen in only one patient (7.1%), case V-7, who has been wheelchair bound for the past four years: they were present at the level of the elbows, wrists, fingers, hamstrings, and ankles. Muscular pain, however, is reported in the majority of our patients (85.7%), with seven patients complaining of myalgia following exercise (50.0%). Mild calf hypertrophy (IV-3, VI-5, VII-3) and facial weakness (IV-3, VII-3) are rarer findings. Scoliosis was not observed in any of our patients. Only VII-3, aged 58, has a known cardiomyopathy with a left ventricular ejection fraction of 20%, which is probably related to his coronary heart disease. Four patients out of 14 (28.6%) are wheelchair bound. The mean age of wheelchair use is 44.3 years, on average 12 years after diagnosis. In our two largest families, males are clearly more affected than their sisters (Table V, page 74). Furthermore, the four brothers of family IX demonstrate a very variable degree of involvement. The variability of the phenotype extends to the level of the individuals, with clear asymmetrical involvement of the same muscles.

Laboratory findings reveal mildly to moderately elevated serum creatine kinase (CK) levels in 10 (71.4%) of our patients (mean: 1290, 254 to 6000 U/l, with a normal range of 37-217) (Table V, page 74). Four patients (28.6%) have normal serum CK: these are V-7, VII-3, VIII-3, and VIII-4. Previous electromyogram (EMG) reports were available on 8 patients. These showed normal motor and sensitive nerve conductions but documented

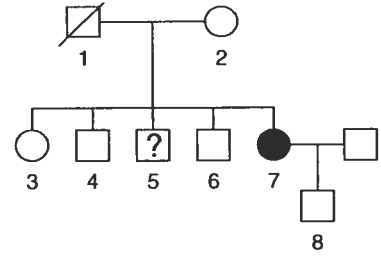
Figure 11: Pedigrees of the LGMD2L families.



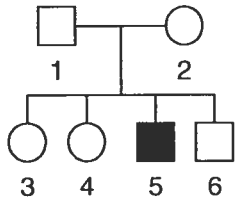
II



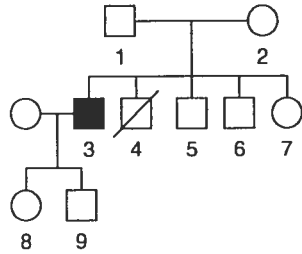
IV



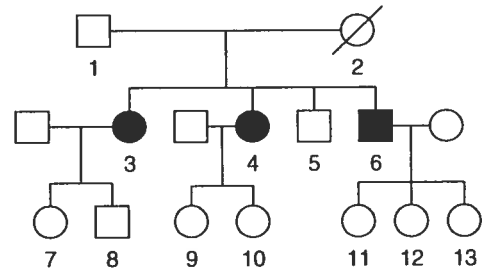
V



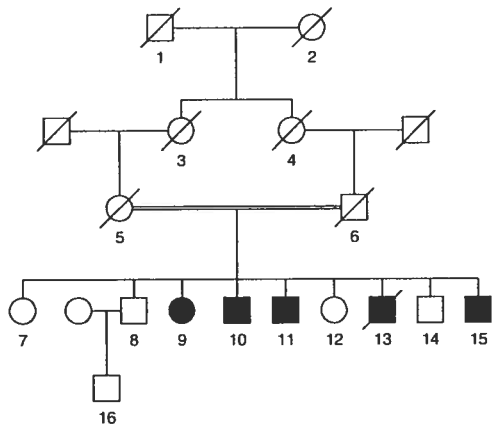
VI



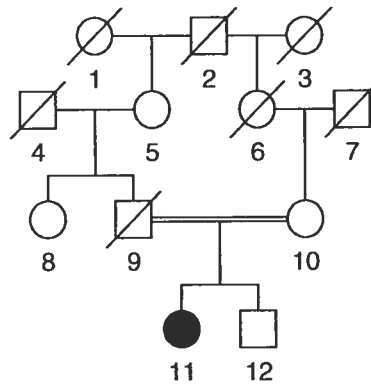
VII



VIII



IX



XI

Figure 12: Atrophy of the arm and thigh muscles as clinically assessed on patients IX-11 and IX-15 and for four patients on MRI. **(A)** Atrophy of the biceps in patient IX-11. **(B)** Asymptomatic patient IX-9 shows no clear atrophy of arm muscles. **(C)** Moderately affected patient IX-15 shows mild atrophy and fatty replacement for the long head of the right biceps brachii and moderate atrophy and fatty replacement for the long head of the left biceps brachii. **(D)** Severely affected patient VIII-6 reveals a marked atrophy of the biceps brachii and brachio-radialis with a minimal atrophy of the triceps. **(E)** Moderately affected patient IX-11 showed mild atrophy and fatty replacement in the long head of the left biceps and moderate atrophy and fatty replacement in the long head of the right biceps. **(F)** Atrophy of the medial part of the quadriceps in patient IX-15. **(G)** Asymptomatic patient IX-9 shows no clear involvement of the quadriceps but a mild to moderate asymmetrical atrophy and fatty replacement of the hamstring muscles (biceps femoris and semitendinosus) and the adductor magnus. **(H)** Moderately affected patient IX-15 shows a severe atrophy and fatty replacement for the adductor magnus bilaterally, the right vastus medialis and the short head of the left biceps femoris and a moderate atrophy of the tensor fasciae latae bilaterally. **(I)** Moderately affected patient IX-11 displays a severe atrophy of the adductor magnus, the hamstrings, the tensor fasciae latae, the gracilis, and the glutei minimus and medius bilaterally, with a moderate atrophy of the vasti lateralis, intermedius, and medialis on the right and mild wasting of the right adductor longus. **(J)** Severely affected patient VIII-6 reveals a moderate to severe atrophy of the vasti intermedius, medialis, and lateralis, the semimembranosus, the left adductor magnus, and the gluteus minimus, associated with a milder atrophy of the gluteus maximus, the gluteus medius, the rectus femoris, the tensor fasciae latae, and the remainder of the hamstrings group.

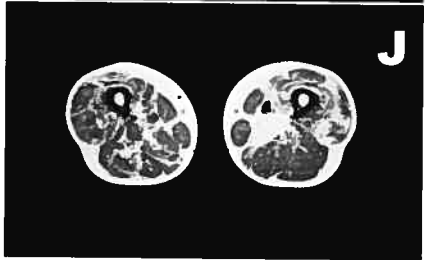
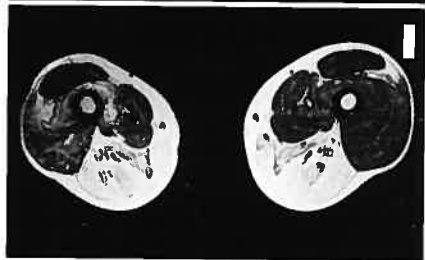
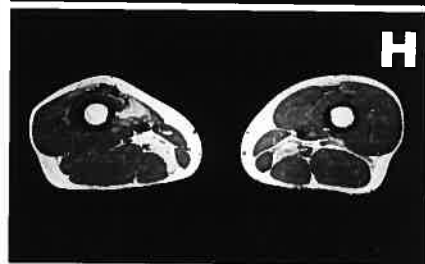
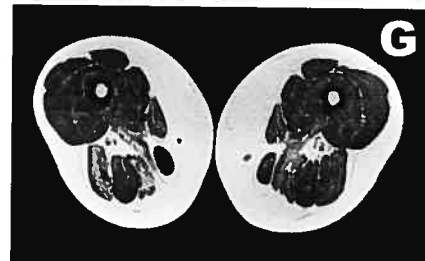
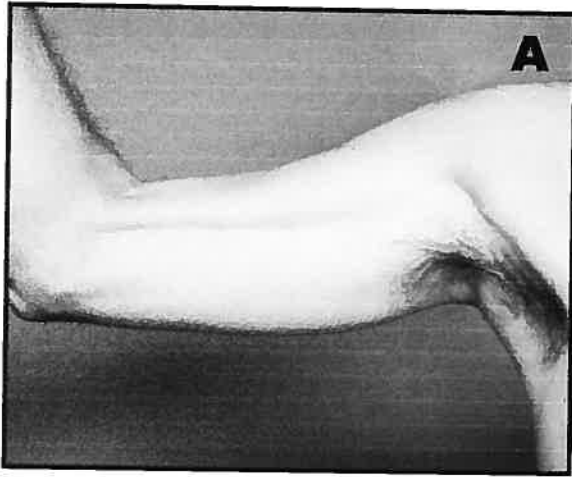


Table V: Clinical data on the LGMD2L cohort

Fam-ID	Sex	Age in 2005	Age of onset	Contractures	Quadriceps atrophy	Myalgia	Call hypertrophy	Facial weakness	Scoliosis	Cardiomyopathy	Wheechair onset	CK	EMG	Muscle biopsy
II-4	M	59	42	no	yes	no	no	no	no	no	no	500-2500	myopathy	myopathy
IV-3	M	64	40	no	yes	articular	yes	mild	no	no	58	751	myopathy	neurogenic muscular atrophy
V-7	F	44	32	elbow, wrist, finger, hamstring, ankle	yes	post-exercise	no	no	no	no	39	48	myopathy w/ spontaneous activity	neurogenic muscular atrophy
VI-5	M	34	21	no	yes	post-exercise	yes	no	no	no	no	1851	myopathy	dystrophy
VII-3	M	58	16	no	yes	articular	yes	moderate	no	yes, LVEF 20%	46	202	n/a	dystrophy
VIII-3	F	48	44	no	yes	lumbar pain	no	no	no	no	no	99	n/a	n/a
VIII-4	F	46	33	no	yes	lumbar and leg pain	no	no	no	no	no	69	n/a	n/a
VIII-6	M	37	30	no	yes	lumbar pain	no	no	no	no	no	254	myopathy	myopathy with rimmed vacuoles
IX-9	F	68	n/a	no	yes	no	no	no	no	no	no	1649	n/a	n/a
IX-10	M	67	50	no	yes	with exercise	no	no	no	no	no	1000-3000	myopathy	dystrophy
IX-11	M	65	37	no	yes	with exercise	no	no	no	no	no	700-3000	myopathy	normal
IX-13	M	died at 54	30	no	yes	with exercise	no	no	no	no	34	3000	n/a	dystrophy
IX-15	M	47	39	no	yes	with exercise	no	no	no	no	no	3000-6000	myopathy	dystrophy
XI-11	F	27	11	no	yes	post-exercise	yes	no	no	no	no	258	n/a	dystrophy

LVEF: left ventricular ejection fraction

myopathic changes with small amplitude polyphasic potentials (Table V, page 74). Five patients (35.7%) also showed signs of possible neurogenic changes: increased insertional activity in one patient; mild spontaneous activity with positive waves and fibrillations in another patient; and important spontaneous activity with positive waves, fibrillation, and repetitive discharges and high amplitude motor unit potentials associated with reduced recruitment at maximal effort in patients IX-10, IX-11, and IX-15.

4.8.2 Magnetic resonance imaging (MRI)

Inspection of muscles revealed a more pronounced atrophy of the biceps brachii and the medial part of the quadriceps femoris (Figure 12A and F, page 73). Magnetic resonance imaging (MRI) was performed on four patients. Cases VIII-6, IX-11, and IX-15 were chosen because they are all moderately to severely affected and belong to two different families (VIII and IX): VIII-6, a 37-year-old, severely affected man; IX-11, a 65-year-old man with a somewhat milder phenotype; and IX-15, a 47-year-old man similarly affected. We chose to study case IX-9 as well, the asymptomatic 68-year-old sister of IX-11 and IX-15. She had elevated CKs (1649 U/l) documented since her forties and on examination had mild biceps brachii atrophy and weakness, as well as mild iliopsoas and quadriceps weakness.

In the upper extremities, case IX-9 showed no clear atrophy (Figure 12B, page 73). Her brother, IX-15, displayed normal brachio-radialis and triceps, but a mild atrophy and fatty replacement was noted for the long head of the right biceps brachii with a moderate atrophy and fatty replacement in the long head of the left biceps (Figure 12C, page 73). Patient IX-11 revealed similar findings, with a mild atrophy and fatty replacement in the long head of the left biceps and moderate atrophy and fatty replacement in the long head of the right biceps (Figure 12E, page 73). Individual VIII-6's images revealed a marked atrophy and fatty infiltration of the biceps brachii and brachio-radialis accompanied by a minimal atrophy of the triceps (Figure 12D, page 73). The right side was more affected than the left, which corresponded to the observed asymmetry on physical examination.

In the lower extremities, patient IX-9 displayed no clear involvement of the quadriceps, but an asymmetrical, mild to moderate atrophy and fatty replacement of the hamstring muscles (biceps femoris and semitendinosus) and of the adductor magnus were observed (Figure 12G, page 73). Case IX-15 presented with severe atrophy and fatty replacement of the adductor magnus bilaterally (slightly less severe on the left), of the right vastus medialis, and of the short head of the left biceps femoris (Figure 12H, page 73). Moderate atrophy was also noted for the tensor fasciae latae bilaterally. The adductors brevis and longus, ilio-psoas, gracilis, sartorius, and glutei were normal. His brother, patient IX-11, showed a severe atrophy of the adductor magnus, the hamstrings, the tensor fasciae latae, the gracilis, and the glutei minimus and medius bilaterally (Figure 12I, page 73). Moderate atrophy of the vastus lateralis, intermedius, and medialis on the right was also noted, with a mild wasting of the right adductor longus. Finally, case VIII-6 revealed a severe atrophy of the medial part of the thigh (Figure 12J, page 73) which corresponded to a moderate to severe atrophy of the vastus intermedius, the vastus medialis, the vastus lateralis, and the semimembranosus. Severe atrophy of the left adductor magnus and gluteus minimus bilaterally was present. Mild atrophy was found of the gluteus maximus and medius, rectus femoris, tensor fasciae latae, and remainder of the hamstrings group. No involvement of the piriformis, ilio-psoas, sartorius, and gracilis were documented.

Therefore, in the lower extremities, atrophy seems to predominate in the hamstring muscles, the adductor magnus, and the medial part (vasti medialis and intermedius) of the quadriceps femoris, while the biceps brachii seem to be affected in most cases in the upper extremities. The clear asymmetry documented clinically in all four patients in the upper and lower extremities was well correlated with the MRI findings.

4.8.3 Muscle histology

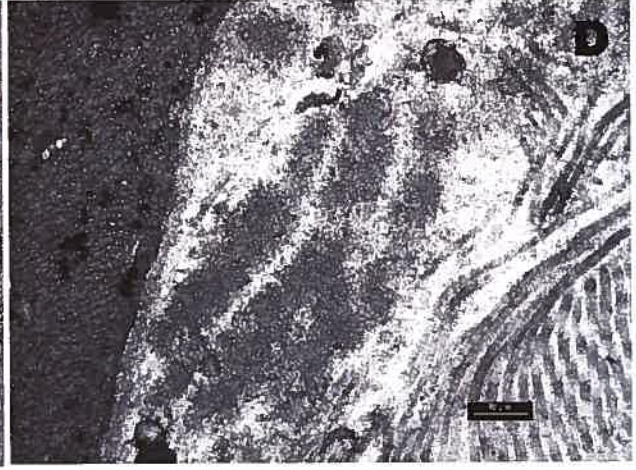
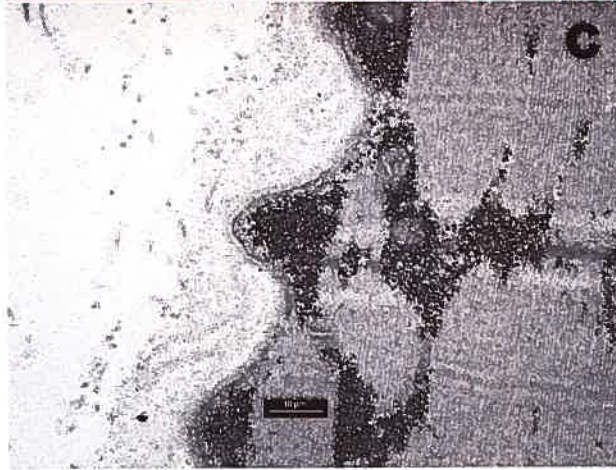
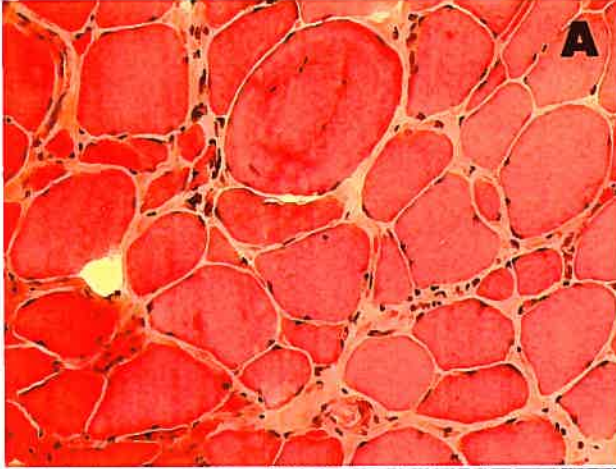
At this stage of our research, only case IX-15 has been thoroughly studied. However, previous muscle biopsy reports were available for 11 of our patients (78.6%) (Table V, page 74). Biopsies from nine of these individuals were described by different pathologists as displaying dystrophic changes with variation in fibre sizes, degeneration

and regeneration of muscle fibres, internal nuclei, and notable increase in endomysial connective tissue and fibre splitting. In patients IV-3 and V-7, neurogenic changes were seen with group atrophy and angular fibres. Mild focal inflammation was reported only in the muscle of the more severely affected case, VIII-6. Available muscle on patient IX-15 was reviewed by an experienced neuropathologist (Y.R.). Deficiencies in dystrophin, dysferlin, and sarcoglycans were excluded by immunohistochemistry and Western blots (data not shown). Electron micrographs on IX-15's biopsy revealed focal duplication of the muscle basement membrane (Figure 13A, page 78). Endomysial extracellular matrix is increased and disorganised, as several collagen protofibrils can be seen spread out in a starburst pattern haphazardly in the endomysium without internal spacing and intermingling with the obscured basement membrane (Figure 13B and C, page 78). Strands of dense flocculent material can also be seen next to the basement membrane, further showing a disorganisation of the extracellular environment close to the muscle fibre (Figure 13D, page 78). Despite documentation of several angular atrophic fibres, sometimes grouped, no definite fibre type grouping atrophy was found on ATPases. Although suggestive of neurogenic atrophy, histoenzymology was inconsistent with chronic denervation. The few groups of either type I or type II fibres were microscopic and more akin to a myopathic type of microfascicular grouping.

4.8.4 Mapping of the LGMD2L locus

Genealogical data on family IX indicated the parents of the affected individuals were first-degree cousins, thereby limiting the chances of two or more mutations within the family and increasing the odds of strong homozygosity at the disease locus (Figure 11, page 72). Individuals IX-10, IX-11, and IX-15 were thus selected for a genome-wide scan along with an unaffected brother (IX-14) and sister (IX-12). Family VIII was comprised of three affected siblings and one unaffected brother. All four siblings, as well as their father, were sampled and selected for the genome scan. A medium-density genome-wide scan was thus performed at deCODE genetics (Reykjavik, Iceland) using 500 polymorphic microsatellite markers. Genotypes were analysed using GENEHUNTER's MAXPROB multipoint linkage method (Kruglyak et al., 1996). The highest LOD score (2.78) was obtained for marker *D11S1360* located on chromosome

Figure 13: (A) HPS stain, x 200. Small groups of atrophic fibres admixed with hypertrophic fibres. (B) EM micro-photograph, x 7,100. Starburst-like organization of collagen protofilaments in perimysium. (C) EM micro-photograph, x 18,000. Reduplicated basement membrane associated with multifocal loss of sarcolemmal membrane. (D) EM micro-photograph, x 18,000. Strands of dense flocculent material adjacent to thickened basement membrane on left-hand side, and long spacing collagen, lower right. On micro-photographs B, C, and D, the bar indicates 10 microns.



