



**UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH**  
**FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES**  
**DEPARTEMENT DE BIOLOGIE**



**Projet de Fin d'Etudes**

**Licence Sciences & Techniques**  
**Sciences Biologiques Appliquées et Santé**  
**(LST - SBAS)**

***Diagnostic moléculaire des myopathies :***  
***(l'amyotrophie spinale infantile)***

**Présenté par : SADOQ Badr-Edine**

**Encadré par : Pr : SQALLI HOUSSAINI Hakima (FSTF)**

**Pr : OULDIM Karim (CHUF)**

**Soutenu le : 09/06/17**

**Devant le jury composé de :**

- Pr : SQALLI HOUSSAINI Hakima
- Pr : GUISSI Sanae (FSTF)
- Pr : OULDIM Karim

**Stage effectué à : l'unité de Génétique Médicale et d'oncogénétique, Centre  
Hospitalier Universitaire Hassan II Fès.**

**Année universitaire 2016-2017**

# *Dédicaces*

## *A mes très chers parents*

*A ceux que j'aime le plus au monde, A ceux qui m'ont tout donné sans compter.*

*Vous avez été pour moi tout au long de mes études le plus grand symbole d'amour de dévouement qui n'a ni cessé ni diminué.*

*En ce jour, j'espère réaliser l'un de vos rêves, et j'espère ne jamais vous décevoir, ni trahir votre confiance.*

*Que dieu vous garde et procure santé, bonheur, et longue vie pour que vous demeuriez le flambeau illuminant le chemin de vos enfants.*

## *A toute ma famille*

*Je vous dédie ce travail en vous souhaitant tout le bonheur du monde.*

## *A mes amis (es) et ceux qui me sont chers*

*Je vous dédie ce travail avec mes sentiments les plus sincères, en mémoire de tous les moments agréables vécus ensemble.*

# Remerciements

Au terme de ce travail, il m'est agréable de remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce mémoire.

**Pr. SQALLI HOUSSAINI Hakima**, Je la remercie d'avoir accepté d'encadrer ce travail, et de me faire part de son expérience. Les résultats de ce travail doivent beaucoup aux exigences de sa rigueur scientifique, à ses orientations, et à son talent pédagogique. C'est pour moi, l'opportunité de lui exprimer ma profonde reconnaissance et mes vifs remerciements pour son esprit ouvert et ses conseils précieux. Je ne saurais exprimer ma reconnaissance, certes, car sa bonté est indescriptible.

**Pr. GUISSI Sanae**, Je vous remercie, Mme, infiniment d'avoir accepté de juger ce travail Qu'il me soit permis de vous exprimer mon estime et ma sincère reconnaissance.

**Pr. OULDIM Karim**, responsable de l'Unité de génétique médicale et d'oncogénétique au Centre hospitalier Hassan II (CHU) de Fès, (au service de Laboratoire). Je le remercie pour sa gentillesse, sa sympathie. Son dynamisme, et ses qualités humaines qui ont suscité en moi une grande admiration et un profond respect.

Mes remerciements vont aussi à tous le personnel de l'unité de génétique médicale et d'oncogénétique au centre hospitalier Hassan II, spécialement Mme **BOUGUENOUCHE Laila**, Mme **SAYEL Hanane**, Mlle **Meryem** et Mr **AHKOUD Mohamed** pour leur accueil chaleureux, leur gentillesse et pour la disponibilité dont ils ont fait constamment preuve envers moi personnellement et envers tous les autres stagiaires du centre.

# Listes des figures

<b>Figures</b>	<b>Page</b>
<b>Figure 1 : Les trois types de tissus musculaires</b>	<b>2</b>
<b>Figure 2 : Structure de la dystrophine</b>	<b>4</b>
<b>Figure 3 : localisation du motoneurone de la corne antérieure de la moelle épinière</b>	<b>5</b>
<b>Figure 4 : structure du gène Survival Motor Neuron (SMN)</b>	<b>7</b>
<b>Figure 5 : Tracé EMG montrant une contraction chez un patient atteints de dystrophie musculaire</b>	<b>9</b>
<b>Figure 6 : Sexe ratios des patients atteints de l'amyotrophie spinale infantile dans quelque pays</b>	<b>18</b>
<b>Figure 7 : Pourcentage de consanguinité chez les parents des patients atteints de SMA</b>	<b>18</b>
<b>Figure 8 : Profil de l'électrophorèse sur gel d'agarose des patients 1, 2, 3, 4 et 5</b>	<b>20</b>
<b>Figure 9 : Profil de l'électrophorèse sur gel d'agarose des patients 6, 7 et 8</b>	<b>20</b>

# Liste des Tableaux

Tableau	Page
<b>Tableau 1 : Répartition des patients selon le sexe et l'âge.</b>	<b>10</b>
<b>Tableau 2 : Solutions nécessaires pour l'extraction de l'ADN par sel</b>	<b>12</b>
<b>Tableau 3 : Donnés sur les amorces utilisées pour l'amplification du gène SMN</b>	<b>14</b>
<b>Tableau 4 : Conditions expérimentales pour la réaction PCR du gène SMN</b>	<b>14</b>
<b>Tableau 5 : Cycle de température du programme PCR du gène SMN</b>	<b>15</b>
<b>Tableau 6 : Préparation du milieu de digestion par l'enzyme Dra I</b>	<b>16</b>
<b>Tableau 7 : Nombre de cas par tranche</b>	<b>17</b>
<b>Tableau 8 : Répartition des patients selon le sexe</b>	<b>17</b>
<b>Tableau 9 : Fréquence de la consanguinité chez les parents des patients atteints de l'ASI</b>	<b>19</b>
<b>Tableau 10 : Rapport <math>DO_{260}/DO_{280}</math> et la concentration d'ADN des patients</b>	<b>19</b>
<b>Tableau 11 : Fréquences de la délétion du gène SMN dans quelques pays</b>	<b>21</b>

# *Liste des abréviations*

**ADN : Acide Désoxyribonucléique**

**ASI : Amyotrophie spinale infantile**

**BET : Bromure d'Ethidium**

**CHU : Centre Hospitalier Universitaire**

**CPK : Créatine Phosphokinase**

**DMB : Dystrophie Musculaire de Becker**

**DMD : Dystrophie Musculaire de Duchenne**

**dNTP : Désoxyribonucléotides triphosphate**

**DO : Densité Optique**

**EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique**

**EMG : Electromyogramme**

**pb : paire de base**

**PCR : Réaction de polymérisation en chaine**

**SDS : Sodium Dodecyl Sulfate**

**SMA : Spinal Muscular Amyotrophy**

**SMN : Survival Motor Neuron**

**SMN1 ou SMNt : Partie télomérique du gène SMN**

**SMN2 ou SMNc : Partie centromérique du gène SMN**

**TBE : Tris Buffered EDTA**

**TE : Tris-EDTA**

**UV : Ultraviolet**

# Sommaire

	Page
<b>Introduction générale</b>	1
<b>Partie 1 : Généralité</b>	
<b>A- GENERALITES SUR LE TISSU MUSCULAIRE</b>	2
1- STRUCTURE DU TISSU MUSCULAIRE	2
2- FONCTION DU TISSU MUSCULAIRE	3
<b>B- HISTORIQUE DE LA MALADIE (MYOPATHIE)</b>	3
<b>C- FORMES CLINIQUES</b>	4
1- DYSTROPHINOPATHIE	4
1-1- Dystrophie musculaire de Duchenne	4
1-2- Dystrophie musculaire de Becker	5
2- AMYOTROPHIE SPINALE INFANTILE	5
2-1- Classification	6
2-2- Gène SMN	7
2-3- Protéine SMN	7
2-4- Diagnostic moléculaire	7
2-5- Autres éléments de diagnostic	8
a- Créatine phosphokinase	8
b- Electromyogramme	9
c- Biopsie musculaire	9
2-6- Facteur de risque : (Consanguinité)	
<b>Partie 2 : Matériel et méthodes</b>	
<b>A- MATERIEL ANALYSE</b>	10
1- ECHANTILLONNAGE DES PATIENTS EXAMINES	10
2- STRATEGIE DE TRAVAIL	10
<b>B- METHODES</b>	11
1- PRELEVEMENT SANGUIN ET CONSERVATION	11
2- EXTRACTION D'ADN PAR SEL	11

