

Article original

Mise au point de la technique PCR multiplex pour le diagnostic génotypique de la myopathie de Duchenne à Oran : Etude de 5 cas de l'Ouest Algérien

Development of genotypic diagnosis of Duchenne muscular dystrophy by multiplex PCR in Oran: A study of 5 cases of western Algeria

Houssam BOULENOUAR^{1,2}, Fatima-Zohra MOGHIT^{1,3}, Amine MELLOUK⁴, Khaldia BENLHADJ-DJELLOUL¹, Hadjira OUHAIBI DJELLOUL^{1,6}, Mohamed BENMANSOUR^{2,5}, Sarah LARJAM HETRAF¹, Faouzia ZEMANI FODIL¹, Nadhira SAIDI MEHTAR¹, Sounnia MEDIENE BENCHEKOR^{1,6}

(1) Laboratoire de Génétique Moléculaire et Cellulaire, Université des sciences et de la technologie d'Oran- Mohamed BOUDIAF, Oran, Algérie

(2) Département de Médecine, Faculté de Médecine « Dr Benzerdjeb Benaouda », Université Aboubekr Belkaid- Tlemcen, Algérie

(3) Centre universitaire Belhadj Bouchaib-Ain Témouchent, Algérie

(4) Université Paris Sud 91405, Orsay cedex, France

(5) Service de Médecine physique et réadaptation neurologique, Centre Hospitalo-Universitaire, Tlemcen, Algérie.

(6) Département de Biotechnologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Oran 1 Ahmed Ben Bella, Oran, Algérie

MOTS CLÉS:

dystrophie musculaire de Duchenne, Dystrophine, PCR Multiplex, délétions, chromosome X

Résumé

La Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) est la plus sévère et la plus fréquente des dystrophies musculaires, atteignant une naissance mâle sur 5000 dans la population mondiale. Elle se caractérise par une dégénérescence musculaire progressive dès le jeune âge et conduit à des défaillances graves de l'organisme qui aboutissent au décès du patient.

Le gène responsable de la DMD est localisé sur le chromosome X. Il code pour une protéine du cytosquelette membranaire « la dystrophine ». Les altérations touchant ce gène sont essentiellement des délétions avec une proportion de 65%. C'est la raison pour laquelle nous nous sommes intéressés à la mise au point au niveau de notre laboratoire d'une technique qui nous permettra de mettre en évidence ce type de mutation chez 5 cas sporadiques atteints de myopathie de Duchenne et originaires de l'Ouest Algérien. L'étude a consisté à amplifier par PCR multiplex les 19 exons du gène DMD les plus fréquemment altérés.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence deux délétions différentes, la pre-

mière touchant le promoteur du gène et la seconde l'exon 43. Ces premiers résultats confirment les données rapportées dans la littérature qui classent ces deux régions comme étant les régions les plus disposées aux délétions.

Les résultats obtenus représentent une première au niveau de l'ouest algérien et pourraient aboutir à la généralisation du diagnostic génotypique et du conseil génétique en vue d'une amélioration de la prise en charge des malades en Algérie.

KEY WORDS:

Duchenne muscular dystrophy, Dystrophin, Multiplex PCR, deletions, X chromosome

Abstract

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is the most common and severe form of muscular dystrophy, reaching one out of every 5000 male births in the world population. It is characterized by progressive muscular degeneration from a young age and leads to serious failures of the body which lead to the death of the patient.

The gene responsible for DMD is located on chromosome X. It encodes a membrane cytoskeleton protein—the dystrophin—. The alterations affecting this gene are essentially deletions with a proportion of 65%. That's why we have interested to develop in our laboratory a technique that will allow us to detect this type of mutations in 5 sporadic cases with Duchenne myopathy from West Algeria.

The study consisted in amplifying by PCR multiplex that cover 19 exons of the DMD gene most commonly deleted.

This study allowed us to reveal two different deletions, the first involving the promoter of the gene and the second one the exon 43. These first results confirm the data reported in the literature which classify these two regions as deletion hotspots.

The results obtained represent a first in the western Algerian and could lead to the generalization of genotypic diagnosis and genetic counseling with a view to improve the care of patients in Algeria.

