

Deficiency of the 50 kDa dystrophin associated glycoprotein (adhalin) in severe autosomal recessive muscular dystrophies in children native from European countries

MICHEL FARDEAU, KIICHIRO MATSUMURA, FERNANDO M. S. TOMÉ, HUGUETTE COLLIN, FRANCE LETURCO, JEAN-CLAUDE KAPLAN, KEVIN P. CAMPBELL

Déficience en une glycoprotéine de 50 kDa liée à la dystrophine (adhaline) chez des sujets d'origine européenne présentant une dystrophie musculaire sévère de l'enfance à transmission autosomique récessive

RÉSUMÉ

Une déficience en l'un des composants du complexe de glycoprotéines associées à la dystrophine (DAG) de 50 kDa (adhaline) a été constamment retrouvée dans une dystrophie musculaire sévère de l'enfant, de transmission autosomique récessive (SCARMMD). Cette myopathie, initialement décrite en Tunisie, a été ensuite retrouvée dans d'autres pays d'Afrique du Nord et du Moyen-Orient. Cependant, en dehors des populations migrantes à partir de ces pays, son existence n'était jusqu'à maintenant pas connue dans des populations d'origine européenne. L'analyse immunocytochimique des biopsies musculaires provenant de cinq patients présentant un phénotype clinico-pathologique très voisin des dystrophies de Duchenne/Becker, mais avec présence de dystrophine dans le sarcolemme des fibres musculaires, a permis de montrer la présence d'une telle déficience dans des familles d'origine européenne. Cette reconnaissance, chez des patients dont la myopathie était jusqu'ici non ou mal diagnostiquée, est importante tant pour le conseil génétique que pour d'éventuelles futures thérapies. ▲

ABSTRACT

A large oligomeric complex of sarcolemmal glycoproteins is associated with dystrophin, the protein absent in Duchenne muscular dystrophy (DMD). The dystrophin-glycoprotein complex spans the sarcolemma, providing a link between the subsarcolemmal cytoskeleton and the extracellular matrix. It was recently shown that one component of this complex, the 50 kDa dystrophin-associated glycoprotein (50 DAG or adhelin), is deficient in severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy with DMD-like phenotype (SCARMMD). This disease, initially described in Tunisia, was also reported in patients from other North-African and Middle-Eastern countries. It has not been known whether this disease exists in other populations or regions of the world. The present study provides immunocytochemical evidence of 50 DAG specific deficiency in muscle biopsies of European sporadic patients (three French, one Italian and one Greek) who clinically presented with a Duchenne or Becker-like muscular dystrophy. This study demonstrates that SCARMMD exists in distinct European populations. Without knowing the status of the 50 kDa, such patients could be either undiagnosed or misdiagnosed as Duchenne, Becker or limb girdle muscular dystrophy. Their accurate diagnosis, which is essential for genetic counseling and eventual future therapies, is now possible by immunocytochemical analysis of the 50 DAG in the biopsied skeletal muscle. ▲

SCIENCES MÉDICALES

Medical sciences

M. F., F. M. S. T., H. C. :
INSERM U 153, CNRS URA 614,
17, rue du Fer-à-Moulin,
75005 Paris, France.

K. M., K. P. C. : Howard Hughes
Medical Institute and Department of
Physiology and Biophysics, University
of Iowa College of Medicine,
Iowa City, Iowa 52242, USA.

F. L., J.-C. K. : INSERM U 129, Institut
Cochin de Génétique Moléculaire,
24, rue du Faubourg-St-Jacques,
75014 Paris, France.

Reprints : M. Fardeau

Note présentée par Jean Rosa.

Note remise le 26 juillet 1993, acceptée le 28 juillet 1993.

Key words : severe childhood autosomal recessive muscular dystrophies, Duchenne/Becker muscular dystrophy, limb girdle muscular dystrophy, dystrophin, dystrophin-associated glycoproteins, adhalin (50 kDa dystrophin-associated glycoprotein).

Mots clés : dystrophie musculaire sévère de l'enfance autosomique récessive, myopathies de Duchenne/Becker, dystrophie musculaire des ceintures, dystrophine, glycoprotéines associées à la dystrophine, adhaline (50 kDa glycoprotéine associée à la dystrophine).