3- DOSAGE DE L'ADN EXTRAIT	13	
4- AMPLIFICATION DE L'ADN EXTRAIT PAR PCR	13	
5- RFLP : ENZYME DE RESTRICTION DRA I	15	
6- VISUALISATION DU PRODUIT PCR PAR ELECTROPHORESE	16	
<b>Partie 3 : Résultats est discussion</b>		
<b>A- ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE</b>	17	
1- REPARTITION DES PATIENTS SELON L'AGE ET LE SEXE	17	
2- CONSANGUINITE CHEZ LES PARENTS	18	
<b>B- ETUDE MOLECULAIRE</b>	19	
1- DOSAGE DE L'ADN EXTRAIT	19	
2- REACTION DE POLYMERISATION EN CHAINE (PCR-RFLP)	20	
<b>Conclusion générale</b>		22
<b>Références bibliographiques</b>		

# *Présentation de l'établissement*

Le Laboratoire Central d'Analyses Médicales est situé au bâtiment J de la première tranche, et conçu comme un pôle d'activité hospitalière comportant plusieurs spécialités d'analyses médicales. Ce bâtiment comprend :

- ◆ Une salle de réception.
- ◆ Une salle de prélèvement.
- ◆ Plusieurs laboratoires, à savoir.
  - ♣ Anatomie pathologique.
  - ♣ Biologie Moléculaire.
  - ♣ Immunohistochimie.
  - ♣ Cytogénétique et Oncogénétique.
  - ♣ Hématologie cytologique et Hémostase.
  - ♣ Bactériologie et Parasitologie.
  - ♣ Immunologie et sérologie.
  - ♣ Anatomie et pathologie.

L'unité de génétique médicale et d'oncogénétique UGMO, représente une première expérience dans un CHU au MAROC, elle est activement mise en place depuis sa création en Mars 2009.



L'unité de génétique médicale et d'oncogénétique est subdivisée en trois disciplines qui assurent des activités variées :

- Génétique clinique (activité clinique)
  - Consultation de génétique (au centre du diagnostic)
  - Conseil génétique (au centre du diagnostic)
  - Consultation d'oncogénétique (au centre du diagnostic)
  - Avis du médecin généticien dans les services cliniques
  - Hôpital de jour (en coordination avec les services cliniques)
- Génétique chromosomique (analyse des chromosomes)
  - Cytogénétique classique (caryotype).
  - Cytogénétique moléculaire (FISH : Hybridation In Situ en Fluorescence).
- Génétique moléculaire (analyse des gènes)
  - Amplification de gène par PCR.
  - Séquençage.
  - Electrophorèse...

La myopathie est une maladie génétique à transmission récessive liée au chromosome X. Elle regroupe un ensemble de maladies touchant les muscles. Les formes de cette maladie sont : la Dystrophinopathie, caractérisée par une dégénérescence progressive des cellules musculaires, et l'amyotrophie spinale infantile, caractérisée par une dégénérescence primaire des cellules de la corne antérieure de la moelle épinière, entraînant une faiblesse musculaire.

Les Dystrophinopathies représentées essentiellement par la dystrophie musculaire de Duchenne et Bougonne (DMD) et de Becker (BMD), constituent la cause la plus fréquente des myopathies de l'enfant de sexe masculin.

L'amyotrophie spinale infantile (ASI) est une maladie autosomique récessive, due à une anomalie génétique située dans le gène *SMN1* sur le chromosome 5. Cette anomalie entraîne l'absence de production de la protéine de survie des motoneurones SMN " Survival of Motor Neuron" ainsi qu'une dégénérescence des cellules nerveuses, les motoneurones, qui transmettent l'ordre de mouvement aux muscles.

C'est une affection grave. C'est la cause la plus fréquente de décès d'origine génétique chez les enfants avec une incidence de 1 sur 6000 naissances vivantes (Hamilton et Gillingwater, 2013). Selon l'âge de début des symptômes, quatre types des amyotrophies spinales sont caractérisés.

L'ASI est associée à une délétion homozygote du gène SMN (Survival Motor Neuron) localisée sur le chromosome 5 (5q13). Ce gène se présente sous deux formes alléliques SMN1 et SMN2 et code une protéine appelée SMN.

Le diagnostic d'amyotrophie spinale peut donc être facilement confirmé par la détection directe d'une délétion homozygote de l'exon 7 du gène SMN.

La présente étude de l'amyotrophie spinale infantile portera donc sur une série de huit patients au sein du laboratoire de Génétique Médicale et d'Oncogénétique du CHU de Fès, durant la période de Avril - Mai 2017.

L'objectif de ce travail est détecter la présence ou l'absence d'une délétion homozygote de l'exon 7 du gène SMN chez ces patients, par l'utilisation des techniques de biologie moléculaire.

## A- GENERALITES SUR LE TISSU MUSCULAIRE

### 1- STRUCTURE DU TISSU MUSCULAIRE

Le tissu musculaire est un ensemble des cellules (fibres musculaires) d'un organisme, ayant des propriétés contractiles. La contraction musculaire, assurée par les fibres musculaires, réalise une transformation de l'énergie chimique en énergie mécanique, permettant ainsi la locomotion et l'exécution des mouvements des différentes parties du corps.

Il existe trois types de tissus musculaires, ces tissus diffèrent par leurs localisations, leurs structures microscopiques, et leurs fonctions (Mader, 2010 ; Lullmann-Rauch, 2008 ; Coujard *et al.*, 1980).

- **Le Tissu musculaire myocardique** : est présent seulement dans le cœur et il constitue la majeure partie de sa paroi (Figure 1A).

La contraction est involontaire sous contrôle du système nerveux autonome(SNA).

- **Le Tissu musculaire squelettique ou strié** (Figure 1B) : la contraction du tissu musculaire squelettique est surtout volontaire, car elle peut être commandée par les neurones du système nerveux périphérique (SNP). Sa contraction est rapide, puissante et de courte durée.

- **Le Tissu musculaire lisse** : se trouve dans la paroi des viscères (Intestin, vessie et d'autres organes internes sauf le cœur) et des vaisseaux sanguins (Figure 1C). Ce sont des muscles involontaires qui permettent le déplacement des substances dans les différentes voies de l'organisme.

La réponse du tissu musculaire lisse est plus lente et sa contraction est prolongée.



Figure 1 : Les trois types de tissus musculaires.

## 2- FONCTIONS DU TISSU MUSCULAIRE

Le tissu musculaire remplit quatre fonctions clés (Tartora *et al.*, 2017) :

- **La production des mouvements du corps** : comme courir, marcher, et hocher la tête ;
- **La stabilisation des articulations** : les contractions des muscles squelettiques stabilisent les articulations et contribuent, avec les ligaments, à les renforcer lors des mouvements ;
- **Le stockage de substances dans l'organisme** : est possible grâce à la contraction continue de muscles circulaires lisses. La contraction des muscles lisses permet le déplacement de la nourriture. La contraction du muscle cardiaque propulse le sang dans tous les vaisseaux du corps et les muscles squelettiques favorisent le retour du sang des veines au cœur ;
- **La production de chaleur** : lorsque le tissu musculaire se contracte, il produit de la chaleur. Ce processus est nommé thermogénèse. Une grande partie de la chaleur libérée sert à maintenir la température normale de l'organisme.

## B- HISTORIQUE DE LA MALADIE (MYOPATHIE)

Les maladies musculaires, appelées encore myopathies, correspondent à une atteinte de la cellule musculaire elle-même.