11p12. Only one other peak was obtained above a 2.0 threshold, with a LOD score of 2.16 on chromosome 4. Two-point linkage analysis on MLINK did not uncover any linkage to X-linked markers (data not shown). Multipoint LOD scores were positive for a 17-cM region on 11p12, centred on and peaking at *D11S1360*. To confirm linkage of our families to the 11p12 locus, we tested the entire cohort against all three consecutive markers from the genome scan (*D11S1776*, *D11S1360*, *D11S4191*). A maximum multipoint LOD score of 3.81 for *D11S1360* was obtained on GENEHUNTER for six of the eight families. The remaining two families, VII and XI, showed negative LOD scores for the first set of tested markers.

Fine mapping of the 17-cM region was conducted by saturating it with all known informative microsatellite markers as well as a set of three markers designed based on genomic repeat sequences found in the region (<http://genome.ucsc.edu>, May 2004 assembly). Recruited individuals for all eight families were genotyped and linkage analysis was computed by GENEHUNTER. A maximum cumulative LOD score of 4.56 was obtained for markers *D11S935-GGJ11GA24* for all eight families, defining a less-than-3.3-cM (1.4 Mb) region (Figure 14, page 80). Since *GGJ11GA24* is not on the deCODE genetic map, the size of the interval in cM was estimated with the next deCODE marker, *D11S4966*. Haplotype analysis demonstrated that up to 81.3% of carrier chromosomes share a two-marker haplotype (Figure 15, page 81). Ten out of 16 carrier chromosomes (62.5%) share a three-marker haplotype. One of the chromosomes shared by the affected individuals of family IX, IXb, might be linked to the common haplotype if allele 2 of marker *D11S4185* is identical by descent. Family IX is linked to the locus with a LOD score of 1.72. Two chromosomes (12.5%), IV-3b and VI-5b, appear to share a second, distinct three-marker haplotype. Chromosome VII-3b does not share alleles with the previous two haplotypes. The presence of shared haplotypes further supports our hypothesis that a more common LGMD2L mutation is present in the French-Canadian population. Present haplotype data suggest that probably 2 to 3 mutations will be found in our cohort. Based on the hypothesis that two distinct recombination events have reshaped the IXb chromosome in the consanguineous IX

Figure 14: Multipoint LOD score distribution for the eight LGMD2L families at the 11p13-p12 locus.

LOD

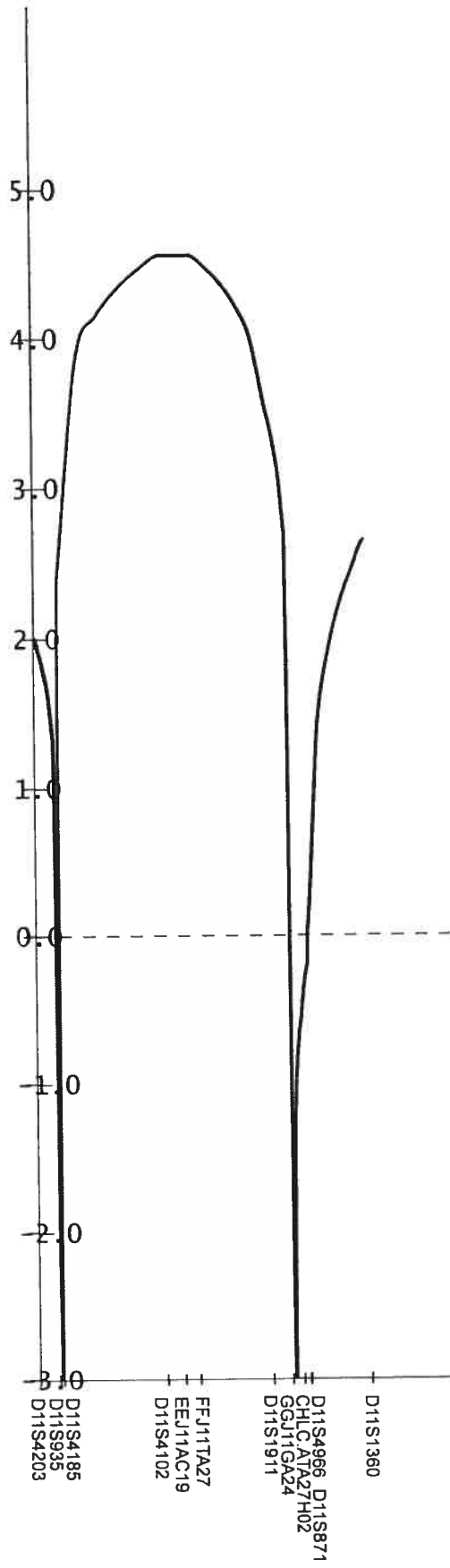


Figure 15: Haplotypes for the affected individuals of the LGMD2L cohort at the 11p13-p12 locus.

FAM-ID	D11S4203	D11S935	D11S4185	D11S4102	EEJ11AC19	FFJ11TA27	D11S1911	GGJ11GA24	CHLC-ATA27H02	D11S4966	D11S871	D11S1360
deCODE (cM)	52.63	52.94	52.95	54.35	n/a	n/a	55.77	n/a	n/a	56.27	56.27	57.09
Marshfield (cM)	45.94	45.94	45.94	47.61	n/a	n/a	50.88	n/a	n/a	48.73	n/a	50.88
Mb	35.77	35.98	36.01	36.73	36.93	37.04	37.17	37.37	37.45	38.24	39.14	40.19
II-4a	6	4	2	4	2	2	3	4	2	3	4	5
II-4b	6	6	2	4	6	10	6	4	3	3	5	5
IV-3a	3	2	2	4	5	10	6	4	3	3	5	4
IV-3b	7	6	1	4	2	8	5	4	3	2	6	5
V-7a	5	2	2	9	2	6	5	4	3	3	3	5
V-7b	7	2	2	3	3	6	3	4	2	3	6	5
VI-5a	4	2	2	4	5	4	5	4	3	2	5	4
VI-5b	7	5	1	4	2	6	3	4	3	2	6	4
VII-3a	6	1	1	9	3	6	6	0	2	0	5	5
VII-3b	7	2	2	3	4	3	2	0	2	0	5	5
VIIIa	7	5	2	4	6	1	6	5	2	3	3	4
VIIIb	7	2	2	4	6	11	3	4	3	1	3	7
IXa	4	2	2	4	4	8	6	7	3	2	5	3
IXb	7	5	2	1	6	10	5	4	3	3	3	5
XI-11a	0	2	2	4	6	7	3	8	1	0	0	4
XI-11b	7	2	2	6	1	8	5	0	3	0	0	5

family (Figure 15, page 81), this would make *D11S4185* the telomeric flanking marker and *D11S4102*, the centromeric flanking marker for a 1.4 cM (725 kb) interval.

4.8.5 Sequencing of the TRAF6 and LOC119710 genes

Eight known genes lie in the less-than-3.3-cM candidate interval. We chose to sequence two that we felt were the most promising candidate genes for LGMD2L: TRAF6 and LOC119710. TRAF6, which lies in the middle of our interval, is mainly involved in the immune system as an adapter protein for dendritic cell maturation and cytokine production (Kobayashi et al., 2004). It also mediates activation of NF κ B and JNK, both major players in apoptosis (Bharti et al., 2004). Most studies have investigated TRAF6's immunological function in the IL-1 receptor/Toll-like receptor pathway. However, TRAF6, as a tumour necrosis factor (TNF) associated factor, could also be linked to the development of skeletal muscles, since it has been reported that TNF α inhibits myogenic differentiation through the NF κ B-dependent destabilisation of the MyoD protein activity, which interferes with skeletal muscle regeneration and may contribute to muscle wasting (Langen et al., 2004). Moreover, TRAF6 is part of the neurotrophin pathway through its interaction with the p75 neurotrophin receptor (Roux and Barker, 2002). The receptor activates NF κ B, Akt, and JNK pathways, and TRAF6 has been shown to promote cell survival in this context. The adapter protein, RIP2, which binds the p75 neurotrophin receptor, provides a bifunctional switch for the survival and death of Schwann cells (Khursigara et al., 2001). Hence, mutations in TRAF6 could have a potential impact on the p75 neurotrophin receptor and its associated factors: an imbalance in the RIP2 switch could have explained the neurogenic component observed on the electromyograms. For these reasons, we chose to first sequence this gene. All six exons and exon/intron boundaries were sequenced, as well as the two putative exons contained in the 5' untranslated region. No mutations were detected, but known SNPs were observed. LOC119710 was also sequenced. Little is known about this predicted gene and the protein it encodes. However, GeneNote expression arrays suggest a high expression of the mRNA in both skeletal and cardiac muscles (Yanai et al., 2005). No mutations were detected in the five coding exons and the exon/intron boundaries. At this point, we cannot exclude putative mutations in the regulatory

elements or promoters of these two genes, large deletions, or post-translational modifications.

4.9 Discussion

This study is the first to report a new chromosomal locus linked to a form of variable limb-girdle muscular dystrophy associated with marked, asymmetrical atrophy of the biceps brachii and quadriceps femoris and myalgia. The disease phenotype seems to be characterised by important variability among and between families. CK levels remain largely uninformative, as 28.6% of our cohort exhibited CK values within the normal range (Table V, page 74). Some of the EMG findings, particularly in the more severe cases, raise the possibility of a neurogenic component to the disease. The combination of myopathic and neurogenic findings was also previously described in cases of “quadriceps myopathy” (Boddie and Stewart-Wynne, 1974). MRI is clearly a very sensitive means to confirm muscle involvement in the milder cases, and it confirms the clinical observations of asymmetrical atrophy and weakness. Inflammatory changes are not a feature of this disease and may only correlate with severity. Case VIII-6, which demonstrates some inflammatory change on biopsy, is clinically and pathologically one of the most affected of our cohort. This LGMD links to a less-than-3.3-cM (1.4 Mb) region on 11p13-p12.

We propose to name this new disease LGMD2L, in keeping with the current nomenclature (Bushby and Beckmann, 1995). Its extreme variability of involvement among and between families may have limited its clear identification in the past. The age of onset is one such variable: two patients presented with symptoms before the age of 20, two between 21 and 30, six between 31 and 40, three between 41 and 50, and one remains asymptomatic in her late sixties despite abnormal clinical and MRI evaluations (Figure 12B and 2G, page 73) and elevated CK values for more than two decades (case IX-9, Table V, page 74). Intrafamilial variability is demonstrated in both families VIII and IX. Patient VIII-6 displays a more severe atrophy than his affected sisters, VIII-3 and VIII-4: symptoms began at an earlier age and his CKs are notably higher than his sisters', whose CK values were found to be normal (Table V, page 74).

In family IX, this range in severity of affection is even more pronounced. Patient IX-13 was wheelchair bound by the age of 34, while his brothers IX-10 and IX-11 are still able to walk into their late sixties. Their sister, IX-9, the elder of the affected siblings, is still asymptomatic, displays elevated CK levels, and has a very mild muscular atrophy. This variability also extends to single individuals, as a clear asymmetry of the muscular wasting was noted. Interfamilial and intrafamilial variability in phenotype, as well as an asymmetrical muscular atrophy, seem to be a hallmark of this form of LGMD. By combining clinical and MRI findings, we suggest that the following muscles are the first affected in this LGMD: the long head of the biceps brachii, the hamstring muscles (in particular the semimembranosus), and the adductor magnus. As the disease progresses, atrophy and weakness extend to the vastus medialis and the tensor fasciae latae. The early involvement of the hamstring muscles and adductor magnus in our cohort seems to be also found in a number of AR-LGMDs, most notably LGMD2A and LGMD2I for which MRI studies revealed a severe atrophy of these muscles (Fischer et al., 2005). However, these LGMD2A and LGMD2I cases showed a symmetrical atrophy, while our patients demonstrate a clear asymmetry in muscle wasting. We believe this asymmetry could help in the clinical diagnosis until the mutated gene is uncovered. Though it is possible that the important variability has limited the diagnosis of cases affected with LGMD2L in the past, it is likely that some of the cases of “quadriceps myopathy”, which were indeed later shown to have progressed into a limb-girdle type of muscular dystrophy, were affected by this disease (Walton, 1956) (Boddie and Stewart-Wynne, 1974).

No tubular filamentous inclusions or signs of inflammation were reported in our participants (with the exception of one demonstrating focal inflammation), thereby excluding the diagnosis of inclusion body myositis (IBM). Clinically, LGMD2L patients did not demonstrate finger flexor weakness or atrophy. While the hallmark of the hereditary form of IBM is a characteristic sparing of the quadriceps muscle, quadriceps myopathies have frequently been associated with the sporadic form of IBM. Inclusion body myositis is further characterised by diminished deep tendon reflexes, dysphagia, and atrophy of the proximal limb muscles (Burstein et al., 2005). The absence of

inflammation in muscle biopsies seems to rule out the possibility of a new form of hereditary IBM. An in-depth pathological review of the first and only muscle biopsy we had access to, patient IX-15's biopsy, uncovered a disorganisation of the basal lamina and extracellular matrix which may suggest that the mutated protein in LGMD2L is either an extracellular matrix or basal lamina protein or a protein important in ensuring the dynamic relationship between the muscle fibre and the extracellular matrix. Further pathological work should allow a better understanding of the pathophysiology of the disease.

Haplotype analysis helped refine the candidate region to a small interval and demonstrated that up to 81.3% of carrier chromosomes may share parts of an ancestral haplotype (Figure 15, page 81). Ten of the 16 carrier chromosomes (62.5%) seem to share the common haplotype on three consecutive markers or more, while two (12.5%) share a second haplotype. Possible historical recombinations between *D11S935* and *D11S4185* on chromosome IXb make *D11S4185* the telomeric flanking marker and between *D11S4185* and *D11S4102* make *D11S4102* the centromeric marker for a candidate interval of 1.4 cM (725 Kb). It is interesting to note that, despite the relatively young ancestry of the French-Canadian population (~400 years), homozygosity at the locus is rare and the conserved region is surprisingly small. This observation can, however, be explained in two ways. First, most of the cases in our cohort have a family history traceable to the Southwest of the Province of Quebec, a region which, unlike the better studied region of Saguenay-Lac-Saint-Jean (Scriver, 2001), displays more genetic heterogeneity and less of a more proximal consanguinity. Second, if the more major mutation is older than the French colonisation that began in 1608 and was introduced more than once in Quebec, this could also explain the relatively small shared ancestral haplotype.

No other LGMD families or, in fact, other neuromuscular hereditary diseases have been linked to this region of chromosome 11p13-p12. Eight genes appear to lie in the candidate region: LOC143458, FLJ45212, COMMD9, FLJ14213, TRAF6, RAG1, RAG2, and LOC119710. COMMD9 has homologues in the mouse and the rat, among other

animals, and its protein, COMM domain containing protein 9, codes for a 198-amino-acid protein. The GeneNote expression array data indicates the protein is highly expressed in skeletal muscles (<http://bioinfo.weizmann.ac.il>). A recent paper has shown that COMM-domain-containing proteins are regulators of NF κ B, thus potentially linking them to apoptosis and cachexia (Burstein et al., 2005). The RAG1 and RAG2 protein products are initiators of the V(D)J recombination pathway in immunoglobulins (Oettinger, 1992). Mutations in both RAG genes have been linked to either of the two forms of severe combined immunodeficiency syndromes (Tabori et al., 2004). Four predicted proteins of unknown function are also encoded in this interval: LOC143458, FLJ45212, FLJ14213, and LOC119710. The centromeric half of the interval (734 606 bp) contains no known gene. No genes have been predicted to lie within this region by most bioinformatic programs, with the exception of GenScan, the biostatistical algorithms of which predict four more genes on the centromeric side of LOC119710 in our interval (Burge and Karlin, 1997). While no mutations were found in the coding sequences of TRAF6 and LOC119710, further work will be required to exclude potential mutations in their regulatory and promoter regions.

The identification of the mutated gene responsible for this new recessive LGMD will require the sequencing of other genes in the candidate interval and the recruitment of other LGMD2L cases of different ethnic backgrounds. The variability of the phenotype and the asymmetry of the atrophy are reminiscent of some of the features of facioscapulohumeral muscular dystrophy type 1 (FSHMD1A, OMIM 158900). This raises the possibility that as in FSHMD1A a non-coding repeat mutation is responsible for LGMD2L (van der Maarel and Frants, 2005). In FSHMD1A the repeat is variably contracted in affected individuals, leading to an overexpression of genes upstream of the repeats. Although no LSau or hhspm3 repeats, known components of the FSHMD1A D4Z4 repeats, were found in the LGMD2L candidate interval, a similar type of mutation might explain the variability of the phenotype and asymmetry of muscle wasting. The identification of the mutations responsible for LGMD2L should provide further insight into the complex pathways leading to adult onset muscular dystrophies.

4.10 Acknowledgements

We would like to thank Marie-Pierre Dubé for her help in linkage analysis and Dr. Louise Charron. This work was supported by an MDA grant (MDA 4001). B.B. is a chercheur-boursier of the Fonds de recherche en santé du Québec (FRSQ).

5

Cartographie fine par SNPs

5.1 Un raffinement de l'intervalle par SNPs

Le locus génétique précédemment défini consiste en une région du chromosome 11p13-p12 allant de 35 979 740 à 37 372 000 paires de bases, soit 1,4 méga-base (Figure 16, page 89). La première moitié de l'intervalle comprend huit gènes (LOC143458, FLJ45212, COMMD9, FLJ14213, TRAF6, RAG1, RAG2 et LOC119710), alors que la deuxième moitié ne contient aucun gène connu. Le programme GenScan prédit des exons dans cette région basé sur la reconnaissance de certains motifs conservés aidant à définir les exons et certains de ces exons sont associés à des ESTs, mais aucun gène n'a vraiment été prédit dans cette région jusqu'à maintenant. Ce vide génétique est bien plus grand que l'intervalle candidat ne pourrait laisser penser: il occupe une région de 3,5 Mb (allant de la position 36,572 à 40,088 Mb sur le chromosome 11). La portion de ce vide chevauchant l'intervalle candidat ne représente que 17% de ces 3,5 Mb (Figure 17, page 90).

Afin d'éviter le séquençage systématique de tous les gènes de l'intervalle candidat, un génotypage de sept SNPs (*single-nucleotide polymorphisms*) a été fait. Les SNPs ont été choisis à des intervalles réguliers afin d'obtenir une couverture complète de la région; de plus, les SNPs aux fréquences alléliques frisant le 50% ont été privilégiés dans le but de maximiser le potentiel informatif du polymorphisme. Le nom et la position des SNPs dans l'intervalle sont représentés dans la figure 18 (page 91).

