



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique

Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed
Boudiaf

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Génétique Moléculaire Appliquée

THÈSE

En vue de l'obtention du
Diplôme de Doctorat LMD

Présentée par :

Madame BENSENOUCI Salima

Intitulé

***Etude moléculaire de la maladie
Xeroderma Pigmentosum dans la région
de l'Ouest Algérien***

Soutenue le 02/11/2016

Spécialité : Génétique moléculaire et cellulaire
Option : Biologie moléculaire

Le jury est composé de :

<i>Grade, Nom &Prénom</i>	<i>Statut</i>	<i>Domiciliation</i>
<i>Pr BOUDJEMA Abdallah</i>	<i>Président</i>	<i>USTOMB (Oran)</i>
<i>Pr SAIDI-MEHTAR Nadhira</i>	<i>Directrice de thèse</i>	<i>USTOMB (Oran)</i>
<i>Pr SAHRAOUI Tewfik</i>	<i>Examineur</i>	<i>U.Oran 1 Ahmed BENBELLA</i>
<i>Dr MEROUFEL Djabaria Naima</i>	<i>Examinatrice</i>	<i>USTOMB (Oran)</i>

Année universitaire 2016 / 2017

*« On m'a appris que le chemin du
progrès n'était ni rapide ni facile »*

- Marie Curie -

*A Mon aimable mari
A la mémoire de ma grand-mère
A Ma famille & mes amis*

Remerciements

*J'adresse mes vifs remerciements au **Pr. BOUDJEMA Abdallah** ; professeur en biologie moléculaire à l'université des sciences et de la technologie d'Oran-Mohamed Boudiaf- (USTO-MB) ; qui a eu la bonté d'accepter d'assurer la présidence de ce jury. Assurée de l'intérêt que vous portez à ce travail, je reste convaincue que votre présence m'assurera de la valorisation et de la teneur de notre projet .Veuillez croire en mon éternel respect et ma sincère gratitude.*

*Mes remerciements au **Dr MEROUFEL Djabaria Naima** ; Maître de conférences classe A en biologie moléculaire à l'université des sciences et de la technologie d'Oran-Mohamed Boudiaf- (USTO-MB) ; pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant d'examiner ce travail et de l'enrichir de ses éminentes compétences scientifiques dont son enseignement et sa passion resteront des exemples pour moi. Veuillez accepter ce travail, en gage de mon grand respect et ma profonde estime.*

*Je remercie également **Pr. SAHRAOUI tewfik** ; professeur au département de biologie à l'université d'Oran 1, Ahmed Ben Bella ; d'avoir accepté avec une grande amabilité de faire partie de ce jury pour examiner cette thèse et pour m'avoir fait l'honneur de sa présence à ma soutenance. Soyez assuré de ma profonde reconnaissance et de ma considération respectueuse.*

*Je souhaite remercier tout particulièrement ma directrice de thèse **Pr. SAÏDI-MEHTAR Nadhira** ; professeur en biologie moléculaire à l'université des sciences et de la technologie d'Oran-Mohamed Boudiaf- (USTO-MB). J'ai été honorée de la grande confiance qu'elle m'a accordée durant ces années en acceptant d'encadrer ce travail doctoral. Je lui suis reconnaissante pour sa patience, sa disponibilité, ses encouragements, sa bienveillance qui m'ont permis de surmonter les difficultés rencontrées au cours de cette thèse. Par ailleurs, par sa rigueur, ses conseils, ses commentaires, son esprit critique et ses qualités scientifiques, elle a su apporter à ce travail le recul nécessaire. Enfin, j'ai été extrêmement sensible à ses qualités humaines, à son dynamisme, à son professionnalisme et à son ouverture d'esprit. Je suis infiniment heureuse et honorée d'avoir fait ma thèse sous sa direction. Aucune expression de gratitude ne sera suffisante pour vous exprimer mon respect et ma reconnaissance.*

*Je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères à **Mr. LOUHIBI Lotfi** ; maître assistant classe A à l'université des sciences et de la technologie d'Oran-Mohamed Boudiaf- (USTO-MB) ; de m'avoir orienté et encouragé dans mes travaux de recherche, également d'avoir consacré du temps à la lecture, l'analyse, et la critique de ce travail. Je lui adresse toute ma gratitude pour son soutien, ces conseils et son aide précieuse quand j'en ai eu besoin. Malgré toutes ses journées surchargées, merci d'avoir toujours trouvé un moment pour discuter quand je frappais à sa porte et de m'avoir supportée dans mes moments de détresse. Il a su me faire partager ses nombreuses connaissances, sa vision toujours claire et synthétique. Que cette thèse soit l'occasion de vous exprimer mon respect, ma reconnaissance et ma gratitude pour m'avoir fait confiance, pour m'avoir beaucoup appris.*

J'aimerais remercier également :

- Tous les patients qui ont accepté de participer à cette étude.
- L'association des enfants de la lune et plus particulièrement **Noureddine Laïd**, président de l'association.
- Le staff hospitalier qui a contribué à la réalisation de cette étude. Je pense plus particulièrement à Madame, le professeur **MAHMOUDI Khadidja**, chef de service d'ophtalmologie de l'hôpital pédiatrique de Canastel, qui a eu l'amabilité de nous recevoir au niveau de son service. Je dois beaucoup à sa confiance chaleureuse et à son enthousiasme, et je tiens à lui exprimer ma profonde gratitude.

*Ce travail est le résultat d'une collaboration avec le laboratoire INSERM, Biothérapies des maladies génétiques et cancers, U1035 de l'Université Bordeaux Segalen, Bordeaux (France). Je suis particulièrement redevable au **Pr. DE VERNEUIL Hubert** qui m'a accueilli au sein de son unité. Je tiens à le remercier pour sa gentillesse et ses conseils qui m'ont permis de me sentir à l'aise dans ce laboratoire. Je remercie chaleureusement tous les membres de son équipe pour leur grande disponibilité et l'ambiance décontractée qui m'a facilité le travail, et tout particulièrement **Dr. GED Cecile** pour ses conseils avisés et pour son suivi qu'elle m'a apporté tout au long de mon stage.*

Je tiens également à exprimer ma gratitude envers l'équipe du Service de biochimie, Plateau technique de Biologie Moléculaire, Pôle de Biologie et Pathologie de l'Hôpital Pellegrin, Bordeaux (France), pour m'avoir permis de réaliser ce travail dans les meilleures conditions.

Je tiens à remercier tout particulièrement l'équipe du laboratoire de Génétique Moléculaire appliquée, Université des Sciences et de la Technologie d'Oran (Mohamed BOUDIAF), j'associe à ces remerciements mes amis, que je ne citerai pas de peur d'oublier quelqu'un, qui ont toujours été présents, et qui m'ont encouragée et soutenue tout au long de ma thèse. Vous avez été une équipe formidable avec laquelle j'ai partagé des moments agréables.

Je remercie toutes les personnes qui par leurs encouragements, leur aide, leurs conseils ou leurs critiques, ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

A toutes et tous, Merci...

Résumé

Le *Xeroderma pigmentosum* (XP) est une maladie héréditaire rare, caractérisée par une hypersensibilité aux rayons UV due à des altérations de la voie de réparation par excision de nucléotides (NER). Les patients XP ont un risque élevé de développer des cancers cutanés et ophtalmologiques, certains présentent également des troubles neurologiques.

Sa transmission sur le mode autosomique récessif explique sa relative fréquence dans les pays où la consanguinité est élevée et la taille des familles est grande, tels que les pays du Maghreb.

À ce jour, huit gènes (*XPA* à *XPG* et *XPV*) sont responsables de la maladie. Parmi eux, les gènes *XPA* et *XPC* décrits comme les plus fréquemment mutés chez les patients XP dans les pays du Maghreb.

Cette présente étude consiste à l'exploration de deux mutations qui par la littérature semblent les plus fréquentes dans les pays du Nord Africain : Mutation non-sens (c.682C> T, p.Arg228X) siégeant au niveau du gène *XPA*, et une délétion de deux paires de bases (c.1643_1644delTG ou p.Val548Ala fsX25) au niveau du gène *XPC*. L'étude s'est portée sur 19 familles non apparentées et l'exploration des mutations a été réalisée par différentes techniques de biologie moléculaire (PCR-RFLP, PCR-séquençage).

L'analyse bio-informatique a montré que parmi les 19 cas index, 17 cas présentaient la mutation delTG (délétion de 2pb) à l'état homozygote. Les deux cas restant ne présentaient pas de délétion mais portaient la mutation non-sens R228X à l'état homozygote.

Les résultats obtenus ont révélé que la mutation (p.Val548AlafsX25) est la cause majeure du *xeroderma pigmentosum* dans les familles Algériennes.

La conception d'une méthode simple pour permettre le diagnostic moléculaire précis, aurait un impact important sur l'amélioration de la prise en charge des patients et de leurs proches. Cela pourrait également contribuer à moyen terme à la mise en place d'un programme « conseil génétique » pour les familles à risque.

A long terme, les résultats obtenus contribueront au dépistage des porteurs asymptomatiques pour diminuer la fréquence d'hétérozygotie ainsi que la fréquence de cette maladie.

Mots clés : *Xeroderma pigmentosum*, *XPA*, *XPC*, système NER, mutation, Ouest Algérien.

Abstract

Xeroderma pigmentosum (XP) is a rare inherited disease, characterized by hypersensitivity to UV radiation due to deteriorations of the nucleotide excision repair pathway (NER). The XP patients have a high risk to develop skin and eye cancers, some also present neurological disorders.

Its transmission autosomal recessive explains its relative frequency in countries where consanguinity is high and family size is large, such as the Maghreb countries

To date, eight genes (*XPA* to *XPG* and *XPV*) are responsible for the disease. Among them, the *XPA* and *XPC* genes described as the most frequently mutated in XP patients in the Maghreb countries.

This present study consists to explore two mutations that appear in literature the most frequent in the countries of North Africa: Nonsense mutation (c.682C> T, p.Arg228X) sitting at the *XPA* gene and a deletion two base pairs (c.1643_1644delTG or p.Val548Ala fsX25) at the *XPC* gene. The study included 19 unrelated families and the exploration of mutations was carried out by various molecular biology techniques (PCR-RFLP, PCR-sequencing).

The bioinformatics analysis showed that among the 19 index cases, 17 cases had the mutation delTG (deletion of 2bp) at the homozygous state. The remaining 2 cases showed no deletion but carried the nonsense mutation R228X in the homozygous state.

The results obtained revealed that the mutation (p.Val548AlafsX25) is the major cause of *xeroderma pigmentosum* in Algerian families.

Design a simple method to allow the precise molecular diagnosis would have a significant impact on improving the care of patients and their relatives, and in the medium term it could contribute to the implementation of a program "genetic counseling" for families at risk.

In the long run, these findings will contribute to screening asymptomatic carriers to reduce the frequency of the heterozygosity and the frequency of this disease.

Keywords: Xeroderma pigmentosum, *XPA*, *XPC*, NER system, mutation, West Algerian.

الملخص

جفاف الجلد المصطبغ (XP) هو مرض وراثي نادر، يتميز بوجود حساسية مفرطة للأشعة فوق البنفسجية (UV) بسبب خلل في آلية إصلاح استئصال النوكليوتيدات (NER) التي تحدث للحمض النووي «DNA». المرضى XP لديهم مخاطر عالية لتطوير سرطان الجلد والعين، وفي بعض الحالات الاضطرابات العصبية. المرض هو وراثي جسدي متنحي وهذا ما يفسر التردد النسبي في البلدان التي تكون فيها زواج الأقارب عالية وحجم الأسرة كبير، مثل دول المغرب العربي.

حتى الآن، ثمانية مورثات (*XPA* إلى *XPG* و *XPV*) هي المسؤولة عن هذا المرض. من بينها، جينات *XPA* و *XPC* وصفها في معظم الأحيان تحور في XP المرضى في بلدان المغرب العربي.

ترمي هذه الدراسة إلى استكشاف اثنين من الطفرات التي تظهر في البحوث الأكثر شيوعا في ودول شمال أفريقيا: طفرة (p.Arg228X، c.682C> T) المتواجدة في الجين *XPA* وحذف زوجي قاعدتين (c.1643_1644delTG) أو p.Val548Ala fsX25 على مستوى المورثة *XPC*. وشملت الدراسة 19 عائلة غير ذات قرابة وتم البحث عن الطفرات عن طريق استعمال مختلف تقنيات البيولوجيا الجزيئية (PCR-RFLP, PCR-sequencing).

أظهر التحليل المعلوماتية الحيوية أن من بين 19 حالة مؤكدة، كانت 17 حالة حاملة للطفرة delTG (حذف 2pb) بشكل متماثل. أما الحالتين المتبقيتين لم تكونا حاملتين للحذف بل اشارت الى وجود الطفرة R228X بشكل متماثل.

وكشفت نتائج الدراسة المتحصل عليها أن الطفرة (p.Val548AlafsX25) هي السبب الرئيسي لمرض الجلد المصطبغ عند الأسر الجزائرية.

تصميم طريقة بسيطة للسماح بالتشخيص الجزيئي الدقيق سيكون لها تأثير كبير على تحسين رعاية المرضى وذويهم، وعلى المدى المتوسط يمكن أن تساهم في تنفيذ برنامج "الاستشارة الوراثية" للأسر المعرضة للخطر.

على المدى الطويل سوف تساهم هذه النتائج لفحص الناقلين بدون أعراض، للحد من وتيرة تباين وتردد هذا المرض.

الكلمات المفتاحية: جفاف الجلد المصطبغ، *XPA*، *XPC*، نظام NER، طفرات، الغرب الجزائري.

Production scientifique

Ce travail de thèse a fait l'objet d'une publication et des communications suivantes :

Publication

BENSENOUCI S., LOUHIBI L., DE VERNEUIL H., MAHMOUDI K., SAIDI-MEHTAR N. «*Diagnosis of Xeroderma Pigmentosum groups A and C by detection of two prevalent mutations in West Algerian population: A rapid genotyping tool for the frequent XPC mutation c.1643_1644delTG*». Article publié en 2016, dans la revue « *Biomed Research International* ».