La myopathie est une maladie génétique. Elle est due à une anomalie (ou mutation) d'un gène nécessaire au bon fonctionnement des muscles ou à leur développement. Lorsque ce gène est muté, les muscles ne peuvent plus se contracter normalement, ils perdent leur vigueur et s'atrophient.

Vers 1851, l'histoire de cette maladie commence, avec les travaux de Duchenne de Boulogne. La découverte de la myopathie coïncide avec la naissance des affections musculaires.

En 1868, la dystrophie musculaire de Duchenne de Boulogne DMD est décrite, et représente la maladie musculaire génétiquement déterminée la plus fréquente. C'est l'une des plus sévères chez l'Homme. Sa forme la moins sévère, rapportée par Becker (BMD) en 1955, se caractérise par un début durant l'enfance ou l'adolescence, et une transmission récessive, liée au chromosome X (Gower, 1879 ; Porte *et al.*, 2010).

En 1891, Guido Werdnig rapporte les deux premiers cas d'une atrophie musculaire progressive, maladie familiale à laquelle il donne alors son nom (Werdnig, 1891).

Entre 1893 et 1900, Johann Hoffmann décrit quatre autres cas d'atrophie musculaire progressive. Il établit l'origine médullaire de la maladie et lui attribue son nom. Elle est devenue depuis la maladie de Werdnig-Hoffmann (Hoffmann, 1889).

## C- FORMES CLINIQUES

### 1- DYSTROPHINOPATHIE

#### 1-1- Dystrophie musculaire de Duchenne

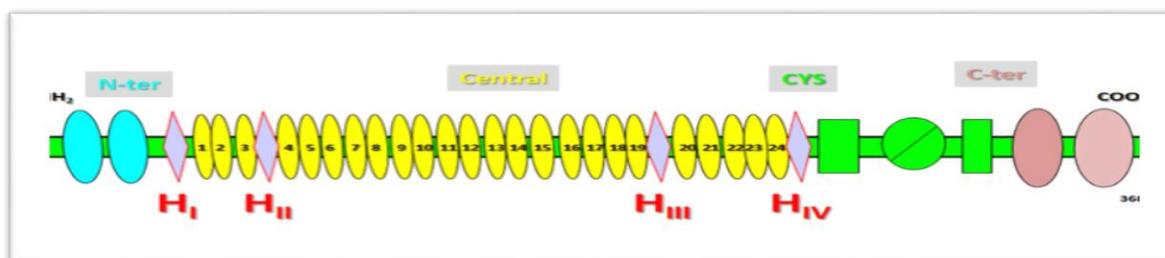
La Dystrophinopathie musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie d'origine génétique qui touche l'ensemble des muscles de l'organisme (muscles squelettiques, muscles cardiaques et certains muscles lisses).

C'est une maladie génétique due à des anomalies dans le gène *DMD* qui code la dystrophine. La dystrophine est une protéine présente sous la membrane cellulaire de toutes les fibres musculaire.

Cette maladie est héréditaire et se transmet sur le mode récessif lié au chromosome X. Le gène responsable de la mutation est situé sur le chromosome sexuel X et la maladie se transmet par les femmes. Seuls les garçons sont atteints sauf quelques exceptions rares. (Fournier, 2013)

La dystrophine se trouve sur la face cytoplasmique de la membrane plasmique. Elle est liée à cette membrane par une glycoprotéine membranaire intégrale. Sa chaîne polypeptidique se replie en quatre domaines différents (Figure 2) :

- un domaine N-terminal de la dystrophine constitue le domaine de liaison à l'actine.
- Le second domaine se compose de 24 répétitions en tandem qui donnent sa forme de bâtonnet à la dystrophine.
- Le troisième domaine est riche en cystéines et se lie à la  $\beta$ -dystroglycane. En effet c'est la  $\beta$ -dystroglycane qui fait le pont transmembranaire entre les protéines intracellulaires et extracellulaires.
- Le quatrième domaine, positionné en C-terminal, sert de domaine de liaison à d'autres membres du complexe (Pasternak, 2003).



## 1-2- Dystrophie musculaire de Becker

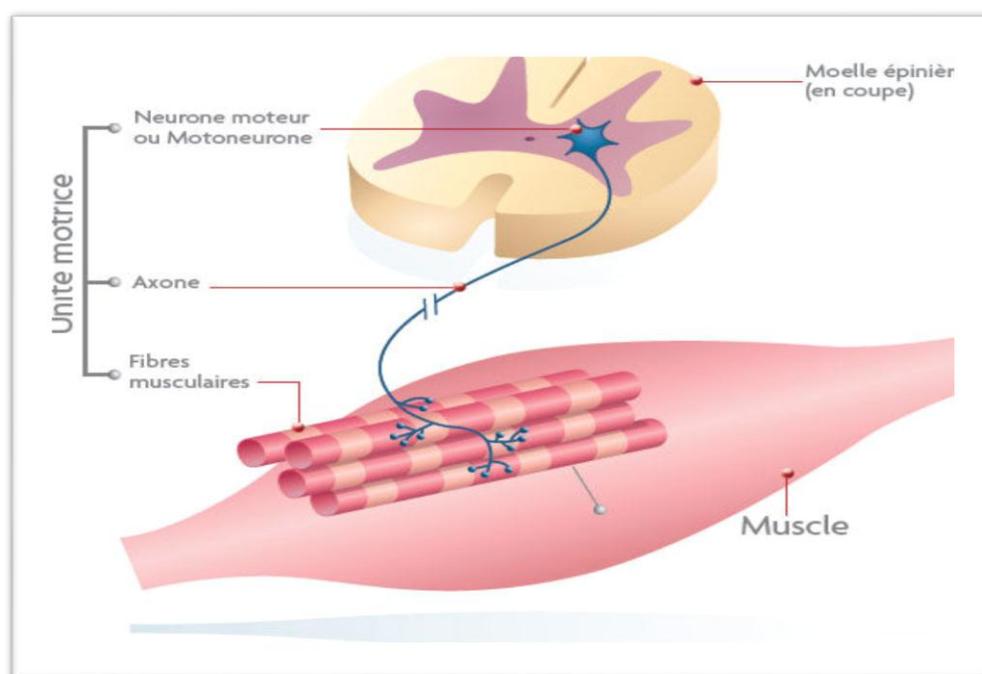
La dystrophie musculaire de Becker (DMB) est une maladie neuromusculaire, caractérisée par une atrophie et une faiblesse musculaire progressive dues à une dégénérescence des muscles squelettiques, lisses et cardiaques.

La maladie de Becker est liée à des mutations dans le gène DMD sur le chromosome X. Ceci entraîne un déficit partiel en protéine dystrophine et /ou une production d'une dystrophine de taille anormale. Cette maladie se transmet sur le mode récessif lié au chromosome X. Seuls les hommes ayant une anomalie sur le gène DMD sont atteints (Fournier, 2013).

## 2- AMYOTROPHIE SPINALE INFANTILE

Les amyotrophies spinales sont des maladies neuromusculaires rares, d'origine génétique, Elles sont dues à des anomalies de l'ADN (mutations). Elles touchent les motoneurones périphériques.

Un motoneurone est un neurone (cellule nerveuse) transmettant les ordres de motricité (sous forme d'influx nerveux) du cerveau et de la moelle épinière vers les muscles qui effectuent le mouvement commandé. (Figure 3)



**Figure 3 : localisation du motoneurone de la corne antérieure de la moelle épinière.**

L'amyotrophie spinale proximale est caractérisée par la dégénérescence des motoneurones alpha de la corne antérieure de la moelle épinière à l'origine d'un déficit

progressif de la force musculaire et d'une amyotrophie, sans atteinte sensitive, ni cognitive, ni des voies longues.