VERSION ABRÉGÉE

Une série de travaux a permis de démontrer que la dystrophine – protéine manquante ou altérée dans les dystrophies musculaires de Duchenne/Becker – était associée à un complexe oligomérique de grande taille, constitué de six protéines, dont quatre glycosylées, de localisation sarcolemmique. Ce complexe est considéré comme établissant un lien entre la dystrophine – partie du cytosquelette sous-membranaire – et la laminine – composante majeure de la matrice extra-cellulaire. Dans la myopathie de Duchenne, l'absence de dystrophine entraîne une réduction très marquée des éléments de ce complexe, et cette rupture du lien entre cytosquelette sous-membranaire et matrice extra-cellulaire peut rendre compte de la susceptibilité des fibres musculaires au processus de nécrose. Dans la myopathie de Becker, l'altération qualitative et/ou quantitative de la dystrophine entraîne une modification parallèle du complexe glycoprotéique. Cet ensemble de découvertes ouvrait la possibilité qu'une déficience sélective en l'un ou l'autre des éléments du complexe puisse entraîner le même processus lésionnel, et donc être en cause dans d'autres myopathies phénotypiquement semblables ou proches des myopathies de Duchenne/Becker.

Effectivement, une déficience en l'une des glycoprotéines (50 DAG) s'est révélée être constamment retrouvée dans une dystrophie musculaire sévère de l'enfance, de transmission autosomique récessive (SCARMD) (MIM 253700) initialement décrite en Tunisie, retrouvée ensuite dans d'autres pays d'Afrique du Nord et du Moyen-Orient. De ce fait, il a été proposé de nommer cette glycoprotéine « adhaline » du terme « adhal » qui signifie « muscle » en langue arabe. La prévalence marquée de cette affection dans ces pays était généralement considérée comme liée à l'importance du taux de consanguinité dans ces populations.

Jusqu'à la caractérisation de cette déficience en 50 DAG, il n'était pas possible, en dehors des populations migrantes à partir de ces pays, d'établir la présence de cette dystrophie musculaire dans d'autres régions que l'Afrique du Nord et le Moyen-Orient. La mise en évidence d'une telle déficience est rapportée ici chez des sujets originaires des pays européens, se présentant avec des tableaux clinico-pathologiques voisins des dystrophies de Duchenne et de Becker, mais avec une expression normale de dystrophine et la *dystrophin associated protein* (DRP ou utrophine) dans les prélèvements musculaires.

Cinq patients, âgés de 8 à 23 ans, ont fait l'objet de cette étude. Trois étaient d'origine française, un d'origine italienne, un d'origine grecque ; les cinq cas se présentaient comme sporadiques. Aucun ne se connaissait d'ascendants ou de liens avec les pays d'Afrique du Nord. Aucune consanguinité n'était retrouvée dans les ascendants. Les deux patients de sexe masculin avaient été diagnostiqués cliniquement comme des myopathies de Duchenne/Becker. Pour les trois patientes de sexe féminin, la possibilité de myopathies de Duchenne chez des filles avait été évoquée pour deux d'entre elles, et la troisième était reconnue comme ayant probablement une dystrophie des ceintures. Aucun ne présentait d'atteinte cardiaque, et l'électrocardiogramme était normal chez les cinq patients. Tous présentaient une hypertrophie des mollets. Trois avaient perdu la marche au moment de l'examen, entre 9 et 21 ans. Le taux maximal de créatine kinase sérique était à plus de 10 fois la normale chez tous les patients (*Tableau I*).

Chaque patient a subi, avec son accord, une biopsie musculaire au niveau du chef moyen du deltoïde. Les prélèvements, après congélation à -165° , ont été traités pour l'histopathologie selon les techniques conventionnelles. Une étude immunocytochimique a été réalisée sur des coupes de 7 μ m d'épaisseur à l'aide des anticorps antidystrophine et d'anticorps développés contre les glycoprotéines de 35, 43, 50, et 156 kDa et la protéine de 59 kDa du complexe des protéines associées à la dystrophine.

Les biopsies musculaires des cinq patients présentaient une formule de nécrose-régénération et une augmentation modérée du collagène endomysial. Les anticorps antidystrophine marquaient le sarcolemme comme chez les témoins normaux. Les anticorps anti-156 DAG, anti-59 DAG et anti-43 DAG coloraient également normalement le contour des fibres musculaires. Par contre, la 50 DAG était indétectable chez trois patients et à peine détectable chez deux patients (*Fig. 1 et 2*). Même chez ces deux patients, la coloration était plus faible que dans les biopsies provenant de malades atteints de myopathie de Duchenne. Le marquage avec l'anticorps anti-35 DAG était également légèrement réduit par rapport aux contrôles (*Fig. 1*).