Un total de quatre individus atteints ont été testés pour ces SNPs afin d'en confirmer l'informativité. Ces individus ont été choisis en fonction des haplotypes connus, afin que chaque haplotype y soit représenté au moins deux fois (à l'exception d'un des deux chromosomes de XI-11 que l'individu semblait être la seule à porter). Certains individus de la cohorte ont été retestés pour quelques marqueurs microsatellites entre le

Figure 16: Intervalle candidat pour la cohorte LGMD2L tel que vu sur le UCSC *Genome Browser*

UCSC Genome Browser on Human May 2004 Assembly

move <<< << < > >> >>> zoom in 1.5x 3x 10x base zoom out 1.5x 3x 10x

position/search chr11:35,979,740-37,372,000 jump clear size 1,392,261 bp. configure

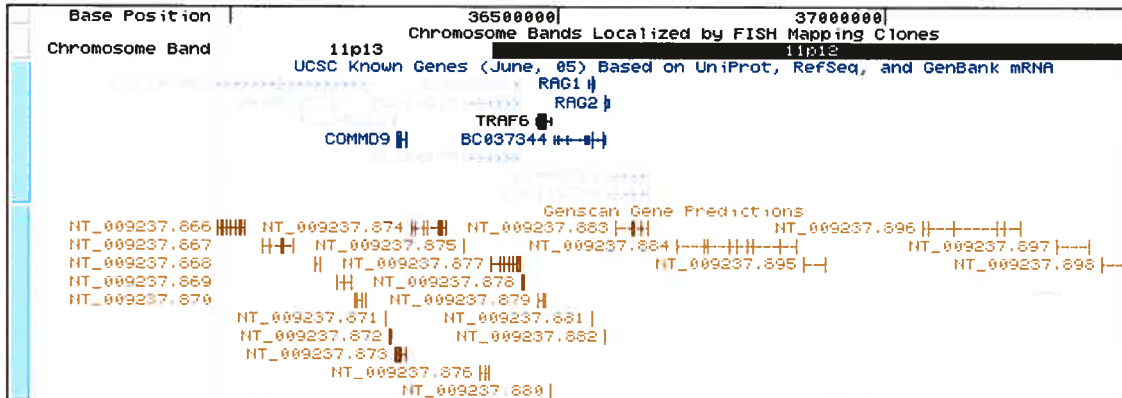
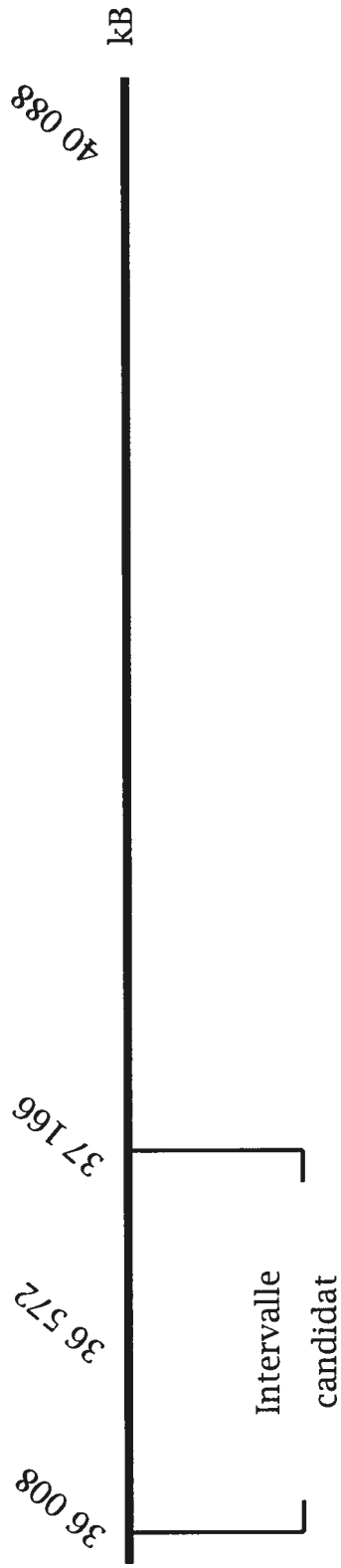


Figure 17: Position de l'intervalle candidat par rapport à la région du chromosome 11 ne contenant aucun gène connu



..... Aucun gène connu
 (3,5 Mb)

Figure 18: Position des SNPs testés dans l'intervalle candidat 11p13-p12



séquençage des SNPs et la soumission de l'article étant donné qu'aucune bande n'était visible sur gel. Lors de la préparation au séquençage des SNPs, trois haplotypes semblaient être présents à même notre cohorte. Ainsi, les ADN de V-7, VII-3, VIII-4 et XI-11 ont été amplifiés dans la région des SNPs et les amplicons ont été séquencés.

Les résultats de ce génotypage initial sont disponibles dans le tableau VI (page 93). Du côté du télomère, l'intervalle candidat semble brisé par le premier SNP, rs1138807: en effet, les individus V-7 et VII-3 qui doivent, en théorie, partager un haplotype (1;2) sont homozygotes pour les allèles (C;C) et (T;T), respectivement. Du côté du centromère, les haplotypes se brisent au sixième SNP, soit le rs1849343: non seulement VIII-4 devrait être homozygote, mais V-7 et VII-3 devraient partager l'haplotype (1;2), ce qui n'est pas le cas. Le septième SNP, rs7942065, vient confirmer cette cassure: V-7 a les allèles (A;A), alors que VII-3 a les allèles (G;G).

Tous les individus atteints ont, par la suite, été typés pour ces sept SNPs afin de raffiner les haplotypes basés sur les données alléliques des marqueurs microsatellites. Les haplotypes redessinés, comprenant maintenant les données SNPs, sont disponibles en figure 19 (page 94). Il est intéressant de remarquer que les haplotypes sont conservés entre les marqueurs *D11S4185* et *D11S4102*, la région intermarqueur pour laquelle le LOD score maximal était atteint. Une franche homozygotie est maintenant apparente pour cet intervalle dans la majorité des familles.

Le code de couleurs nous informe que l'haplotype que seul l'individu XI-11 semblait posséder s'est révélé être possiblement un des deux chromosomes les plus communs. De plus, les deux familles pour lesquelles le LOD score est toujours négatif (c'est-à-dire les familles I et X) ont des haplotypes qui n'adhèrent aux haplotypes connus que sur une très petite région constituée presque exclusivement de SNPs, laissant croire qu'il ne s'agit peut-être que d'une coïncidence et que ces familles ne sont véritablement pas

Tableau VI: Données alléliques suivant le séquençage des sept SNPs pour les quatre individus sélectionnés

	VIII-4	VII-3	V-7	XI-11
Haplotype attendu	(1;1)	(1;2)	(1;2)	(1;5)
rs1138807	C C	T T	C C	C T
rs11539717	G G	G G	G G	G G
rs331439	G G	G G	G G	0 0
rs2227973	A A	A A	A A	A A
rs7117450	T T	T C	T C	T C
rs1849343	A G	A A	A G	A G
rs7942065	G G	G G	A A	A A

Figure 19: Haplotypes pour les individus atteints après le séquençage des SNPs dans l'intervalle candidat 11p13-p12

ATTENTS NON LIÉS

PHASÉS

FAM-ID	SEXE	STATUT	52.83	52.94	52.95	51138807	511539717	53031439	52227973	D154102	5717450	EJ11AC19	51849343	FF411TA27	57942066	D151911	GG111GA24	CHLCAT27H02	D154966	D15871	D151366
		17/15/10/10/12/1	45.94	45.91	45.94	n/a	n/a	n/a	n/a	54.95	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	55.77	n/a	n/a	56.27	56.27	57.09
			35.77	35.88	36.01	36.06	36.25	36.44	36.55	36.73	36.8	36.93	37.03	37.04	37.09	37.17	37.37	37.45	38.24	39.14	40.19
II-4	1	2	6	4	2	C	G	G	A	4	C	2	A	2	A	3	4	2	3	4	5
II-4	1	2	6	6	2	T	G	G	A	1	T	2	A	10	A	6	4	3	3	5	5
IV-3	1	2	3	2	1	T	G	G	A	4	C	5	G	10	A	6	4	3	2	5	4
IV-3	1	2	7	6	1	T	G	G	A	4	T	2	G	8	A	5	4	3	2	5	5
V-7	2	2	5	2	2	C	G	G	A	9	T	2	A	6	A	5	4	3	3	3	5
V-7	2	2	7	2	2	C	G	G	A	3	C	3	G	6	A	3	4	2	3	6	5
V-5	1	0	5	2	2	C	G	G	A	9	T	2	A	6	A	5	4	2	3	3	5
V-5	1	0	7	2	2	C	G	G	A	3	C	3	G	6	A	3	4	2	3	6	5
VI-5	1	2	4	2	2	T	G	G	A	4	C	5	A	4	A	5	4	3	2	5	4
VI-5	1	2	7	6	1	T	G	G	A	4	T	2	G	6	A	3	4	3	2	6	4
VII-3	1	2	6	1	1	T	G	G	A	9	T	3	A	5	G	6	0	2	0	5	5
VII-3	1	2	7	2	2	T	G	G	A	3	C	4	A	3	G	2	0	2	0	5	5
VIII-6	1	2	7	5	2	C	G	G	A	4	T	6	G	1	G	5	5	2	3	3	4
VIII-6	1	2	7	2	2	C	G	G	A	4	T	6	A	11	G	3	4	3	1	3	7
VIII-4	2	2	7	5	2	C	G	G	A	4	T	6	G	1	G	6	5	2	3	3	4
VIII-4	2	2	7	2	2	C	G	G	A	4	T	6	A	11	G	3	4	2	3	3	7
VIII-3	2	2	7	3	2	C	G	G	A	4	T	6	G	1	G	6	5	2	3	3	4
VIII-3	2	2	7	2	2	C	G	G	A	4	T	6	A	11	G	3	4	3	2	3	7
IX-10	1	2	4	2	2	T	G	G	A	4	T	4	A	8	A	6	7	3	2	5	3
IX-10	1	2	7	5	2	T	G	G	A	1	T	6	G	10	G	4	4	3	3	3	5
IX-11	1	2	4	2	2	T	G	G	A	4	T	4	A	8	A	6	7	3	2	5	3
IX-11	1	2	7	5	2	T	G	G	A	1	T	6	G	10	G	4	4	3	3	3	5
IX-15	1	2	4	2	2	T	G	G	A	4	T	4	A	8	A	6	7	3	2	5	3
IX-15	1	2	7	5	2	T	G	G	A	1	T	6	G	10	G	4	4	3	2	3	5
IX-9	2	2	4	2	2	T	G	G	A	1	T	6	G	10	G	4	4	3	2	3	5
IX-9	2	2	7	5	2	T	G	G	A	4	T	6	A	7	A	3	6	1	0	0	4
XI-11	2	2	0	2	2	C	G	0	A	4	T	6	A	6	A	5	0	3	0	0	5
XI-11	2	2	7	2	2	T	G	G	A	6	C	1	G	8	A	3	6	2	0	5	6
1-4	1	2	1	2	2	C	G	G	A	8	T	2	A	5	G	2	2	3	0	6	3
1-4	1	2	4	1	1	T	G	G	A	9	T	2	A	5	G	2	6	2	0	4	1
III-5	2	2	5	2	2	T	G	G	A	1	T	2	A	5	G	3	8	3	0	6	5
III-5	2	2	1	2	1	T	G	G	A	5	C	2	A	2	G	3	8	3	0	5	4
X-7	2	2	6	3	1	C	G	G	A	8	C	1	A	6	A	5	4	2	0	5	4
X-7	2	2	7	3	1	T	G	G	A	5	T	1	A	3	A	6	4	2	0	3	5

liées au locus ou que la mutation est très ancienne et a peut-être été introduite plus d'une fois au Québec.

En ce qui a trait aux familles positives, les haplotypes conservés sont relativement petits considérant la relative «jeunesse» de la population canadienne-française, laissant croire à une mutation ancestrale très ancienne même dans l'ensemble de notre cohorte partageant un haplotype.

Afin de délimiter un intervalle conservateur, des recombinants observables sont requis de part et d'autre du locus. Les deux seuls recombinants observés pour notre cohorte sont III-6 (recombinant télomérique et centromérique) et VIII-3 (recombinant centromérique) (Figure 20, page 96). Ces recombinaisons ont, cependant, été assignées de façon arbitraire par le programme MAXPROB du lot GENEHUNTER: en effet, comme les individus non-atteints de ces deux familles n'ont pas été typés dans la région des SNPs, il est impossible d'identifier *a priori* le locus exact de chacune des recombinaisons.

La définition télomérique de l'intervalle candidat par voie du recombinant III-6 pourrait être supplantée par les données du SNP rs1138807. En effet, bien que l'auteur ait choisi d'identifier un haplotype jaune et un vert sur la figure, on peut remarquer que ceux-ci ne diffèrent que pour un marqueur, soit le SNP rs1138807. Les porteurs de l'haplotype jaune ont l'allèle C, alors que les porteurs de l'haplotype vert ont l'allèle T. La question demeure: est-ce que ces deux haplotypes ne seraient, en fait, qu'un seul, le marqueur rs1138807 délimitant la frontière télomérique de celui-ci? Une plus grande couverture de SNPs pourrait résoudre cette question.

5.2 En quête de recombinants observables

Face à l'incertitude de la localisation précise des recombinaisons-clés chez les familles III et VIII, les frères et sœurs non-atteints ont été séquencés pour les sept SNPs de la région afin de comparer leurs haplotypes à ceux de III-6 et de VIII-3 et de mieux cerner les bornes de l'haplotype conservé.

Figure 20: Recombinants observés chez les individus III-6 et VIII-3 après le séquençage des SNPs pour les individus atteints de la cohorte

III-6

VIII-3

D11S4203
D11S935
D11S4185
rs1138807
rs11539717
rs331439
rs2227973
D11S4102
rs7117450
EEJ11AC19
rs1849343
FFJ11TA27
rs7942065
D11S1911
GGJ11GA24
CHLC.ATA27H02
D11S4966
D11S871
D11S1360

1 5
x 2
1 2
T T
G G
C G
x A A
5 4
C T
8 2
G A
2 5
x G G
x 3 2
8 6
3 2
0 0
6 4
5 1

7 7
2 3
2 2
C C
G G^x
G G^x
A A
4 4
T T
6 6
A G
11 1
G G
3 6
4 5
3 2
1 3
3 3
7 4

Les haplotypes ainsi générés pour la région révèlent une plus grande incertitude. Il est impossible de dire si la différence allélique au niveau du marqueur *D11S935* pour le patient VIII-3 est due à une recombinaison ou simplement à une mutation du marqueur sur ce bout de chromosome (Figure 21A, page 98). En effet, le chromosome maternel de cette soeur atteinte ne diffère des chromosomes maternels de sa soeur et de son frère atteints que pour ce marqueur dans l'intervalle candidat. S'il ne s'agit pas d'une mutation de marqueur mais bien d'une recombinaison, la famille ne nous permet pas de trancher franchement quant à la localisation de celle-ci: cette recombinaison pourrait avoir eu lieu n'importe où en amont du marqueur *D11S4102*. La cartographie fine de la région pour la famille III révèle le même problème (Figure 21B, page 98). Ce qui avait été identifié comme une recombinaison pourrait n'être qu'une mutation du marqueur *D11S4185* chez l'individu III-6. Peu importe l'explication, cependant, le génotypage complet des soeurs non atteintes démontre une ambiguïté non négligeable: l'une des soeurs non-atteintes devrait être porteuse de la maladie ou, alors, la maladie affectant l'individu III-6 n'est pas la même que la dystrophie des ceintures présentement étudiée.

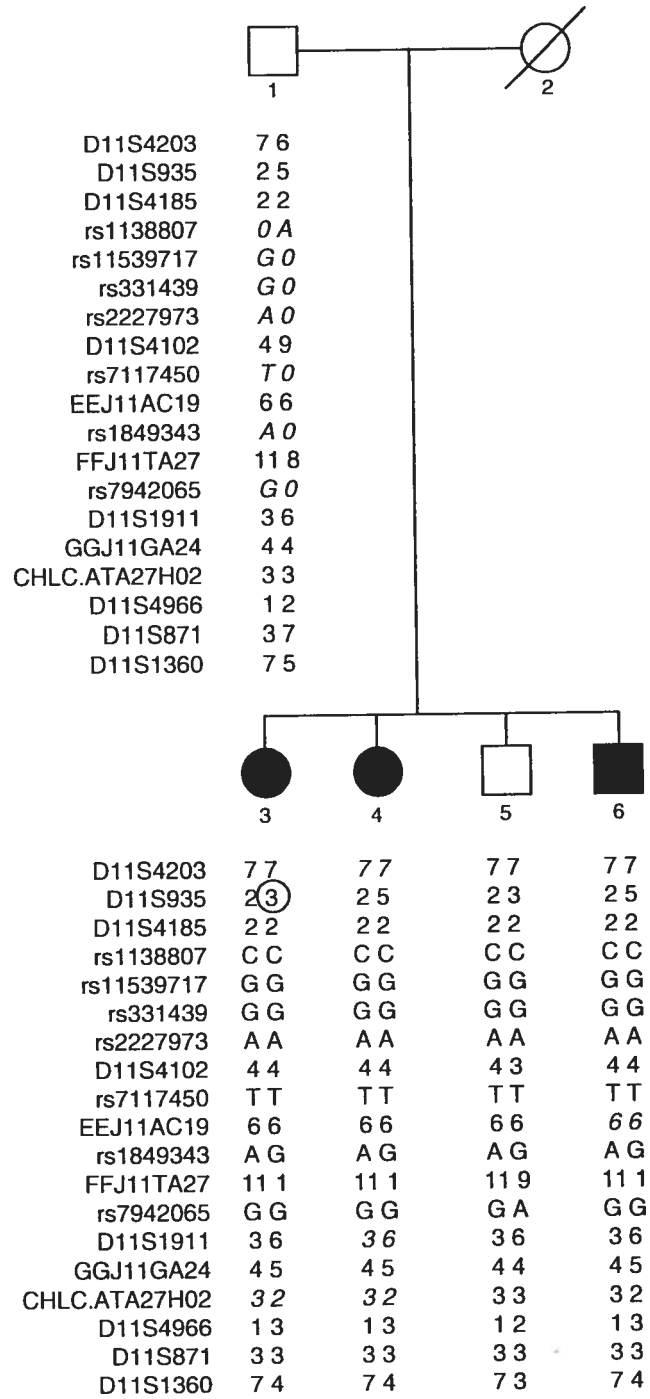
En effet, si le marqueur *D11S4185* a muté, III-6 est génotypiquement identique à sa soeur III-4. S'il y a eu recombinaison dans la région des SNPs, III-6 est génotypiquement identique à ses soeurs III-3 et III-5 pour la région. Comme la pénétrance de la maladie semble très variable (même de façon intrafamiliale), les soeurs III-3, III-4 et III-5 devront être vues en clinique afin de s'informer de symptômes musculaires potentiels et d'effectuer un examen neurologique complet dans le but de détecter s'il y a une atteinte musculaire non perçue par le patient.