Ce dérèglement est secondaire à une délétion homozygote au niveau d'un gène situé sur le bras long du chromosome 5. Ce gène appelé "Survival Motor Neuron" (SMN) code une protéine SMN dont le niveau d'expression est fortement réduit dans les motoneurons et les fibres musculaires d'enfants atteints de la forme sévère de SMA "Spinal Muscular Atrophy". (Michel Mercier *et al.*, 2016)

## **2-1- Classification**

Les amyotrophies spinales peuvent être regroupées en quatre groupes : deux types d'amyotrophie infantile (type I et II), un type d'amyotrophie spinale juvénile (type III) et un type d'amyotrophie spinale de l'adulte (type IV) (Munsat, 1991 ; Mercier *et al.*, 2016).

- **L'amyotrophie spinale de type I** : aussi appelée "maladie de Werdnig-Hoffman", apparaît lorsque le bébé a moins de six mois et parfois même avant qu'il ne naisse. Le bébé présente une grande hypotonie et peut éprouver des difficultés pour téter et avaler. Il peut développer par contre des graves problèmes respiratoires qui pourront engager son pronostic vital ;

- **L'amyotrophie spinale de type II** : apparaît entre six et 18 mois et se remarque par une faiblesse et une atrophie de la masse musculaire qui touche surtout les muscles du tronc et des jambes. La plupart des bébés pourront s'asseoir et tenir leur tête droite. Les rétractions sont généralement fréquentes et sévères, celles-ci risquent de compromettre le potentiel musculaire à plus long terme ;

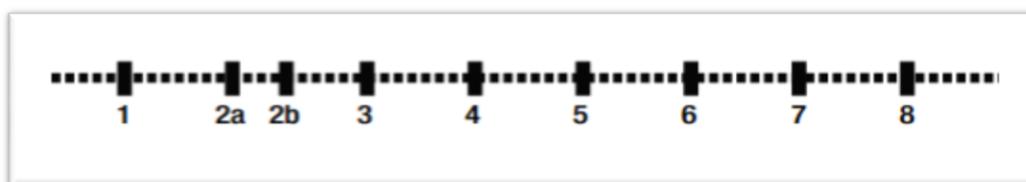
- **L'amyotrophie spinale de type III** : aussi nommée "Amyotrophie spinale juvénile" ou encore "maladie de Kugelberg-Welander", apparaît après 18 mois, et généralement à partir de l'âge de 3-4 ans, parfois plus tard. L'enfant présentera alors une démarche dandinante plus ou moins gênante ;

- **L'amyotrophie spinale de type IV** : apparaît à l'âge adulte, Elle se manifeste par une paralysie progressive des muscles des membres inférieurs. Elle peut occasionner par la suite, dans certains cas, des troubles respiratoires. Elle est cependant plus rare que les formes 1(33% des cas d'amyotrophie spinale) et 2 (45% des cas).

## 2-2- Gène SMN

Ce gène déterminant l'apparition de la SMA, est également appelé SMNt (ou SMN1) pour le différencier de sa copie centromérique, SMNc (ou SMN2) (Lefebvre *et al.*, 1995). C'est un petit gène de 20 Kpb et de 9 exons (Exons 1, 2a, 2b, 3, 4, 5, 6, 7 et 8) (Figure 4), Il code une protéine de 32 kDa (294 acides aminés). Le gène SMN1 est modifié (absent ou tronqué) chez 95% des malades toutes formes confondues. Il est toujours présent dans une population contrôle. Le gène SMN 1 diffère de sa copie centromérique SMNc (ou SMN 2) par cinq bases dont deux sont situées sur l'exon 7 (Monani *et al.*, 1999). La copie SMN2 n'est présente que dans 95% d'une population contrôle. Cette copie peut être présente sans empêcher la maladie lorsque SMN1 est tronqué. Elle peut être tronquée sans entraîner la maladie lorsque SMN1 est présent. Les deux gènes ne sont jamais absents simultanément chez un individu.

L'absence simultanée du gène SMN1 et de sa copie centromérique, SMN2, est probablement létale. (Leonard, 2016)



**Figure 4 : Structure du gène Survival Motor Neuron (SMN) (Belaid A, 2006).**

## 2-3- Protéine SMN

La SMN est une protéine de petite taille (38 kDa) comportant 294 acides aminés. Elle ne possède aucune homologie significative avec des protéines déjà connues (Lefebvre *et al.*, 1995). Elle est codée par le gène SMN1 et sa copie centromérique SMN2 (Coover *et al.*, 1997). La SMN2, subissant un épissage alternatif, donne lieu à deux types de transcrits dont l'un ne possède pas l'exon 7. Il en résulterait une protéine proche de SMN ne différant d'elle que par son extrémité "C-terminale" (Lefebvre *et al.*, 1995).

## 2-4- Diagnostic moléculaire

### a- Indications

Le test est indiqué chez tout enfant ou adulte qui présente le phénotype de la maladie.

### **b- Principe**

Le gène SMN étant connu et cloné, le diagnostic consiste à mettre en évidence la lésion moléculaire grâce à l'étude de l'ADN extrait.

### **c- Technique**

Le procédé le plus couramment employé pour le diagnostic génétique moléculaire de la SMA est l'amplification en chaîne in vitro ou la " polymérase Chain réaction " (PCR) du gène. C'est actuellement la méthode la plus rapide, la plus simple et la plus sensible pour rechercher sur un gène identifié et séquencé, une mutation ponctuelle ou une micro-délétion. La PCR consiste à amplifier la région du gène, siège éventuel du remaniement, à l'aide d'amorces oligonucléotidiques. Après digestion par une enzyme de restriction (Dra I), reconnaissant spécifiquement le gène SMN dans sa copie normale, une électrophorèse en gel d'acrylamide permet ensuite de différencier un allèle normal d'un allèle délété grâce à la visualisation des fragments d'ADN par fluorescence en présence d'un intercalant (bromure d'ethidium).

### **d- Confirmation du diagnostic**

Le diagnostic est confirmé lorsqu'on observe dans le gène SMN1 une délétion homozygote SMN1. Une délétion hétérozygote SMN1 n'élimine pas le diagnostic et nécessite la recherche d'une mutation ponctuelle.

## **2-5- Autres éléments de diagnostic**

### **a- Créatine phosphokinase**

La créatine est une substance, contenant de l'azote, présent dans l'organisme et jouant un rôle dans la contraction musculaire. Elle est synthétisée à partir d'acides aminés, puis transformée dans le tissu musculaire par la créatine kinase.

La créatine kinase est une enzyme que l'on trouve essentiellement dans les muscles, et qui intervient dans la mise en réserve de l'énergie par un mécanisme appelé phosphorylation de la créatine.

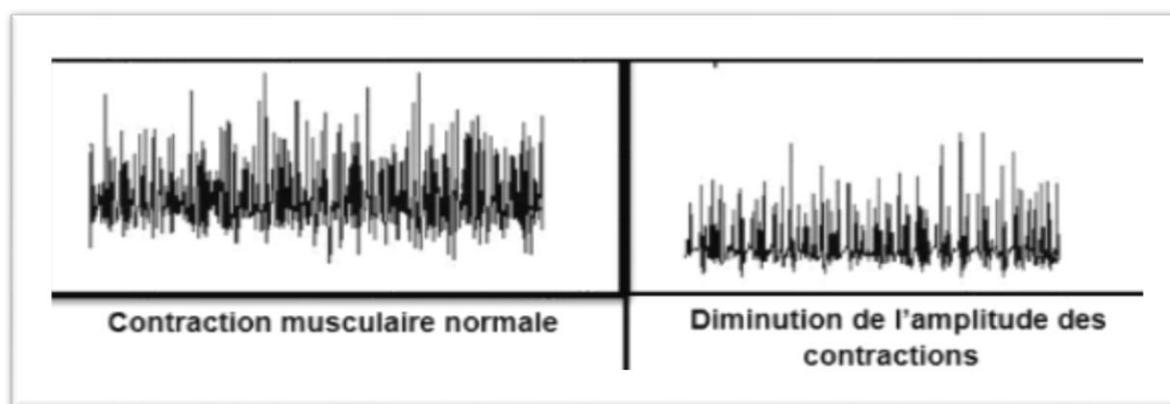
La phosphorylation de la créatine, se nomme également créatine phosphokinase ou CPK. Les CPK sont des enzymes musculaires qui se trouvent naturellement à l'intérieur des fibres (ou cellules) musculaires et, à de très faibles taux, dans le sang. Une augmentation du taux des CPK dans le sang signifie qu'il y a une sortie de ces enzymes de l'intérieur vers l'extérieur des cellules (dans le sang).