La déficience en 50 DAG a été mise en évidence récemment dans une forme de myopathie sévère de l'enfance de transmission autosomique récessive, décrite d'abord en Tunisie, puis retrouvée dans d'autres pays d'Afrique du Nord et du Moyen-Orient. Un important degré de consanguinité était présent dans ces familles. Jusqu'aux résultats présentés ici, on ignorait si une myopathie semblable était présente dans les pays européens, ou si cette myopathie particulière était confinée à l'Afrique du Nord et aux pays du Moyen-Orient.

Certes, des cas isolés de dystrophie musculaire sévère de l'enfance ou de l'adolescence, en particulier chez des filles cliniquement proches des myopathies de Duchenne, avaient été précédemment reconnus dans des pays non africains, mais sans qu'il soit possible de les caractériser de façon précise dans le groupe aux frontières mal définies des dystrophies des ceintures. Dans ce groupe, la caractérisation des anomalies de distribution de la dystrophine avait permis de reconnaître des filles hétérozygotes pour la myopathie de Duchenne, avec une expression clinique inhabituellement sévère. L'hypothèse d'une dystrophie identique à celle décrite en Tunisie était parfois évoquée, comme chez nos patients, mais sans possibilité de l'établir formellement. Des résultats exposés ici établissent que des patients jusqu'ici considérés comme atteints de dystrophies de Duchenne/Becker ou de dystrophies des ceintures sont en fait diagnostiqués comme tels à tort, et relèvent d'une pathologie dystrophique différente, aujourd'hui bien caractérisée.

On ne sait toujours pas si la déficience en 50 DAG est le défaut primaire de cette myopathie (SCARMD). La localisation du gène déficient a été précisée sur trois familles tunisiennes dans la région périméditerranéenne du chromosome 13, et cette localisation a été confirmée sur une série de familles d'origine algérienne. Jusqu'à ce que la relation entre anomalie génique et déficience en 50 DAG soit précisée, l'hétérogénéité génétique de ce groupe pathologique n'est pas exclue. Cependant, la démonstration de la déficience en 50 DAG permet une première clarification au sein d'un groupe de malades, à dystrophine normale, diagnostiqués à tort comme atteints de dystrophies musculaires d'autre nature. L'extension géographique des myopathies SCARMD est maintenant à préciser. ▲

Dystrophin, the deficient protein in Duchenne and Becker muscular dystrophy (DMD/BMD), is associated with a large oligomeric complex of sarcolemmal glycoproteins [1, 2]. The dystrophin-glycoprotein complex comprising 4 glycoproteins (35, 43, 50 and 156 kDa) and 2 proteins (25 and 59 kDa) spans the sarcolemma to provide a linkage between the subsarcolemmal cytoskeleton and the laminin, a major component of the extracellular matrix [1, 2]. In DMD, the absence of dystrophin leads to a great reduction in all of the dystrophin-associated proteins, thus disrupting the linkage between the subsarcolemmal cytoskeleton and the extracellular matrix [3]. This is presumed to render muscle cells susceptible to necrosis [3]. In BMD it was recently shown that the deficiency in dystrophin correlates both in intensity and distribution with the reduction in all of the dystrophin-associated proteins [4]. These discoveries raised the possibility that the deficiency in one of the dystrophin-associated proteins could be the cause of other muscular dystrophies. We have demonstrated the deficiency of the 50 kDa dystrophin-associated glycoprotein (50 DAG) in severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy with DMD-like phenotype (SCARMD) [5], (MIM 253700) [6], a disease prevalent in North-African countries [6-11]. Because of this, it was proposed to name this glycoprotein "adhalin", from the Arab word "adhal" which means muscle. The dystrophin and the dystrophin-related protein (or utrophin) are normally expressed in this disease [12, 13]. High rate of consanguinity was assumed to be a possible explanation for the high prevalence of SCARMD in these countries [5]. Dysfunction of the dystrophin-glycoprotein complex due to the deficiency of the 50 DAG is presumed to lead to muscle cell necrosis in SCARMD [5].

Until the discovery of the deficiency of 50 DAG, it was uncertain whether this disease existed in other regions of the world, except in migrant families originating from North-African and Middle-Eastern countries. Here we report the specific deficiency of 50 DAG in a subset of European patients, who clinically presented with a Duchenne/Becker-like or limb girdle muscular dystrophy, but who had normal expression of dystrophin.