5.3 Des bornes conservatrices

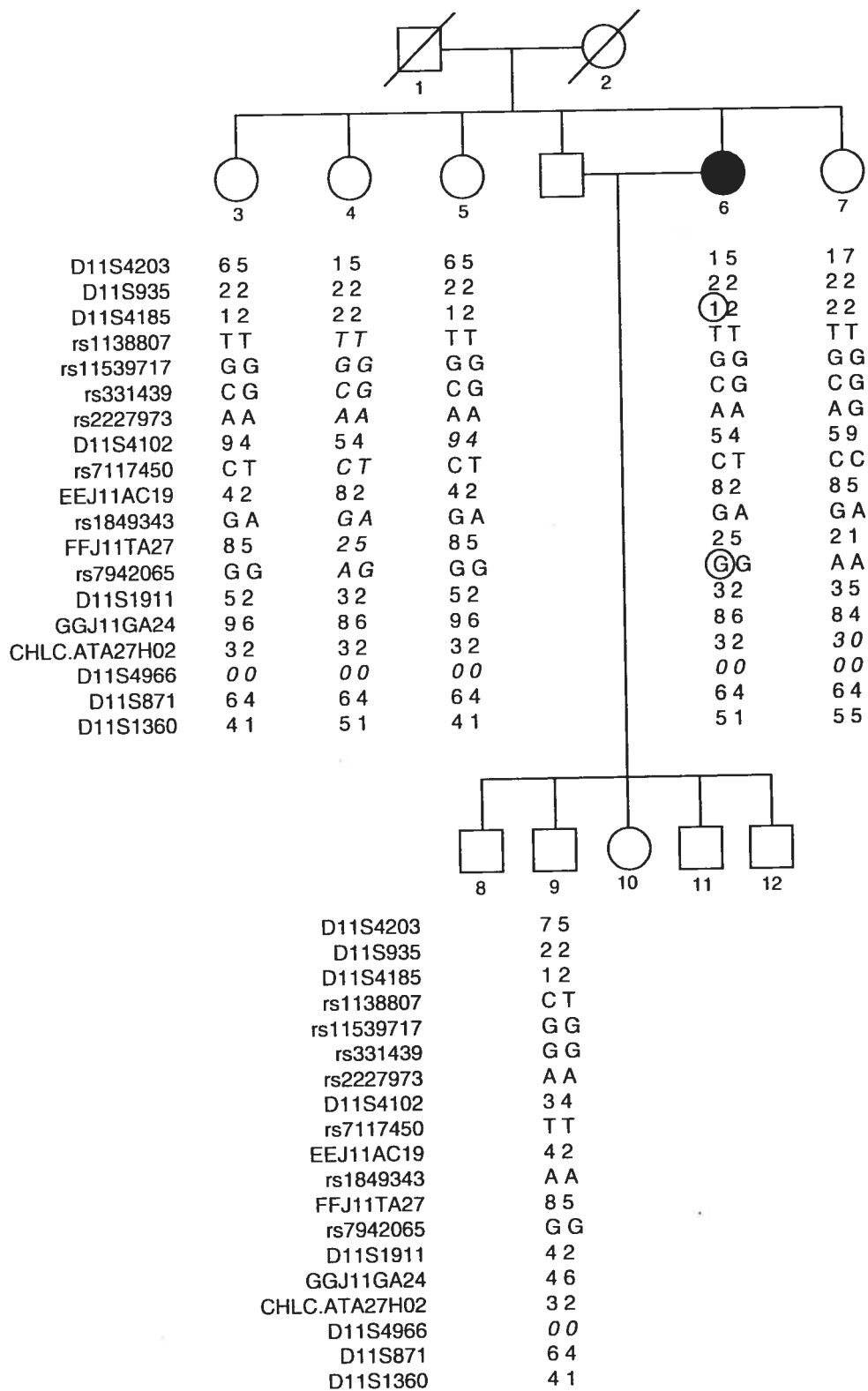
L'intervalle candidat a donc du être réévalué de façon conservatrice avec les familles dont le LOD score était positif.

Les familles I et X ont été écartées de la cohorte dû à un LOD score franchement négatif pour la région du chromosome 11p13-p12. La famille III a été temporairement exclue en

Figure 21: Haplotypes des familles III et VIII après le séquençage des SNPs pour tous les individus recrutés de ces familles



(A) Famille VIII



(B) Famille III

raison d'une ambiguïté au niveau de l'atteinte potentielle d'une ou de plusieurs soeurs de la famille telle que soulevée à la section précédente. Finalement, la boucle de consanguinité de la famille XI a été retirée. Depuis son introduction, le LOD score de cette famille, qui avait été positif *a priori*, était devenu négatif; cependant, les haplotypes ont toujours démontré un partage de chromosomes important pour l'individu atteint, XI-11, avec les patients d'autres familles de la cohorte. La suppression de cette boucle de consanguinité résulte en un LOD score maximal de 0,03 pour cette famille, laissant croire que le logiciel ne détectait pas de liaison dû à l'absence d'homozygotie franche pour cette famille, homozygotie qui devrait être conservée sur une région importante dans les cas de parents consanguins. Bien que le LOD score ne soit pas très élevé pour la famille, il demeure positif et la famille ne peut être écartée du reste de la cohorte.

Ainsi, les familles II, IV, V, VI, VII, VIII, IX et XI délimitent un intervalle candidat de 1,36 Mb allant du marqueur *D11S4185* au marqueur *GGJ11GA24*, avec un LOD score maximal de 4,56. Les huit gènes décrits comme faisant partie de l'intervalle candidat dans l'article (voir chapitre 4), soit *LOC143458*, *FLJ45212*, *COMMD9*, *FLJ14213*, *TRAF6*, *RAG1*, *RAG2* et *LOC119710*, restent présents dans la région. Aucun nouveau gène ne s'est rajouté.

5.4 *COMMD9* et *FLJ45212* séquencés

Les exons et les frontières exons-introns de deux autres gènes candidats ont été séquencés pour les individus VIII-6, IX-10, VI-5 et un contrôle, représentant ainsi les trois haplotypes répertoriés. Ces gènes sont *COMMD9* et *FLJ45212*. Une étude sur les gènes codant pour les *COMM-domain-containing proteins* a récemment été publiée, identifiant ces protéines comme étant des régulateurs de NFκB (Burstein et al., 2005). Ce lien potentiel du gène à l'apoptose et à la cachéxie s'est ajouté à l'intérêt déjà exprimé pour le gène dû à son expression élevée dans les muscles squelettiques (<http://bioinfo.weizmann.ac.il>). Quant à *FLJ45212*, l'absence d'article et de donnée d'expression et d'interaction sur ce gène ne nous permettait pas de l'exclure de la liste des gènes candidats intéressants. La présence d'un seul exon connu de 366 paires de bases a permis un séquençage rapide et efficace de ce gène.

Aucune mutation n'a été détectée dans les six exons de COMMD9 et dans l'unique exon de FLJ45212. Cependant, le SNP rs7939948 a été identifié en amont de l'exon 1 de COMMD9 sur la séquence *reverse* seulement (le SNP se trouvant quelques bases avant le début de l'amorce *forward*) (Appendice II). De même, le SNP rs7107433 a été identifié autant sur les séquences *forward* que *reverse* pour le gène FLJ45212. Pour ces deux SNPs, le contrôle est homozygote alors que les trois individus atteints testés sont hétérozygotes (T;G pour rs7939948, A;G pour rs7107433). Alors que VI-5 devrait être hétérozygote dans la région, les individus VIII-6 et IX-10 devraient être homozygotes pour les haplotypes jaunes et verts, respectivement. Ces résultats soulèvent la possibilité que les séquences amplifiées ne sont pas bien localisées dans le génome, car cette hétérozygotie ponctuelle brise les haplotypes à deux endroits. En l'absence d'un grand nombre d'individus testés, ces données brutes révèlent le besoin de tester le reste de la cohorte pour ces SNPs. De plus amples analyses seront requises afin de confirmer ces données SNPs.

5.5 Matériels et méthodes

Les amorces flanquant les séquences à amplifier ont été créées à partir de Primer3 (Rozen S, 2000). L'amplification a été confirmée sur gel d'agarose 1,5% coloré au bromure d'éthidium. Les amplicons et les paires d'amorces ont été envoyés au Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill afin que les amplicons soient séquencés dans les deux sens. Les séquences ont été alignées dans le logiciel SeqMan 4,03 (DNASStar, Wisconsin, USA) et analysées avec Chromas 1,62 (Technelysium Pty Ltd, Australia).

6

Discussion

6.1 Les dangers d'une cohorte hétérogène

La caractérisation clinique et moléculaire d'une nouvelle maladie, plus particulièrement l'épuration d'une cohorte de patients, est directement dépendante de l'homogénéité du phénotype clinique et de la pénétrance de la maladie. Lorsque le phénotype est très hétérogène et que la pénétrance est variable, le diagnostic devient difficile à poser, mais son impact n'en demeure pas moins crucial.

Le tableau clinique révèle une hétérogénéité assez remarquable pour notre cohorte de dystrophie musculaire des ceintures (Tableau II, page 44). L'âge de début des symptômes est très variable: les individus I-4, VII-3 et XI-11 se sont plaints de leur condition avant ou durant l'adolescence, alors que les patients II-4, IV-3, VIII-3 et IX-10 n'ont remarqué des symptômes qu'au début de la quarantaine. L'individu IX-9 n'avait toujours pas de symptôme de la maladie lors de son diagnostic. Ainsi, l'âge du début des symptômes ne peut être utilisé comme paramètre fixe aidant au diagnostic.

La présence de contractures est une autre variable. Bien que la vaste majorité des patients n'en ait pas, trois individus se sont présentés avec des contractures, les chevilles étant les seules parties contracturées que ces trois individus avaient en commun. La maladie ne semble donc pas associée à des contractures.

La composante myalgique, comme l'atrophie marquée de la face médiane des quadriceps, semble beaucoup plus partagée. La définition de cette douleur musculaire, cependant, change d'un individu à l'autre. Alors que les hommes atteints de la famille IX se plaignent de douleurs pendant et à la suite d'exercices, les individus V-7, VI-5 et XI-11 ne rapportent une douleur musculaire que suivant l'exercice. Les patients III-6 et X-7 décrivent leur myalgie comme étant diffuse; IV-3 et VII-3, quant à eux, ciblent leur

douleur plus aux articulations. Les trois frères et sœurs de la famille VIII se plaignent, de leur côté, de douleurs lombaires. Trois individus de la cohorte ne rapportent aucune douleur musculaire. Bien qu'une myalgie semble caractéristique de la cohorte, la façon dont cette douleur s'exprime autant spatialement que temporellement varie d'une famille à l'autre. Les deux familles comprenant plus d'un individu atteint faisant partie de notre cohorte semblent indiquer que l'expression de cette douleur musculaire est constante au sein d'une même famille.

L'hypertrophie des mollets est un trait caractéristique d'un certain nombre de dystrophies musculaires des ceintures. Même si la majorité de nos patients n'ont pas de mollets hypertrophiés, 29%, soit près du tiers de la cohorte, en ont. L'hypertrophie des mollets ne peut donc être utilisée comme élément discriminatoire lors de l'établissement d'un diagnostic clinique.

L'hétérogénéité de la cohorte est d'autant plus évidente que dans les valeurs des taux sériques de créatine kinase (CK). Les taux varient de normaux à 30 fois la norme maximale. Des niveaux de CK élevés peuvent raffermir le diagnostic, mais des taux normaux ne constituent pas un critère d'exclusion.

En dépit de cette hétérogénéité de la cohorte au point de vue clinique et biochimique, certains traits semblent être partagés par tous les individus atteints de notre bassin de patients. L'atrophie du quadriceps à l'examen clinique est une constante, de même que l'absence notable de cardiomyopathie (un seul individu, VII-3, démontre une atteinte cardiaque probablement due à sa maladie coronarienne). Les muscles faciaux sont respectés chez tous les individus à l'exception de deux patients dont l'atteinte varie de légère à modérée. De façon similaire, l'atteinte musculaire n'est jamais accompagnée de déviations marquées de la colonne vertébrale, à l'exception de deux cas de scoliose légère.

La présence d'une grande variabilité à même notre cohorte n'élimine nullement la possibilité que tous ces patients soient liés par des mutations dans un même gène. En

effet, les maladies causées par des mutations dans le gène de la myotiline révèlent un spectre clinique assez hétérogène. LGMD1A, l'une des myotilinopathies, se caractérise par une atteinte des muscles proximaux des jambes qui se répand aux muscles proximaux et distaux des membres supérieurs et inférieurs avec le temps (Hauser et al., 2000). De plus, une dysarthrie nasale est notable chez la majorité des patients. Les patients atteints de myopathie myofibrillaire liée à des mutations dans la myotiline (MFM/MYOT), quant à eux, ont une faiblesse musculaire qui cible généralement les muscles des jambes soit distaux, soit proximaux (Selcen and Engel, 2004). Des signes cliniques d'une neuropathie périphérique sont observés et une atteinte cardiaque est souvent diagnostiquée. Une nouvelle classe de patients chez qui le gène de la myotiline est muté a été présentée pour la première fois par Olivé *et al.* en 2005: le phénotype de ces patients se situe à mi-chemin entre celui des patients LGMD1A et MFM/MYOT (Olive et al., 2005). Ceci prouve encore une fois que des mutations dans un même gène peuvent s'exprimer de manière différente et qu'il reste probable que notre cohorte, bien qu'hétérogène, soit unie par un même gène.

Cette hétérogénéité relative de notre cohorte nous amène à nous pencher sur le phénomène de pénétrance. Une pénétrance génétique inférieure à 100% signifie que la présence de la mutation dans le gène ne mène pas au phénotype dans tous les cas: la maladie, même lorsque présente au niveau moléculaire, n'est pas exprimée dans 100% des patients. La pénétrance peut varier en terme d'âge. Par exemple, d'une cohorte de 100 individus tous âgés de 25 ans et portant la même mutation, seuls 44 individus peuvent exprimer la maladie si la pénétrance de celle-ci, à 25 ans, est de 44%. Cette même cohorte, lorsque vue en clinique 25 ans plus tard, pourrait révéler un total de 92 individus atteints si la pénétrance de la maladie à 50 ans devient 92%. De la même façon, une cohorte comprenant des individus de plusieurs groupes d'âge peut apparaître hétérogène si la pénétrance de la maladie varie avec l'âge. La pénétrance peut aussi être influencée par le type de mutation, d'autres facteurs génétiques, le sexe et même l'environnement. De plus, des cas extrêmes peuvent apparaître, tels que de jeunes individus affectés sévèrement et des personnes âgées aux symptômes légers, qui donnent l'illusion d'un portrait clinique difficile à saisir. Par exemple, l'individu VI-5 de

notre cohorte a été diagnostiqué à l'âge de 25 ans. Il a des mollets hypertrophiés et souffre de myalgie. De plus, ses CK sont très élevés (1851). À l'autre bout du spectre, la patiente IX-9, âgée de 69 ans, la soeur aînée d'un groupe de quatre frères tous diagnostiqués LGMD, ne s'est jamais plaint de symptômes musculaires ou de troubles à monter les escaliers ou à se relever d'une position assise. Ses muscles ne semblaient que légèrement atteints à l'examen clinique; des études de résonance magnétique ont révélé une très légère atrophie d'un nombre limité de muscles des cuisses.

Qui plus est, les frères de l'individu IX-9 ont été diagnostiqués à un plus jeune âge (30, 37, 39 et 50 ans), témoignant d'une variabilité intrafamiliale qui peut s'expliquer par une pénétrance variable de la maladie. L'analyse de liaison en multipoint s'est donc fait en assignant à chaque individu le numéro d'une classe de pénétrance. Ces classes ont pu être établies par tranche de 10 ans en se basant sur l'âge du début des symptômes tel que rapporté par le patient. Bien que d'origine subjective, ces classes ont permis une meilleure définition biostatistique de la maladie. Un recrutement plus exhaustif de patients pourra, un jour, permettre une meilleure définition de la pénétrance de cette maladie.

L'hétérogénéité d'une telle cohorte pose un problème réel au début du projet lorsque des individus-clés doivent être sélectionnés pour un criblage de l'ensemble du génome. Un grand nombre d'individus provenant d'un petit nombre de familles semble être la meilleure approche, particulièrement lorsque la maladie étudiée semble être un effet fondateur d'une région au bassin génétique hétérogène. Un grand nombre de familles augmente le nombre d'haplotypes différents, diminuant du même coup les chances d'identifier le locus (tout particulièrement avec une approche par homozygotie). Les grandes familles comprenant plus d'un individu atteint permettent d'augmenter, en théorie, le nombre de patients possédant le même haplotype, tout spécialement dans le cas de familles au lien de consanguinité connu. À cette effet, les deux plus grandes familles de notre cohorte, les familles VIII et IX, ont été sélectionnées pour les deux criblages du génome entrepris au cours du projet.

Ce choix n'était cependant pas une garantie absolue de résultats. En effet, au moment du criblage, le fait que ces deux familles étaient porteuses de la même maladie demeurait toujours incertain. L'atteinte musculaire, en particulier en relation avec l'âge, différait: les individus de la famille VIII étant beaucoup plus atteints et plus jeunes que ceux de la famille IX dont le phénotype était plus léger. Les taux sériques de CK étaient aussi drastiquement différents d'une famille à l'autre: alors que les soeurs de la famille VIII avaient des CK normaux et leur frère, des CK légèrement au-dessus de la norme (254 U/L), les frères atteints de la famille IX étaient caractérisés par des taux de CK très élevés, dans les milliers d'unités internationales par litre, le frère IX-15 obtenant le taux le plus élevé pour la cohorte entière (6000 U/L). Finalement, seuls des hommes semblaient affligés dans la famille IX (la soeur IX-9 n'ayant pas reçu son diagnostic au moment des criblages), laissant croire à la possibilité d'une maladie transmise sur le chromosome X, à la différence de la famille VIII où deux soeurs démontraient des symptômes francs de la maladie. Les deux familles ont quand même été choisies pour leur pouvoir discriminatoire, autant pour l'analyse par homozygotie que pour l'étude de liaison génétique. Étant donné le nombre de frères et soeurs atteints dans chacune de ces familles, il n'est pas impossible de penser que chacun des loci respectifs aurait pu être identifié s'il s'était avéré que les familles VIII et IX représentaient, en fait, deux maladies différentes.

6.2 Tous les chemins ne mènent pas à Rome: criblage par homozygotie vs. criblage par liaison

Un criblage de l'ensemble du génome analysé par homozygotie n'a pas révélé le locus de la maladie; un criblage semblable analysé par liaison a, d'emblée, isolé le locus du reste du génome de manière flagrante. Y a-t-il des leçons à tirer de ce double exercice?

La première explication de la futilité ultime du premier criblage demeure le manque d'informativité des marqueurs. Tel que mentionné dans le chapitre 3, il n'était pas rare que tous les individus d'une large famille, qu'ils soient atteints ou non, soient homozygotes pour le même allèle d'un des marqueurs du criblage. L'ensemble de marqueurs microsatellites utilisé par le Centre d'innovation Génome Québec et

Université McGill a depuis été changé afin, entre autres, de régler ce problème. Les 500 marqueurs testés par deCODE genetics pour le second criblage avaient, quant à eux, été soigneusement sélectionnés du point de vue de leur polymorphisme et de leur position sur la carte génétique deCODE.

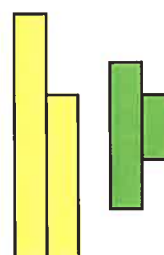
Un resserrement de l'étau au niveau de la densité de marqueurs utilisée a sans doute eu un rôle à jouer dans la différence d'efficacité des deux criblages. La distance moyenne entre les marqueurs lors du premier criblage était de 10 cM; elle est tombée à 8 cM lors du deuxième criblage, un écart qui peut paraître presque insignifiant à première vue mais dont l'utilité est non négligeable lorsque l'haplotype conservé est très ancien, comme le laissent maintenant supposer les résultats de cartographie fine.

La petite taille de la région chromosomique conservée entre les familles de la cohorte est au coeur d'une différence majeure entre les deux criblages: la méthode d'analyse des résultats. L'analyse par homozygotie (*homozygosity mapping*) focalise sur la présence de régions d'homozygotie chez les individus atteints. Son utilisation est donc limitée aux maladies à transmission récessive. En présence de marqueurs polymorphiques, seul l'ADN d'individus atteints est nécessaire au criblage. Lorsque les marqueurs utilisés ne sont pas informatifs, cependant, les faux positifs ne peuvent être éliminés d'emblée et doivent être testés un à un avec l'ADN des individus non atteints recrutés pour l'étude, un processus long et dispendieux. L'analyse par liaison (*linkage analysis*), quant à elle, permet la réduction de faux positifs et l'identification du locus d'intérêt à condition de cribler des frères, soeurs et/ou parents non atteints.