Lorsque les cellules musculaires "souffrent", elles ont tendance à libérer dans la circulation sanguine une grande quantité de créatine kinase. C'est le cas dans les myopathies. Dans la dystrophie musculaire de Duchenne, le taux de CPK est souvent très augmenté.

### **b- Electromyogramme**

L'électromyogramme (EMG) est un examen qui permet d'étudier l'activité électrique des muscles au repos et durant la contraction. L'étude de la contraction nerveuse mesure à quel point et à quelle rapidité les nerfs peuvent envoyer des signaux électriques. L'analyse de l'activité électrique des muscles et des nerfs est utile pour diagnostiquer les maladies.

Dans la dystrophie musculaire, le tracé électromyographique oriente vers une atteinte musculaire (tracé myopathique).



**Figure 5 : Tracé EMG montrant une contraction chez un patient atteints de dystrophie musculaire.**

### **c- Biopsie musculaire**

La biopsie musculaire est un examen médical qui consiste à prélever, sous anesthésie locale, un petit fragment de tissu musculaire. Ces fragments prélevés sont observés au microscope, c'est un élément essentiel de la démarche diagnostique dans le cadre d'une pathologie musculaire génétique.

## **2-6- Facteur de risque : (Consanguinité)**

La consanguinité augmente le risque que les deux membres d'un couple soient porteurs d'une anomalie génétique au niveau du gène SMN1, et donc le risque de survenue de la maladie dans la famille.

## A- MATERIEL ANALYSE

Ce travail porte sur l'amyotrophie spinale infantile, (ASI) la forme la plus fréquente des myopathies.

### 1- ECHANTILLONNAGE DES PATIENTS EXAMINES

Il s'agit d'une étude portée sur une série de huit patients. Ces patients sont colligés au sein du laboratoire de Génétique Médicale et d'Oncogénétique du CHU de Fès.

Le tableau 1 regroupe les données concernant ces patients.

**Tableau 1 : Répartition des patients selon le sexe et l'âge.**

N°	Sexe	Age
P1	Masculin	1 mois
P2	Masculin	3 mois
P3	Masculin	9 ans
P4	Féminin	2 mois
P5	Masculin	2 ans
P6	Masculin	9 mois
P7	Masculin	10 ans
P8	Féminin	5 ans

### 2- STRATEGIE DE TRAVAIL

Une extraction de l'ADN est d'abord réalisée à partir du sang, suivie de sa quantification par dosage spectrophotométrique. Par la suite, les échantillons sont analysés par PCR "polymérase Chain réaction" pour amplifier le gène recherché.

Après digestion par une enzyme de restriction (Dra I) permettant de reconnaître spécifiquement le gène SMN de sa copie, une électrophorèse en gel d'agarose permet ensuite de différencier un allèle normal d'un allèle deleté grâce à la visualisation des fragments d'ADN par fluorescence en présence d'un intercalant (bromure d'ethydium).

## **B- METHODES**

### **1- PRELEVEMENT SANGUIN ET CONSERVATION**

Pour chaque patient de la série d'étude, un prélèvement de sang veineux de 3 à 5 ml est réalisé dans un tube EDTA (Ethylène Diamine Tétra-acétique acide), puis stocké à -20°C.

### **2- EXTRACTION D'ADN PAR SEL**

#### **2-1- Principe**

L'extraction de l'ADN, est la première étape pour l'analyse et la recherche moléculaire. Elle consiste en l'isolement de l'ADN à partir du sang en quantité suffisante pour permettre son analyse.

La technique utilisée pour l'extraction est une technique classique (extraction d'ADN par sel). Un lavage est d'abord effectué pour éliminer les globules rouges. Les globules blancs restants sont traités par une solution de lyse pour déstabiliser la membrane de la cellule, et par la protéine K pour la digestion des protéines cellulaire. Après la lyse cellulaire, l'ADN est précipité et récupéré sous forme d'une « méduse ».

#### **2-2- Protocole expérimental**

Pour l'extraction de l'ADN, le sang conservé dans le tube EDTA et congelé à -20°C sera utilisé. Il est décongelé juste avant la manipulation.

##### **a- Lyse des globules rouges**

Le sang est récupéré dans un tube de 15 ml, traité avec deux volumes du tampon d'extraction TE 20/5, puis une incubation dans la glace est ensuite réalisée pendant 20 mn. Ces étapes permettent la lyse des globules rouges.

Après incubation et centrifugation à 2500 tr/mn pendant 5 mn. Le surnageant est éliminé.

Les étapes précédentes sont répétées (ajout de deux volumes de TE 20/5, incubation...) jusqu'à obtenir un culot blanc ne renfermant que les globules blancs (Tableau 2).

##### **b- Lyse des globules blancs**

Le culot est suspendu dans 3 ml de SLB (solution de lyse des globules blancs), homogénéisé, puis additionné de 100 µl de protéinase K. Ensuite, une incubation est réalisée à 42°C pendant une nuit sous agitation douce (Tableau 2).

### c- Dénaturation et précipitation des protéines et impuretés

Le lendemain, 4 ml d'eau distillée stérile et 4 ml de NaCl 5 M sont ajoutés .Après homogénéisation, une centrifugation à 3000 tr/mn pendant 30 mn est réalisée (Tableau 2).

### d- Précipitation et lavage de l'ADN

Le surnageant est récupéré dans un nouveau tube de 50 ml, Deux volumes d'éthanol absolu froid sont ajoutés. L'homogénéisation fait apparaitre enfin "la méduse" d'ADN.

La méduse est récupérée dans un tube eppendorf de 1.5 ml, Un lavage à l'éthanol 70% est réalisé et ensuite les traces de l'éthanol sont évaporées (Tableau 2).

Après évaporation, l'ADN est dilué dans 200 µl de TE 10mM/1Mm (Tris-EDTA) et stocké à +4°C pour toute utilisation ultérieure. Pour un stockage prolongé, il est préférable de conserver l'ADN à -20°C.

**Tableau 2 : Solutions nécessaires pour l'extraction de l'ADN par sel.**

Solution utilisées	Réactifs	Volumes	concentration	PH
Lyse des globules rouges	Tris-HCl	20 ml	1 M	7,6
	EDTA disodique	10 ml	0,5 M	8
	Eau distillée			
Lyse des globules blancs	Tris-HCl	10 ml	1 M	7,6
	EDTA disodique	20 ml	0,5 M	8
	SDS	20 ml	10 %	
	NaCl	10 ml	5 M	
Dénaturation et précipitation des protéines	NaCl	4 ml	5 M	
Précipitation de l'ADN et lavage	Ethanol	8	100 %	
	Ethanol	8	75 %	
	Eau distillée	4		
Solution de conservation de la méduse	Tris-HCl	2	1 M	7,6
	EDTA	400 µl	0,5 M	8

### 3- DOSAGE DE L'ADN EXTRAIT

La concentration d'ADN extraite est déterminée par spectrophotométrie. Notons que les protéines absorbent à 280 nm alors que les acides nucléiques absorbent à 260 nm. Une unité de densité optique à 260 nm correspond à 50 µg /ml d'ADN double brin.

Au laboratoire, le "NANODROP" est l'appareil utilisé pour réaliser ce dosage. Il suffit de déposer dans l'appareil 2 µl d'ADN extrait pour déterminer sa concentration et obtenir la courbe qui renseigne sur sa pureté.

Une dilution, des échantillons d'ADN extraits, est ensuite effectuée pour arriver à une concentration finale d'ADN de 100 ng selon le travail de Wang *et al.* (2011).