Communications Affichées

- **BENSENOUCI S.**, LOUHIBI L., MAHMOUDI K., SAIDI-MEHTAR N. «*Etude moléculaire de Xeroderma Pigmentosum dans l'Ouest Algérien*». Premières Journées de Génétique Moléculaire Appliquée organisées à Oran (ALGERIE), les 4 et 5 Décembre 2011.
- C. M. GED, L. CARRAT, E. LACANAL, H. REZVANI, **S. BENSENOUCI**, H. DE VERNEUIL, A. TAIEB, K. EZZEDINE. « *Rapid genotyping for the prevalent mutation of XPC gene: A useful tool for genetic counseling* ». Pediatric Dermatology at the IID 2013 Wednesday, May 8th, Sidlaw Room at the Edinburgh International Conference Centre.
- **BENSENOUCI S.**, LOUHIBI L., MAHMOUDI K., GED C., DE VERNEUIL H., SAIDI-MEHTAR N. «*Identification de la mutation prévalente du gène XPC en utilisant l'analyse par Sizing en Fragment*». Journées Internationales de Biotechnologie (JIB 2013) organisées à Hammamet (TUNISIE), du 21 au 24 Décembre 2013.
- **BENSENOUCI S.**, LOUHIBI L., MAHMOUDI K., GED C., DE VERNEUIL H., SAIDI-MEHTAR N. «*Détection de la délétion du gène XPC en utilisant l'analyse par Sizing en Fragment*». 7èmes Assises de Génétique Humaine et Médicale – Bordeaux, 23, 30 et 31 janvier 2014.

Table des matières

<i>Liste des figures</i>	I
<i>Liste des tableaux</i>	III
<i>Liste des annexes</i>	IV
<i>Liste des abréviations</i>	V
<i>Avant propos</i>	2
<i>Chapitre I : Revue bibliographique</i>	4
I. Mécanismes de réparation de l'ADN	5
1. Structure de l'ADN	5
2. Lésions de l'ADN.....	6
2.1. Mésappariements de bases	6
2.2. Sites abasiques (Dépurination / Dépyrimidation)	7
2.3. Désamination.....	7
2.4. Addition de molécules exogènes.....	7
2.5. Erreurs de méthylation	7
2.6. Lésions d'oxydation	8
2.7. Formation de liaisons covalentes	8
3. Mécanismes de réparation de l'ADN	10
3.1. Système de réparation des mésappariements de l'ADN	10
3.2. Système de réparation par excision de base	12
3.3. Système de réparation par recombinaison.....	13
3.3.1. Réparation par recombinaison homologue	13
3.3.2. Réparation par recombinaison non homologue	15
3.4.1. Facteurs intervenant dans le système NER.....	15
3.4.2. Etapes du NER	18
3.4.3. Pathologies liées à un défaut du NER	22
II. Généralités sur le <i>xeroderma pigmentosum</i>	25
1. Historique	25
2. Epidémiologie	27
3. Description clinique	27
3.1. Manifestations cutanées et cancers	28
3.2. Manifestations oculaires.....	29
3.3. Troubles neurologiques	29

3.4.	Déficiencia immunitaire	29
4.	Diagnostic.....	30
4.1.	Tests biologiques.....	30
4.2.	Diagnostic de biologie moléculaire.....	32
5.	Hétérogénéité génétique (les groupes de complémentation).....	32
5.1.	XP-A.....	32
5.2.	XP-B.....	32
5.3.	XP-C.....	33
5.4.	XP-D.....	33
5.5.	XP-E	33
5.6.	XP-F	33
5.7.	XP-G.....	34
5.8.	XP-V.....	34
6.	Traitement	36
6.1.	Photoprotection	36
6.2.	Prévention des complications secondaires	36
6.3.	Prise en charge des lésions, traitements symptomatiques	37
6.3.1.	Prise en charge des lésions cutanées.....	37
6.3.2.	Prise en charge des complications ophtalmologiques	39
6.4.	Thérapies en investigation.....	39
6.4.1.	Utilisation du bactériophage T4 endonucléase	39
6.4.2.	Utilisation des photolyases	40
III.	Génétique du <i>Xeroderma pigmentosum</i> A et C.....	41
1.	Revue sur XPA.....	41
1.1.	Gène <i>XPA</i>	41
1.2.	Protéine XPA.....	41
1.3.	Différentes interactions de la protéine XPA	42
1.4.	Différentes mutations dans le gène <i>XPA</i>	42
1.5.	Corrélation génotype/phénotype	43
2.	Revue sur XPC	43
2.1.	Gène <i>XPC</i>	43
2.2.	Protéine XPC.....	44
2.3.	Fonction de la protéine XPC	45
2.4.	Mutations du gène <i>XPC</i>	45

IV. Conseil Génétique	46
Chapitre II : Problématique et objectifs	49
Chapitre III : Population d'étude et Méthodes	51
I. Population d'étude	52
1. Fiche clinique et exploration	52
II. Méthodes.....	53
1. Méthodes d'exploration génétique	53
2. Extraction d'ADN génomique et dosage	54
3. Analyse génétique	54
3.1. Première approche : Détection de la mutation (c.682C>T, p.Arg228X)	54
3.2. Deuxième approche : Détection de la mutation (c.1643_1644delTG ou p.Val548Ala fsX25).....	59
a. Identification de la mutation (c.1643_1644delTG ou p.Val548Ala fsX25) : Analyse par SeqScape.....	60
b. Identification de la mutation (c.1643_1644delTG ou p.Val548Ala fsX25) : Analyse par GeneScan.....	62
Chapitre IV : Résultats et discussion	64
I. Résultats.....	65
1. Description de la population d'étude	65
2. Résultats de l'amplification.....	67
3. Résultat de la digestion enzymatique	67
4. Résultats de l'analyse des mutations par le logiciel SeqScape	68
5. Résultats de l'analyse des mutations par le logiciel GeneScan.....	69
6. Impact de la mutation c.682C>T du gène XPA.....	70
7. Impact de la mutation c.1643_1644delTG du gène XPC.....	71
II. Discussion.....	80
Chapitre V : Conclusion et perspectives	89
Annexes	91
Références bibliographiques	112

Liste des figures

Figure 01 : Structure de la molécule d'ADN	06
Figure 02 : Désamination d'une cytosine en uracile et d' une 5-méthylcytosine en Thymine.....	07
Figure 03 : Rayonnement UV et peau.....	08
Figure 04 : Structure des dimères de pyrimidine induits par exposition aux UV	09
Figure 05 : Schéma récapitulatif de la nature et les conséquences des dommages de l'ADN, et les différentes voies de réparation	10
Figure 06 : Mécanismes de réparation de l'ADN par « MMR ».....	11
Figure 07 : Système de réparation par excision de base.....	13
Figure 08 : Système de réparation par recombinaison	14
Figure 09 : Complexe TFIIH	17
Figure 10 : Schéma simplifié de la voie de réparation par excision de nucléotides (NER)...	19
Figure 11 : Différentes maladies induites par des mutations dans les gènes NER.....	22
Figure 12 : Etapes importantes pour la découverte du NER dans le XP.....	27
Figure 13 : Predisposition des cancers chez la population XP	28
Figure 14 : Test UDS sur des préparations autoradiographiques UV	30
Figure 15 : Test de la survie cellulaire après irradiation aux rayons UV.....	31
Figure 16 : 25-dihydroxy vitamine D.....	36
Figure 17 : Modèle du motif à doigts de zinc trouvé dans le domaine de liaison avec l'ADN de la protéine XPA.....	41
Figure 18 : Différents domaines de la protéine XPA et différentes interactions de XPA avec les autres protéines de la NER	42
Figure 19 : Structure du gène <i>XPC</i> humain.....	44

Figure 20 : Domaines d'interaction connus entre XPC et l'ADN ou ses partenaires protéiques.....	44
Figure 21 : Fonctions de XPC et son rôle dans l'inhibition des dommages oxydatifs de l'ADN, l'instabilité génomique et le cancer.....	45
Figure 22 : Représentation d'un couple à risque de $\frac{1}{4}$	46
Figure 23 : Représentation d'un couple à risque de $\frac{1}{2}$	47
Figure 24 : Répartition géographique des familles XP icluses dans cette étude.....	52
Figure 25 : Principe de la PCR.....	56
Figure 26 : Séquence d'ADN avec amorces encadrant la région d'intérêt (la position 682)...	57
Figure 27 : Représentation schématique des profils électrophorétiques attendus après la digestion des ADN par HphI.....	59
Figure 28 : Interface du logiciel SeqScape.....	63
Figure 29 : Interface du logiciel Genescan	63
Figure 30 : Tests d'amplification obtenus pour quelques échantillons.....	67
Figure 31 : Profil électrophorétique de restriction (RFLP) obtenus à partir des produits d'amplification de la région adéquate du gène <i>XPA</i>	67
Figure 32 : Exemple de résultat de l'analyse de la mutation c.1643_1644delTG par le logiciel SeqScape.....	68
Figure 33 : Exemple de résultat de l'analyse de la mutation c.1643_1644delTG par le logiciel GeneScan.....	69
Figure 34 : Structure de l'arginine et du codon stop (UGA).....	70
Figure 35 : Impact de la mutation R228X chez les patients XP-A.....	70
Figure 36 : Séquence d'ADN provenant de l'exon 09 du gène <i>XPC</i>	71
Figure 37 : Impact de la mutation c.1643_1644delTG chez les patients XP-C.....	72
Figure 38 : Correlation entre le site mutationnel et la gravité de la maladie.....	83

Liste des tableaux

Tableau I : Principales protéines impliquées dans le système NER.....	18
Tableau II : Caractéristiques des différents groupes de xeroderma pigmentosum	35
Tableau III : Séquences des amorces encadrant la mutation c.682C>T, p.Arg228X	57
Tableau IV : Programme de la PCR.....	60
Tableau V : Liste des oligonucléotides	62
Tableau VI : Caractéristiques cliniques des dix-neuf cas index atteints de XP.....	66

Liste des annexes

Annexe 01 : Fiche Patient.....	93
Annexe 02 : Formulaire de consentement pour participation à une étude scientifique.....	96
Annexe 03 : Arbres généalogiques.....	97
Annexe 04 : Information sur le patient XP1417.....	101
Annexe 05 : Protocole d'extraction d'ADN par le kit Stratagene	103
Annexe 06 : Xeroderma Pigmentosum - HAS - Protocole National de diagnostic et de soins pour une maladie rare.....	105

Liste des abréviations

% : Pourcentage

°C : Degré Celsius

µl : Microlitre

µM : Micromolaire

6-4PP : Pyrimidine (6-4) Pyrimidone

6-fam : 6-Carboxyfluorescein

A : Adénine

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNc : ADN Complémentaire

AP : Site Apurique ou Apyrimidique

APE1 : AP Endonucléases 1

ARN : Acide RiboNucléique

ARN pol II : ARN polymérase de classe II

ATP : Adénosine TriPhosphate

ATR : Ataxia Télangiectasia and Rad3-related kinase

BER : Base Excision Repair

BET : Bromure d'Éthidium

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool

C : Cytosine

CAK : Kinase Activant les cdk

CDK : Cyclin-Dependant Kinase

CDK2 : Cyclin-Dependent Kinase 2

CEN2 : Centrin 2

CPD : Dimère Cyclobutylique de Pyrimidines

CpG : Cytosine-Phosphate-Guanine

CS : Syndrome de Cockayne

CSA : Syndrome de Cockayne du groupe de complémentation A

CSB : Syndrome de Cockayne du groupe de complémentation B

DDB1/2 : DNA Damage Binding protein 1/2

DNA-PK : Protéine kinase dépendante de l'ADN

dNTP : DésoxyNucléotides TriPhosphates

ddNTP : DidésoxyriboNucléotidesTriPhosphates

DO : Densité Optique

DSB : Double Strand Break

EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique

ERCC: Excision Repair Cross Complementation group

FEN1: Flap Endonuclease 1

G: Guanine

GFP: Green Fluorescent Protein

GGR: Global Genome Repair

GTP: Guanosine TriPhosphate

HAS: Haute Autorité de Santé

HCR: Host Cell Reactivation

hHR23B: Human RAD23 Homolog B

HR: Homologous Repair

IL-10 : Interleukin 10

IMC : Indice de Masse Corporelle

kb : KiloBase

KbrO3 : Bromate de Potassium

KDa : Kilo Dalton

LGMC : Laboratoire de Génétique Moléculaire et Cellulaire

M : Molaire

MgCl₂ : Chlorure de Magnésium

Min : Minute

ml : MilliLitre

MLH1 : MutL Homolog1

mM : MiliMolaire

MMR : MisMatch Repair ou réparation des mésappariements

Mre11 : Meiotic REcombination 11

MRN : Complexe protéique constitué des trois molécules Mre11, Nbs1 et Rad50

MSH2: MutS Homolog 2

MSH6: MutS Homolog 6

MutS: Mutator S, Methyl-directed mismatch repair protein

MT : Marqueur de Taille

Nbs1: Nijmegen Breakage Syndrome 1

NCBI: National Center of Biotechnology Information

NER : Réparation par Excision de Nucléotides

ng: NanoGramme

NHEJ: Non-Homologous End-Joining

nm: NanoMètre

NLS: Nuclear Localization Sequence

PARP1: Poly ADP Ribose Polymérase 1

pb: Paires de Base

PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen

PCR: Polymerase Chain Reaction

PCR-SSCP : PCR-Single-Strand Conformation Polymorphism

PMS2: Postmeiotic Segregation 2

PNK: PolyNucléotide Kinase

Pol δ : ADN polymérase Delta

Pol ϵ : ADN polymérase Epsilon

Pol η : ADN polymérase Eta

RAD4: Yeast homolog of XPC

Ras : Rat Sarcoma

RFC : Facteur de Réplication C

ROS : Espèces Réactives d'Oxygène ou « Reactive Oxygen Species »

RPA : Protéine de Réplication A

RPA : Replication Protein A

S : Seconde

SF2 : SuperFamille 2

T : Thymidine

Taq: Thermus Aquaticus

TBP: TATA-Box Binding Protein

TCR: Transcription Coupled Repair

TDG: Thymine DNA Glycosylase

TFIIH: Transcription Factor II H

TNF- α : Tumor Necrosis Factor Alpha

Tp53: Tumor Protein 53

TTD: TrichoThioDystrophie

U: Unité

UDS: Unscheduled DNA Synthesis

USTO-MB : Université des Sciences et de la Technologie d'Oran-Mohamed BOUDIAF

UV : UltraViolets

UV-A : UltraViolets de type A

UV-B : UltraViolets de type B

UV-C : UltraViolets de type C

V : Volts

XP : *Xeroderma Pigmentosum*

XPA : *Xeroderma Pigmentosum* de groupe de complémentation A

XPB : *Xeroderma Pigmentosum* de groupe de complémentation B

XPC : *Xeroderma Pigmentosum* de groupe de complémentation C

XPB : *Xeroderma Pigmentosum* de groupe de complémentation D

XPF : *Xeroderma Pigmentosum* de groupe de complémentation F

XPG : *Xeroderma Pigmentosum* de groupe de complémentation G

XRCC: X-ray Repair Cross Complementing group

Nomenclature :

- Les gènes sont indiqués en italique.
- Les protéines sont indiquées en lettres droites.
- Les groupes de complémentations sont indiqués en lettres droites avec un trait d'union entre la deuxième et la troisième lettre.