Materials and methods

Patients

Five patients, aged 8 to 23 years, were investigated in this study. Their clinical characteristics are summarized

in *Table I*. Three were originated from France, one from Italy and the other from Greece. All were sporadic cases. No familial links with North-African populations were found. No consanguinity was evident in their pedigrees. The two male patients were previously diagnosed as having Duchenne (case 3) or Becker (case 4) muscular dystrophies. In the females patients the diagnosis was either Duchenne muscular dystrophy "in girls" (cases 1 and 2) or limb girdle muscular dystrophy (case 5). All patients had calf hypertrophy. None had cardiac involvement and the ECG was normal. The serum CK level was fourteen times or more the normal levels.

Muscle biopsies

Biopsies of the medial head of deltoid muscle were performed in the five patients. The biopsy samples were frozen in isopentane cooled in liquid nitrogen and stored at -80°C . Conventional histological and histochemical techniques were performed in $10\ \mu\text{m}$ transverse frozen cryostat sections [14].

Antibodies

Monoclonal antibody VIA42 against dystrophin and IVD31 against the 50 DAG were characterized previously [1-5]. Specific antibodies against dystroglycan (156 DAG), 59 kDa dystrophin-associated protein (59 DAP), 50 DAG, 43 kDa dystrophin-associated glycoprotein (43 DAG) and 35 kDa dystrophin-associated glycoprotein (35 DAG) were affinity-purified as described [1-5]. Other monoclonal (NLC DYS 2 and NLC DYS 3, Novocastra) and polyclonal [15] anti-dystrophin antibodies directed against epitopes in different domains of this protein were also used.

Immunocytochemistry

Indirect immunofluorescence microscopy of $7\ \mu\text{m}$ -thick cryosections from skeletal muscle biopsy specimens was performed as described previously [1-5, 15]. Blocking was performed by a 30 min incubation with 5 % bovine serum albumin in PBS (50 mM sodium phosphate, pH 7.4, 0.9 % NaCl). Incubation with primary antibodies was performed for 1 h. In the case of monoclonal antibodies, cryosections were incubated with 1 : 200 diluted fluorescein-labeled goat anti-mouse IgG (Boeringer-Manheim) for 1 h. In the case of sheep primary antibodies, cryosections were incubated for 30 min with 1 : 500 diluted biotinylated rabbit anti-sleep IgG (Vector Laboratories) followed by incubation for 30 min with 1 : 1000 diluted fluorescein-

Table I

Summary of clinical data of the European patients with SCARMD

Patient	Age	Sex	Origin	Consanguinity	Onset	Loss of Ambulation	Calf Hypertrophy	Serum CK Level (Age)*
1	8 y	F	French	-	6-7 y	-	+	4 375 (8 y)
2	9 y	F	Italian	-	5 y	9 y	+	6 400 (8 y)
3	11 y	M	French	-	5-6 y	11 y	+	4 000 (8 y)
4	21 y	M	French	-	4 y	21 y	+	1 500 (21 y)
5	23 y	F	Greek	-	4 y	-	+	2 300 (23 y)

* Serum creatine kinase level in U/l (normal upper limit 110 U/l).

conjugated streptavidin (Jackson Company). Incubation with all antibodies was performed at room temperature. Each incubation was followed by extensive washing with PBS. Final specimens were examined under a Zeiss Axioplan fluorescence microscope. For reliable comparison, cryosections from normal control and patients with other muscle diseases (Duchenne, facioscapulohumeral, oculopharyngeal, limb girdle, and myotonic muscular dystrophies) were placed on the same microscopy slide and processed identically. In addition, photographs were taken under identical conditions with the same exposure time.

Results

The muscle biopsies from the five patients showed a necrotic regenerative pattern. The regenerating fibers had a generally focal distribution. Variation of fiber diameter, increase in number of muscle fiber nuclei and internal nuclei were found in all cases. Opaque or hyaline hypercontracted fibres were rarely found. Type I fiber predominance was present in all cases. There was a slight increase of interstitial collagen tissue in all cases.

Antibodies against dystrophin and the 43 kDa (43 DAG), 50 kDa (50 DAG) and 156 kDa (156 DAG) dystro-

phin-associated-glycoprotein and 59 kDa dystrophin-associated-protein (59 DAP) identically stained the sarcolemma in the skeletal muscle from normal human controls (Fig. 1) and from patients with facioscapulohumeral, oculopharyngeal, myotonic and limb girdle muscular dystrophies, as described previously [5]. In the skeletal muscle from DMD patients, sarcolemma was not stained by the antibodies against dystrophin, and the staining for the 50 DAG (Fig. 1) and all the other dystrophin-associated proteins was greatly reduced in the sarcolemma.