Introduction

La Myopathie de Duchenne (DMD) est la plus sévère et la plus fréquente des dystrophies musculaires, atteignant une naissance mâle sur 5000 dans la population mondiale [1]. Elle se caractérise par une dégénérescence musculaire progressive et conduit à des défaillances graves de l'organisme [2]. Les décès par défaillance cardiaque surviennent dans 10 à 40% des cas [3]. L'âge du décès varie entre 11.6 et 27.5 ans avec une moyenne de 17.7[4].

Les myopathies de Duchenne et de Becker transmises sur le mode récessif lié au chromosome X sont des formes alléliques d'une dystrophie musculaire [5]. Toutes deux résultent de mutations survenant dans un gène identifié en 1986 codant pour une protéine du cytosquelette membranaire, la dystrophine[6, 7, 8]. Il s'agit de grandes délétions génomiques dans environ 65 % des cas [6, 9, 10], et de mutations ponctuelles dans la quasi-totalité des cas restants [11]. La DMD est caractérisée par la dégénérescence progressive des muscles touchant l'enfant dès son jeune âge et présente une similitude dans le tableau clinique avec la myopathie maghrébine qui a une transmission autosomique récessive

[12] et qui est très répandue au sein de la population algérienne ; d'où l'intérêt d'élaborer une stratégie de diagnostique permettant d'une part de dépister la myopathie de Duchenne et d'autre part de trancher avec précision sur le type de la myopathie considérée.

Un diagnostic génotypique de la myopathie de Duchenne est réalisable dans les familles où il existe des antécédents de la maladie, afin de dépister les femmes vectrices et de réaliser, le cas échéant, un diagnostic prénatal grâce à l'étude de l'ADN fœtal [13]. En pratique, seules les délétions facilement détectables par la technique de PCR multiplex (*polymerase chain reaction*) sont recherchées par les laboratoires de diagnostic moléculaire.

La mise en évidence d'une délétion permettra ensuite de réaliser un diagnostic prénatal direct (de certitude). L'approche indirecte basée sur l'étude familiale de marqueurs polymorphes du locus *DMD* est utilisée pour suivre la ségrégation de l'haplotype lié au gène muté et de l'haplotype lié au gène normal, permettant la discrimination des femmes conductrices. L'étude de liaison est délicate et parfois non informative ; elle n'est pas applicable en cas

de néomutation [14]

Ainsi l'objectif de notre étude a été de mettre au point la technique PCR Multiplex, afin d'amplifier 19 exons situés dans des régions du gène *DMD* et qui correspondent aux points chauds (hots spots) de délétions. Cette démarche permettrait d'établir le diagnostic et de confirmer le tableau clinique chez 5 individus non apparentés et présentant des signes cliniques évocateurs de myopathie de Duchenne.

La finalité serait de mettre au point une stratégie diagnostique qui soit reproductible, rapide et facile à réaliser dans le cadre de dépistage des femmes conductrices dans la fratrie de cas index.

Matériel et méthodes :

I. Population étudiée

Les prélèvements nécessaires pour cette étude ont été réalisés (2009) sur 5 cas sporadiques de myopathie de Duchenne (**Figure 1**) recrutés dans différents services : 3 patients adressés par l'association des myopathes d'Oran (AMYO), un patient suivi au niveau du service de médecine physique et réadaptation neurologique du CHU de Tlemcen, et un patient adressé par le service de neurologie du CHU d'Oran. Ces patients âgés de 6 à 19 ans ont tous présenté des signes dystrophiques depuis leur jeune âge (chutes fréquentes, difficulté lors de la montée des escaliers, hypertrophie des

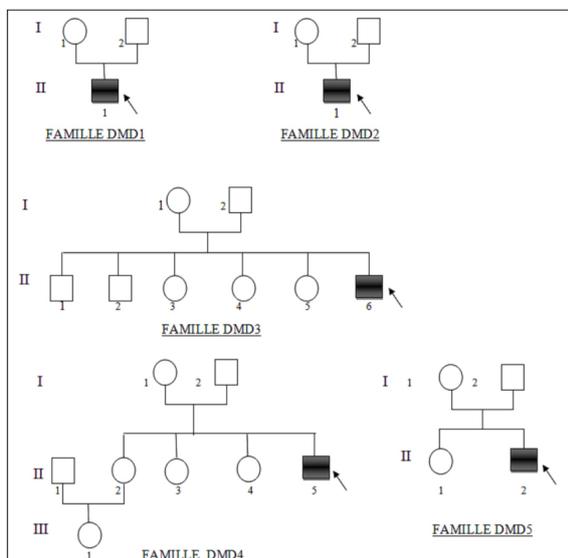


Figure 1 :Arbres généalogiques des familles recrutées

mollets) . L'examen clinique a reposé sur l'électromyographie et les dosages de créatine kinase. Dix ml de sang ont été recueillis sur des tubes EDTA.