Avant propos

Le *Xeroderma Pigmentosum* (XP) ou « parchment skin » fut décrit pour la première fois en 1870 par le dermatologue hongrois Moritz KAPOSI qui attribua le nom « *xeroderma* », ce terme latin signifie "peau sèche ou parcheminée". Plus tard, le terme « *pigmentosum* » fut rajouté pour souligner les perturbations pigmentaires des patients souffrant de cette maladie.

L'XP est une affection rare caractérisée par une hypersensibilité aux ultraviolets (UV). Sa transmission sur le mode autosomique récessif explique sa relative fréquence dans les pays où la consanguinité est élevée et la taille des familles est grande, comme les pays du Maghreb.

En absence d'une protection totale et efficace contre la lumière du soleil, les malades subissent un vieillissement accéléré de la peau, des troubles de la pigmentation, des lésions des yeux et de la peau pouvant conduire à l'apparition de multiples cancers.

En 1968, Cleaver a mis en évidence dans les cellules de XP un déficit de réparation de l'acide désoxyribonucléique (ADN) altéré par les UV. En effet, il a été démontré que l'hétérogénéité clinique de cette maladie est liée à l'existence d'altération des gènes appartenant aux différents groupes de complémentation classiques « XP-A à XP-G » qui se distinguent par certaines particularités symptomatiques et évolutives. Le produit de chacun de ces gènes joue un rôle spécifique dans la voie de réparation de l'ADN par excision-resynthèse des nucléotides (NER). Il existe également un groupe XP variant (XP-V) avec une activité normale du système NER.

Actuellement, on ne dispose d'aucun traitement curatif permettant de soigner les malades XP. La prise en charge repose essentiellement sur les mesures préventives telles que la photoprotection et la détection précoce des tumeurs cutanées et ophtalmologiques. Ces « enfants de la lune » doivent mener une vie nocturne, privés de toute exposition intentionnelle au soleil et aux UV artificiels.

Cependant, l'apparition de lésions cutanées au cours de la vie des patients XP reste quasiment inévitable même en présence de la plus stricte protection. La prise en charge de ces lésions est assurée par des traitements symptomatiques tels que l'exérèse chirurgicale, la radiothérapie et les traitements topiques qui permettent malgré tout l'amélioration de la qualité de vie de ces patients.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée aux protéines humaines XPA et XPC. Celles-ci sont impliquées dans la reconnaissance d'un grand nombre de lésions de l'ADN, cette activité étant nécessaire au déclenchement de la réparation par excision de nucléotides (NER). Cette voie de réparation de l'ADN est particulièrement importante parce qu'elle permet la réparation de lésions induites par divers carcinogènes environnementaux et les ultraviolets.

Je développerai d'une part des mécanismes de réparation, plus particulièrement le système de réparation par excision de nucléotides, et d'autre part, la maladie de *xeroderma pigmentosum*, due à une déficience dans une voie de réparation de l'ADN. Ensuite, je présenterai les résultats de la recherche portée sur l'exploration des gènes *XPA* et *XPC*. Enfin, les résultats seront discutés, tout comme leur contribution à l'avancement des connaissances sur cette maladie.

Chapitre I

Revue bibliographique

I. Mécanismes de réparation de l'ADN

L'acide désoxyribonucléique (ADN), support de l'information génétique, subit constamment des agressions par des agents génotoxiques endogènes (métabolites, radicaux libres) ou exogènes (agents chimiques, rayonnements ionisants). Ceux-ci induisent des lésions très diverses dans l'ADN, qui peuvent favoriser la transformation oncogénique de la cellule ou mener à la mort cellulaire et la dégénérescence tissulaire. Afin de maintenir l'intégrité du génome, la cellule possède différents mécanismes de réparation de l'ADN qui vont être activés en réponse à ces lésions et ainsi assurer la survie de la cellule et le contrôle du cycle cellulaire. Actuellement, cinq voies de réparation ont été décrites et impliquent un grand nombre de protéines connues pour agir au sein de la même voie ou dans une autre. La déficience des systèmes de réparation présente les caractéristiques d'un vieillissement prématuré et/ou d'une dégénérescence des fonctions d'un tissu spécifique comme il favorise considérablement le développement accru des cancers, ceci est particulièrement illustré par des exemples de maladies autosomales récessives chez les humains telles que le syndrome de Cockayne (CS), le syndrome de Bloom et le *xeroderma pigmentosum*.

Cette partie introductive évoquera une brève description des différentes lésions pouvant endommager la molécule d'ADN suivie d'une description des mécanismes de réparation.

1. Structure de l'ADN

L'ADN est une macromolécule polymère formée de deux brins oligonucléotidiques complémentaires qui s'enroulent de façon antiparallèle pour former une double hélice (Figure 1a). Ces deux brins sont constitués d'un enchaînement précis (séquence) d'unités élémentaires que sont les nucléotides (dATP, dGTP, dCTP et dTTP). Un nucléotide est composé d'un phosphate relié à un sucre, le 2'-désoxyribose, lui-même relié à une base azotée. L'adénine (A) et la guanine (G) sont des bases puriques, la cytosine (C) et la thymine (T) sont des bases pyrimidiques (figure 1b). La stabilité de l'ADN est due en partie aux liaisons hydrogènes se formant entre bases, l'adénine étant complémentaire de la thymine et la guanine étant complémentaire de la cytosine (Watson & Crick, 1953).

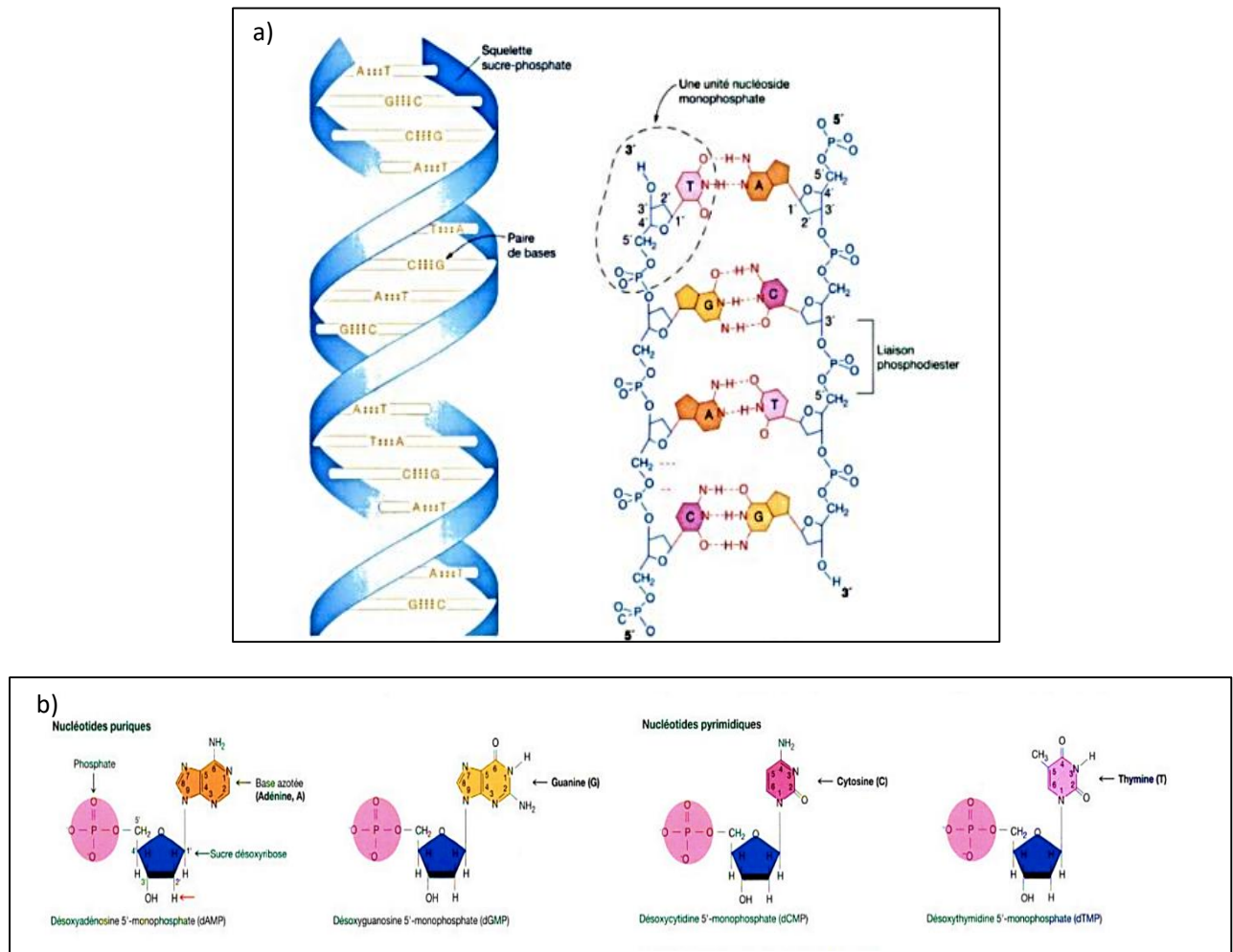


Figure 01 : Structure de la molécule d'ADN (Dickerson & Geis, 1983; Griffiths, 2006).

2. Lésions de l'ADN

L'apparition de lésions dans le génome est un phénomène continu. Il existe différents types de lésions susceptibles de perturber le bon fonctionnement de la cellule incluant majoritairement des modifications des bases azotées, ainsi que des cassures d'un ou des deux brins de la double hélice. Les plus communes sont :

2.1. Mésappariements de bases

Les mésappariements peuvent être la conséquence d'erreurs lors de la réplication (source endogène). En effet, les ADN polymérases répliquatives peuvent incorporer un nucléotide non approprié en face du nucléotide du brin matrice par exemple une adénine (A) peut-être associée à une cytosine (C) ou une thymine (T) à une guanine (G) (Lewin & Sanlaville, 1998).



2.2. Sites abasiques (Dépurination / Dépyrimidation)

Cette catégorie de lésion concerne la perte d'une base azotée par un processus hydrolytique spontané de la liaison N-Glycosidique conduisant ainsi à la formation de site abasique appelé site apurinique/apyrimidique « AP » (Lindahl, 1993; Cooper & François, 1999).

2.3. Désamination

Les désaminations ou perte du groupement amine (NH_2) dues à des excès de chaleur endogène ou exogène transforment la cytosine, l'adénine et la guanine, respectivement en uracile, en hypoxanthine et en xanthine. En outre, la désamination d'une cytosine méthylée génère une thymine (Cooper & François, 1999) (figure 02).

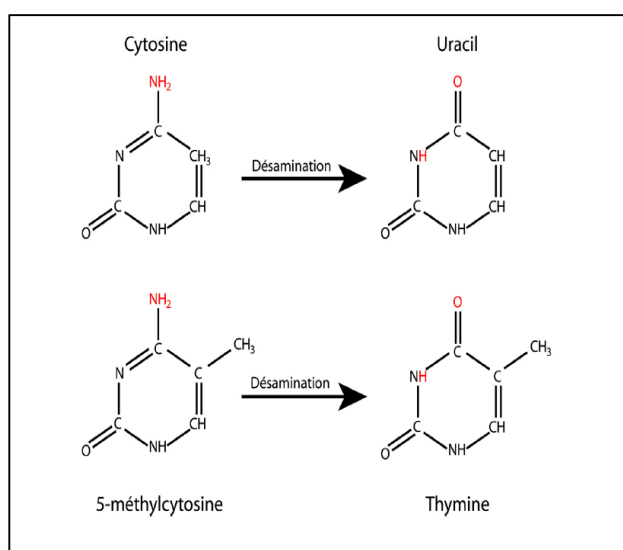


Figure 02: Désamination d'une cytosine en uracile et d'une 5-méthylcytosine en Thymine (Rochette, 2005).

2.4. Addition de molécules exogènes

Divers agents chimiques de sources exogènes ont la faculté de réagir avec les bases nucléotidiques provoquant une distorsion considérable de la structure de l'ADN. On compte les aflatoxines, les benzantracènes, les agents alkylants (ex. le busulfan), les agents intercalants (ex. le bromure d'éthidium) et le cisplatine (Lindahl et al, 1982; Robert, 2011).

2.5. Erreurs de méthylation

La méthylation de l'ADN est un phénomène normal et représente un élément clé de la régulation épigénétique de l'expression des gènes. C'est une modification qui se produit principalement sur les résidus cytosines des îlots CpG par l'addition d'un groupement méthyle ($-\text{CH}_3$) à la place d'un atome d'hydrogène (H). Cependant, les erreurs de méthylation, également

appelées « adduits de méthylation », peuvent entraîner une distorsion de la double hélice voire une cassure de l'ADN (Lodish et al, 1997; Rottach et al, 2009).

2.6. Lésions d'oxydation

Les lésions formées par oxydation sur les acides nucléiques sont les plus nombreuses des lésions. Ces oxydations peuvent provenir non seulement de phénomènes exogènes, mais aussi de métabolites endogènes (Cadet et al, 2002). Ces phénomènes ont tendance à produire des ROS « espèces réactives oxygénées » (O_2 , H_2O_2 et OH) qui oxydent les molécules biologiques, dont les acides nucléiques. La base la plus facilement oxydable est la guanine qui génère un super oxydant hautement réactif. Ces attaques sur l'ADN donnent des coupures simple et double brin, des sites abasiques et participent au vieillissement cellulaire (Riberio et al, 1992; Cadet et al, 2003).

2.7. Formation de liaisons covalentes

Lorsque l'ADN est exposé aux UV, il se forme notamment des photoproduits dont les plus fréquents impliquent des liaisons covalentes entre deux pyrimidines adjacentes, formant ainsi un dimère de pyrimidines (par exemple thymine-thymine ou thymine-cytosine) (Pfeifer, 1997; Gillet & Schärer, 2006). En effet, le rayonnement UV fait partie des rayonnements électromagnétiques émis par le soleil qui parviennent à la surface de la terre avec la lumière visible, les infrarouges (IR) et les ondes de radiofréquence (figure 03). Ces rayonnements peuvent être divisés en 3 catégories (A, B et C). Les UVA (315 à 400 nm) représentent 95% des ultraviolets solaires parvenant à la surface de la terre tandis que les UVB (280 à 315 nm) ne représentent que 5% des UV solaires. Les UVC (200 à 280 nm) sont absorbés totalement par la couche d'ozone (Kuluncsics et al, 1999).