In the skeletal muscle from five patients with severe childhood muscular dystrophy, the dystrophin and the 43 DAG, 156 DAG and the 59 DAP were preserved in the sarcolemma. However staining by three different antibodies against the 50 DAG [5] was drastically reduced (Figs 1 and 2). Using a monoclonal antibody, IVD31 [4, 5], the 50 DAG-staining was undetectable in three of these patients [patients 2, 3 and 4 (Figs. 1 and 2)] and was barely detectable in the sarcolemma in two patients [patients 1 (Fig. 2) and 5 (not shown)]. Even in these two patients, the staining was far less intense than in DMD patients (Fig. 2). Staining for the 35 DAG was moderately reduced in these five patients compared to normal controls (Fig. 1).

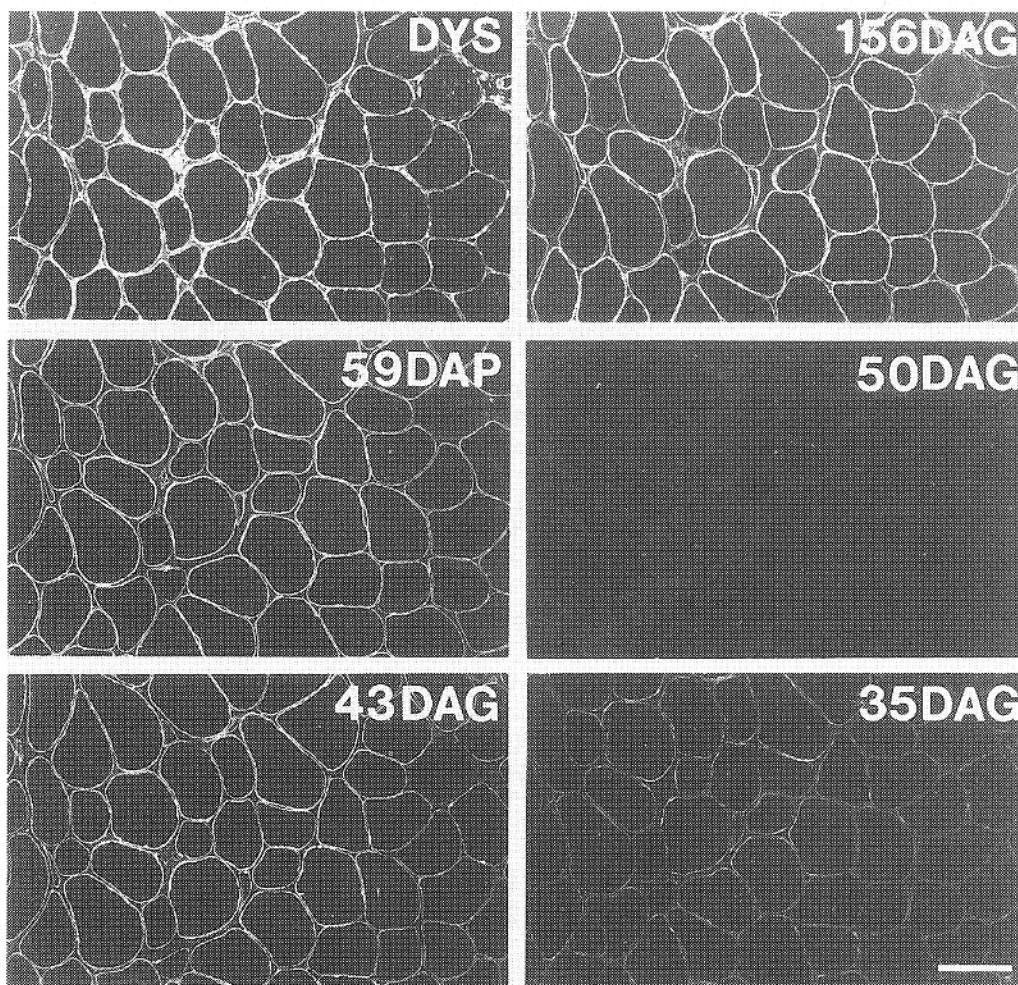
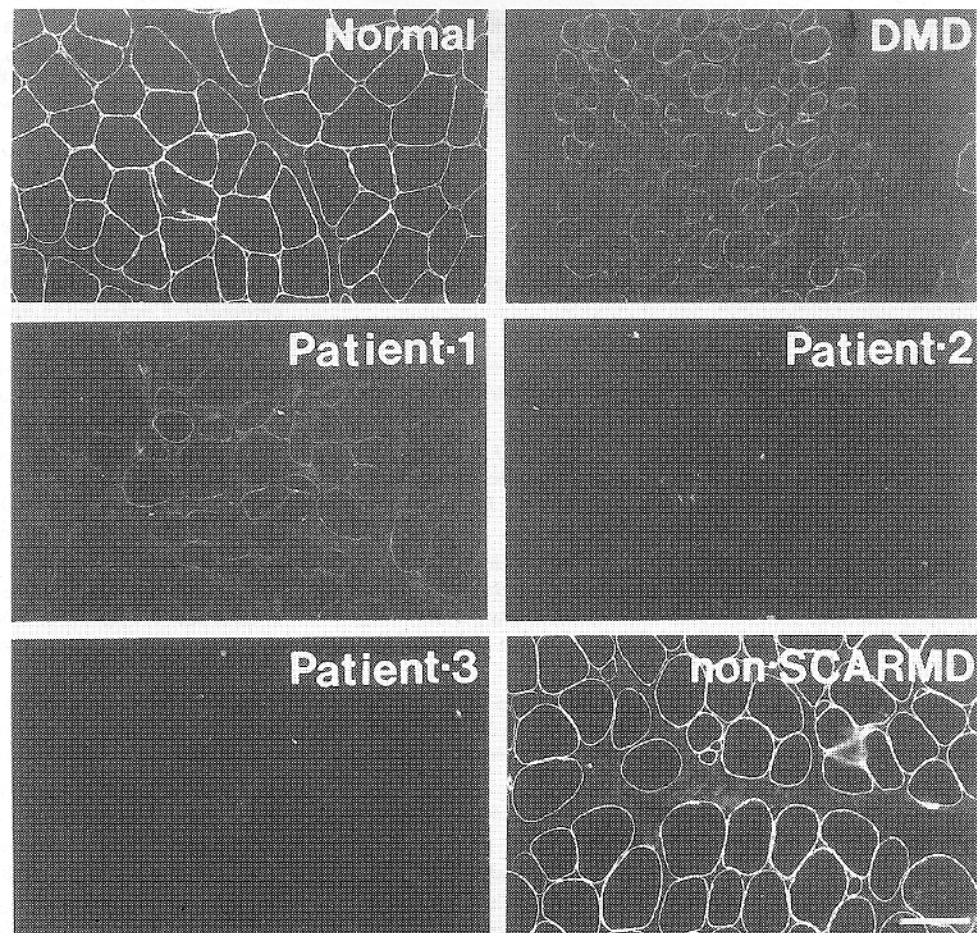