II. Méthodes utilisées

1.Extraction de l'ADN

Les ADN ont été extraits par la technique de Salting Out[15]

2. Amplification par polymérisation en chaîne (PCR)

Afin de réaliser un diagnostic génotypique de la myopathie de Duchenne chez les 5 sujets présentant des signes de dystrophie musculaire, nous avons amplifié 19 exons situés préférentiellement dans les deux régions *hot spot* de délétions localisées dans les régions 5' et 3' du gène par la technique PCR Multiplex. La migration sur gel d'agarose des produits d'amplification va nous permettre de mettre en évidence les éventuelles délétions des exons amplifiés et qui se révèlent par l'absence d'une bande d'amplification.

2.1.Choix des amorces

Pour pouvoir réaliser cette étude nous avons utilisé deux séries d'amorces ; la première série qui contient en plus de la série originale de Chamberlain de 9 exons[16], l'exon 46 rajouté par Beggs[17]et le couple d'amorces encadrant le promoteur musculaire. Selon leur ordre d'apparition sur le gel, on peut les classer selon le tableau 1.

La deuxième série d'amorces correspond à la série de Beggs (1990) et permet l'amplification de 8 exons (mis à part le couple d'amorces amplifiant le promoteur musculaire que nous avons inclus dans la première série). Ainsi, suivant leur ordre d'apparition sur le gel, on peut classer les exons selon le tableau 2.

2.2. Mise au point de la PCR multiplex

La mise au point de la PCR multiplex du gène *DMD* a nécessité la préparation de deux tampons (tampon Chamberlain et tampon 10X PCR Invitrogen), ainsi que le changement de plusieurs paramètres dans le mélange réactionnel et des modifications dans le programme d'amplification initial notamment dans la température d'hybridation.

Les conditions retenues pour l'amplification du gène *DMD* après plusieurs essais sont les suivantes : Dans un volume réactionnel final de 50 μ l, les éléments sont répartis comme suit (Tableau 5).

L'amplification du gène *DMD* est réalisée avec le Thermocycleur à gradient (Biometra) selon le programme suivant : 1ère phase (se réalise en un seul cycle): une étape de dénaturation à 95°C pendant 7 minutes ; une étape d'hybridation à 56°C pendant 1 minute; une étape d'élongation à 65°C pendant 2 minutes. La 2ème phase : répétée en 35 cycles, chaque cycle contient les étapes suivantes : Une étape de dénaturation à 95°C pendant 30 secondes ; une étape d'hybridation à 56°C pendant 1 minute et une étape d'élonga-

tion à 65 °C pendant 2 minutes. La 3ème phase : extension d’amorces à 65 °C pendant 10 minutes.

La visualisation des résultats de l’amplification est réalisée dans un gel à 2% de Nusieve et 1% d’agarose préparé dans du TBE 1X (Tris 0.089 M - EDTA 0.25 mM - acide borique 0.089 M ; pH=8). La migration se fait dans du tampon TBE 1X à 70 VoltS pendant 1h30 mn et la visualisation des produits amplifiés se fait sous UV. Une amplification positive se traduit par l’observation de plusieurs bandes sur le gel, et dont les tailles varient de 148 pb à 547 pb pour la série PI et entre 113 et 410 pour la série PII. [16, 17].

Nous remarquons l’absence de la bande de 535 pb qui correspond au promoteur musculaire chez le sujet DMD3 amplifié avec la série PIa. Cette observation témoigne d’une délétion ayant touché le promoteur musculaire et dont l’étendue n’est pas bien déterminée. Aussi, il apparaît très clairement que l’ADN du sujet DMD1 amplifié avec la série PIla montre une absence de la bande de 357 pb, ce qui rend compte d’une délétion ayant touché l’exon 43. Ces observations viennent confirmer les statistiques rapportées dans la littérature qui indiquent que les délétions sont fréquentes dans les 20 premiers exons et autour de l’exon 44. Ceci confirme également que l’incidence et la nature des mutations touchant le gène

DMD ne sont pas spécifiques d’une région ou d’une ethnie donnée [18, 19].