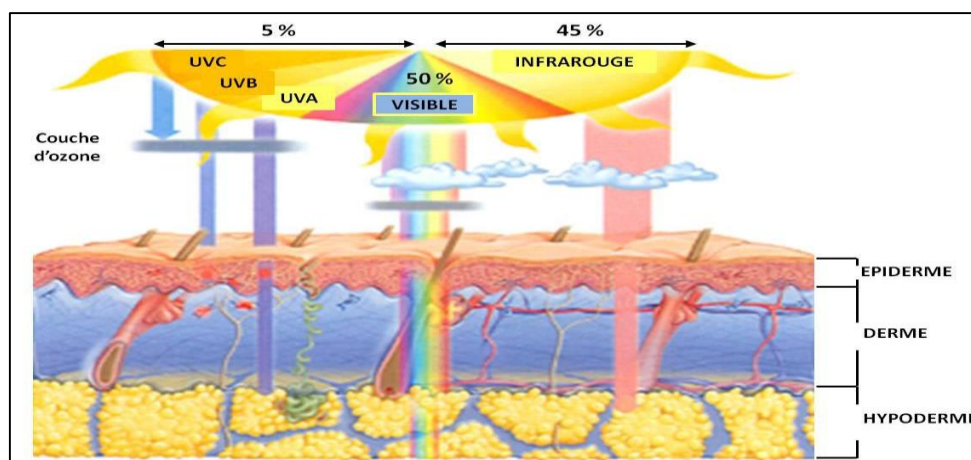


Figure 03 : Rayonnement UV et peau. Après le passage au travers de la couche d'ozone, une partie des UVB atteint l'épiderme et le derme superficiel, alors que la totalité des UVA pénètre la peau jusqu'au derme profond. (http://www.skin-science.fr/img/db/news/big/news_UV_photod_2007-big.jpg)



La génération de liaisons covalentes entre deux bases pyrimidiques adjacentes (figure 04) induit des distorsions de l'hélice d'ADN qui peuvent être fixées par l'action des UV et qui perturbent les mécanismes de transcription (Cooper & François, 1999; Gillet & Schärer, 2006).

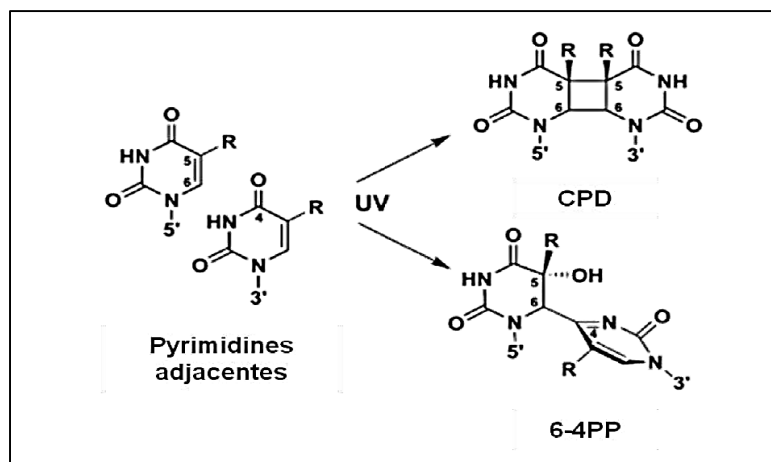


Figure 04 : Structure des dimères de pyrimidine induits par exposition aux UV (Li et al, 2006).

Formation de dimères de pyrimidine cyclobutane (CPD) et de pyrimidine (6-4) pyrimidone (6-4PP) à partir de deux pyrimidiques adjacentes.

Les dommages infligés à l'ADN par les divers agents peuvent avoir de lourdes conséquences. Ainsi, les agents endogènes entraînent des mésappariements de bases ou dépurination spontanée de certaines bases (à raison de 2 000 à 10 000 sites par cellule humaine quotidiennement) lors du renouvellement de l'ADN. Cependant, les agents exogènes provoquent des désaminations, lésions oxydatives, addition de molécules exogènes, modifications covalentes de nucléotides ou encore l'apparition des cassures simple et double brin (Lindahl, 1993; Thompson & Limoli, 2003; Lacave et al, 2005). Ces dommages induisent un certain nombre de réponses au sein de la cellule, étroitement liées et hautement coordonnées avec les processus de réparation des sites lésés (figure 05).

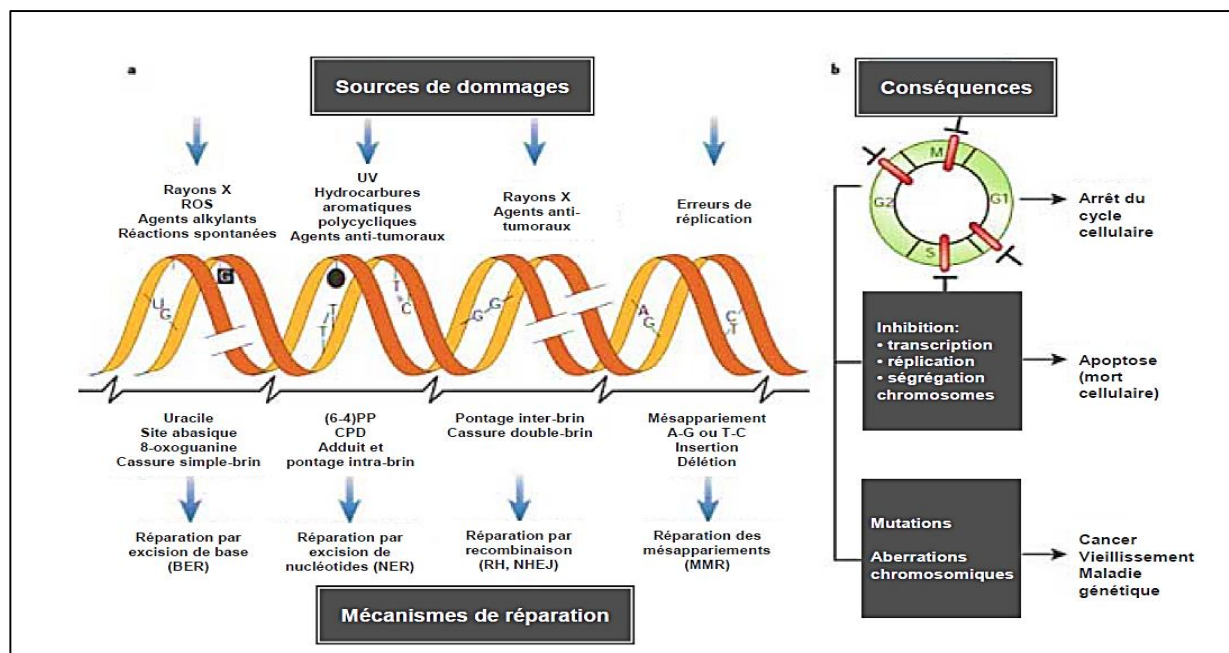


Figure 05 : Schéma récapitulatif de la nature, les conséquences des dommages de l'ADN, et les différentes voies de réparation (Hoeijmakers, 2001). **(a)** Principales lésions de l'ADN (milieu) induites par différents agents génotoxiques (haut) et mécanismes de réparation les prenant en charge (bas). **(b)**

Conséquences des lésions de l'ADN sur les processus cellulaires et l'intégrité du génome.

3. Mécanismes de réparation de l'ADN

En réponse aux effets délétères des lésions, les cellules possèdent différents systèmes de réparation de l'ADN. Chez l'humain, cinq mécanismes ont été décrits et sont actuellement bien connus : La réparation des mésappariements « *mismatch repair*, MMR », le processus d'excision de la base « *Base Excision Repair*, BER », la réparation par excision des nucléotides « *Nucleotide Excision Repair*, NER », la réparation par recombinaison homologue « *homologous recombination*, HR » et non-homologues par jointure des extrémités « *Non Homologous End-Joining repair*, NHEJ ». Ce chapitre reviendra donc sur les différents systèmes de réparation connus, par contre seule la partie sur la réparation par excision des nucléotides sera plus développée, car elle correspond au sujet de ce manuscrit.

3.1. Système de réparation des mésappariements de l'ADN

Les mésappariements de bases sont des dommages qui se produisent principalement lors des phénomènes de réplication de l'ADN. Outre, les ADN polymérases répliquatives possèdent une activité exonucléase 3'→5' permettant de corriger une partie des erreurs d'insertion qu'elles pourraient commettre. Une caractéristique importante du MMR est que cette voie de réparation



est brin-spécifique, n'agissant que sur le brin nouvellement synthétisé lors de la réplication afin d'éviter des mutations (Brown & Jiricny, 1987; Lahue et al, 1989).

Dans les cellules humaines, la reconnaissance des mésappariements est assurée par les complexes MutS α (MSH2-MSH6) et MutS β (MSH2-MSH3). L'hétérodimère MutS α détecte les mésappariements impliquant une seule base ainsi que les petites insertions et délétions (une ou deux bases). Alors que l'hétérodimère MutS β reconnaît les boucles d'insertions / délétions de plus de deux bases (Macpherson et al, 1998; Hsieh, 2001; Schärer, 2003). Une fois le mésappariement reconnu, MutL α (dimère formé par MLH1 / PMS2) est recruté. Cela permet l'incision du brin en 5' par MutL ensuite l'exonucléase 5'-3'ExoI va dégrader le brin contenant l'erreur tandis que l'autre brin est protégé par la protéine RPA (*replication protein A*). La resynthèse de la séquence correcte est assurée par l'ADN polymérase. Au final, les extrémités d'ADN sont jointes par la ligase I (Genschel & Modrich, 2003; Jun et al, 2006; Kadyrov et al, 2006) (figure 06).

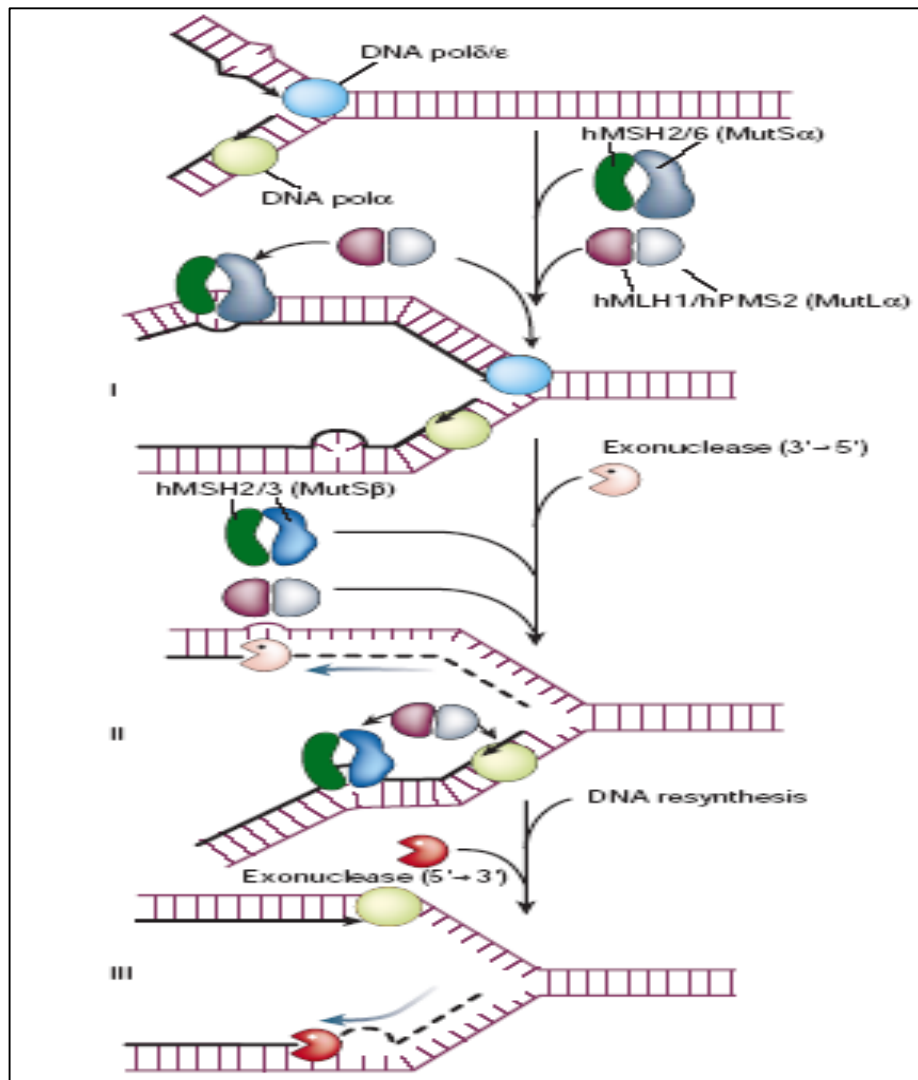


Figure 06 : Mécanismes de réparation de l'ADN par « MMR ». D'après (Hoeijmakers, 2001).



3.2. Système de réparation par excision de base

La réparation par excision de base (BER) est le principal mécanisme de réparation des bases incorrectes (ex. l'uracile dans l'ADN), des bases endommagées (bases oxydées, bases alkylées), des sites abasiques et des cassures simple brin (Christmann et al, 2003).

Le BER est initié par les ADN N-glycosylases, enzymes qui reconnaissent le dommage au sein de l'ADN et hydrolysent leur liaison N-glycosidique afin de générer un site abasique. L'AP endonucléase 1 humaine (APE1) est ensuite recrutée sur le site abasique de l'ADN, provoquant l'élimination de l'ADN glycosylase. Elle coupe en 5' du site AP générant ainsi une extrémité 3'-OH (Chen et al, 1991; Wilson & Barsky, 2001). Deux voies de resynthèse sont possibles, et pour chacune d'entre elles le nombre de nucléotides incorporés diffère.

La voie majoritaire, appelée « *Short Patch Repair* » (SP-BER, voie à brèches courtes), survient dans 75 à 90% des réparations par BER dans les cellules humaines (Bennett et al, 1997). Elle consiste au remplacement de la base manquante par l'ADN polymérase Bêta (Pol β), qui insère un seul nucléotide et élimine le sucre abasique en 5' grâce à son activité lyase (Matsumoto & Kim, 1995). Ensuite, les protéines XRCC1 (*X Ray Cross Complementation Protein 1*) et PARP1 « *Poly ADP ribose Polymérase 1* » interviennent alors et recrutent une protéine PNK « *Polynucléotide kinase* » qui phosphoryle l'extrémité 5'OH et déphosphoryle l'extrémité 3'P au niveau de la coupure. Le complexe XRCC1-Ligase III assure la liaison phosphodiester des deux nucléotides adjacents permettant ainsi le retour d'un brin d'ADN non endommagé (Wei et al, 1995).