Par le moyen du rapport de  $DO_{260\text{ nm}} / DO_{280\text{ nm}}$ , la pureté de l'ADN est déterminée en indiquant la contamination de l'ADN par les protéines ou par les ARN.

On considère que :

- L'ADN est suffisamment pur, lorsque le rapport  $DO_{260\text{ nm}} / DO_{280\text{ nm}}$  est compris entre 1,8 et 2.
- L'ADN est contaminé par les protéines si :  $DO_{260\text{ nm}} / DO_{280\text{ nm}} < 1,8$ .
- L'ADN est contaminé par les ARN si le rapport  $DO_{260\text{ nm}} / DO_{280\text{ nm}}$  est compris entre 2 et 2,2.

### 4- AMPLIFICATION DE L'ADN EXTRAIT PAR PCR

#### 4-1- Principe

La réaction PCR (Polymérase Chain réaction) est une technique *in vitro*, qui permet d'amplifier une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier.

Pour ce faire, une série de réactions permettant la réplication d'une matrice d'ADN double brin est répétée en boucle. Ainsi, au cours de la réaction PCR, les produits obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant, l'amplification est donc exponentielle.

#### 4-2- Conditions et programme de la réaction de PCR

L'amplification est effectuée en 35 cycles, précédée par une étape de dénaturation allongée de 10 min à 95°C.

Chaque cycle est constitué d'une étape de dénaturation 0,30 s à 95°C, d'une étape d'hybridation 0,30s à une température spécifique aux amorces et d'une étape d'élongation 0,30 s à 72°C.

Les amorces sont choisies de façon à encadrer la séquence d'ADN à amplifier (Tableau 3).

**Tableau 3 : Données sur les amorces utilisées pour l'amplification du gène SMN.**

<b>Gène</b>	SMN
<b>Locus</b>	5q13
<b>Numéro d'exon</b>	7
<b>Amorce Forward (5' → 3')</b>	AGACTATCAACTTAATTTCTGATCA
<b>Amorce Revers (5' → 3')</b>	CCTTCCTTCTTTTTGATTTTGTTT

Les volumes des solutions utilisées pour la PCR sont résumés dans le tableau 4.

**Tableau 4 : Conditions expérimentales pour la réaction PCR du gène SMN.**

Conditions expérimentales		
Réactif	concentration	V (µl)
Tampon	10 mM	4
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	4
dNTP	10 mM	4
Amorce F	10 mM	2
Amorce R	10 mM	2
H <sub>2</sub> O		0,4
Taq	5 unité/µl	21,6
ADN	100ng	2
Volume total	40µl	

Chaque réactif ajouté, joue un rôle primordial dans la réaction PCR.

- **ADN** : Généralement sous forme de double brin, il contient le fragment à amplifier.
- **Deux amorces** : Sens et anti-sens qui sont des petits brins d'ADN d'environ 20bases, capables de s'hybrider de façon spécifique, grâce à la complémentarité des bases.

- **Taq polymérase** : Assure la polymérisation entre les deux amorces.
- **Les nucléotides** : (dGTP, dATP, dCTP, dTTP) sont les éléments de base utilisés par la Taq Pol pour synthétiser les brins d'ADN complémentaire.
- **Tampon** : le maintien du pH du milieu réactionnel.
- **MgCl<sub>2</sub>** : C'est un cofacteur de la Taq polymérase.

Les échantillons sont ensuite placés dans le Thermocycleur et soumis aux cycles de température du programme PCR (Tableau 5).

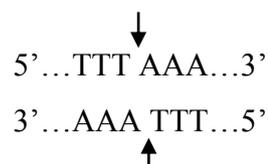
**Tableau 5 : Cycle de température du programme PCR du gène SMN.**

Etape	T (°C)	Temps	cycles
<b>Dénaturation initiale</b>	95°C	10min	1
<b>Dénaturation</b>	95°C	0,30sec	35
<b>Hybridation</b>	56°C	0,30sec	
<b>Elongation</b>	72°C	0,30sec	
<b>Elongation finale</b>	72°C	7min	1

Le mélange préparé est aliquoté à raison de 38 µl par tube. En suite, 2 µl d'ADN sont ajoutés dans chaque tube pour avoir un volume de 40 µl. Les tubes sont placés dans un Thermocycleur.

### 5- RFLP : ENZYME DE RESTRICTION DRA I

Dra I est une enzyme de restriction produite par *Deinococcus radiophilus*. Elle reconnaît et clive la séquence suivante :



Le tableau 6 présente les réactifs utilisés pour la préparation du milieu de digestion et leurs volumes nécessaires.

Tableau 6 : Préparation du milieu de digestion par l'enzyme Dra I.

	Volume (µl)
Dra I	0,5
Tampon	2,5
H2O	7
Produit PCR	10

## 6- VISUALISATION DU PRODUIT PCR PAR ELECTROPHORESE

### 6-1- Principe

Le contrôle des produits amplifiés se fait par électrophorèse sur gel d'agarose. L'ADN est une macromolécule chargée négativement. De ce fait, elle peut migrer dans un champ électrique de la cathode (-) vers l'anode (+), dans un tampon de migration TAE (Tris-Acétate-EDTA).

Les échantillons sont mélangés au bleu de bromophénol, colorant possédant une masse moléculaire faible et permettant de détecter le front de migration.

Lors de la préparation du gel d'agarose, le BET (Bromure d'ethidium), agent intercalant, se fixant entre les bases nucléiques à l'intérieur de la double hélice, est ajouté. Cette molécule est fluorescente sous UV, et permet de détecter les fragments d'acides nucléiques.

### 6-2- Protocole expérimental

Dans un premier temps, on prépare le gel d'agarose 2%. Pour ceci, on met dans un récipient 1 g de poudre d'agarose et 50 ml de TAE 1X, L'ensemble est porté à ébullition, puis on ajoute 2 µl de BET.

Le gel est coulé dans le moule à électrophorèse. Un peigne y est installé et sera retiré après refroidissement du gel en laissant à sa place des puits où sera déposé l'ADN. Après refroidissement, le gel est installé et déposé dans la cuve, remplie de tampon de migration (TAE 1X). Dans chaque puits, un mélange de 6 µl de produit PCR et 2 µl de solution de charge afin de stabiliser l'ADN au fond du puit. La migration est lancée à 100 V.

## A- ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE

L'étude a inclus huit patients dont les principales caractéristiques sociodémographiques dégagées concernent : l'âge, le sexe et la consanguinité.

### 1- REPARTITION DES PATIENTS SELON L'AGE ET LE SEXE

#### 1-1- Répartition des patients selon l'âge

La moyenne d'âge des patients est de 15 ans. La tranche d'âge la plus représentée est située entre (0 – 4ans) (Tableau 7).

**Tableau 7 : Nombre de cas par tranche.**

Tranche d'Age	Nombre de cas
<b>0 &lt; Age (ans) &lt; 4</b>	5
<b>4 &lt; Age (ans) &lt; 8</b>	1
<b>8 &lt; Age (ans) &lt; 12</b>	2

#### 1-2- Répartition des patients selon le sexe

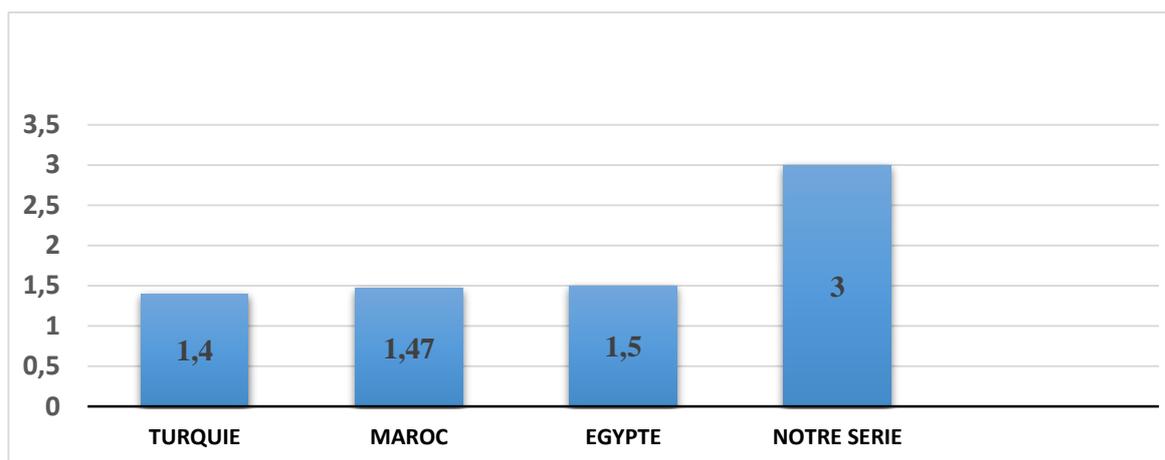
Parmi les 8 cas explorés, figurent 6 hommes et 2 femmes (Tableau 8), avec un sexe ratio H/F de 3, d'où une nette prédominance masculine de 75%.