Les délétions observées dans notre étude, et qui concernaient l’exon 43 et le fragment du promoteur ont été également reportées dans l’étude de Cherrallah et al sur la population algérienne, avec une fréquence de mutations de 85% dans la région centrale du gène dite (3’ hot spot), et de 15% dans la région 5’ [20]. La fréquence des délétions dans les deux régions hot spot, varie d’une manière considérable d’une population à une autre; En effet, les fréquences reportées dans la population arabe (marocaine et égyptienne) [21, 22] et caucasienne (française, canadienne, hongroise et grecque) [23, 24, 25, 26] indiquent des fréquences allant de 75% à 85% pour les délétions de la région 3’, et de 15% à 25% dans la région 5’.

Le fait de ne pas avoir trouvé de délétions chez les autres patients n’exclut pas la probabilité qu’ils soient atteints de myopathie de Duchenne. La délétion peut siéger dans une région non explorée par les amorces utilisées ; il peut également s’agir d’autres types de dystrophinopathies ou de cas de myopathie de Duchenne non délétionnel où la mutation en cause pourrait être une duplication ou une mutation ponctuelle. En effet, la fréquence des délétions connaît une

Tableau 1 : Séquences des amorces de la série PI du gène DMD

Exon amplifié	Séquence 5’ 3’ F/R	Longueur du fragment	Références
Exon 45	5’AAACATGGAACATCCTTGTGGGGAC3’ 5’CATTCCATTAGATCTGTCGCCCTAC3’	547pb	Chamberlain 1990
Pm	5’..GAAGATCTAGACAGTGGATACATAACAAATGCATG..3’ 5’..TTCTCCGAAGGTAATTGCCTCCCAGATCTGAGTCC..3’	535pb	Beggs1990
exon 48	5’..TTGAATACATTGGTTAAATCCCAACATG..3’ 5’..CCTGAATAAAGTCTTCCTTACCACAC..3’	506 pb	Chamberlain 1990
exon 19	5’..GATGGCAAAAGTGTGAGAAAAAGTC.. 3’ 5’..TTCTACCACATCCCATTTTCTTCCA..3’	459 pb	Chamberlain 1990
exon 17	5’..GACTTTTCGATGTTGAGATTACTTTCCC..3’ 5’..AAGCTTGAGATGCTCTCACCTTTTCC..3’	416 pb	Chamberlain 1990
exon 51	5’..GAAATTGGCTCTTTAGCTTGTGTTTC ...3’ 5’..GGAGAGTAAAGTGATTGGTGGAAAATC...3’	388 pb	Chamberlain 1990
exon 8	5’..GGCCTCATTCTCATGTTCTAATTAG3’ 5’..GTCCTTTACACACTTTACCTGTTGAG...3’	360 pb	Chamberlain 1990
exon 12	5’..GATAGTGGGCTTTACTTACATCCTTC3’ 5’..GAAAGCACGCAACATAAGATACACCT....3’	331 pb	Chamberlain 1990
exon 44	5’..CTTGATCCATATGCTTTTACCTGCA ...3’ 5’..TCCATCACCTTCAGAACCTGATCT...3’	268 pb	Chamberlain 1990
exon 4	5’..TTGTGGTCTCTCTGCTGGTCAGTG3’ 5’..CAAAGCCCTCACTCAAACATGAAGC..3’	196 pb	Chamberlain 1990
exon 46	5’.. GCTAGAAGAACAAGAAATATCTTGTC..3’ 5’.. CTTGACTTGCTCAAGCTTTTCTTTAG.....3’	148 pb	Beggs 1991