Lors du premier criblage, le locus d'intérêt, situé sur le chromosome 11p13-p12, n'a pas été identifié, car la région d'homozygotie pour les atteints des familles VIII et IX était trop petite: les marqueurs flanqueurs ont révélé une hétérozygotie disparate non intéressante (Figure 22, page 107). Il est possible de voir que les marqueurs utilisés lors du premier criblage (en rouge sur la figure) ne font pas partie de la région d'homozygotie observée chez les deux familles ayant fait partie du criblage, les familles VIII et IX. Lors du second criblage, l'analyse multipoint des données alléliques faite par le logiciel

Figure 22: Position des haplotypes conservés pour les familles VIII et IX en fonction des marqueurs testés lors des deux criblages et de la cartographie fine

MARQUEUR	MARSHFIELD (cM)	deCODE (cM)	bp
ATA34E08	-	-	25 893 703
D11S1776	40,12	-	33 498 748
D11S1392	43,16	50,64	34 596 581
D11S4203	45,94	52,63	35 769 949
D11S935	45,94	52,94	35 979 740
D11S4185	45,94	52,95	36 008 516
D11S4102	47,61	54,35	36 733 886
EEJ11AC19	-	-	36 886 422
FFJ11TA27	-	-	37 031 288
D11S1911	50,88	55,77	37 165 834
GGJ11GA24	-	-	37 364 007
CHLC.ATA27H02	-	-	37 438 935
D11S4966	48,73	56,27	38 235 296
D11S871	-	56,27	39 136 474
D11S1360	50,88	57,09	40 186 930
D11S4949	-	57,39	40 608 217
D11S4191	60,09	64,96	59 756 135
D11S987	67,48	72,17	67 649 917



Légende

- D11S marqueur du premier criblage
- D11S marqueur du second criblage
- D11S marqueur testé en cartographie fine
-  haplotype de la famille VIII
-  haplotype de la famille IX

MAXPROB du lot GENEHUNTER a identifié le locus comme le pic le plus élevé sur un graphique du LOD score en fonction de la position sur le génome. Le marqueur au coeur de cet intervalle initial, *D11S1360*, ne démontrait aucune homozygotie pour les individus atteints: en effet, un aperçu des données du criblage pour cette région ne semblait pas intéressant. La cartographie fine, cependant, a pu démontrer que la région était bel et bien intéressante, confirmant le LOD score initial. Les algorithmes de liaison génétique semblent donc beaucoup plus perceptifs que la construction d'haplotypes assisté de la recherche d'homozygotie.

Il apparaît donc important de faire valoir qu'un criblage de l'ensemble du génome par liaison semble beaucoup plus efficace dans la recherche d'effets fondateurs potentiellement anciens qu'un criblage par homozygotie. À moins d'avoir recours à une densité de marqueurs supérieure à 0,5 marqueur/cM, l'analyse de données par homozygotie est peu informative: les blocs d'homozygotie observés sont souvent le fruit du hasard ou de marqueurs peu polymorphiques. Les criblages par liaison ont fait leur preuve de par le passé (lors de l'identification des loci de plusieurs LGMDs, entre autres): les résultats d'un tel criblage pour ce projet confirment qu'il s'agit d'une méthode robuste.

6.3 L'impact des boucles de consanguinité en étude de liaison

La présence d'une importante boucle de consanguinité dans l'arbre généalogique de la famille IX a eu un impact sur l'analyse des résultats de génotypage (Figure 3, page 41). En effet, les boucles de consanguinité peuvent être traitées par les deux programmes utilisés dans le cadre de ce projet pour les études de liaison, soit MLINK du lot LINKAGE pour l'analyse en deux points et MAXPROB du lot GENEHUNTER pour l'analyse multipoint. Les données alléliques pour tous les marqueurs microsatellites de la région ont été analysées en deux points et en multipoint, avec et sans la boucle de consanguinité pour la famille IX afin d'illustrer l'impact de ce lien, tout particulièrement pour des régions où l'homozygotie n'est préservée que sur un très petit intervalle.

L'impact de cette boucle de consanguinité sur le LOD score est particulièrement flagrant au niveau de la liaison en deux points sous MLINK. Pour une valeur θ de 0,0, la famille IX avait un LOD score positif pour tous les marqueurs microsatellites de l'intervalle, à l'exception du marqueur *GGJ11GA24*, pour lequel le LOD score était de -infini (Tableau VII, page 110). Le LOD score maximal dans l'intervalle a été de 2,18 pour le marqueur *FFJ11TA27*. Lorsque la boucle est préservée dans le tableau de données initial et qu'elle est brisée au niveau de la mère (IX-5), le LOD score chute de façon dramatique, devenant négatif pour tous les marqueurs de l'intervalle à l'exception de *D11S4185* et *CHLC.ATA27H02*. Pour une valeur θ de 0,0, le LOD score de 1,14 sans la boucle devient 1,91 avec la boucle pour *D11S4185*; le LOD score de 0,11 sans la boucle devient 0,64 avec la boucle pour *CHLC.ATA27H02*. Le LOD score maximal sans la boucle, soit 2,18 pour *FFJ11TA27*, est réduit à -1,72 pour ce même marqueur lors de la restitution de la boucle. Alors que l'analyse sans la boucle permet difficilement de réduire l'intervalle, les résultats de l'analyse avec la boucle de consanguinité indiquent une liaison de la maladie au marqueur *D11S4185*.

L'ajout de la boucle de consanguinité en liaison deux points a démontré une réduction de l'intervalle candidat pour la famille IX; l'ajout de cette même boucle en liaison multipoint n'a pas eu d'impact sur la taille de l'intervalle, mais bien sur le LOD score maximal. Sans la boucle, un LOD score de 2,2 est obtenu du marqueur *D11S4203* au marqueur *D11S1911*, après quoi le LOD score chute pour atteindre -2,4 au marqueur *GGJ11GA24* et remonter graduellement à 0,0 pour le dernier marqueur testé, *D11S1360*. La boucle de consanguinité a été rajoutée au fichier de départ en incluant les individus nécessaires et en définissant leurs parents de manière à recréer le lien de consanguinité. La boucle n'a pas besoin d'être brisée sous GENEHUNTER; le logiciel la reconnaît et la traite de manière autonome. Le seul impact que l'ajout de cette boucle a eu sur les résultats a été sur les valeurs de LOD scores elles-mêmes: en effet, chacune des valeurs a baissé de 0,5, le plateau à 2,2 tombant à 1,7. La distribution des scores et la forme du graphique est restée la même: les valeurs sont demeurées positives et négatives pour les mêmes marqueurs, l'intervalle ne s'étant pas déplacé. L'explication la plus plausible de cette chute globale du LOD score est qu'une boucle de consanguinité

Tableau VII: Analyse de liaison en deux points sous MLINK pour la famille IX avec et sans la boucle de consanguinité pour une valeur θ de 0,0

Marqueurs	LOD sans la boucle	LOD avec la boucle
D11S4203	1,49	-2,69
D11S935	1,58	-2,58
D11S4185	1,14	1,91
D11S4102	0,61	-3,30
EEJ11AC19	0,64	-3,44
FFJ11TA27	2,18	-1,72
D11S1911	2,06	-1,97
GGJ11GA24	<i>-infini</i>	<i>-infini</i>
CHLC.ATA27H02	0,11	0,64
D11S4966	0,60	-3,44
D11S871	1,49	-2,69
D11S1360	1,58	-2,31

de premier degré prédit une homozygotie plus importante que celle qui est observée pour les individus atteints de cette famille. De cette façon, le logiciel d'analyse calcule que les chances que ce soit le locus de la maladie sont plus faibles étant donné cette boucle de consanguinité et le fait que peu d'homozygotie soit observée au locus.

De façon générale, l'ajout d'une boucle de consanguinité a fait chuter les LOD scores en analyse deux points et multipoint pour une région à faible homozygotie. La boucle a permis d'identifier un marqueur-clé auquel la maladie semble être liée lors de l'analyse en deux points sous MLINK: les LOD scores positifs des marqueurs avoisinants sont devenus négatifs et le LOD score de ce marqueur-clé, le *D11S4185*, a monté de 1,14 à 1,91. L'ajout de cette boucle de consanguinité en analyse multipoint sous MAXPROB de GENEHUNTER n'a eu aucun impact sur la définition des bornes de l'intervalle candidat mais a fait chuter le LOD score maximal de 0,5, la cause probable étant l'absence d'une importante homozygotie chez les individus atteints pour les marqueurs de la région. Les liens de consanguinité doivent donc être préservés pour l'analyse de liaison.

6.4 Les familles négatives

Des onze familles recrutées initialement pour l'étude, huit ont pu être liées au locus de la maladie (familles II, IV, V, VI, VII, VIII, IX et XI). Trois ont été exclues.

Un LOD score négatif tout au long de la cartographie de la région 11p13-p12 pour la famille I a permis de l'exclure de l'étude. La raison du LOD score négatif est que l'unique frère de l'individu atteint a un génotype identique à son frère pour tous les marqueurs testés. Bien que la pénétrance de la maladie semble variable, plusieurs facteurs nous permettent d'exclure la possibilité que ce frère asymptomatique est en fait atteint de la maladie. Le patient, I-4, a commencé à noter les symptômes de sa maladie au début de l'adolescence et a dû recourir à l'usage d'un fauteuil roulant à 29 ans. Son frère, I-3, de quatre ans son aîné, a aujourd'hui 52 ans et n'a aucun symptôme dystrophique. Ses taux sériques de CK sont normaux (93, comparés aux 373 de son frère). De plus, la famille est originaire du nord du Lac St-Jean, ce qui semble l'exclure du bassin géographique du sud-ouest ayant présument nourri la mutation fondatrice.

Les familles III et X ont été exclues de l'étude jusqu'à preuve du contraire. En effet, l'absence de liaison de ces familles au locus de la maladie s'explique par la présence d'un frère ou d'une soeur au génotype identique à celui de l'individu atteint pour la région testée. Pour la famille X, il s'agit du frère X-4, qui se décrit comme étant asymptomatique. La comparaison des CK est ici futile, étant donnée que la patiente, X-7, a des taux sériques de CK normaux (soit de 77). La famille X a pour origine Paspébiac en Gaspésie, une région bien à l'est de la province et en dehors du champ géographique de l'effet fondateur soupçonné. Les raisons concernant l'exclusion à tout de moins temporaire de la famille III de la cohorte ont été mentionnées plus haut: à moins qu'une des soeurs non atteintes de la famille se révèle être atteinte, cette famille n'est pas liée au locus LGMD2L.

6.5 La composante immune

Un certain nombre de facteurs nous amène à considérer l'implication potentielle du système immunitaire dans cette maladie. Bien que ces spéculations ne soient qu'hypothétiques pour le moment, il demeure intéressant de les mentionner.

L'extraction de tous les ADN utilisés pour le projet s'est faite au laboratoire du docteur Brais suivant des protocoles normalisés pour l'extraction d'ADN de l'anneau de globules blancs de prélèvements sanguins. Bien que subjective, l'observation faite par plusieurs étudiants et assistants de recherche lors de l'extraction d'ADN de patients souffrant de cette dystrophie musculaire des ceintures a très souvent été que la quantité d'ADN précipitant suite à l'ajout d'éthanol froid était nettement supérieure à la quantité d'ADN obtenue pour des patients atteints d'une des autres maladies neuromusculaires étudiées au laboratoire. Un taux anormalement élevé de leucocytes pourrait expliquer la très grande taille des «méduses» d'ADN récoltées.

De plus, à la fin février 2005, le patient IX-15 a contacté le docteur Brais afin de l'informer du fait que son médecin lui avait dit que son taux de leucocytes était très élevé, le patient voulant savoir si ce phénomène était relié à sa dystrophie musculaire.

Ce qui rend ces observations intéressantes, ce sont les gènes dans l'intervalle candidat. En effet, cette région du chromosome 11 semblerait, à première vue, être un agglomérat immunologique. Tous les gènes de l'intervalle dont la fonction est connue codent pour des protéines impliquées dans le système immunitaire.

COMMD9 est une protéine contenant un domaine COMM similaire à celui de MURR1. Cette dernière est une protéine aux multiples fonctions, dont celle d'inhiber NF κ B, un facteur de transcription aux implications majeures dans l'immunité innée et adaptée. Les protéines au domaine COMM ont récemment été observées en agglomérats inhibant l'association de NF κ B d'avec la chromatine (Burstein et al., 2005).

TRAF6 possède des liens encore mieux connus d'avec le système immunitaire. La protéine joue le rôle de médiateur dans deux voies signalétiques reliées à l'immunité: la voie des *tumor necrosis factors* (TNF) et celle de la famille Toll/IL-1 (Kobayashi et al., 2004). TRAF6 interagit elle aussi avec NF κ B lors de l'activation de cytokines proinflammatoires.

Quant à RAG1 et RAG2, ils sont les coactivateurs de la recombinaison V(D)J des immunoglobulines. Une mutation dans l'un des gènes codant pour ces protéines mène à l'immunodéficience sévère combinée ou SCID (Tabori et al., 2004).

Pour certains des gènes dont la fonction demeure inconnue, les données d'expression de GeneNote (disponibles sur le site GeneCards à <http://bioinfo.weizmann.ac.il/>) suggèrent une fonction immunologique: l'expression de FLJ14213, situé au milieu de l'intervalle candidat, est la plus élevée dans la rate.

Cette composante immune, pour le moment hypothétique, pourrait s'expliquer de multiples façons. Il est possible que le gène responsable de la maladie en soit un dont la fonction n'est, pour l'instant, pas connue et que son rôle échappe en fait à cet agglomérat immunologique. Il est aussi possible que le gène responsable ait une fonction primaire dans le système immunologique, mais qu'un rôle second au niveau de la charpente musculaire lui soit jusqu'à maintenant inconnu. Une troisième possibilité est que le phénotype clinique observé soit dû à un processus immunologique altéré. L'absence d'inflammation au niveau de la biopsie de l'individu IX-15 semble contredire cette hypothèse; la présence d'inflammation dans la biopsie musculaire du patient VIII-6, cependant, pourrait appuyer l'hypothèse. Comme VIII-6 démontre un phénotype plus sévère que IX-15 (tant au niveau clinique qu'au niveau de l'imagerie médicale), et ce en dépit d'un âge plus jeune, il est possible que cette inflammation participe activement à la pathophysiologie de LGMD2L.

En dépit du fait qu'une implication du système immunitaire dans la fonte musculaire de cette cohorte de patients est toujours hypothétique, le processus cachéxique semble appuyer cette association. La cachéxie est définie comme étant la fonte musculaire survenant lors de la mobilisation à long terme du système immunitaire dans le combat contre la maladie (Jackman and Kandarian, 2004). Des études ont révélé que TNF- α , IL-1 et IL-6 voient leur concentration grimper lors de la cachéxie; de plus, l'injection de TNF- α peut induire l'état cachéxique, alors que le blocage de ce facteur par la torbafylline chez le rat cancéreux ou dans un état de sepsis peut prévenir la fonte musculaire (Moldawer and Copeland, 1997) (Combaret et al., 2002). La classe de protéines NF κ B a aussi été impliquée dans la cachéxie de multiples façons. NF κ B semble provoquer une atrophie musculaire en activant la transcription de protéines d'ubiquitination (Li et al., 2003); un deuxième mécanisme d'action semble être l'activation par TNF- α et l'interféron- γ de NF κ B qui diminue les niveaux de MyoD active de façon post-traductionnelle, baissant du coup l'efficacité de la synthèse des myofibrilles dans le muscle (Guttridge et al., 2000).

Il sera donc fort intéressant, lorsque le gène muté sera identifié, d'en étudier le rôle potentiel dans le système immunitaire et de confirmer si ce système est directement ou indirectement impliqué dans la pathologie de cette nouvelle forme de dystrophie musculaire des ceintures.

6.6 Un biais de sélection: des cas potentiels dans Charlevoix

La distribution géographique des cas, basée sur l'histoire familiale et les lieux de mariage, démontre clairement un agrégat dans la région du sud-ouest de la province de Québec (Figure 23, page 116). Les deux familles qui se distinguaient nettement de cette grappe géographique, la famille I du nord du Lac St-Jean et la famille X de Paspébiac en Gaspésie, semblent avoir été éliminées de la cohorte de par leur absence de liaison et la divergence de leurs haplotypes. La méthode d'investigation clinique par effet fondateur régional semble donc avoir fait ses preuves: les cas du sud-ouest ont bel et bien la même maladie et présentent un haplotype partagé, alors que d'autres cas phénotypiquement ressemblants mais géographiquement dissimilaires ont été exclus de la cohorte.

Ce micro-effet fondateur, c'est-à-dire au niveau régional par opposition aux effets de fondation de calibre provincial, pourrait être mis en doute par l'addition de nouvelles familles.

Un cas a été transféré au docteur Brais par un collègue s'intéressant aux maladies neuromusculaires du bassin de Charlevoix-Saguenay-Lac-St-Jean. Le patient, se présentant avec un phénotype très similaire à celui des autres patients de notre cohorte, porte le diagnostic d'amyotrophie spinale chronique distale. Qui plus est, cet individu ne serait que le premier d'une plus importante cohorte de cas de Charlevoix portant ce diagnostic et correspondant probablement au phénotype clinique rencontré chez nos patients LGMD2L. Ceci laisse entrevoir la possibilité de découvrir un bassin non négligeable de cas de cette nouvelle forme de dystrophie musculaire des ceintures dans l'est de la province, soit la région de Charlevoix et, peut-être, celle du Saguenay-Lac-St-Jean, où une telle présence décentraliserait l'effet de fondation. L'établissement de

Figure 23: Origine géographique des huit familles liées au locus LGMD2L



critères cliniques de sélection clairs et dénués d'ambiguïté permettrait alors de recruter un nombre maximal de cas sur l'ensemble du territoire québécois. La découverte du gène muté mènerait à un diagnostic moléculaire tranchant contribuant à l'expansion de la cohorte de patients.

Il demeure entièrement possible que d'autres cas de la maladie soient découverts ailleurs dans le monde. En effet, un cas d'origine haïtienne-française a déjà été recruté et sera testé pour les marqueurs de la région. Les États-Unis constituent un bassin potentiellement très intéressant. Comme le rapportent des données statistiques, près d'un million de Québécois ont quitté le Québec pour s'établir en territoire américain de 1840 à 1930 (Lavoie, 1981). Loin de s'être complètement dispersés, ces Québécois ont formé des concentrations régionales intéressantes: 10% de la population de Rhode Island et du Vermont est composé d'individus de souche québécoise. Il en est de même pour 15% de la population du New Hampshire et du Maine. Il ne serait donc pas inattendu que des cas de cette forme de dystrophie des ceintures soient identifiés aux États-Unis, tout particulièrement dans ces états du nord-est où l'immigration canadienne-française est bien connue. Pour ce qui est d'autres pays à travers le monde, la présence d'un effet fondateur au Québec n'exclue aucunement la possibilité d'autres cas ailleurs. LGMD2A, initialement répertoriée chez un isolat de l'Île de la Réunion, représente de 9 à 30% des cas de dystrophies musculaires des ceintures dans le monde (Wicklund, 2003), des études de prévalence ayant été publiées pour des mutations dans le gène de la calpaïne 3 en Italie (Fanin et al., 2005), en Croatie (Canki-Klain et al., 2004) et au Brésil (Passos-Bueno et al., 1996). Il en va de même pour les autres formes autosomiques récessives de la maladie où le locus a souvent été identifié à partir d'une petite cohorte de patients provenant d'une même région: d'autres cas de ces maladies ont par la suite été découverts sur tous les continents.