La voie annexe, appelée « *Long Patch Repair* » (LP-BER, voie à brèches longues), nécessite le recrutement de la protéine PCNA « *Proliferating Cell Nuclear Antigen* » qui s'associe à l'ADN polymérase Pol δ et ϵ . Celles-ci ajoutent quelques nucléotides (2 à 10) à extrémité 3'-OH de la cassure, générant ainsi une courte extrémité flottante (*flap*) qui sera excisée par FEN1 « *Flap Endonuclease 1* ». La ligation de la coupure va s'effectuer par l'intermédiaire d'une ligase I (Spirio et al, 1993; Tomkinson et al, 2001; Fromme & Verdine, 2004). La Pol β peut potentiellement agir dans les deux voies du BER (Beard et al, 2006)(figure 07).

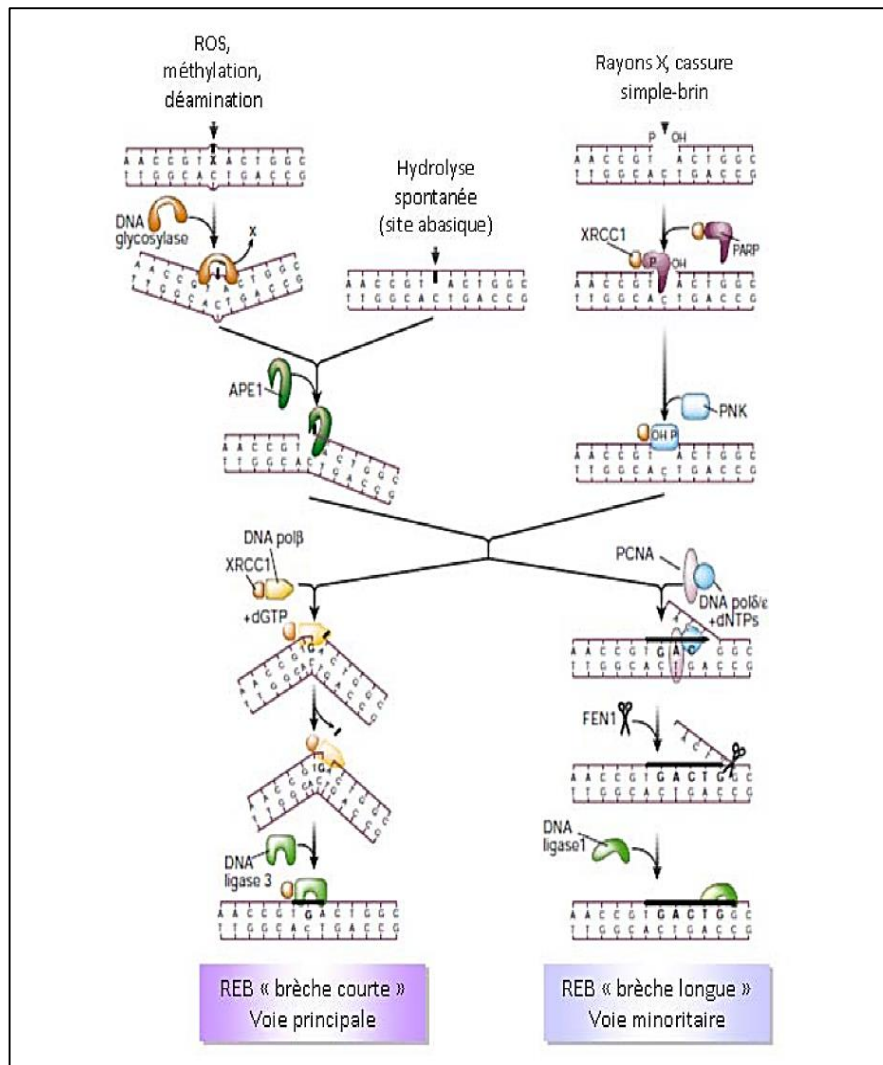


Figure 07 : Système de réparation par excision de base (Hoeijmakers, 2001).

3.3. Système de réparation par recombinaison

Les cassures doubles brins de l'ADN (DSB : *double strand breaks*) sont des lésions létales majeures, induites par les radiations ionisantes ou par des stress cellulaires endogènes. Deux voies sont connues pour réparer les DSB : la réparation par recombinaison homologue « *homologous recombination, HR* » et non-homologue par jointure des extrémités « *Non-Homologous End-Joining repair, NHEJ* ». La recombinaison homologue est qualifiée de mécanisme fidèle, car elle utilise une séquence homologue intacte pour réparer la cassure. Alors que la NHEJ est dite infidèle puisqu'elle ne nécessite pas d'homologie de séquence (figure 08).

3.3.1. Réparation par recombinaison homologue

Cette voie de recombinaison consiste à utiliser l'information portée par la chromatide sœur comme modèle pour resynthétiser la partie endommagée (Cromie et al, 2001). Elle est initiée par une étape de résection de l'ADN par le complexe MRN (Mre11, Rad50 et Nbs1). Cela consiste



à éliminer l'extrémité de la cassure double brin de quelques dizaines de nucléotides en 5'-3'. Ce complexe MRN interagit avec la protéine CtIP, qui stimule l'activité endonucléasique de Mre11 « *meiotic recombination 11* ». L'étape suivante est assurée par l'action de l'exonucléase Exo1, qui génère ainsi un ADN simple brin (Bolderson et al, 2009). Cet ADN simple brin est immédiatement recouvert et protégé par la protéine RPA qui empêche également la formation de structure secondaire. Le complexe RPA-ADN permet le recrutement et l'activation de la protéine clef de cette voie de réparation : la recombinaise Rad51. Pour être active, Rad51 a besoin de former un filament nucléoprotéique hélicoïdal en recrutant les protéines Rad52 et Rad54. Cela permet l'invasion du brin lésé au niveau de la séquence homologue intacte sur la chromatide sœur, formant ainsi deux structures cruciformes connues sous le nom de « *Jonction de Holliday, JH* ». Il a été démontré que Rad54 peut permettre la mise en place de l'étape de resynthèse en éliminant Rad51 et en permettant le recrutement des ADN polymérases. Celles-ci vont ensuite synthétiser un nouvel ADN à partir des extrémités 3' (Fu et al, 1994; Heyer et al, 2006).

Une fois la synthèse d'ADN terminée, les extrémités franches sont liguées par la ligase I et les jonctions de Holliday sont résolues grâce à l'action d'endonucléases reconnaissant ces structures spécifiques (Hoeijmakers, 2001; Brugmans et al, 2007).

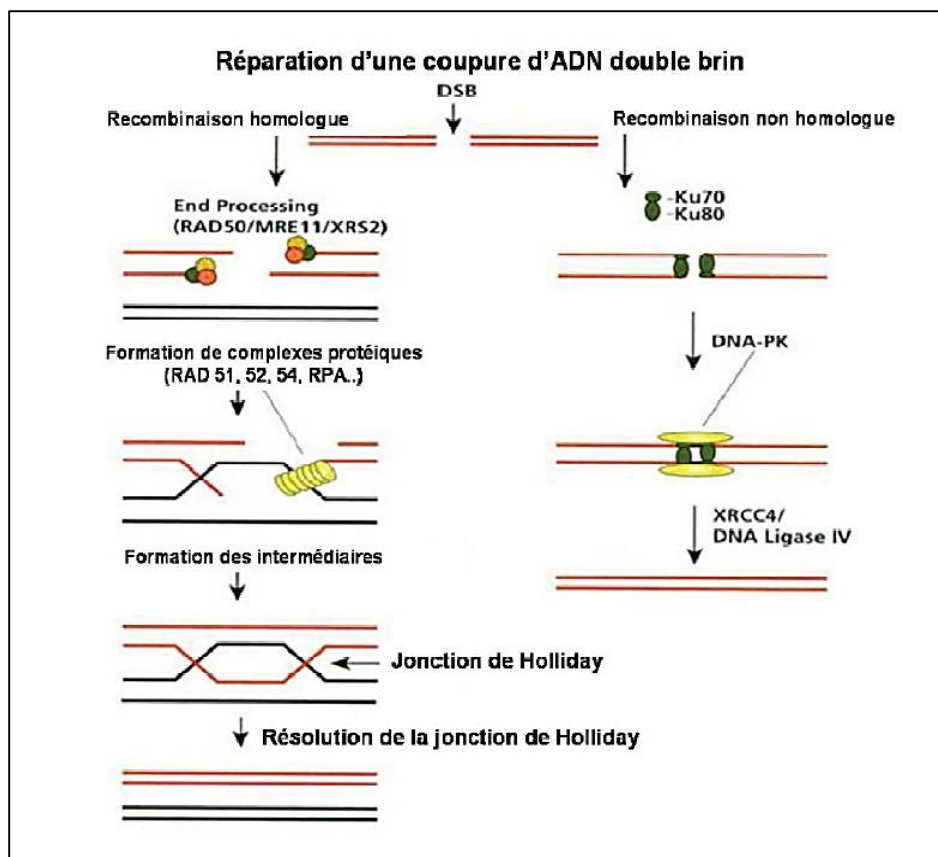


Figure 08: Système de réparation par recombinaison (Schärer, 2003).



3.3.2. Réparation par recombinaison non homologue

La réparation par recombinaison non homologue est la principale voie de réparation des cassures double brin chez les eucaryotes. Elle consiste en un rattachement direct des deux extrémités de la cassure (Kanaar et al, 1998). Ce processus est initié par l'identification de la cassure par l'hétérodimère Ku70/ Ku80 qui lie chaque extrémité et recrute la sous-unité catalytique de DNA-PK, DNA-PKcs (*DNA-dependent Protein Kinase catalytic subunit*) (Reeves & Sthoeger, 1989; Uematsu et al, 2007). Sa liaison au complexe Ku provoque son autophosphorylation ayant pour conséquence son activation. Par la suite, DNA-PKcs régule par phosphorylation différents partenaires impliqués dans le traitement des extrémités et permet le rapprochement, ainsi que l'alignement des extrémités (Huang & Dynan, 2002). Parmi ces partenaires, on trouve la protéine Artémis. Cette dernière acquiert après phosphorylation une activité endonucléase qui lui permet de dégrader les structures d'ADN en épingle à cheveux (Schlissel, 2002). Enfin, la Polynucléotide Kinase (PNK) peut assurer le nettoyage des extrémités 5'-OH et 3'-phosphate des cassures induites par les radiations grâce à ses activités 5'-kinase et 3'-phosphatase (Karimi-Busheri et al, 1999). Les étapes finales de traitement de l'ADN endommagé sont alors possibles, grâce à l'association d'un complexe formé par XLF (XRCC4-Like Factor, aussi appelé Cernunnos), XRCC4 et l'ADN-ligase IV (LigIV), chargé de relier ensemble les deux extrémités de la coupure (Ahnesorg et al, 2006).

3.4. Système de réparation par excision de nucléotides

Le mécanisme de réparation par excision de nucléotides (NER) est responsable de l'élimination de lésions de l'ADN provoquées par les rayons UV et par des agents chimiques génotoxiques comme le cisplatine. Ce mécanisme reconnaît la présence de divers dommages à travers la distorsion de l'hélice générée par ceux-ci. Ainsi, les lésions réparées par la NER incluent les dimères de pyrimidine, les pontages intra-brin et les gros adduits de l'ADN comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques (de Laat et al, 1999; Dip et al, 2004; Gillet & Schärer, 2006).

3.4.1. Facteurs intervenant dans le système NER

Un grand nombre de protéines interviennent de manière séquentielle dans ce mécanisme. Leurs propriétés sont résumées dans le tableau I.

- Le gène **XPA** code pour une protéine (**XPA**) qui joue un rôle crucial dans les deux voies de NER. En effet, elle intervient dans la reconnaissance du dommage de l'ADN et qui a la fonction de maintenir la région à réparer à l'état simple brin (Yang et al, 2006).



- La protéine (**XPB**), produit du gène **ERCC3** « *Excision repair cross complementation group 3* », comporte deux motifs hélicase. Elle permet le déroulement de l'ADN et fait partie d'un complexe multi-protéique nommé TFIIH « *transcription Factor II H* » (Hall et al, 2006).
- La protéine **XPC** forme un hétérodimère avec la protéine hHR23B « *Human RAD23 homolog B* » qui est impliqué dans la reconnaissance du dommage de l'ADN (Wood, 1999). En plus de l'activité d'ouverture à proximité du dommage, XPC pourrait aider à la réparation de dommages oxydatifs de l'ADN. Elle présente une haute affinité pour la molécule d'ADN, simple brin comme double brin, avec une préférence pour l'ADN endommagé par les rayons UV (Masutani et al, 1997).
- **XPB** est une 5'-3' hélicase dépendante de l'ATP codée par le gène **ERCC2** « *Excision repair cross complementation group 2* ». Comme XPB, XPD fait partie des hélicases de la superfamille SF2 (Schaeffer et al, 1993). XPD permet le déroulement de l'ADN autour de la lésion afin de générer une structure ouverte de l'ADN qui permet le recrutement des endonucléases XPG et XPF (Evans et al, 1997). L'activité de XPD semble moins cruciale que celle de XPB dans l'initiation de transcription (Bradsher et al, 2002). L'ancrage du sous-complexe CDK activating kinase (CAK) au coeur de TFIIH semble être une fonction importante de XPD (Coin et al, 2008).
- **XPE** est formé d'un hétérodimère composé de deux protéines combinées **DDB1** et **DDB2** (Damage-specific DNA Binding protein) (Kulaksız et al, 2005) qui, avec XPC, est impliqué dans la reconnaissance initiale des dommages induits par les UV dans les régions non transcrites du génome (Kapetanaki et al, 2006).
- **XPF** joue le rôle d'endonucléase au sein du complexe stable XPF-ERCC1 (Van Vuuren et al, 1993). XPF contient aussi un domaine de liaison à l'ADN, similaire à celui d'ERCC1 « *Excision repair cross complementation group 1* » qui semble être inactif (Nishino et al, 2003).
- **XPG (ERCC5)** est une 3' endonucléase indispensable à l'excision du brin lésé, durant la réparation par NER. Par ailleurs, la protéine XPG a aussi été décrite pour son rôle primordial dans la stabilité de l'ancrage du CAK sur le core de TFIIH (O'Donovan et al, 1994; Ito et al, 2007).
- **RPA** est un hétéro-trimère stable composé de sous-unités de 70 kDa, 32 kDa et 14 kDa (respectivement RPA70, RPA32, RPA14) (Cai et al, 2007). Ce complexe intervient dans la réplication, la réparation et la recombinaison (Sakaguchi et al, 2009). La protéine RPA protège le brin monocaténaire non endommagé qui sert de matrice pour la phase de re-synthèse du NER et stabilise l'interaction de la protéine XPA avec l'ADN (Sugasawa et al, 2001).