**Tableau 8 : Répartition des patients selon le sexe.**

Sexe	Nombre de patients	Pourcentage
<b>Homme</b>	6	75
<b>Femme</b>	2	25
<b>Totale</b>	8	100

Dans cette étude de séries des cas, on a trouvé une prédominance masculine.

L'âge moyen des patients de notre série est de 15 ans, avec un sexe ratio H/F de 3. Ce résultat n'est pas compatible avec celui retrouvé dans certains pays comme la Turquie, Maroc et Egypte où la valeur de sexe ratio varie de 1,4 à 1,5 (Figure 6) (Erdem *et al.*, 1999 ; Souirti *et al.*, 2009 ; Shawky *et al.*, 2010 ). Notre résultat peut être dû au faible effectif des patients examinés ici.

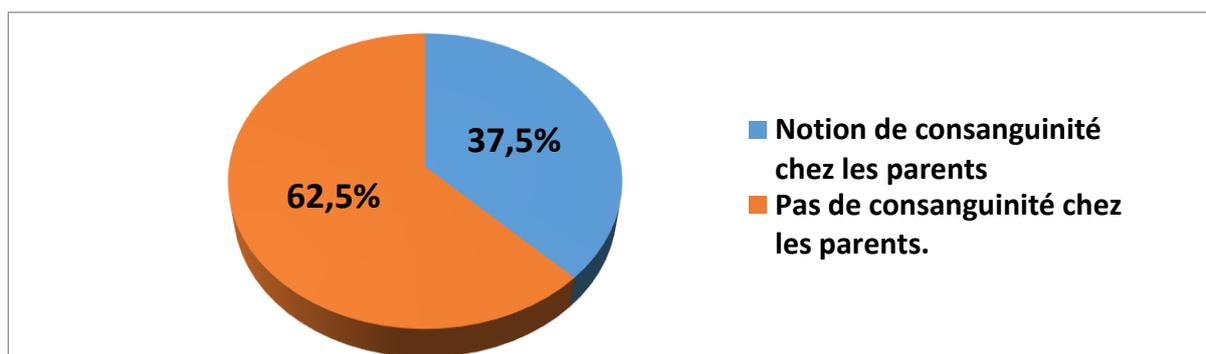


**Figure 6 : Sexe ratios des patients atteints de l'amyotrophie spinale infantile dans quelque pays.**

## 2- CONSANGUINITE CHEZ LES PARENTS

Dans notre série, Trois patients sont issus d'un mariage consanguin 37,5% (Figure 7).

**Figure 7 : Pourcentage de consanguinité chez les parents des patients atteints de SMA.**



La consanguinité augmente le risque d'apparition d'une amyotrophie spinale proximale dans une famille. La présence de ce facteur, a été notée chez 37,5% des cas (Tableau 9).

Par contre l'étude réalisée en Turquie (Erdem *et al.*, 1999) a rapporté 57% des cas consanguins. Ceci peut être aussi expliqué par la faible échantillonnage de notre étude incluant seulement huit patients.

Tableau 9 : Fréquence de la consanguinité chez les parents des patients atteints de l'ASI.

	Nombre de patients	Consanguinité chez les parents
Turquie (H.Erdemet <i>al.</i> , 1999)	106	57%
Maroc (Souirtiet <i>al.</i> , 2009)	32	40,6%
Egypte (Shawky, <i>et al.</i> , 2010)	117	46%
Notre série	8	37,5%

## B- ETUDE MOLECULAIRE

Après extraction de l'ADN, un dosage est réalisé avant son amplification par la technique de PCR.

### 1- DOSAGE DE L'ADN EXTRAIT

La quantité et la qualité d'ADN extrait requiert une importance majeure, car elles influencent directement le rendement de la PCR.

Le rapport de l'absorbance  $DO_{260}/DO_{280}$  est compris pour la totalité des échantillons entre les valeurs 1,8 et 2, ce qui permet de conclure que ces extraits ne sont contaminés ni par l'ARN ni par les protéines et peuvent donc être qualifiés de purs (Tableau 10).

Tableau 10 : Rapport  $DO_{260}/DO_{280}$  et la concentration d'ADN des patients.

Patients	$DO_{260}/DO_{280}$	Concentration ADN ng / $\mu$ l
P1	1,88	290
P2	1,9	157
P3	1,95	326
P4	1,85	158
P5	2	147
P6	1,87	123
P7	1,93	150
P8	2	179

## 2- REACTION DE POLYMERISATION EN CHAÎNE (PCR-RFLP)

La réaction PCR consiste à amplifier la région du gène, à l'aide d'amorce oligonucléotidiques, après avoir traité les échantillons par l'enzyme de restriction Dra I, qui reconnaît spécifiquement la séquence 5' TTT/AAA 3' du gène SMN. Par la suite, une électrophorèse sur gel d'agarose permet de différencier un allèle normale d'un allèle muté grâce à la visualisation des fragments d'ADN par fluorescence en présence du bromure d'éthidium qui permet de s'intercaler entre les bases.

### 2-1- Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification par PCR de l'exon 7 du gène SMN

Les profils des patients sont présentés dans les figures 8 et 9.

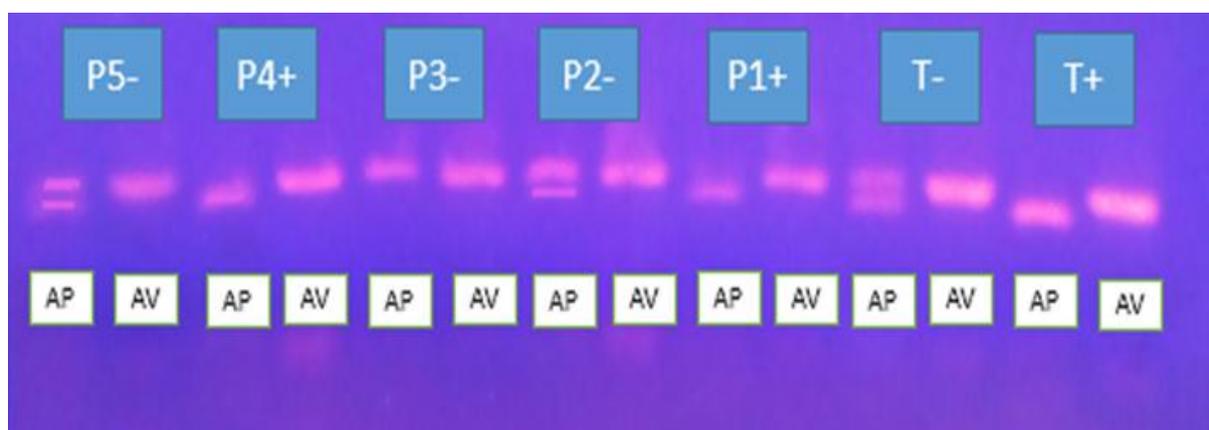


Figure 8 : Profil de l'électrophorèse sur gel d'agarose des patients 1, 2, 3, 4 et 5.