Figure 1. **Immunohistochemical analysis of dystrophin and the dystrophin-associated proteins in biopsied skeletal muscle from patient 4.** Transverse cryosections (7 μ m) from deltoid muscle were immunostained with antibodies against dystrophin (DYS), 156 DAG, 59 DAP, 50 DAG, 43 DAG and 35 DAG. Bar, 100 μ m. In the patient with SCARM (patient 4), the 50 DAG was undetectable and the 35 DAG was reduced, although dystrophin, 156 DAG, 59 DAP and 43 DAG were well preserved.

Figure 2. **Immunohistochemical analysis of the 50 DAG in biopsied skeletal muscle.** Transverse cryosections (7 μ m) from deltoid muscle were immunostained with monoclonal antibody against the 50 DAG. Bar, 100 μ m. The 50 DAG-staining was undetectable in two patients with SCARMD (patients 2 and 3). In patient 1 (as well as in patient 5, not shown), sarcolemmal 50 DAG-staining was barely detected but it was far less intense than in DMD patient. The photograph labelled "non-SCARMD", is from a patient with limb girdle muscular dystrophy; in this disorder and in different other muscular dystrophies (facioscapulohumeral, oculopharyngeal and myotonic) the 50 DAG as well as the other components of the dystrophin-glycoprotein complex were well preserved.



Discussion

A form of severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy (SCARMD) very close to that of Duchenne/Becker muscular dystrophies (DMD/BMD), but which affected both males and females, and has a wider range of clinical onset and intra-familial severity than the DMD/BMD was initially reported from Tunisia [7, 8]. A similar disease has been reported from other South-mediterranean and Middle-Eastern countries, including Algeria and Sudan [6-13, 16-18]. Consanguinity was common in Tunisian and Algerian pedigrees [7-11]. The deficiency of 50 DAG initially reported in three patients from Algeria and one patient from Lebanon [5], made possible the accurate diagnosis of this disease, as confirmed in series of other patients from Algeria [11] and Morocco (unpublished personal data).