- La protéine **hHR23B** homologue humaine de Rad23B chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Cette protéine intervient dans la phase de reconnaissance du dommage du NER en formant un complexe avec la protéine XPC (Wood, 1999; Dip et al, 2004).
- La protéine **CSA** (Cockayne Syndrom protein A), codée par le gène **ERCC8** « *Excision repair cross complementation group 8* », intervient dans la reconnaissance du dommage durant NER couplé à la transcription, elle a été décrite dans des interactions avec les sous-unités du complexe TFIIH (Henning et al, 1995; Foustéri & Mullenders, 2008).
- La protéine **CSB** (Cockayne Syndrom protein B), codée par le gène **ERCC6** « *Excision repair cross complementation group 6* », intervient durant la transcription, dans le recrutement des protéines du NER (Foustéri & Mullenders, 2008), avec une fonction présumée de type ADN ou ARN hélicase et hydrolase (Pazin and Kadonaga, 1997). Les protéines CSA et CSB ne sont pas requises pour le GGR.
- Le facteur de transcription IIH (**TFIIH**) est un grand complexe protéique d'au moins 10 sous unités, impliqué non seulement dans la NER mais aussi dans l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II (ARN pol II) et dans le contrôle du cycle cellulaire (Svejstrup et al, 1996). Il possède une structure en forme de bague mise en évidence par la microscopie électronique. Le *core* du complexe est formé des protéines p34, p44, p52, p62, XPB et (Giglia-Mari et al, 2004) une autre sous-unité de TFIIH, TTD-A. Cette dernière régule le complexe et stimule l'activité ATP-ase de XPB, aidant ainsi à l'ouverture de l'hélice d'ADN (Coin et al, 2006) (figure 09).

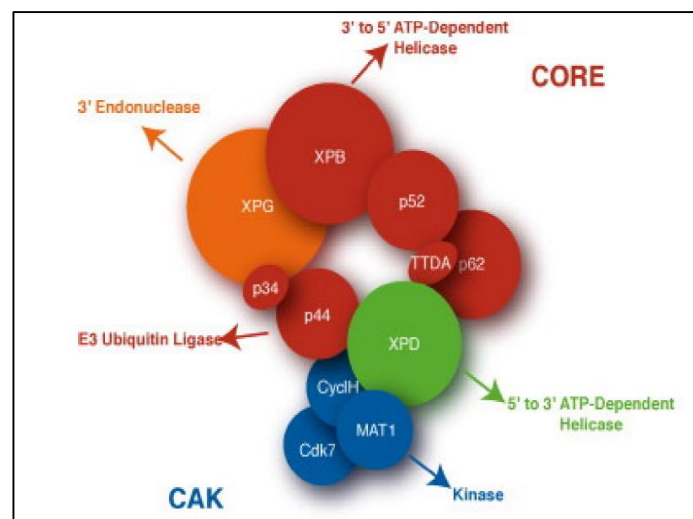


Figure 09 : Complexe TFIIH (Egly & Coin, 2011). En rouge : le *core* du complexe ; en bleu : le sous complexe CAK ; en vert : la protéine d'ancrage XPD ; en orange : XPG indispensable à la stabilité de l'ancrage de CAK.



Tableau I : Principales protéines impliquées dans le système NER, d'après (Gillet & Schärer, 2006). Ce tableau regroupe les protéines intervenant dans la NER avec mention de leur taille (en kDa) et de leur fonction connue ou supposée. Les partenaires connus sont indiqués dans la dernière colonne.

Facteur	Gènes	Protéines	Taille (kDa)	Fonction	Partenaires
XPC/Rad23B/Centrine 2	<i>Rad23B</i>	Rad23B	58	Reconnaissance des lésions	TFIIH
	<i>XPC</i>	XPC	125		XPA
	<i>HsCen2</i>	Centrine 2	19		UV-DDB
UV-DDB	<i>DDB1 (p127)</i>	DDB1	127	Reconnaissance des CPD ? Remodelage de la chromatine ?	XPC
	<i>DDB2 (p48)</i>	DDB2	48		RPA
XPA/RPA	<i>XPA</i>	XPA	31	Rôle architectural ?	XPC
	<i>RPA1</i>	RPA70	68	Vérification de la	RPA
	<i>RPA2</i>	RPA32	30	présence d'une lésion ?	TFIIH
	<i>RPA3</i>	RPA14	14		ERCC1
TFIIH	<i>XPB (ERCC3)</i>	XPB	89	Hélicase 3' 5'	XPC
	<i>XPB (ERCC2)</i>	XPB	87	Hélicase 5' 3'	XPA
	<i>GTF2H1 (TFB1)</i>	p62	62	Liaison à l'ADN ?	XPG
	<i>GTF2H2</i>	p44	44	Liaison à l'ADN ?	XPF
	<i>GTF2H3 (TFB4)</i>	p34	34	Stabilisation TFIIH	
	<i>GTF2H4 (TFB2)</i>	p52	52	CAK : phosphoryle	
	<i>GTF2H5 (TTDA)</i>	p8	9	l'ARN pol II et d'autres	
	<i>MNAT1 (TFB3)</i>	Mat1	36	substrats	
	<i>CDK7</i>	Cdk7	39		
XPF/ERCC1	<i>XPB (ERCC4)</i>	XPF	103	Endonucléase 5'	XPA
	<i>ERCC1</i>	ERCC1	33		TFIIH
XPG	<i>XPG</i>	XPG	133	Endonucléase 3'	RPA TFIIH PCNA ?
PCNA/RFC	<i>RFC1</i>	RFC1	128	Facteur de processivité de PCNA	RPA
	<i>RFC2</i>	RFC2	39		
	<i>RFC3</i>	RFC3	41		
	<i>RFC4</i>	RFC4	40	anneau de processivité	pol δ XPG ?
	<i>RFC5</i>	RFC5	38		
	<i>PCNA</i>	PCNA (trimère)	3x29		
pol δ	<i>p125</i>	p125	124	ADN polymerase	PCNA
	<i>p66</i>	p66	51		
	<i>p50</i>	p50	51		
	<i>p12</i>	p12	12		
pol ε	<i>p261</i>	p261	261	ADN polymerase	PCNA
	<i>p59</i>	p59	59		
	<i>p17</i>	p17	17		
	<i>p12</i>	p12	12		
ligase I	<i>LIG1</i>	Ligase I	102	Ligature des discontinuités	PCNA

3.4.2. Etapes du NER

Le mécanisme de réparation par excision de nucléotide met en jeu plus d'une vingtaine de protéines différentes. C'est le système de réparation le plus polyvalent en terme de reconnaissance de lésions. Il existe deux voies de NER qui se distinguent à l'étape de reconnaissance de la lésion : la réparation par excision de nucléotides du génome globale (*Global Genome Repair*, GGR) qui



prend en charge les dommages présents sur l'ensemble du génome et la réparation par excision de nucléotides couplée à la transcription (*Transcription Coupled Repair*, TCR) ne s'occupant que des lésions présentes uniquement sur le brin transcrit de gènes codants (Hanawalt, 2002; Gillet & Schärer, 2006; Hanawalt & Spivak, 2008). Les deux voies de NER s'organisent en quatre étapes majeures telles qu'elles sont présentées dans la figure 10.

Seul le processus de reconnaissance des dommages, qui constitue la première étape du NER, est différent dans les deux voies.

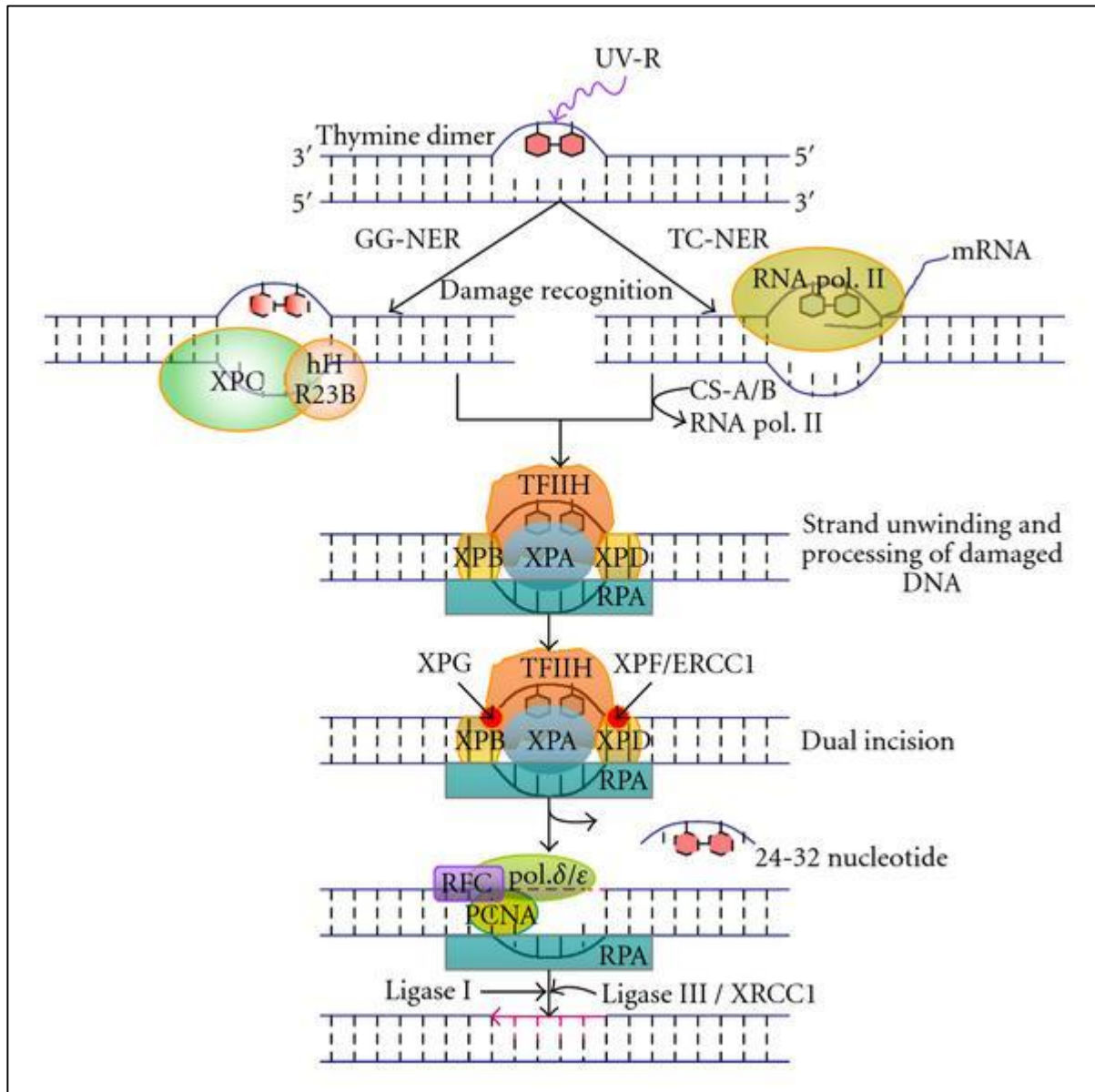


Figure 10 : Schéma simplifié de la voie de réparation par excision de nucléotides (NER)

(Rastogi et al, 2010). La première étape, celle de reconnaissance de la lésion, est la seule différence entre la réparation globale du génome (GGR) et celle couplée à la transcription (TCR). Les étapes suivantes sont identiques pour les deux sous-voies : ouverture de la double hélice de l'ADN, double incision de part et d'autre de la lésion permettant l'excision du fragment portant la lésion puis resynthèse du brin d'ADN et sa ligature.



a) Reconnaissance de la lésion

Lors de la GGR, la reconnaissance de la lésion est effectuée par la protéine XPC qui est capable de détecter plusieurs types de lésions. Cette protéine forme un complexe hétérotrimère composé de XPC, HR23B et de la centrine 2 (CEN2)¹ (Masutani et al, 1994; Sugasawa et al, 1996; Nishi et al, 2005). Ce complexe a la capacité de se fixer sur l'ADN, avec une affinité d'autant plus importante si des dommages comme les photoproduits (6-4) sont présents (Sugasawa et al, 2001). Cependant, ce complexe ne se limite pas à la reconnaissance du dommage dans le sens où il est aussi nécessaire au recrutement des protéines permettant de réaliser les étapes suivantes de la NER (Araújo et al, 2000). Toutefois, XPA se fixe aussi de manière précoce à l'ADN, vérifiant la présence du dommage et aidant au recrutement des facteurs de réparation (Missura et al, 2001). Le complexe DDB1/DDB2 (XPE), quant à lui, se charge de la reconnaissance des lésions faiblement reconnues par XPC, comme les CPDs ou les adduits générés par le cisplatine (Payne & Chu, 1994; Buterin et al, 2005). Cependant, XPE ne permet pas la mise en place du NER à lui tout seul. Certains chercheurs pensent que le complexe DDB1/DDB2 effectuerait un remaniement de la chromatine, dans le but de permettre à XPC/hHR23B d'accéder au dommage (Fujiwara et al, 1999; Tang & Chu, 2002). La seconde hypothèse serait qu'XPE recrute directement XPC/hHR23B (Moser et al, 2005).

Dans la seconde voie de la NER (TCR), c'est le blocage de l'ARN polymérase au niveau du site lésé sur le brin transcrit qui constitue un second moyen pour signaler la présence d'un dommage indépendant de XPC. L'arrêt de la machinerie transcriptionnelle permet de recruter les protéines CSA, CSB, déficientes chez les patients atteints du syndrome de Cockayne (Scicchitano et al, 2004). Ces protéines permettent à leur tour le recrutement des effecteurs suivants de NER ainsi que le retrait de l'ARN polymérase (Friedberg, 2001; Svejstrup, 2002).

b) Ouverture de la double hélice

Suite à l'étape de la reconnaissance du dommage, les deux voies (GGR et TCR) utilisent un processus commun d'ouverture de l'ADN par le facteur de transcription TFIIH. Ce facteur est un grand complexe protéique composé notamment des protéines XPB et XPD possédant respectivement une activité hélicase 3'-5' et 5'-3' (Gerard et al, 1991; Tapias et al, 2004). Une autre sous-unité de TFIIH, TTD-A, régule le complexe et stimule l'activité ATP-ase de XPB, aidant ainsi à l'ouverture de l'hélice d'ADN (Coin et al, 2006). Une fois recruté au dommage,

¹ CEN2 est une protéine partiellement associée aux centrosomes et impliquée dans la duplication des centrioles. L'interaction des protéines XPC et CEN2 stimule la NER et augmente l'affinité de la protéine XPC pour les 6-4 PP (Nishi et al, 2005).