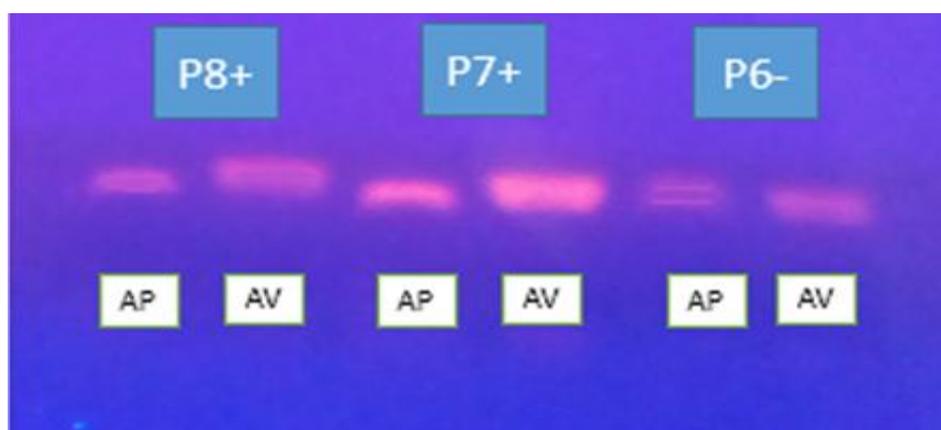


Figure 9 : Profil de l'électrophorèse sur gel d'agarose des patients 6, 7 et 8.

P1, P2, ...à P8 : Numéros des patients.

T+ : Témoin positif.

Av : Avant l'addition de l'enzyme de restriction.

T- : Témoin négatif.

Ap : Après l'addition de l'enzyme de restriction.

- : Absence de mutation.

+ : Présence de mutation.

L'analyse des gels obtenu (figures 8 et 9) permet de constater que :

- ☞ Pour les patients 1, 4, 7, 8 : on a la présence de la délétion de l'exon 7 du gène SMN à l'état homozygote.
- ☞ Pour les patients 2, 3, 5, 6 : on a l'absence de la délétion de l'exon 7 du gène SMN dans les limites de la technique utilisée.

## 2-2- Fréquences de la délétion

L'étude moléculaire chez la totalité de nos patients montre la présence d'une délétion homozygote de l'exon 7 du gène SMNt chez quatre patients parmi les huit inclus dans l'étude soit chez 50%.

Ce résultat des patients est nettement inférieur à celui annoncé par Souirti *et al* (2009) dans une population marocaine (98 %), ainsi que celui de Erdem *et al* (1999) dans une population de la Turquie (93 %). Par contre, notre résultat coïncide avec celui de Shawky *et al* (2010) sur une population Egyptien (55 %). En effet, ce dernier a porté sur un échantillon assez important (117patients).

**Tableau 11 : Fréquences de la délétion du gène SMN dans quelques pays.**

Pays	Fréquence
Turquie (Erdem et al., 1999)	93%
Maroc (Souirti et al., 2009)	98%
Egypte (Chawky et al., 2010)	55%
Notre série	50%

L'amyotrophie spinale infantile est une maladie génétique héréditaire due à la dégénérescence des motoneurons de la moelle épinière. Cela signifie que les nerfs moteurs n'achèment plus l'ordre du mouvement jusqu'aux muscles. Le gène responsable de cette maladie est localisé sur le chromosome 5 et code pour la protéine SMN. Les anomalies du gène SMN consistent en une délétion homozygote de l'exon 7.

Cette étude porte sur huit patients colligés au sein du laboratoire de Génétique Médicale et d'Oncogénétique du CHU de Fès. L'âge moyen des patients examinés est de 15 ans. La tranche d'âge la plus représentée est située entre 0 – 4 ans, avec une nette prédominance masculine de 75 %.

La consanguinité augmente le risque d'apparition d'une amyotrophie spinale proximale dans une famille. Nous avons noté la présence de ce facteur a été noté chez 37,5 % des cas.

L'utilisation des techniques de biologie moléculaire est devenue désormais un outil clé car elles permettent de détecter la présence ou l'absence de la délétion du gène SMNt localisé en 5q13 confirmant ou infirmant le diagnostic.

L'étude moléculaire chez la totalité de nos patients montre la présence d'une délétion homozygote de l'exon 7 du gène SMNt chez quatre patients parmi les huit inclus dans l'étude.

La recherche de la délétion de l'exon 8 est indiquée chez les cas négatifs.

Des études cliniques sont en cours afin d'identifier des médicaments potentiels de l'ASI de type 1, visant surtout à augmenter les taux de SMN complète. Cependant, actuellement, le traitement reste symptomatique, et son approche multidisciplinaire a pour but d'améliorer la qualité de vie.

# Références bibliographique

- ☞ **Belaid A, Jaeger-Buet C** : – 2006 – Monographie : amyotrophies spinales Paris : Collection savoir et comprendre.
- ☞ **Coovert D, Andrew P.E, Strasswimmer J, Crawford T.O**: –1997–.The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy.Hum Mol Genet.
- ☞ **Debra G.B, Leonard M.D** : – 2016 – Molecular Pathology in Clinical Practice —Page 133
- ☞ **Erdem H , Pehlivan S , Topaloglu H , Ozgüç M** :– 1999 – Deletion analysis in Turkish patients with spinal muscular atrophy.
- ☞ **FOURNIER Emmanuel** : – 2013 – Syndromes EMG d’atteinte des nerfs et des muscles.
- ☞ **Gowers WR**: –1879– Clinical lecture on pseudo-hypertrophic muscular paralysis.
- ☞ **Hamilton G, Gillingwater TH**: – 2013 – Spinal muscular atrophy: going beyond the motor neuron.
- ☞ **HOFFMANN J**: – 1889 – « Über progressive neurotische Muskelatrophie ». Arch. Psychiatr. Nervenkr., - Page 661- 673
- ☞ **Jack J. Pasternak** : – 2003 – Genetique moleculaire humaine : une introduction aux mecanisme des maladies héréditaires.
- ☞ **Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L**:–1995–Identification and characterisation of spinal muscular atrophy determining gene. Page 155-165.
- ☞ **Lüllmann-Rauch** : – 2008 – Histologie :-Page 221
- ☞ **MERCIER Michel , BERREWAERTS Joelle , Jacques Veronique** : – 2016 – Vivre, lutter, aimer avec une maladie neuromusculaire: - Page 22
- ☞ **MONANI U.R, LORSON C.L, PARSONS D.W, PRIOR T.W, ANDROPHY E.J, BURGHEES A.H, ANDMCPHERSON J.D**: –1999– A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2.
- ☞ **M.Porte., K.Patte., J.Pélissier., V.Gautheron** : –2010– Dystrophinopathie de l'enfant et de l'adulte : Maladies de Duchenne- Page 1
- ☞ **MUNSAT T.L** : 1991 « International SMA Collaboration ». Neuromuscul. Disord.,.
- ☞ **R.COIJARD., J.J.RACADOT ,POIRIER** : – 1980 – Précis d'histologie humaine :- Page 251

- ☞ **Shawky A. Rabah M. Nermine S. El-Sayed B:** – 2010 – Clinico-epidemiologic characteristics of spinal muscular atrophy among Egyptians.
- ☞ **Souirti Zouhayr et al.** –2009– Les amyotrophies spinals progressives à propos de 32 cas.
- ☞ **Sylvia S. Mader :** – 2010 – Biologie Humaine :- Page 122
- ☞ **Tortora G J., DERRICKSON B :** –2017– Manuel d'anatomie et de physiologie humaines :- Page 197
- ☞ **WERDNIG.G:** – 1891 – « Two early infantile hereditary cases of progressive muscular atrophy simulating dystrophy, but on a neural basis ». Arch. psychiatr. –Page 437-481.