Occasional cases of severe childhood muscular dystrophy, particularly in girls, have been described previously in non-North-African countries, but they were difficult to characterize within the ill-defined group of limb-girdle muscular dystrophies [16, 19-23]. The demonstration of a mosaic expression of dystrophin has allowed the identification, within the latter group, of symptomatic carriers of DMD [24]. The possibility of the occurrence of a muscular dystrophy similar to that frequently observed in Tunisia was sometimes evoked, like in the five patients reported here, but without the possibility of having any confirmation.

The present results show that this disease exists outside the Southern and Eastern Mediterranean countries, and suggest that non-North-African patients with SCARMD can be either undiagnosed or mis-diagnosed as DMD/BMD or a severe form of limb girdle muscular dystrophy.

In the populations where endogamy is much less frequent than in North-Africa, a much lower incidence of this disease is expected. This could explain the low incidence of SCARMD in the European populations. Indeed, consanguinity was negative for all of the European SCARMD patients reported here.

At present, the primary defect causing the deficiency of the 50 DAG in SCARMD is unknown [5]. Recently, the defective gene of this disease has been mapped to the pericentrometric region of chromosome 13q in three Tunisian families [25] and this was confirmed in thirteen Algerian families [11]. Until the relationship between the abnormality of this gene and the deficiency of 50 DAG is clarified, a genetic heterogeneity of the patients presenting this deficiency cannot be excluded. However, the present results allowed, for the first time, the identification of a deficiency of the 50 DAG within the group of European patients with a phenotype similar to DMD/BMD or limb girdle muscular dystrophy, and this is important for genetic counseling and for potential future therapies. Furthermore, these results imply that the geographic distribution of SCARMD should be reevaluated. ▼

Acknowledgments : we thank J. Cartaud for the gift of the polyclonal antibody against dystrophin and Ch. Thènard Noël for referring patient 1. We also thank Cynthia J. Leveille and Michael J. Mullinix for expert technical assistance, and Steven L. Roberds and Oxana Ibraghimov-Beskrovnya for the helpful comments on the manuscript. This work was supported by the Association Française contre les Myopathies (France) and the Muscular Dystrophy Association (USA). KPC is an investigator of the Howard Hughes Medical Institute.