TFIIH sépare les deux brins d'ADN pour former une ouverture d'environ 30 nucléotides de part et d'autre du dommage (Yokoi et al, 2000). Le RPA, trimère constitué de trois sous unités (RPA1, RPA2 et RPA3), se lie à l'ADN simple brin stabilisant ainsi la structure en « bulle » ouverte de l'ADN autour de la lésion. De plus, son association avec XPA conduit au recrutement des protéines impliquées dans les étapes suivantes de NER (Gillet & Schärer, 2006; Zou et al, 2006).

c) Incision du fragment endommagé

L'élimination du fragment endommagé nécessite la coopération de la protéine XPG et le complexe XPF/ERCC1 qui incisent l'ADN autour du site de dommage dans un ordre précis. Initialement, la 3'endonucléase XPG est recrutée au niveau de la lésion ce qui provoque le relargage de XPC (Riedl et al, 2003). Cette étape est suivie du recrutement de la 5'endonucléase XPF/ERCC1, via une interaction possible avec XPA (Orelli et al, 2010). XPA et RPA positionneraient et stimuleraient l'activité des 2 endonucléases, alors que la mise en place de XPF/ERCC1 induirait le relargage de TFIIH (Riedl et al, 2003). L'action conjointe de XPG et de XPF/ERCC1 va aboutir à l'incision d'un fragment de 25 à 30 nucléotides contenant le dommage (Matsunaga et al, 1995). L'endonucléase XPG est chargée de l'incision en 3' alors que la coupure en 5' est assurée par l'hétérodimère XPF/ERCC1 (Wakasugi et al, 1997). Néanmoins, il semblerait que l'incision en 5' par XPF/ERCC1 précède l'incision en 3' par XPG (Staresincic et al, 2009; Fagbemi et al, 2011). Après cette double incision, le facteur XPA est relargué de l'ADN pour être recyclé dans un nouveau complexe d'incision. RPA est alors le seul facteur du complexe d'incision à rester sur l'ADN afin d'assurer la protection du brin non endommagé des attaques nucléasiques (Riedl et al, 2003).

d) Synthèse d'ADN et remplissage de la brèche

L'incision en 5' par le complexe XPF/ERCC1 laisse un groupe hydroxyle (OH) à l'extrémité 3' de la brèche. Cette extrémité 3'OH libre peut-être utilisée comme une amorce d'ADN par les ADN polymérases replicatives δ ou ϵ , associées à la pince coulissante PCNA (Shivji et al, 1992; Budd & Campbell, 1995). Pour terminer, une ligature de l'extrémité 5' du brin néosynthétisé. Cette ligation restante est effectuée par l'hétérodimère ADN ligase I/FEN1 ou ADN ligase III/XRCC1, le tout marquant la fin du processus de réparation par excision de base (Nocentini, 1999; Moser et al, 2007).



3.4.3. Pathologies liées à un défaut du NER

Chez l'homme, la déficience de l'un des facteurs du NER peut-être associée principalement à trois pathologies : le *Xeroderma pigmentosum* (XP), le syndrome de Cockayne (CS), et la Trichothiodystrophie (TTD).

Certains patients présentent des formes mixtes telles que XP/CS, XP/TTD, COFS/TTD, CS/TTD. La figure 11 ci-après présente la répartition des 10 maladies provoquées par des troubles de la réparation de l'ADN en fonction des gènes mutés. Ces dysfonctionnements du NER caractérisés par des prédispositions aux cancers, mais aussi par des désordres neurologiques et cutanés sévères.

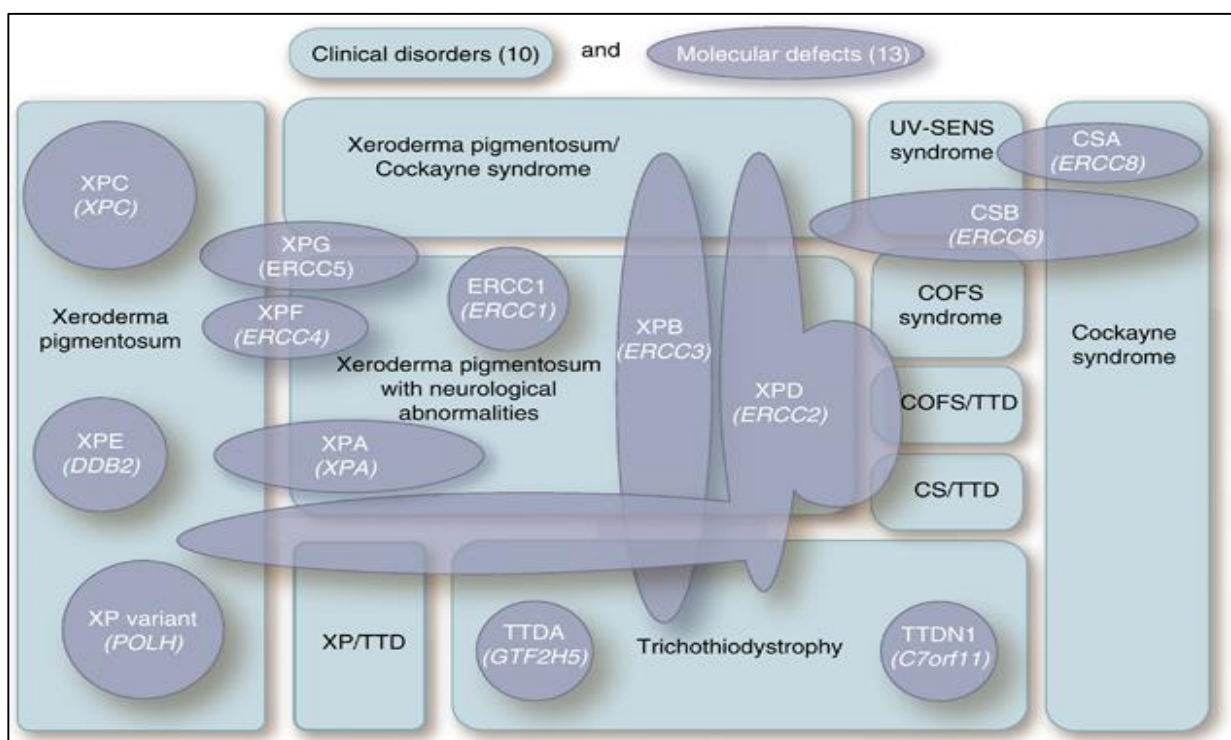


Figure 11 : Différentes maladies induites par des mutations dans les gènes NER (DiGiovanna & Kraemer, 2012). Les pathologies sont représentées par des rectangles bleus et les gènes mutés impliqués dans ces différentes pathologies sont schématisés en violet.

✓ *Xeroderma Pigmentosum*

C'est une maladie autosomale récessive rare correspondant à une déficience en l'un des sept groupes de complémentation XP (A à G). Les patients XP sont extrêmement sensibles aux rayons ultraviolets et représentent un risque accru (multiplié par 2000) à développer des cancers de la peau (Kraemer et al, 1994). Cette maladie sera plus détaillée dans ce manuscrit.



✓ **Syndrome de Cockayne**

Le syndrome de Cockayne est une maladie très rare qui a été décrite pour la première fois en 1936 par le pédiatre Edward Alfred Cockayne, qui donna son nom à ce syndrome. Le CS est une maladie autosomale récessive héréditaire très rare, parfois associée aux formes sévères de *xeroderma pigmentosum*. Il résulte de mutations sur les gènes de la famille CS (*CSA* ou *CSB*) dont la déficience entraîne une hypersensibilité aux UV, mais sans s'accompagner du risque accru de cancers de la peau (Lehmann, 1982; Bregman et al, 1996; Leibel et al, 2006). Les principaux symptômes du CS sont nombreux et variés : retard mental, retard de croissance, microcéphalie, troubles neurologiques et psychomoteurs, troubles de la vue, surdité ainsi que des caries dentaires (de Boer & Hoeijmakers, 2000).

Les cellules de patients CS présentent un défaut de réparation des lésions liées aux UV ainsi qu'une instabilité chromosomique après irradiation par des UV (Lehmann & Norris, 1989; Mallery et al, 1998). Les conséquences phénotypiques du CS s'expliquent par le fait qu'un défaut de TCR résultant des mutations de *CSA* ou *CSB* entraîne un blocage de la transcription de l'ADN par l'ARN pol II au niveau des lésions, et favorise l'apoptose (Andressoo et al, 2006; Laine & Egly, 2006).

Certaines mutations retrouvées au niveau des gènes *ERCC3* (*XPB*), *ERCC2* (*XPD*) ou *XPG* peuvent être responsables d'un syndrome combiné XP/CS. Ces patients ont des atteintes caractéristiques du syndrome XP au niveau de la peau et des yeux, et des atteintes neurologiques typiques du syndrome CS (Lindenbaum et al, 2001).

✓ **Syndrome cérébro-oculo-facio-squelettique (COFS)**

COFS est aussi une maladie génétique autosomique récessive associée à une déficience du NER. Le syndrome COFS constitue un phénotype particulièrement sévère de mutation des gènes *ERCC6* (*CSB*), *ERCC2* et *ERCC5* (Graham et al, 2001). Il se manifeste par des troubles neurologiques progressifs marqués par une microcéphalie avec calcifications intracrâniennes et un retard de croissance. Les anomalies oculaires telles que microcornée, cataractes et atrophie optique qui sont présentes en même temps que les contractures articulaires congénitales. Une photosensibilité peut se manifester avec un phénotype cellulaire simultané de sensibilité aux UV (Meira et al, 2000).

✓ **Trichothiodystrophy (TTD)**

La trichothiodystrophie est une maladie génétique très rare, elle a été décrite pour la première fois en 1968 par R. J. Pollitt (Pollitt et al, 1968). Le terme de trichothiodystrophie a été introduit en 1979 par Vera Price d'après un des symptômes principaux de la maladie (Leibel et al, 2006). En effet, les individus affectés par ce syndrome sont caractérisés par des cheveux



cassants (dus à une déficience en protéines riches en soufre), une ichtyose² (Vagamon et al, 2003) et une photosensibilité modérée sans toutefois prédisposer au cancer (Lehmann et al, 1988; Itin et al, 2001). Ce syndrome est provoqué par des mutations dans des gènes codants pour des sous-unités du facteur TFIIH soit : TTD-A, XPB et XPD (Giglia-Mari et al, 2004).

² Maladie cutanée se caractérisant par une extrême sécheresse et la présence de squames ressemblant à des écailles de poisson (Vagamon et al, 2003).



II. Généralités sur le *xeroderma pigmentosum*

1. Historique

Le *xeroderma pigmentosum* fut décrit initialement en 1870 par le dermatologue hongrois Moritz Kaposi qui lui donna son nom. Celui-ci, venant du latin, signifie littéralement derme sec (*xeroderma*) pigmenté (*pigmentosum*). Il fait ainsi référence à la peau en parchemin et à la pigmentation hétérogène des parties exposées au soleil. Quatre ans plus tard, Kaposi et Ferdinand Ritter von Hebra, son mentor et beau-père, vont décrire de nombreux cas dans le « *textbook of dermatology* » (Kaposi & Hebra, 1875; Kraemer et al, 1987).

En 1883, Albert Neisser décrit de nouveaux cas qui ont la particularité d'associer des symptômes neurologiques. L'atteinte neurologique a été définitivement incluse dans le cadre de la maladie XP en 1932 par De Sanctis et Cacchione (ils ont décrit 3 frères atteints du XP présentant retard mental, nanisme et hypoplasie gonadique) (Neisser, 1883; De Sanctis & Cacchione, 1932).

En 1968, grâce aux travaux de James Cleaver le XP est définitivement répertorié comme pathologie due à un défaut de réparation des lésions ultraviolets-induites au niveau de l'ADN. Il a expliqué que les cellules des patients atteints du XP sont défectives dans la réparation par excision resynthèse des nucléotides (NER) (Cleaver, 1968). Ceci a lancé une grande voie de recherche pour la compréhension moléculaire.

En 1972, Weerd-Kastelein découvre l'hétérogénéité génétique du XP par hybridation cellulaire, trois groupes de complémentation sont ainsi définis. Dans la même année, le XP type variant est défini à la suite d'un travail de Cleaver. (Cleaver, 1972; De Weerd-Kastelein et al, 1972).

Vers 1979, sept types de XP (de A à G, par ordre de découverte) à système NER défectueux étaient identifiés (Arase et al, 1979; Keijzer et al, 1979). En 1984, le premier gène (*ERCC1*) du système NER est cloné (Westerveld et al, 1984).

En 1988, Kreamer découvre que le traitement par les isotrétinoïne³ (Martin et al, 1987) prévient l'apparition de tumeurs cutanées développées par les patients atteints de XP (Kraemer et al, 1988). Toujours dans la même année, le système NER est développé *in vitro* et la découverte du TBP (*TATA-Box Binding Protein*) facteur essentiel dans la reconnaissance du

³ Isotrétinoïne ou acide 13-cis-rétinoïque est un dérivé de synthèse de la vitamine A. La molécule, commercialisée depuis 1984, est utilisée dans le traitement des acnés sévères (Martin et al, 1987).



promoteur des gènes transcrits par Jean-Marc Egly (Cavallini et al, 1988). Dans l'année suivante, *ERCC2*, gène du groupe D du XP fut cloné (Weber et al, 1988).

En 1990 : l'équipe de Tanaka localise et clone le gène et l'ADNc du groupe A du XP ; Weeda et son équipe clonent le gène du groupe B du XP connu aussi sous le nom de *ERCC3* (Tanaka et al, 1990; Weeda et al, 1990).

En 1992 : Legerski et Peterson clonent le gène et l'ADNc du groupe C du XP (Legerski & Peterson, 1992).

En 1993 : Keeney isole « *DNA damage-binding protein 1*, DDB1 » dont l'absence est impliquée dans le XP type E ; Jean-Marc Egly découvre TFIIH et le rôle de la sous unité XPB dans la transcription (Egly, 1993); MacInnes isole et clone le gène *ERCC5 (XPG)* (MacInnes et al, 1993).