Tableau 2: Séquence des amorces de la série PII du gène DMD

Exon amplifié	Séquence 5' 3' F/R	Longueur du fragment	Reference
exon 3	5'.. TCATCC A TCATCTTCGGCAGATTA..3' 5'... CAGGCCGGTAGAGTATGCCAAATGAAAATCA.3'	410pb	Beggs 1990
exon 43	5'.. GAACATGTCAAAGTCACTGGACTTCATGG ..3' 5'.. ATATATGTGTTACCTACCCTTGTCGGTCC ..3'	357pb	Beggs 1990
exon 50	5'.. CACCAAATGGATTAAGATGTTTCATGAAT ..3' 5'... TCTCTCTCACCCAGTCATCACTTCATAG.3'	271pb	Beggs 1990
exon 13	5'.. AATAGGAGTACCTGAGATGTAGCAGAAAT..3' 5'.. CTGACCTTAAGTTGTTCTTCCAAAGCAG..3'	238pb	Beggs 1990
exon 6	5'.. CCACATGTAGGTCAAAAATGTAATGAA ..3' 5'.. GTCTCAGTAATCTTCTTACCTATGACTATGG..3'	202pb	Beggs 1990
exon 47	5'.. CGTTGTTGCATTTGTCTGTTTCAGTTAC..3' 5'.. GTCTAACCTTTATCCACTGGAGATTTG..3'	181pb	Beggs 1990
exon 60	5'.. AGGAGAAATTGCGCCTCTGAAAGAGAACG ..3' 5'.. CTGCAGAAGCTTCCATCTGGTGTTCAGG..3'	139pb	Beggs 1990
exon 52	5'.. AATGCAGGATTTGGAACAGAGGCGTCC..3' 5'.. TTCGATCCGTAATGATTGTTCTAGCCTC..3'	113pb	Beggs 1990

Tableau 3 : composants du Tampon Chamberlain

Composants du tampon Chamberlain	Concentrations des composants
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.166M
MgCl ₂	0.067M
Tris-HCl à pH8.8	0.67M
EDTA	0.067M
β Mercaptoéthanol	0.1M

grande disparité de part le monde, variant de 40% à 50 % dans les populations asiatiques notamment du Pakistan, ou du Singapour [27, 28], à 65% jusqu'à 85% dans les populations caucasiennes : française, hongroise, turque ou canadienne [23, 24, 25, 29]. L'étude de Cherrallah et al sur la population algérienne rapporte une fréquence de délétions de 68% dont l'étendue du fragment délété varie d'un à plusieurs exons [20].

Conclusion et perspectives :

Ce travail nous a permis d'étudier l'aspect génétique d'une pathologie musculaire qui est la myopathie de Duchenne en utilisant une technique de biologie moléculaire qui est l'amplification In Vitro (PCR). En pratique, ce travail s'est divisé en deux parties distinctes après le recrutement des malades. La première partie était de mettre au point la technique et de déterminer ses paramètres pratiques, ainsi que

les concentrations de ses composantes. La PCR Multiplex a été testée ensuite dans la deuxième partie sur les échantillons correspondants aux 5 cas de Myopathie de Duchenne recrutés. Deux délétions ont ainsi été mises en évidence ce qui constitue une première dans l'ouest algérien. Le fait d'avoir pu mettre en évidence ces deux mutations pourrait aboutir à la généralisation du diagnostic génotypique et du conseil génétique en vue d'une amélioration de la prise en charge des malades en Algérie voire la prévention et l'adaptation d'un traitement.

Conflit d'intérêt

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêt.

Remerciements

Nous tenons à remercier l'Association des Myopathes d'Oran (AMYO), ainsi que le Service de Neurologie du CHU d'Oran

Tableau 4 : composition et volumes du mélange réactionnel de la PCR

Réactifs	L'H ₂ O distillée stérile	Tampon d'amplification PCR 10X	MgCl ₂ à 25mM	dNTP à 25mM	DMSO	Amorces à 100ng/μl Dilués au 1/10	ADN à 200ng/μl	Taq polymérase à 5U/μl
Volume (μl)	20.45μl	5μl	8 μl	0.75μl	5 μl	9 μl	1 μl	0.8 μl

et les patients qui ont accepté de participer à cette étude.