Nous avons identifié une nouvelle forme de dystrophie musculaire des ceintures avec atteinte des biceps et des quadriceps que nous suggérons d'appeler LGMD2L. Le phénotype témoigne d'une très grande variabilité intra- et interfamiliale. Un criblage de l'ensemble du génome pour les individus de deux familles informatives a révélé une

liaison à une région du chromosome 11p13-p12. Jusqu'à maintenant, 14 patients canadiens-français semblent liés à ce locus qu'une cartographie fine par marqueurs microsatellites et par SNPs a pu restreindre à un intervalle de moins de 3,3 cM. Les haplotypes semblent suggérer la présence de trois mutations distinctes. Quatre gènes des huit connus comme faisant partie de l'intervalle candidat ont été séquencés, mais aucune mutation n'a été trouvée dans les séquences codantes; le phénotype et la pénétrance variable de la maladie pourraient cependant s'expliquer par une macrodélétion dans la région et un effet épigénétique sur les gènes avoisinants, comme en témoigne la dystrophie musculaire facioscapulohumérale (van der Maarel and Frants, 2005). Une mutation dynamique de type expansion de triplets pourrait expliquer la variabilité du phénotype tant au niveau de la sévérité que de l'âge du début de la maladie.

L'ajout de nouvelles familles, incluant celles du bassin potentiel de la région de Charlevoix, permettra de raffiner la région candidate et de mieux évaluer la fréquence de chaque haplotype. Les données brutes provenant des SNPs détectés lors du séquençage des gènes COMMD9 et FLJ45212 devront être analysées et intégrés aux haplotypes des individus atteints. Une couverture de SNPs plus dense pourrait trancher quant au nombre réel d'haplotypes en présence et pourrait aider au rétrécissement de la région candidate. Les quatre gènes de la région encore non séquencés n'étant pas des candidats intéressants, les régions régulatrices des gènes déjà séquencés, tout particulièrement celles de COMMD9 et TRAF6 qui sont exprimés dans les muscles squelettiques et qui ont le potentiel d'être impliqués dans la cachéxie, deviennent intéressantes. La moitié centromérique de l'intervalle candidat, dans laquelle aucun gène connu n'a été rapporté, devra être investiguée. Des ESTs existent dans la région: des buvardages de Northern à l'aide de sondes basées sur ces ESTs sur l'ARN provenant de muscles de patients LGMD2L pourraient servir à l'estimation de la longueur de l'ARNm dans cette région et à l'identification possible d'un gène jusqu'à maintenant non répertorié. L'identification du gène ou du facteur épigénétique de la maladie mènera à une meilleure compréhension de celle-ci et, potentiellement, du

mécanisme pathologique des autres dystrophies musculaires et contribuera à l'expansion de nos connaissances des pathologies du muscle.

Bibliographie

- Baghdiguian S, Martin M, Richard I, Pons F, Astier C, Bourg N, et al. Calpain 3 deficiency is associated with myonuclear apoptosis and profound perturbation of the I κ B α /NF- κ B pathway in limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Nat Med* 1999; 5: 503-11.
- Balci B, Uyanik G, Dincer P, Gross C, Willer T, Talim B, et al. An autosomal recessive limb girdle muscular dystrophy (LGMD2) with mild mental retardation is allelic to Walker-Warburg syndrome (WWS) caused by a mutation in the POMT1 gene. *Neuromuscul Disord* 2005; 15: 271-5.
- Bansal D, Campbell KP. Dysferlin and the plasma membrane repair in muscular dystrophy. *Trends Cell Biol* 2004; 14: 206-13.
- Bansal D, Miyake K, Vogel SS, Groh S, Chen CC, Williamson R, et al. Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature* 2003; 423: 168-72.
- Beckmann JS, Richard I, Hillaire D, Broux O, Antignac C, Bois E, et al. A gene for limb-girdle muscular dystrophy maps to chromosome 15 by linkage. *C R Acad Sci III* 1991; 312: 141-8.
- Beltran-Valero de Bernabe D, Voit T, Longman C, Steinbrecher A, Straub V, Yuva Y, et al. Mutations in the FKRP gene can cause muscle-eye-brain disease and Walker-Warburg syndrome. *J Med Genet* 2004; 41: e61.
- Ben Othmane K, Ben Hamida M, Pericak-Vance MA, Ben Hamida C, Blel S, Carter SC, et al. Linkage of Tunisian autosomal recessive Duchenne-like muscular dystrophy to the pericentromeric region of chromosome 13q. *Nat Genet* 1992; 2: 315-7.
- Bharti AC, Takada Y, Shishodia S, Aggarwal BB. Evidence that receptor activator of nuclear factor (NF)- κ B ligand can suppress cell proliferation and induce apoptosis through activation of a NF- κ B-independent and TRAF6-dependent mechanism. *J Biol Chem* 2004; 279: 6065-76.
- Blake DJ, Nawrotzki R, Loh NY, Gorecki DC, Davies KE. beta-dystrobrevin, a member of the dystrophin-related protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 241-6.
- Boddie HG, Stewart-Wynne EG. Quadriceps myopathy--entity or syndrome? *Arch Neurol* 1974; 31: 60-2.
- Bonnemann CG, Modi R, Noguchi S, Mizuno Y, Yoshida M, Gussoni E, et al. Beta-sarcoglycan (A3b) mutations cause autosomal recessive muscular dystrophy with loss of the sarcoglycan complex. *Nat Genet* 1995; 11: 266-73.
- Brais B. Oculopharyngeal muscular dystrophy: from phenotype to genotype. Montreal: McGill, 1998.
- Bramwell E. Observations on myopathy. *Proc R Soc Med* 1922: 1-12.
- Brockington M, Blake DJ, Prandini P, Brown SC, Torelli S, Benson MA, et al. Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) cause a form of congenital muscular dystrophy with

- secondary laminin alpha2 deficiency and abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan. *Am J Hum Genet* 2001a; 69: 1198-209.
- Brockington M, Yuva Y, Prandini P, Brown SC, Torelli S, Benson MA, et al. Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) identify limb girdle muscular dystrophy 2I as a milder allelic variant of congenital muscular dystrophy MDC1C. *Hum Mol Genet* 2001b; 10: 2851-9.
- Brown SC, Torelli S, Brockington M, Yuva Y, Jimenez C, Feng L, et al. Abnormalities in alpha-dystroglycan expression in MDC1C and LGMD2I muscular dystrophies. *Am J Pathol* 2004; 164: 727-37.
- Burge C, Karlin S. Prediction of complete gene structures in human genomic DNA. *J Mol Biol* 1997; 268: 78-94.
- Burstein E, Hoberg JE, Wilkinson AS, Rumble JM, Csomos RA, Komarck CM, et al. COMMD proteins: A novel family of structural and functional homologs of MURR1. *J Biol Chem* 2005.
- Bushby KM. The limb-girdle muscular dystrophies-multiple genes, multiple mechanisms. *Hum Mol Genet* 1999a; 8: 1875-82.
- Bushby KM. Making sense of the limb-girdle muscular dystrophies. *Brain* 1999b; 122 (Pt 8): 1403-20.
- Bushby KM, Beckmann JS. The limb-girdle muscular dystrophies--proposal for a new nomenclature. *Neuromuscul Disord* 1995; 5: 337-43.
- Butler MH, Douville K, Murnane AA, Kramarcy NR, Cohen JB, Sealock R, et al. Association of the Mr 58,000 postsynaptic protein of electric tissue with Torpedo dystrophin and the Mr 87,000 postsynaptic protein. *J Biol Chem* 1992; 267: 6213-8.
- Canki-Klain N, Milic A, Kovac B, Trlaja A, Grgicevic D, Zurak N, et al. Prevalence of the 550delA mutation in calpainopathy (LGMD 2A) in Croatia. *Am J Med Genet A* 2004; 125: 152-6.
- Cavaldesi M, Macchia G, Barca S, Defilippi P, Tarone G, Petrucci TC. Association of the dystroglycan complex isolated from bovine brain synaptosomes with proteins involved in signal transduction. *J Neurochem* 1999; 72: 1648-55.
- Charniot JC, Pascal C, Bouchier C, Sebillon P, Salama J, Duboscq-Bidot L, et al. Functional consequences of an LMNA mutation associated with a new cardiac and non-cardiac phenotype. *Hum Mutat* 2003; 21: 473-81.
- Cohn RD, Campbell KP. Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 2000; 23: 1456-71.
- Combaret L, Tilignac T, Claustre A, Voisin L, Taillandier D, Obled C, et al. Torbafylline (HWA 448) inhibits enhanced skeletal muscle ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis in cancer and septic rats. *Biochem J* 2002; 361: 185-92.
- Compton AG, Cooper ST, Hill PM, Yang N, Froehner SC, North KN. The syntrophin-dystrobrevin subcomplex in human neuromuscular disorders. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005; 64: 350-61.
- Crosbie RH, Heighway J, Venzke DP, Lee JC, Campbell KP. Sarcospan, the 25-kDa transmembrane component of the dystrophin-glycoprotein complex. *J Biol Chem* 1997; 272: 31221-4.
- Crosbie RH, Lim LE, Moore SA, Hirano M, Hays AP, Maybaum SW, et al. Molecular and genetic characterization of sarcospan: insights into sarcoglycan-sarcospan interactions. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 2019-27.

- Darin N, Kyllerman M, Wahlstrom J, Martinsson T, Oldfors A. Autosomal dominant myopathy with congenital joint contractures, ophthalmoplegia, and rimmed vacuoles. *Ann Neurol* 1998; 44: 242-8.
- Davis DB, Doherty KR, Delmonte AJ, McNally EM. Calcium-sensitive phospholipid binding properties of normal and mutant ferlin C2 domains. *J Biol Chem* 2002; 277: 22883-8.
- Dawn Teare M, Barrett JH. Genetic linkage studies. *Lancet* 2005; 366: 1036-44.
- De Braekeleer M, Gauthier S. Autosomal recessive disorders in Saguenay-Lac-Saint-Jean (Quebec, Canada): a study of inbreeding. *Ann Hum Genet* 1996; 60 (Pt 1): 51-6.
- Denny-Brown D. Myopathic weakness of quadriceps. *Proc R Soc Med* 1939: 867-869.
- Dincer P, Balci B, Yuva Y, Talim B, Brockington M, Dincel D, et al. A novel form of recessive limb girdle muscular dystrophy with mental retardation and abnormal expression of alpha-dystroglycan. *Neuromuscul Disord* 2003; 13: 771-8.
- Driss A, Amouri R, Ben Hamida C, Souilem S, Gouider-Khouja N, Ben Hamida M, et al. A new locus for autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy in a large consanguineous Tunisian family maps to chromosome 19q13.3. *Neuromuscul Disord* 2000; 10: 240-6.
- Driss A, Noguchi S, Amouri R, Kefi M, Sasaki T, Sugie K, et al. Fukutin-related protein gene mutated in the original kindred limb-girdle MD 2I. *Neurology* 2003; 60: 1341-4.
- Duquette A, Roddier K, McNabb-Baltar J, Gosselin I, St-Denis A, Dicaire MJ, et al. Mutations in senataxin responsible for Quebec cluster of ataxia with neuropathy. *Ann Neurol* 2005; 57: 408-14.
- Durbeej M, Cohn RD, Hrstka RF, Moore SA, Allamand V, Davidson BL, et al. Disruption of the beta-sarcoglycan gene reveals pathogenetic complexity of limb-girdle muscular dystrophy type 2E. *Mol Cell* 2000; 5: 141-51.
- Eisenberg I, Hochner H, Shemesh M, Levi T, Potikha T, Sadeh M, et al. Physical and transcriptional map of the hereditary inclusion body myopathy locus on chromosome 9p12-p13. *Eur J Hum Genet* 2001; 9: 501-9.
- Ervasti JM, Campbell KP. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J Cell Biol* 1993; 122: 809-23.
- Espir ML, Matthews WB. Hereditary quadriceps myopathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1973; 36: 1041-5.
- Ettinger AJ, Feng G, Sanes JR. epsilon-Sarcoglycan, a broadly expressed homologue of the gene mutated in limb-girdle muscular dystrophy 2D. *J Biol Chem* 1997; 272: 32534-8.
- Fanin M, Nascimbeni AC, Fulizio L, Angelini C. The frequency of limb girdle muscular dystrophy 2A in northeastern Italy. *Neuromuscul Disord* 2005; 15: 218-24.
- Fardeau M, Hillaire, D., Mignard, C. et al. Limb-girdle muscular dystrophies frequent in Réunion Island (Abstract). *Neurol India* 1989: Supplement.
- Fischer D, Walter MC, Kesper K, Petersen JA, Aurino S, Nigro V, et al. Diagnostic value of muscle MRI in differentiating LGMD2I from other LGMDs. *J Neurol* 2005; 252: 538-47.
- Frosk P, Greenberg CR, Tennese AA, Lamont R, Nysten E, Hirst C, et al. The most common mutation in FKRP causing limb girdle muscular dystrophy type 2I (LGMD2I) may have occurred only once and is present in Hutterites and other populations. *Hum Mutat* 2005; 25: 38-44.
- Frosk P, Weiler T, Nysten E, Sudha T, Greenberg CR, Morgan K, et al. Limb-girdle muscular dystrophy type 2H associated with mutation in TRIM32, a putative E3-ubiquitin-ligase gene. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 663-72.
- Furukawa T, Akagami N, Maruyama S. Chronic neurogenic quadriceps amyotrophy. *Ann Neurol* 1977; 2: 528-30.

- Gamez J, Navarro C, Andreu AL, Fernandez JM, Palenzuela L, Tejeira S, et al. Autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy: a large kindred with evidence for anticipation. *Neurology* 2001; 56: 450-4.
- Gautam M, Noakes PG, Mudd J, Nichol M, Chu GC, Sanes JR, et al. Failure of postsynaptic specialization to develop at neuromuscular junctions of rapsyn-deficient mice. *Nature* 1995; 377: 232-6.
- Gerull B, Gramlich M, Atherton J, McNabb M, Trombitas K, Sasse-Klaassen S, et al. Mutations of TTN, encoding the giant muscle filament titin, cause familial dilated cardiomyopathy. *Nat Genet* 2002; 30: 201-4.
- Guttridge DC, Mayo MW, Madrid LV, Wang CY, Baldwin AS, Jr. NF-kappaB-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia. *Science* 2000; 289: 2363-6.
- Hackman P, Vihola A, Haravuori H, Marchand S, Sarparanta J, De Seze J, et al. Tibial muscular dystrophy is a titinopathy caused by mutations in TTN, the gene encoding the giant skeletal-muscle protein titin. *Am J Hum Genet* 2002; 71: 492-500.
- Haravuori H, Makela-Bengs P, Udd B, Partanen J, Pulkkinen L, Somer H, et al. Assignment of the tibial muscular dystrophy locus to chromosome 2q31. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 620-6.
- Hauser MA, Horrigan SK, Salmikangas P, Torian UM, Viles KD, Dancel R, et al. Myotilin is mutated in limb girdle muscular dystrophy 1A. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 2141-7.
- Hein S, Schaper J. Weakness of a giant: mutations of the sarcomeric protein titin. *Trends Mol Med* 2002; 8: 311-3.
- Henry MD, Campbell KP. Dystroglycan inside and out. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 602-7.
- Heyer E, Tremblay M. Variability of the genetic contribution of Quebec population founders associated to some deleterious genes. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 970-8.
- Holt KH, Campbell KP. Assembly of the sarcoglycan complex. Insights for muscular dystrophy. *J Biol Chem* 1998; 273: 34667-70.
- Horn EJ, Albor A, Liu Y, El-Hizawi S, Vanderbeek GE, Babcock M, et al. RING protein Trim32 associated with skin carcinogenesis has anti-apoptotic and E3-ubiquitin ligase properties. *Carcinogenesis* 2004; 25: 157-67.
- Ibraghimov-Beskrovnaya O, Ervasti JM, Leveille CJ, Slaughter CA, Sernett SW, Campbell KP. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* 1992; 355: 696-702.
- Illarioshkin SN, Ivanova-Smolenskaya IA, Greenberg CR, Nylen E, Sukhorukov VS, Poleshchuk VV, et al. Identical dysferlin mutation in limb-girdle muscular dystrophy type 2B and distal myopathy. *Neurology* 2000; 55: 1931-3.
- Jackman RW, Kandarian SC. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 287: C834-43.
- Jung D, Yang B, Meyer J, Chamberlain JS, Campbell KP. Identification and characterization of the dystrophin anchoring site on beta-dystroglycan. *J Biol Chem* 1995; 270: 27305-10.
- Khursigara G, Bertin J, Yano H, Moffett H, DiStefano PS, Chao MV. A prosurvival function for the p75 receptor death domain mediated via the caspase recruitment domain receptor-interacting protein 2. *J Neurosci* 2001; 21: 5854-63.
- Kobayashi T, Walsh MC, Choi Y. The role of TRAF6 in signal transduction and the immune response. *Microbes Infect* 2004; 6: 1333-8.
- Kruglyak L, Daly MJ, Reeve-Daly MP, Lander ES. Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach. *Am J Hum Genet* 1996; 58: 1347-63.

- Laberge AM, Jomphe M, Houde L, Vezina H, Tremblay M, Desjardins B, et al. A "Fille du Roy" Introduced the T14484C Leber Hereditary Optic Neuropathy Mutation in French Canadians. *Am J Hum Genet* 2005; 77.
- Langen RC, Van Der Velden JL, Schols AM, Kelders MC, Wouters EF, Janssen-Heininger YM. Tumor necrosis factor-alpha inhibits myogenic differentiation through MyoD protein destabilization. *Faseb J* 2004; 18: 227-37.
- Lathrop GM, Lalouel JM. Easy calculations of lod scores and genetic risks on small computers. *Am J Hum Genet* 1984; 36: 460-5.
- Lathrop GM, Lalouel JM, Julier C, Ott J. Strategies for multilocus linkage analysis in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81: 3443-6.
- Lathrop GM, Lalouel JM, White RL. Construction of human linkage maps: likelihood calculations for multilocus linkage analysis. *Genet Epidemiol* 1986; 3: 39-52.
- Lavoie Y. L'émigration des Québécois aux États-Unis de 1840 à 1930. Québec: Éditeur officiel du Québec, 1981.
- Lebakken CS, Venzke DP, Hrstka RF, Consolino CM, Faulkner JA, Williamson RA, et al. Sarcospan-deficient mice maintain normal muscle function. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 1669-77.
- Li YP, Chen Y, Li AS, Reid MB. Hydrogen peroxide stimulates ubiquitin-conjugating activity and expression of genes for specific E2 and E3 proteins in skeletal muscle myotubes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 285: C806-12.
- Louhichi N, Triki C, Quijano-Roy S, Richard P, Makri S, Meziou M, et al. New FKRPs mutations causing congenital muscular dystrophy associated with mental retardation and central nervous system abnormalities. Identification of a founder mutation in Tunisian families. *Neurogenetics* 2004; 5: 27-34.
- Mahjneh I, Vannelli G, Bushby K, Marconi GP. A large inbred Palestinian family with two forms of muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 1992; 2: 277-83.
- Martinsson T, Oldfors A, Darin N, Berg K, Tajsharghi H, Kyllerman M, et al. Autosomal dominant myopathy: missense mutation (Glu-706 --> Lys) in the myosin heavy chain IIa gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 14614-9.
- Matsuda C, Hayashi YK, Ogawa M, Aoki M, Murayama K, Nishino I, et al. The sarcolemmal proteins dysferlin and caveolin-3 interact in skeletal muscle. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 1761-6.
- McNally EM, Passos-Bueno MR, Bonnemann CG, Vainzof M, de Sa Moreira E, Lidov HG, et al. Mild and severe muscular dystrophy caused by a single gamma-sarcoglycan mutation. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 1040-7.
- Messina DN, Speer MC, Pericak-Vance MA, McNally EM. Linkage of familial dilated cardiomyopathy with conduction defect and muscular dystrophy to chromosome 6q23. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 909-17.
- Metzinger L, Blake DJ, Squier MV, Anderson LV, Deconinck AE, Nawrotzki R, et al. Dystrobrevin deficiency at the sarcolemma of patients with muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 1185-91.
- Michele DE, Barresi R, Kanagawa M, Saito F, Cohn RD, Satz JS, et al. Post-translational disruption of dystroglycan-ligand interactions in congenital muscular dystrophies. *Nature* 2002; 418: 417-22.
- Michele DE, Campbell KP. Dystrophin-glycoprotein complex: post-translational processing and dystroglycan function. *J Biol Chem* 2003; 278: 15457-60.