REFERENCES

1. Ervasti J. M., Campbell K. P. 1991. Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell* 66: 1121-31.
2. Ibraghimov-Beskrovnya O., Ervasti J. M., Leveille C. J., Slaughter C. A., Sernett S. W., Campbell K. P. 1992. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to extracellular matrix. *Nature* 355: 696-702.
3. Ohlendieck K., Matsumura K., Ionasescu V., Towbin J. A., Bosch E. P., Weinstein S. L., Sernett S. W., Campbell K. P. 1993. Duchenne muscular dystrophy : deficiency of dystrophin-associated proteins in the sarcolemma. *Neurology* 43: 795-800.
4. Matsumura K., Nonaka I., Tomé F. M. S., Arahata K., Collin H., Leturcq F., Récan D., Kaplan J. C., Fardeau M., Campbell K. P. 1993. Mild deficiency of dystrophin-associated proteins in Becker muscular dystrophy patients having in-frame deletions in the rod domain of dystrophin. *Am. J. Hum. Genet.* 53: 409-16.
5. Matsumura K., Tomé F. M. S., Collin H., Azibi K., Chaouch M., Kaplan J. C., Fardeau M., Campbell K. P. 1992. Deficiency of the 50 K dystrophin-associated glycoprotein in severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy. *Nature* 359: 320-2.
6. McKusick V. A. 1991. Mendelian Inheritance in Man, 9th ed. Baltimore and London : The Johns Hopkins University Press.
7. Ben Hamida M., Fardeau M. 1980. Severe autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies frequent in Tunisia. In : Angelini C., Danieli G. A., Fontanari D., eds. *Muscular Dystrophy Research : Advances and New Trends*. ICS No. 527. Amsterdam : Excerpta Medica, 143-6.
8. Ben Hamida M. Fardeau M., Attia N. 1983. Severe childhood muscular dystrophy affecting both sexes and frequent in Tunisia. *Muscle Nerve* 6: 469-80.
9. Masmoudi A. N. 1986. Les dystrophies musculaires progressives en Algérie. Etude sur 153 cas. *Thèse de Médecine*, Alger.
10. Azibi K., Chaouch M., Reghis A., Vinet M. C., Vignal A., Becuwe N., Beckmann J., Seboun E., Nguyen S., Cometto M., Fardeau M., Tomé F., Leturcq F., Chafey P., Bachner L., Kaplan J. C. 1991. Linkage analysis of 19 families with autosomal recessive (Duchenne-like) muscular dystrophy from Algeria. *Human Gene Mapping 11* (1991). *Cytogenet. Cell Genet.* 58: 1907.
11. Azibi K., Bachner L., Beckmann J., Hamouda M., Matsumura K., Chaouch M., Chaouch A., Ait-Ouarab R., Vignal A., Weissenbach J., Vinet M. C., Leturcq F., Collin H., Tomé F. M. S., Reghis A., Fardeau M., Campbell K. P., Kaplan J. C. 1993. Severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy with the deficiency of the 50 kDa dystrophin-associated glycoprotein maps to chromosome 13q12. *Hum. Mol. Genet.* (in press).
12. Ben Jelloun-Dellagi S., Chaffey P., Hentati F., Ben Hamida Ch., Tomé F., Collin H., Dellagi K., Kaplan J. C., Fardeau M., Ben Hamida M. 1990. Presence of normal dystrophin in Tunisian severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy. *Neurology* 40: 1903.
13. Khurana T. S., Watkins S. C., Chafey P., Chelly J., Tomé F. M. S., Fardeau M., Kaplan J. C., Kunkel L. M. 1991. Immunolocalization and developmental expression of dystrophin related protein in skeletal muscle. *Neuromusc. Disord.* 1: 185-94.
14. Fardeau M. 1973. Caractéristiques cytochimiques et ultrastructurales des différents types de fibres musculaires squelettiques extrafusales (chez l'homme et quelques mammifères). *Ann. Anat. Pathol.* 18: 7-34.
15. Cartaud A., Ludosky M. A., Tomé F. M. S., Collin H., Stetzkowski-Marden F., Khurana T. S., Kunkel L. M., Fardeau M., Changeux J. P., Cartaud J. 1992. Localisation of dystrophin and dystrophin-related-protein at the electromotor synapse and neuromuscular junction in *Torpedo marmorata*. *Neuroscience* 48: 995-1003.
16. Dubowitz V. 1980. Rapidly progressive limb girdle muscular dystrophy in childhood. In Angelini C., Danieli G. A., Fontanari D., eds. *Muscular Dystrophy Research : Advances and New Trends*. ICS No. 527. Amsterdam : Excerpta Medica, 129-33.
17. Salih M. A. M., Omer M. I. A., Bayoumi R. A., Johnson O. K. M. 1983. Severe autosomal recessive muscular dystrophy in an extended Sudanese kindred. *Dev. Med. Child. Neurol.* 25: 52-3.
18. Farag T. I., Teebi A. S. 1990. Duchenne-like muscular dystrophy in arabs. *Am. J. Med. Genet.* 32: 290.
19. Gardner-Medwin D., Johnston H. M. 1984. Severe muscular dystrophy in girls. *J. Neurol. Sci.* 64: 79-87.
20. Somer H., Voutilainen A., Knuutila S., Kaitila I., Rapola J., Leinonen H. 1985. Duchenne-like muscular dystrophy in two sisters with normal karyotypes : evidence for autosomal recessive inheritance. *Clin. Genet.* 28: 151-6.
21. Norman A. M., Hughes H. E., Gardner-Medwin D., Nicholson L. V. B. 1989. Dystrophin analysis in the diagnosis of muscular dystrophy. *J. Neurol. Sci.* 64: 79-87.
22. Passos-Bueno M. R., Vainzof M., Pavenello R. C. M., Pavenello-Filho I., Lima M. A. B. O., Zatz M. 1991. Limb-girdle syndrome : a genetic study of 22 large Brazilian families. Comparison with X-linked Duchenne and Becker dystrophies. *J. Neurol. Sci.* 103: 65-75.
23. Zatz M., Passos-Bueno M. R., Papaport D. 1989. Estimation of the proportion of Duchenne muscular dystrophy with autosomal recessive inheritance. *Am. J. Med. Genet.* 32: 407-10.
24. Hoffman E. P., Arahata K., Minetti C., Bonilla E., Rowland L. P. et al. 1992. Dystrophinopathy in isolated cases of myopathy in females. *Neurology* 42: 967-75.
25. Ben Othmane K., Ben Hamida M., Pericak-Vance M. A., Ben Hamida C., Blél S., Carter S. C., Bowcock A. M., Petruhkin K., Gilliam T. C., Roses A. D., Hentati F., Vance J. M. 1992. Linkage of Tunisian autosomal recessive Duchenne-like muscular dystrophy to the pericentromeric region of chromosome 13q. *Nature Genet.* 2: 315-7.