Références bibliographiques

- [1] Mendell JR, Shilling C, Leslie ND et al. Evidence-based path to newborn screening for Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* 2012, 71:304-13.
- [2] Yiu E.M., Kornberg A.J. Duchenne muscular dystrophy. *J Paediatr Child Health* 2015, 51:759-764
- [3] Mukoyama, M., K. Kondo, et al. "Life spans of Duchenne muscular dystrophy patients in the hospital care program in Japan." *J NeurolSci* 1987, 81 (2-3): 155-8.
- [4] Passamano L, Taglia A, Palladino A, Viggiano E, D'Ambrosio P, Scutifero M, Rosaria Cecio M, Torre V, DEL F, Picillo E, et al. Improvement of survival in Duchenne Muscular Dystrophy: retrospective analysis of 835 patients. *ActaMyol* 2012, 31:121-5.
- [5] Davies KE, Pearson PL, Harper PS et al. Linkage analysis of two cloned DNA sequences flanking the Duchenne muscular dystrophy locus on the short arm of the human X chromosome. *Nucl Acids Res* 1983, 11: 2303-2312.
- [6] Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ et al. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 1987, 50: 509-517.
- [7] Hoffman E. P, Brown R. H. Jr, Kunkel L. M. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 1987, 51: 919-928.
- [8] Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell*. 1988, 53(2):219-226.
- [9] Forrest SM, Cross GS, Flint T et al. Further studies of gene deletions that cause Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Genomics* 1988, 2:109-14.
- [10] Den Dunnen J. T, Grootsholten PM, Bakker E, et al. Topography of the Duchennemuscular dystrophy (DMD) gene: FIGE and cDNA analysis of 194 cases reveals 115 deletions and 13 duplications. *Am J Hum Genet* 1989, 45: 835-847.
- [11] Roberts RG, Barby TFM, Manners E et al. Direct detection of dystrophin gene rearrangements by analysis of dystrophin mRNA in peripheral blood lymphocytes. *Am j Hum Genet* 1991, 49 : 298-10.
- [12] Ben Hamida M, Fardeau M, Attia N. Severe childhood muscular dystrophy affecting both sexes and frequent in Tunisia. *Muscle Nerve* 1983, 6:469-480.
- [13] Aartsma-Rus A, Ginjaar IB, Bushby K. The importance of genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy. *J Med Genet* 2016, 53(3):145-151
- [14] Tuffery-Giraud S, Chambert S, Demaille J, et al. Le diagnostic génotypique des myopathies de Duchenne et de Becker. *Annales de Biologie Clinique* 1999, 57 : 417-26
- [15] Miller S A, Dykes D D, Plesky H F. A Simple Salting out Procedure for Extracting DNA from Human Nucleated Cells. *Nucleic Acids Res* 1988, Vol. 16, p. 1215.
- [16] Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE et al. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res* 1988;16:11141-11156
- [17] Beggs AH, Koenig M, Boyce FM et al. Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum Genet* 1990, 86:45-48
- [18] Banerjee M, Verma IC. Are there ethnic differences in deletions in the dystrophin gene?. *Am J Med Genet* 1997, 68:152-157.
- [19] Öngüt S, Kavaslar GN, Battaloglu E et al. Deletion

pattern in the dystrophin gene in Turks and a comparison with Europeans and Indians. *Ann Hum Genet* 2000, 64: 33-40.

[20] Cherrallah, A, Benhassine, T, Nouioua, S. et al Intragenic deletion patterns of dystrophin gene in Duchenne and Becker muscular dystrophy patients from Algeria. *Genes Genom* 2014, 36: 17.

[21] Sbiti A, El Kerch F, Sefiani A Analysis of dystrophin gene deletions by multiplex PCR in Moroccan patients. *J Biomed Biotechnol* 2002, 2:158-160

[22] Elhawary NA, Rabah MS, Nemat H. Frameshift deletion mechanisms in Egyptian Duchenne and Becker muscular dystrophy families. *Mol Cells* 2004, 18:141-149

[23] Tuffery-Giraud S, Beroud C, Leturcq F et al. Genotype-phenotype analysis in 2,405 patients with a dystrophinopathy using the UMD-DMD database: a model of nationwide knowledgebase 2009, *Hum Mutat* 30:934-945

[24] Mah JK, Selby K, Campbell C et al. A population-based study of dystrophin mutations in Canada. *Can J Neurol Sci* 2011, 38:465-474

[25] Herczegfalvia A, Toth G, Gyurus P et al. Deletion patterns of dystrophin gene in Hungarian patients with Duchenne/Becker muscular dystrophies. *Neuromuscul Disord* 1999, 9:552-554

[26] Florentin L, Mavrou A, Kekou K et al. Deletion patterns of Duchenne and Becker muscular dystrophies in Greece. *J Med Genet* 1994, 32:48-51

[27] Hassan MJ, Mahmood S, Ali G et al. Intragenic deletions in the dystrophin gene in 211 Pakistani Duchenne muscular dystrophy patients. *Pediatr Int* 2008, 50:162-166

[28] Lai PS, Takeshima Y, Adachi K et al. Comparative study on deletions of the dystrophin gene in three Asian populations. *J Hum Genet* 2002, 47:552-555

[29] Dincer P, Topaloglu H, Ayter S et al. Molecular deletion patterns in Turkish Duchenne and Becker muscular dystrophy patients. *Brain Dev* 1996, 18:91-94