- Minetti C, Bado M, Broda P, Sotgia F, Bruno C, Galbiati F, et al. Impairment of caveolae formation and T-system disorganization in human muscular dystrophy with caveolin-3 deficiency. *Am J Pathol* 2002; 160: 265-70.
- Moldawer LL, Copeland EM, 3rd. Proinflammatory cytokines, nutritional support, and the cachexia syndrome: interactions and therapeutic options. *Cancer* 1997; 79: 1828-39.
- Moreira ES, Vainzof M, Marie SK, Sertie AL, Zatz M, Passos-Bueno MR. The seventh form of autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy is mapped to 17q11-12. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 151-9.
- Moreira ES, Wiltshire TJ, Faulkner G, Nilforoushan A, Vainzof M, Suzuki OT, et al. Limb-girdle muscular dystrophy type 2G is caused by mutations in the gene encoding the sarcomeric protein telethonin. *Nat Genet* 2000; 24: 163-6.
- Morton NE. Sequential tests for the detection of linkage. *Am J Hum Genet* 1955; 7: 277-318.
- Mümenthaler M. Myopathy in neuropathy. In: Walton JN, Canal, N., Scarlato, G., editor. *Muscle Diseases*. Vol 199. Amsterdam: Excerpta Medica Foundation, 1970: 585-598.
- Nakamura A, Yoshida K, Ikeda S. Late-onset autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy with rimmed vacuoles. *Clin Neurol Neurosurg* 2004; 106: 122-8.
- Nigro V, de Sa Moreira E, Piluso G, Vainzof M, Belsito A, Politano L, et al. Autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy, LGMD2F, is caused by a mutation in the delta-sarcoglycan gene. *Nat Genet* 1996; 14: 195-8.
- Noguchi S, McNally EM, Ben Othmane K, Hagiwara Y, Mizuno Y, Yoshida M, et al. Mutations in the dystrophin-associated protein gamma-sarcoglycan in chromosome 13 muscular dystrophy. *Science* 1995; 270: 819-22.
- Oettinger MA. Activation of V(D)J recombination by RAG1 and RAG2. *Trends Genet* 1992; 8: 413-6.
- Olive M, Goldfarb LG, Shatunov A, Fischer D, Ferrer I. Myotilinopathy: refining the clinical and myopathological phenotype. *Brain* 2005; 128: 2315-26.
- Palenzuela L, Andreu, AL., Gamez, J., Vila, MR., Kunitatsu, T., Meseguer, A., Cervera, C., Fernandez Cadenas, I., van der Ven, PF., Nygaard, TG., Bonilla, E., Hirano, M. A novel autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy (LGMD 1F) maps to 7q32.1-32.2. *Neurology* 2003; 61: 404-6.
- Passos-Bueno MR, Bashir R, Moreira ES, Vainzof M, Marie SK, Vasquez L, et al. Confirmation of the 2p locus for the mild autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy gene (LGMD2B) in three families allows refinement of the candidate region. *Genomics* 1995; 27: 192-5.
- Passos-Bueno MR, Moreira ES, Marie SK, Bashir R, Vasquez L, Love DR, et al. Main clinical features of the three mapped autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies and estimated proportion of each form in 13 Brazilian families. *J Med Genet* 1996; 33: 97-102.
- Passos-Bueno MR, Richard I, Vainzof M, Fougousse F, Weissenbach J, Broux O, et al. Evidence of genetic heterogeneity in the autosomal recessive adult forms of limb-girdle muscular dystrophy following linkage analysis with 15q probes in Brazilian families. *J Med Genet* 1993; 30: 385-7.
- Phillips BA, Cala LA, Thickbroom GW, Melsom A, Zilko PJ, Mastaglia FL. Patterns of muscle involvement in inclusion body myositis: clinical and magnetic resonance imaging study. *Muscle Nerve* 2001; 24: 1526-34.

- Politano L, Nigro V, Passamano L, Petretta V, Comi LI, Papparella S, et al. Evaluation of cardiac and respiratory involvement in sarcoglycanopathies. *Neuromuscul Disord* 2001; 11: 178-85.
- Rambukkana A, Yamada H, Zanazzi G, Mathus T, Salzer JL, Yurchenco PD, et al. Role of alpha-dystroglycan as a Schwann cell receptor for *Mycobacterium leprae*. *Science* 1998; 282: 2076-9.
- Reddy A, Caler EV, Andrews NW. Plasma membrane repair is mediated by Ca(2+)-regulated exocytosis of lysosomes. *Cell* 2001; 106: 157-69.
- Richard I, Broux O, Allamand V, Fougousse F, Chiannikulchai N, Bourg N, et al. Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell* 1995; 81: 27-40.
- Richard I, Roudaut C, Saenz A, Pogue R, Grimbergen JE, Anderson LV, et al. Calpainopathy-a survey of mutations and polymorphisms. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 1524-40.
- Roberds SL, Leturcq F, Allamand V, Piccolo F, Jeanpierre M, Anderson RD, et al. Missense mutations in the adhalin gene linked to autosomal recessive muscular dystrophy. *Cell* 1994; 78: 625-33.
- Roux PP, Barker PA. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol* 2002; 67: 203-33.
- Rozen S SH. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S MS, editor. *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ: Humana Press, 2000: 365-386.
- Schindl K, Rueker O. Differential interference contrast for transmitted-light (Nomarski method). *J Biol Photogr Assoc* 1973; 41: 109-11.
- Scriber CR. Human genetics: lessons from Quebec populations. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2001; 2: 69-101.
- Sebillon P, Bouchier C, Bidot LD, Bonne G, Ahamed K, Charron P, et al. Expanding the phenotype of LMNA mutations in dilated cardiomyopathy and functional consequences of these mutations. *J Med Genet* 2003; 40: 560-7.
- Selcen D, Engel AG. Mutations in myotilin cause myofibrillar myopathy. *Neurology* 2004; 62: 1363-71.
- Serratrice GT, Munsat TL. Overview of the pathogenesis and therapy of amyotrophic lateral sclerosis. *Adv Neurol* 1995; 68: 1-5.
- Shokeir MH, Kobrinsky NL. Autosomal recessive muscular dystrophy in Manitoba Hutterites. *Clin Genet* 1976; 9: 197-202.
- Speer MC, Gilchrist JM, Chutkow JG, McMichael R, Westbrook CA, Stajich JM, et al. Evidence for locus heterogeneity in autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Am J Hum Genet* 1995; 57: 1371-6.
- Speer MC, Vance JM, Grubber JM, Lennon Graham F, Stajich JM, Viles KD, et al. Identification of a new autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy locus on chromosome 7. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 556-62.
- Starling A, Kok F, Passos-Bueno MR, Vainzof M, Zatz M. A new form of autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy (LGMD1G) with progressive fingers and toes flexion limitation maps to chromosome 4p21. *Eur J Hum Genet* 2004; 12: 1033-40.
- Sternberger LA. Some new developments in immunocytochemistry. *Mikroskopie* 1969; 25: 346-61.

- Straub V, Ettinger AJ, Durbeej M, Venzke DP, Cutshall S, Sanes JR, et al. epsilon-sarcoglycan replaces alpha-sarcoglycan in smooth muscle to form a unique dystrophin-glycoprotein complex. *J Biol Chem* 1999; 274: 27989-96.
- Sunada Y, Campbell KP. Dystrophin-glycoprotein complex: molecular organization and critical roles in skeletal muscle. *Curr Opin Neurol* 1995; 8: 379-84.
- Sunohara N, Arahata K, Hoffman EP, Yamada H, Nishimiya J, Arikawa E, et al. Quadriceps myopathy: forme fruste of Becker muscular dystrophy. *Ann Neurol* 1990; 28: 634-9.
- Tabori U, Mark Z, Amariglio N, Etzioni A, Golan H, Biloray B, et al. Detection of RAG mutations and prenatal diagnosis in families presenting with either T-B- severe combined immunodeficiency or Omenn's syndrome. *Clin Genet* 2004; 65: 322-6.
- Tsubata S, Bowles KR, Vatta M, Zintz C, Titus J, Muhonen L, et al. Mutations in the human delta-sarcoglycan gene in familial and sporadic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest* 2000; 106: 655-62.
- Turner JW, Heathfield KW. Quadriceps myopathy occurring in middle age. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1961; 24: 18-21.
- Udd B, Haravuori H, Kalimo H, Partanen J, Pulkkinen L, Paetau A, et al. Tibial muscular dystrophy--from clinical description to linkage on chromosome 2q31. *Neuromuscul Disord* 1998; 8: 327-32.
- Udd B, Kaarianen H, Somer H. Muscular dystrophy with separate clinical phenotypes in a large family. *Muscle Nerve* 1991; 14: 1050-8.
- Udd B, Rapola J, Nokelainen P, Arikawa E, Somer H. Nonvacuolar myopathy in a large family with both late adult onset distal myopathy and severe proximal muscular dystrophy. *J Neurol Sci* 1992; 113: 214-21.
- Vachon PH, Loechel F, Xu H, Wewer UM, Engvall E. Merosin and laminin in myogenesis; specific requirement for merosin in myotube stability and survival. *J Cell Biol* 1996; 134: 1483-97.
- Vainzof M, Moreira ES, Suzuki OT, Faulkner G, Valle G, Beggs AH, et al. Telethonin protein expression in neuromuscular disorders. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1588: 33-40.
- van der Maarel SM, Frants RR. The D4Z4 repeat-mediated pathogenesis of facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Am J Hum Genet* 2005; 76: 375-86.
- Walton JN. Two cases of myopathy limited to the quadriceps. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1956: 106-108.
- Weiler T, Greenberg CR, Nylén E, Halliday W, Morgan K, Eggertson D, et al. Limb-girdle muscular dystrophy and Miyoshi myopathy in an aboriginal Canadian kindred map to LGMD2B and segregate with the same haplotype. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 872-8.
- Weiler T, Greenberg CR, Nylén E, Morgan K, Fujiwara TM, Crumley MJ, et al. Limb girdle muscular dystrophy in Manitoba Hutterites does not map to any of the known LGMD loci. *Am J Med Genet* 1997; 72: 363-8.
- Weiler T, Greenberg CR, Zelinski T, Nylén E, Coghlan G, Crumley MJ, et al. A gene for autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy in Manitoba Hutterites maps to chromosome region 9q31-q33: evidence for another limb-girdle muscular dystrophy locus. *Am J Hum Genet* 1998; 63: 140-7.
- Wicklund MP, Mendell, J.R. The Limb Girdle Muscular Dystrophies: Our Ever-Expanding Knowledge. *Journal of Clinical Neuromuscular Disease* 2003; 5: 12-28.
- Williams MW, Bloch RJ. Extensive but coordinated reorganization of the membrane skeleton in myofibers of dystrophic (mdx) mice. *J Cell Biol* 1999; 144: 1259-70.

- Williamson RA, Henry MD, Daniels KJ, Hrstka RF, Lee JC, Sunada Y, et al. Dystroglycan is essential for early embryonic development: disruption of Reichert's membrane in Dag1-null mice. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 831-41.
- Yanai I, Benjamin H, Shmoish M, Chalifa-Caspi V, Shklar M, Ophir R, et al. Genome-wide midrange transcription profiles reveal expression level relationships in human tissue specification. *Bioinformatics* 2005; 21: 650-9.
- Zatz M, de Paula F, Starling A, Vainzof M. The 10 autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. *Neuromuscul Disord* 2003; 13: 532-44.
- Zatz M, Vainzof M, Passos-Bueno MR. Limb-girdle muscular dystrophy: one gene with different phenotypes, one phenotype with different genes. *Curr Opin Neurol* 2000; 13: 511-7.
- Zelinski T. The use of DNA restriction fragment length polymorphisms in conjunction with blood group serology. *Transfusion* 1991; 31: 762-70.
- Zimprich A, Grabowski M, Asmus F, Naumann M, Berg D, Bertram M, et al. Mutations in the gene encoding epsilon-sarcoglycan cause myoclonus-dystonia syndrome. *Nat Genet* 2001; 29: 66-9.

Appendice I

Cet appendice poursuit le travail d'analyse des régions potentiellement intéressantes du premier criblage de l'ensemble du génome. On se référera au chapitre 3 pour l'introduction à ce travail et les conclusions tirées de cette exercice, de même qu'à la section 6.2 pour une discussion des mérites et problèmes de l'analyse de données de criblage par homozygotie et par liaison.

Régions des chromosomes 6, 4 et X

Les régions d'intérêt testées après l'exclusion du locus du chromosome 14 ont été celles où une homozygotie était observée pour tous les atteints d'une même famille pour deux marqueurs consécutifs ou plus.

Les marqueurs *D6S1009* et *GATA184A08*, de même que le marqueur *D6S1040* (pour lequel deux des trois individus testés de la famille VIII étaient homozygotes) ont été testés par gel de polyacrylamide sur le LI-COR Gene ReadIR 4200, et ce pour tous les individus recrutés des familles VII, VIII, IX et XI (Tableau III, page 49). L'ajout du père et du frère non-atteints de la famille VIII est significatif: en effet, le frère VIII-5 est génotypiquement identique à ses frères atteints. Les trois mêmes marqueurs, lorsque testés chez les individus atteints de la famille IX, révèlent, comme lors du criblage, un manque de partage allélique. L'individu VII-3 est toujours hétérozygote et l'individu XI-11 est identique à son frère non-atteint. Cette région a donc dû être éliminée.

Les marqueurs *D4S1629* et *D4S2368* ont été testés de la même manière avec la même cohorte d'individus. *D4S1629* semble peu informatif: les sept individus de la famille IX sont tous homozygotes pour le même allèle. Pour le second marqueur, *D4S2368*, un des frères non-atteints (IX-8) est homozygote pour le même allèle que ses frères

atteints. Les trois autres familles démontrent un phénomène semblable: un grand nombre d'individus non atteints sont génotypiquement identiques à leur(s) frère(s)/soeur(s) atteints(es).

Le chromosome X comportait une grande région (40,6 cM) pour laquelle IX-10, -11 et -15 étaient homozygotes d'un bout à l'autre (Tableau III, page 49). En l'absence de femmes atteintes à même la famille au moment de l'étude et suite à l'élimination de la région du chromosome 14, cette nouvelle région devenait potentiellement très intéressante. Les marqueurs *DXS1068*, *DXS6810*, *GATA144D04* et *DXS7132* ont été testés. Comme pour la région d'intérêt du chromosome 4, le frère IX-8 est homozygote pour les mêmes allèles des quatre marqueurs testés. Les dossiers cliniques ont été revus: l'individu ne démontre aucun signe de faiblesse musculaire. Cette région a donc nécessairement été rejetée.

Les régions d'intérêt à un seul marqueur homozygote

Devant l'incapacité des régions d'homozygotie s'étendant sur plus d'un marqueur à conserver leur intérêt après l'ajout d'individus et de marqueurs en leur sein, de nouvelles régions d'intérêt ont dû être définies. Celles-ci, au nombre de neuf, étaient propices à une analyse plus poussée par le fait que, pour l'unique marqueur les définissant, les individus atteints des deux familles étaient homozygotes (les individus atteints de la famille VIII ne partageant pas nécessairement l'allèle des individus atteints de la famille IX) (Tableau VIII, page xviii). Certains de ces marqueurs ont été inclus même si un des trois individus d'une famille n'avait pas pu être génotypé (les valeurs alléliques rapportées par le logiciel d'analyse étant «0»), à condition que les deux autres soient homozygotes pour le même allèle, afin de ne pas rayer de la liste une région potentiellement intéressante simplement parce que la réaction lors du criblage n'avait pas fonctionné pour un individu.

Les marqueurs d'intérêt sont les suivants: *D1S1622*, *D2S1356*, *D2S2981*, *D4S1629*, *D11S4949*, *D12S1052*, *D17S1294*, *D18S1155* et *D20S477*. Tous les individus recrutés des familles I à XI ont été testés pour ces marqueurs.

Tableau VIII: Régions d'intérêt à un seul marqueur homozygote pour le premier criblage de l'ensemble du génome

	VIII			IX		
	3	4	6	10	11	15
D1S1622	269 269	269 254	269 269	257 257	257 257	257 257
D2S1356	236 233	236 236	236 236	233 233	233 248	233 248
D2S2981	249 249	249 249	249 249	253 249	253 253	253 253
D4S1629	146 0	0 0	146 146	146 146	146 146	146 146
D11S4949	241 241	241 241	241 241	246 246	246 246	246 246
D12S1052	150 150	150 150	150 150	150 150	150 150	150 150
D17S1294	246 246	246 246	246 246	254 250	254 254	254 254
D18S1155	197 197	197 207	197 197	197 197	197 197	197 197
D20S477	0 0	256 0	256 256	256 256	256 256	256 256

Les génotypes ainsi obtenus n'ont pas permis de retenir aucun de ces marqueurs comme indiquant une région d'intérêt méritant une analyse plus fine. Au moins un individu non-atteint de chaque famille a démontré les deux mêmes allèles que l'individu (ou les individus) atteint(s) et le partage allélique entre les individus atteints des onze familles était mince. L'analyse des génotypes générés a permis de postuler que les marqueurs ainsi retenus n'étaient pas très polymorphiques. La récurrence de certains allèles à travers les familles et à même certaines familles a réduit de beaucoup l'informativité potentielle de ces marqueurs: en effet, il n'est pas rare de voir les sept membres d'une famille homozygotes pour le même allèle d'un marqueur, sans tenir compte du statut des individus.

Une homozygotie trop petite pour être détectée

Devant cette accumulation de résultats négatifs, une nouvelle hypothèse de travail a dû être mise de l'avant. Si l'effet fondateur attendu était particulièrement ancien, la région de déséquilibre devrait, en théorie, être très petite, échappant possiblement à la détection étant donné la distance moyenne entre les marqueurs du criblage (10 cM). Cependant, la famille IX étant consanguine, les chances de détecter de l'homozygotie dans la région du gène muté étaient plus grandes que pour la famille VIII. Ainsi, un recensement de nouvelles régions d'intérêt a pu être accompli en ciblant les régions d'homozygotie chez les atteints de la famille IX pour lesquelles un des deux chromosomes semblait partagé chez les atteints de la famille VIII (Figure 24, page xx). La construction d'haplotypes à cette échelle étant difficile (due aux fréquentes recombinaisons), la création de chromosomes partagés chez les deux familles a plutôt penché du côté libéral afin de ne pas rejeter de régions potentiellement intéressantes.

Une illustration de ces sept régions d'intérêt est disponible dans la Figure 23 (page 116). Les marqueurs délimitant ces régions ont tous été testés pour la cohorte entière afin de vérifier si les haplotypes initiaux se tenaient. Cinq de ces régions d'intérêt ont été rejetées dû au manque d'informativité des marqueurs sélectionnés. Le partage possible

Figure 24: Régions génomiques où l'homozygotie des individus atteints de la famille IX révèle le partage possible d'un chromosome chez les individus atteints de la famille VIII

	D1S482	D1S1622	GATA100B09	D1S2130	D1S200	D1S209	
VIII-3	182	269	215	247	166	0	CHR 1
	186	269	211	251	166	0	
VIII-4	178	269	215	247	166	161	
	186	254	211	247	166	159	
VIII-6	178	269	215	247	166	161	
	182	269	211	251	166	159	
IX-10	178	257	215	0	166	161	
	178	257	219	0	168	157	
IX-11	178	257	215	247	166	0	
	176	257	215	251	168	0	
IX-15	178	257	215	247	166	159	
	176	257	215	251	168	157	

	D5S1480	D5S820	D5S1475	D5S1456	D5S2073	
VIII-3	224	194	165	0	238	CHR 5
	215	194	161	0	236	
VIII-4	233	194	157	0	240	
	215	190	161	0	242	
VIII-6	224	194	157	201	238	
	215	190	161	197	242	
IX-10	233	194	153	0	240	
	230	207	153	0	0	
IX-11	233	194	153	201	240	
	236	207	153	197	240	
IX-15	233	194	153	201	240	
	236	207	153	197	240	

	D8S1130	D8S1106	D8S1145	D8S1734	D8S137	D8S1471	
VIII-3	145	136	274	115	152	0	CHR 8
	141	136	271	111	150	0	
VIII-4	145	0	274	115	152	155	
	141	0	271	111	150	155	
VIII-6	145	136	274	115	152	168	
	141	136	271	111	150	164	
IX-10	149	136	279	115	152	159	
	145	132	279	115	154	159	
IX-11	149	136	279	115	0	159	
	128	140	279	111	0	159	
IX-15	149	136	279	115	152	159	
	145	132	279	115	154	159	

	D11S987	D11S2371	D11S2002	D11S1366	D11S1893	D11S1998	D11S4464
VIII-3	111	195	239	238	247	148	239
	109	199	239	246	247	156	235
VIII-4	111	195	239	238	247	148	239
	107	199	239	246	255	156	235
VIII-6	111	199	239	238	247	148	239
	109	199	222	242	255	156	235
IX-10	113	195	239	238	247	148	239
	105	195	231	242	249	156	235
IX-11	113	195	239	238	247	148	243
	105	195	231	242	249	128	227
IX-15	113	195	239	238	247	148	239
	105	195	231	242	249	156	235

CHR
11

	D14S588	D14S71	D14S606	D14S610	D14S617
VIII-3	121	207	262	359	164
	129	197	258	363	156
VIII-4	121	207	262	359	164
	129	197	266	355	156
VIII-6	121	207	262	359	164
	129	197	258	363	160
IX-10	121	191	262	359	140
	121	191	274	359	140
IX-11	121	191	262	359	140
	121	191	266	363	160
IX-15	121	191	262	359	140
	121	191	274	359	140

CHR
14

	D16S403	D16S769	D16S753	D16S757	D16S3253
VIII-3	134	268	255	0	185
	134	256	263	0	181
VIII-4	134	268	255	276	172
	134	264	255	285	181
VIII-6	134	268	255	276	185
	136	264	255	285	181
IX-10	142	260	255	276	185
	136	260	0	276	177
IX-11	142	260	255	276	185
	136	260	0	273	181
IX-15	142	260	255	276	185
	136	260	0	273	181

CHR
16

	D18S851	D18S858	D18S1155	D18S1270	D18S979
VIII-3	274	193	197	0	158
	258	202	197	271	150
VIII-4	266	193	197	282	154
	258	202	207	286	154
VIII-6	274	193	197	282	154
	270	205	197	286	150
IX-10	262	193	197	282	162
	258	193	197	290	154
IX-11	270	193	197	0	158
	258	196	197	271	158
IX-15	270	193	197	282	162
	258	202	197	290	154

CHR

18

d'un chromosome pour les deux autres régions a été infirmé lors de la reconstruction d'haplotypes pour ces familles. De plus, l'individu VIII-5 était identique à ses soeurs et frère atteints dans deux des sept régions testées; un des frères et soeur non-atteints(e) de la famille IX était identique aux frères atteints dans trois des sept régions. Ces régions ont donc été rejetées.

Une couverture incomplète

Un regard critique vis-à-vis du spectre de marqueurs utilisés pour le criblage a pu révéler une couverture incomplète du génome humain tel que connu en avril 2004. En effet, les télomères de plusieurs chromosomes étaient insuffisamment représentés; de plus, bien que la distance moyenne entre les marqueurs ait été de 10 cM, certains marqueurs étaient séparés de 20 cM et plus. Les extrémités chromosomiques ne doivent pas être délaissées lors d'un criblage de l'ensemble du génome. Par exemple, le gène encodant la protéine SDHA qui, lorsque muté, cause le syndrome de Leigh se trouve dans les 30 000 premières paires de base du chromosome 5. Ainsi, il importait de compléter la couverture microsatellite du criblage.

Vingt-cinq marqueurs ont été sélectionnés afin de remplir ces trous et ont été testés avec les six mêmes individus dont l'ADN avait été envoyé pour le criblage. Un seul marqueur, *D2S2584*, n'a pas amplifié; des génotypes ont été générés pour les 24 autres marqueurs. Ceux-ci ont permis d'isoler six nouvelles régions potentiellement intéressantes, dont deux télomériques et une (*D13S232*) centromérique.

Ces régions ont été testées avec la cohorte entière et cinq des six régions ont pu être éliminées de cette façon. La sixième, centrée sur le marqueur centromérique *D13S232*, était originellement intéressante pour les six ADN testés, mais la qualité des bandes sur le gel laissait beaucoup de place à l'interprétation. L'intérêt de ce marqueur était d'autant plus augmenté qu'il s'agissait du marqueur-clé auquel était liée la dystrophie des ceintures LGMD2C. Un raffinement des conditions d'amplification a démontré une hétérozygotie disparate, brisant de ce coup le potentiel de la région. L'individu IX-15

ayant déjà été testé pour une déficience en sarcoglycans par immunohistochimie et buvardage de Western, le diagnostic de LGMD2C a donc pu être fermement rejeté.

Matériels et méthodes

L'ADN génomique des individus VIII-3, VIII-4 et VIII-6, de même que celui des individus IX-10, IX-11 et IX-15, a été envoyé au Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill pour un criblage de l'ensemble du génome. Les échantillons ont été reçus au Centre à une concentration de 10 ng/μL; une nouvelle plaque a été générée par le Centre à une concentration de 3 ng/μL comprenant, non seulement les six échantillons de dystrophie des ceintures, mais aussi 22 autres ADN utilisés dans le cadre d'autres projets. L'ensemble Weber 8 de 392 marqueurs microsatellites a été utilisé. Les plaques 384 puits contenant le mélange à PCR et l'ADN ont été roulées sur un ABI 9700 Thermocycler. Les amplicons ont par la suite été soumis à une machine ABI 3700 dotée de GeneScan. L'analyse des données a été effectuée grâce à Genotyper. Les erreurs mendéliennes ont été vérifiées par le programme gsh. Tous les marqueurs dont l'efficacité d'amplification avait été inférieure à 50% ont été reroulés. 95% des marqueurs roulés ont amplifié pour au moins 70% des échantillons de la plaque.

Le génotypage par cartographie fine s'est effectué sur un appareil LI-COR Gene ReadIR 4200. La réaction d'amplification par PCR a été faite en préparant un mélange suivant les proportions suivantes: 4,62 μL d'eau de qualité HPLC, 1,60 μL de dNTP (1,25 mM), 1,00 μL de tampon à PCR 10X additionné de magnésium (15 mM), 0,60 μL de magnésium (25 mM), 0,14 μL d'enzyme AmpliTaq (1000 u, Applied Biosystems), 0,14 μL de fluorochrome m13 *forward* à émission dans le 800 nm ou le 700 nm (1 pM/μL, LI-COR Biosciences), 0,20 μL d'amorce *forward* dotée d'une queue pour la liaison de la molécule de m13 (20 μM) et 0,20 μL d'amorce *reverse* (20 μM) (AlphaDNA et Invitrogen). Chaque puits a reçu 8,5 μL de mélange et 1,5 μL d'ADN à 40 ng/μL, pour un total de 10,0 μL par puits. Les plaques ont été roulées sur une machine GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) suivant le programme standard suivant: 5 minutes à 92 degrés C, suivi de 35 cycles d'amplification (30 secondes à 94°C, 30 secondes à

55°C, 30 secondes à 72°C), suivi de 5 minutes à 72°C, puis d'une mise à 4°C. Les marqueurs faisant preuve d'une plus grande résistance à l'amplification ont été amplifiés selon le programme MyhCAG doté d'un *hot start*: 5 minutes à 95°C, suivi de cinq cycles de *hot start* (30 secondes à 95°C, 30 secondes à 68°C, 30 secondes à 74°C), suivi de 30 cycles d'amplification (30 secondes à 95°C, 30 secondes à 58°C, 30 secondes à 74°C), puis 7 minutes à 74°C, suivi d'une mise à 4°C.

Cinq µL d'une solution de charge non-commerciale (19 mL de formamide 100%, 800 µL d'EDTA 500 mM pH 8,0, 333 µL de bleu de bromophénol 3%) ont été ajoutés à chacun des puits, suivi d'une dénaturation de dix minutes à 95°C dans un appareil GeneAmp PCR System 9700. Les échantillons ont été conservés sur glace jusqu'à leur dépôt sur un gel de polyacrylamide par des seringues à dépôt sur gel multicanaux Hamilton. Les amplicons ont migré dans le gel à 1500 V, 40 mA, 35 W et 46°C.

Appendice II

Haplotypes incluant les SNPs rs7939948 et rs7107433 typés lors du séquençage des gènes COMMD9 et FLJ45212, respectivement

Appendice III

Accord des coauteurs de l'article

"A novel autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy with quadriceps atrophy
maps to 11p13-p12"

soumis au journal *Brain* le 9 août 2005

Accord des coauteurs

Identification de l'étudiant et du programme :

Jonathan Jarry
Programme de Biologie-moléculaire (2-466-1-0)
Faculté des Études supérieures de l'Université de Montréal

Description de l'article :

Titre :

A novel autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy with quadriceps atrophy maps to 11p12

Auteurs :

J. Jarry, M.F. Rioux, Y. Robitaille, V. Khoury, I. Thiffault, M. Tétreault, L. Loisel, J.F. Boichard, B. Brass

Journal et date de soumission :

Envis. pour être soumis le 5 juillet 2005

Déclaration des coauteurs :

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Jonathan Jarry inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre «Caractérisation génétique d'un effet fondateur du sud-ouest du Québec : une nouvelle forme de dystrophie musculaire des ceintures».

MARIE-FRANCE RIUX		2005/07/07
Coauteur		Date

	Signature	Date
Coauteur		Date

	Signature	Date
Coauteur		Date

	Signature	Date
Coauteur		Date

	Signature	Date
Coauteur		Date

Accord des coauteurs

Identification de l'étudiant et du programme :

Jonathan Jarry
Programme de Biologie moléculaire (2-466-1-0)
Faculté des Études supérieures de l'Université de Montréal

Description de l'article :

Titre :

A novel autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy with quadriceps atrophy maps to 11p13-p12

Auteurs :

J. Jarry, M.F. Rioux, Y. Robitaille, V. Khoury, I. Thiffault, M. Tétreault, L. Loisel, M. Vanasse, G. Karpati, B. Brais.

Journal et date de soumission :

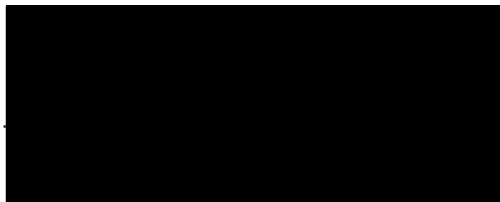
Brain, pour être soumis le 23 juin 2005.

Déclaration des coauteurs :

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Jonathan Jarry inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre «Caractérisation génétique d'un effet fondateur du sud-ouest du Québec : une nouvelle forme de dystrophie musculaire des ceintures ».

Viviane Khoury

Coauteur



10 Juin 2005

Date

.....
Coauteur

.....
Signature

.....
Date

.....
Coauteur

.....
Signature

.....
Date

.....
Coauteur

.....
Signature

.....
Date

.....
Coauteur

.....
Signature

.....
Date

Accord des coauteurs

Identification de l'étudiant et du programme :

Jonathan Jarry
Programme de Biologie moléculaire (2-466-1-0)
Faculté des Études supérieures de l'Université de Montréal

Description de l'article :

Titre :

A novel autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy with quadriceps atrophy maps to 11p13-p12

Auteurs :

J. Jarry, M.F. Rioux, Y. Robitaille, V. Khoury, I. Thiffault, M. Tétreault, L. Loisel, J.P. Bouchard, B. Brais.

Journal et date de soumission :

Brain, pour être soumis le 5 juillet 2005.

Déclaration des coauteurs :

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Jonathan Jarry inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre «Caractérisation génétique d'un effet fondateur du sud-ouest du Québec : une nouvelle forme de dystrophie musculaire des ceintures».

YVES ROBITAILLE <i>md.</i>		05/07/07
Coauteur		Date

	Signature	Date
Coauteur		

	Signature	Date
Coauteur		

	Signature	Date
Coauteur		

	Signature	Date
Coauteur		

Accord des coauteurs

Identification de l'étudiant et du programme :

Jonathan Jarry
Programme de Biologie moléculaire (2-466-1-0)
Faculté des Études supérieures de l'Université de Montréal

Description de l'article :

Titre :

A novel autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy with quadriceps atrophy maps to 11p13-p12

Auteurs :

J. Jarry, M.F. Rioux, Y. Robitaille, V. Khoury, I. Thiffault, M. Tétreault, L. Loisel, J.P. Bouchard, B. Brais.

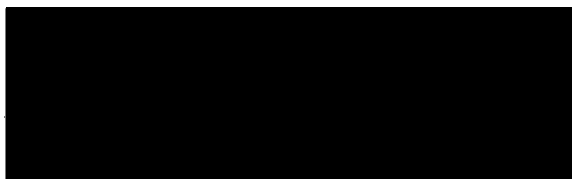
Journal et date de soumission :

Brain, pour être soumis le 5 juillet 2005.

Déclaration des coauteurs :

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Jonathan Jarry inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre «Caractérisation génétique d'un effet fondateur du sud-ouest du Québec : une nouvelle forme de dystrophie musculaire des ceintures ».

Isabelle Thiffault
.....
Coauteur



4/7/05
.....
Date

.....
Coauteur Signature Date

.....
Coauteur Signature Date

.....
Coauteur Signature Date

.....
Coauteur Signature Date

Accord des coauteurs

Identification de l'étudiant et du programme :

Jonathan Jarry
Programme de Biologie moléculaire (2-466-1-0)
Faculté des Études supérieures de l'Université de Montréal

Description de l'article :

Titre :

A novel autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy with quadriceps atrophy maps to 11p13-p12

Auteurs :

J. Jarry, M.F. Rioux, Y. Robitaille, V. Khoury, I. Thiffault, M. Tétreault, L. Loisel, J.P. Bouchard, B. Brais.

Journal et date de soumission :

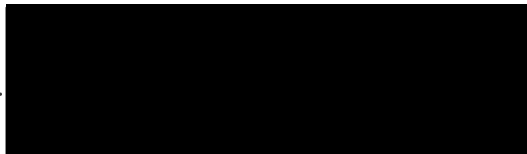
Brain, pour être soumis le 5 juillet 2005.

Déclaration des coauteurs :

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Jonathan Jarry inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre «Caractérisation génétique d'un effet fondateur du sud-ouest du Québec : une nouvelle forme de dystrophie musculaire des ceintures ».

Martine Tétreault

Coauteur



06.07.05

Date

.....
Coauteur

.....
Signature

.....
Date

.....
Coauteur

.....
Signature

.....
Date

.....
Coauteur

.....
Signature

.....
Date

.....
Coauteur

.....
Signature

.....
Date

Accord des coauteurs

Identification de l'étudiant et du programme :

Jonathan Jarry
Programme de Biologie moléculaire (2-466-1-0)
Faculté des Études supérieures de l'Université de Montréal

Description de l'article :

Titre :

A novel autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy with quadriceps atrophy maps to 11p13-p12

Auteurs :

J. Jarry, M.F. Rioux, Y. Robitaille, V. Khoury, I. Thiffault, M. Tétreault, L. Loisel, M. Vanasse, G. Karpati, B. Brais.

Journal et date de soumission :

Brain, pour être soumis le 23 juin 2005.

Déclaration des coauteurs :

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Jonathan Jarry inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre «Caractérisation génétique d'un effet fondateur du sud-ouest du Québec : une nouvelle forme de dystrophie musculaire des ceintures ».

LINA LOISEL 2005/06/07
Coauteur Date

.....
Coauteur Signature Date

.....
Coauteur Signature Date

.....
Coauteur Signature Date

.....
Coauteur Signature Date

Accord des coauteurs

Identification de l'étudiant et du programme :

Jonathan Jarry
Programme de Biologie moléculaire (2-466-1-0)
Faculté des Études supérieures de l'Université de Montréal

Description de l'article :

Titre :

A novel autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy with quadriceps atrophy maps to 11p13-p12

Auteurs :

J. Jarry, M.F. Rioux, Y. Robitaille, V. Khoury, I. Thiffault, M. Tétreault, L. Loisel, J.P. Bouchard, B. Brais.

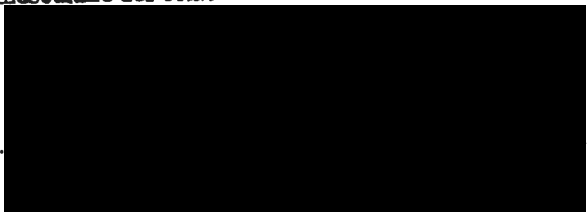
Journal et date de soumission :

Brain, pour être soumis le 5 juillet 2005.

Déclaration des coauteurs :

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Jonathan Jarry inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre «Caractérisation génétique d'un effet fondateur du sud-ouest du Québec : une nouvelle forme de dystrophie musculaire des ceintures».

JEAN-PIERRE BOUCHARD M.D.
Coauteur



04/07/2005
Date

.....
Coauteur Signature Date

.....
Coauteur Signature Date

.....
Coauteur Signature Date

.....
Coauteur Signature Date

Accord des coauteurs

Identification de l'étudiant et du programme :

Jonathan Jarry
Programme de Biologie moléculaire (2-466-1-0)
Faculté des Études supérieures de l'Université de Montréal

Description de l'article :

Titre :

A novel autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy with quadriceps atrophy maps to 11p13-p12

Auteurs :

J. Jarry, M.F. Rioux, Y. Robitaille, V. Khoury, I. Thiffault, M. Tétreault, L. Loisel, J.P. Bouchard, B. Brais.

Journal et date de soumission :

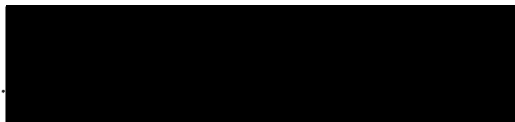
Brain, pour être soumis le 5 juillet 2005.

Déclaration des coauteurs :

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Jonathan Jarry inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre «Caractérisation génétique d'un effet fondateur du sud-ouest du Québec : une nouvelle forme de dystrophie musculaire des ceintures ».

Bernard BRAIS

Coauteur



05-07-07

Date

.....
Coauteur

.....
Signature

.....
Date

.....
Coauteur

.....
Signature

.....
Date

.....
Coauteur

.....
Signature

.....
Date

.....
Coauteur

.....
Signature

.....
Date