En 1996 : Sijbers isole et clone le gène *ERCC4 (XPF)* (Sijbers et al, 1996).

En 1999 : Masutani et son équipe identifient le gène de la polymérase *eta* et décèlent sa mutation dans les cellules XP-V (Masutani et al, 1999). Ensuite, le gène du *XPV* est cloné par Johnson et son équipe (Johnson et al, 1999).

En 2001 : Volker décrit l'ensemble des complexes NER dans les cellules humaines normales et cellules XP à système déficient (Volker et al, 2001).

Toujours en 2001, des chercheurs du CNRS, laboratoire Instabilité génétique et cancer, et de l'Oréal, Département des sciences du vivant, ont réussi pour la première fois à reconstruire *in vitro* de peaux de patients atteints de XP. En juillet 2001, Françoise Bernerd, Daniel Asselineau, Corinne Vioux, Odile Chevallier-Lagente, Bakar Bouadjar, Alain Sarasin, et Thierry Magnaldo publient les résultats de ce travail (Bernerd et al, 2001b).

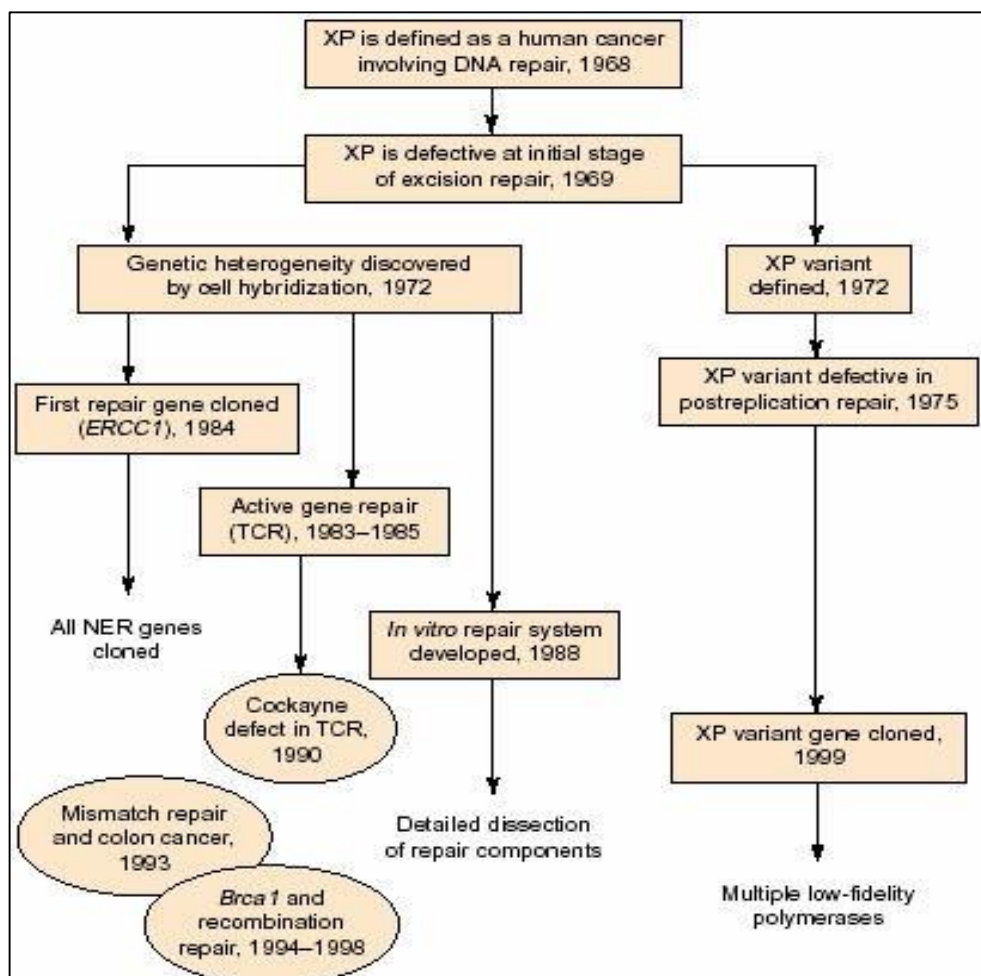


Figure 12: Etapes importantes pour la découverte du NER dans le XP (Cleaver, 2001).

2. Epidémiologie

Xeroderma pigmentosum est une maladie héréditaire très rare qui atteint généralement les deux sexes à transmission autosomique récessive. Le XP est rapporté dans toutes les ethnies avec une prévalence estimée à 1/300 000 aux Etats-Unis et en Europe (Kleijer et al, 2008). Il est moins rare au Japon où la prévalence atteint 1/100 000 (Hirai et al, 2006). Il reste relativement plus fréquent dans certains pays à taux de consanguinité élevée et la grande taille des familles comme au pays du Maghreb et Moyen-Orient où l'incidence est, à titre d'exemple, estimée à 1/10 000 en Tunisie (Fazaa et al, 2001; Moussaid et al, 2004; Ben Rekaya et al, 2013).

3. Description clinique

Le tableau clinique du XP traduit une hyperphotosensibilité associée à une atteinte cutanée, oculaire et parfois des manifestations neurologiques. Le tableau clinique est assez caractéristique et permet lorsqu'il est complet de porter aisément le diagnostic malgré l'assez



grande variabilité dans l'âge de début et l'intensité de la symptomatologie expliquée aussi bien par une hétérogénéité génétique que par des facteurs d'environnementaux.

3.1. Manifestations cutanées et cancers

L'âge moyen d'apparition des premiers symptômes varie entre un et deux ans. Ces symptômes sont initialement une sensibilité aigue aux UV avec l'apparition de graves coups de soleil avec des cloques guérissant lentement, dès que les enfants s'exposaient à la lumière du jour même faible. Par la suite, leur peau présentait des troubles de pigmentation de type taches de rousseur au niveau des zones exposées à la lumière (Kraemer et al, 1987). L'apparition de cette pigmentation anormale chez les enfants en dessous de l'âge de deux ans est un marqueur clinique de la maladie. La peau des enfants atteints du XP peut développer des lésions précancéreuses comme des kératoses actiniques et surtout des tumeurs malignes (Zghal et al, 2006). Ces tumeurs sont majoritairement des carcinomes à cellules basales ou squameuses, et moins fréquemment des mélanomes, avec une moyenne d'âge d'apparition de l'ordre de 8 ans, c'est-à-dire environ 50 ans plus tôt que dans la population générale (figure 13)(Lehmann, 2003; Leibel et al, 2006). La fréquence des carcinomes chez les individus atteints de XP est 4 800 fois supérieure à celle de la population américaine et le risque de développer un mélanome est 2 000 fois supérieure à celle d'un individu sain (Takebe et al, 1989; Kraemer, 1997). De plus, ces malades ont un facteur de risque 10 à 20 fois plus élevé de développer de nombreux types de cancers internes avant l'âge de 20 ans, de nombreux malades décèdent avant l'âge de 30 ans de néoplasie (Kraemer et al, 1987).

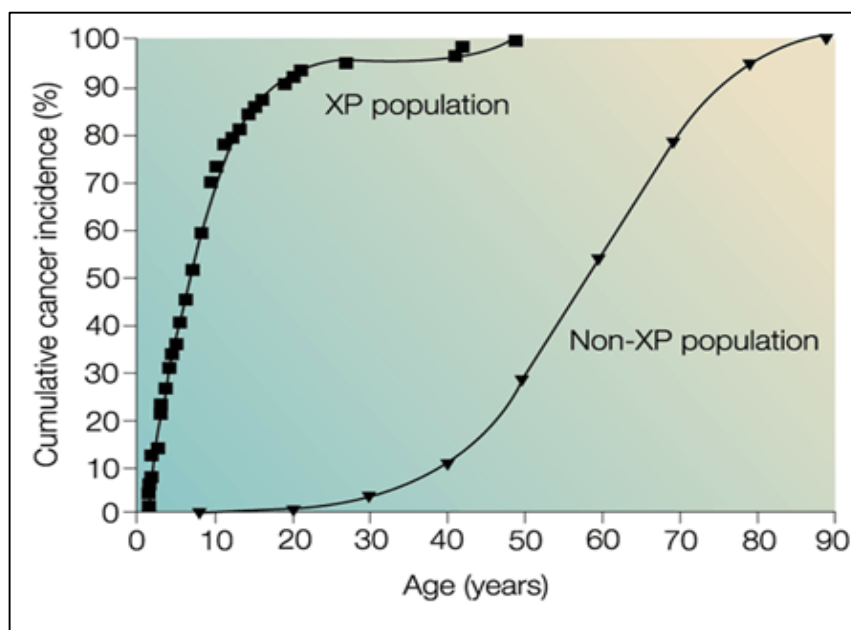


Figure 13 : Prédisposition des cancers chez la population XP (Friedberg, 2001).



L'apparition précoce de ces tumeurs est expliquée par l'effet des UV en présence d'un système NER défectueux qui provoque des lésions de l'ADN non réparées. La persistance de ces lésions engendre une instabilité et favorise l'apparition de mutations sur certains gènes impliqués dans la carcinogénèse, tels que les gènes suppresseurs *Tp53* « *tumor protein 53* » et les oncogènes *Ras* « *Rat Sarcoma* ». Chez 50% des patients XP, l'oncogène *Ras* est muté et chez plus de 80% des patients, le gène *Tp53* est muté (Daya-Grosjean & Sarasin, 2005). Ainsi, une accumulation de mutations dans les gènes régulateurs clés, conduit à la formation de cancers.

3.2. Manifestations oculaires

Outre les problèmes cutanés, les personnes atteintes du XP présentent aussi des problèmes oculaires au niveau des paupières et de la cornée. Les anomalies ophtalmologiques sont généralement limitées au segment antérieur des yeux, exposé aux UV : conjonctive, cornée et paupières (Dollfus et al, 2003; Norgauer et al, 2003). Par ailleurs, les patients souffrent souvent de photophobie qui peut-être associée à la conjonctivite. L'exposition continue de l'œil aux UV peut provoquer des kératites sévères pouvant elles-mêmes entraîner une opacification de la cornée. Les paupières peuvent être le siège des entropions ou ectropions⁴(Ruban & Baggio, 2004) responsables de complications oculaires et dans les cas les plus graves la perte de la paupière (Ramkumar et al, 2011).

3.3. Troubles neurologiques

Enfin, environ 20% des cas XP développent des anomalies neurologiques : une dégénérescence neuronale probablement due à l'accumulation de dommages oxydatifs dont une fraction est normalement réparée via le mécanisme de NER qui entraîne la mort des neurones par apoptose (Reardon et al, 1997; Itoh et al, 1999; Rolig & McKinnon, 2000). La conclusion la plus sévère de ces manifestations cliniques est le syndrome de DeSanctis-Cacchione qui conduit à une microcéphalie, une détérioration mentale progressive, un nanisme et des atteintes du développement sexuel (de Boer & Hoeijmakers, 2000).

3.4. Déficience immunitaire

Les défenses immunitaires des patients XP sont aussi vraisemblablement affaiblies avec la diminution de l'activité des cellules tueuses « natural killer » responsables de l'immunité innée et la diminution de la production d'interféron dans les lymphocytes. 20% des patients XP

⁴ L'entropion (inversion de la marge palpébrale avec bascule postérieure du bord libre qui vient au contact du globe) et l'ectropion (éversion de la paupière dont le bord libre perd le contact avec le globe oculaire), ils sont rares et nécessitent le plus souvent un traitement chirurgical (Ruban & Baggio, 2004).



présentent une immunodéficience (Bridges, 1998; Sarasin, 1999; Daya-Grosjean & Sarasin, 2005).

4. Diagnostic

Le diagnostic du XP repose sur des observations cliniques de la peau, des yeux et de possibles manifestations neurologiques. Lorsque de jeunes enfants consultent pour une extrême réactivité suite à une exposition au soleil avec l'apparition de nombreuses taches de rousseur sur le visage, le médecin peut suspecter un cas de XP. Néanmoins, pour vérifier que les signes cliniques en correspondent, des tests de réparation de l'ADN sont réalisés après exposition aux UV.

4.1. Tests biologiques

✓ UDS, synthèse d'ADN non programmée (*Unscheduled DNA synthesis*).

La réalisation de ce diagnostic nécessite une biopsie prélevée sur une partie non exposée de la peau du patient. Cette synthèse non-programmée (UDS) est basée sur la mesure autoradiographique de l'incorporation d'un précurseur radioactif de l'ADN (la thymidine tritiée) par des fibroblastes préalablement irradiés aux rayons UV (figure 14). Après chaque réparation d'une lésion de l'ADN, un patch d'ADN est néosynthétisé à la place de la lésion. La synthèse de ce nouveau fragment d'ADN présente des caractéristiques différentes de celles des synthèses classiques. Lorsque le système de réparation est défaillant, le taux de fragment néosynthétisé et donc l'UDS est diminué, ce qui confirme le diagnostic de XP (Lehmann & Stevens, 1980; Moussala et al, 2000; Beogo et al, 2012).

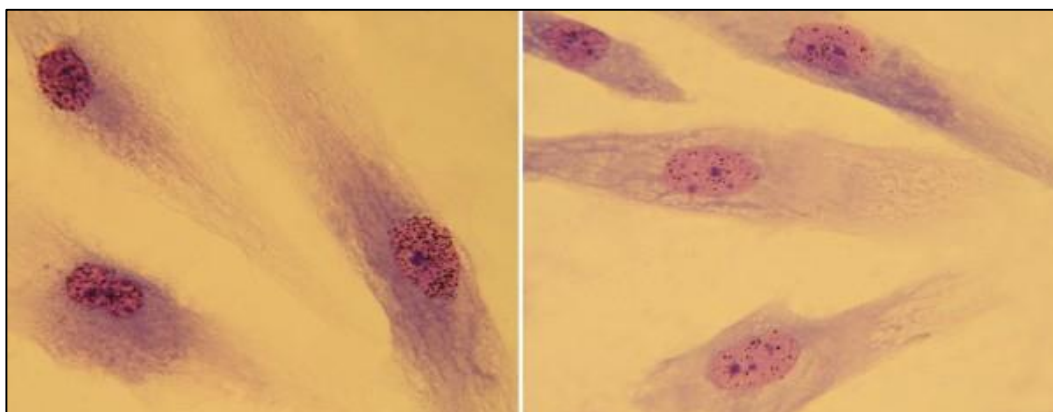


Figure 14 : Test UDS sur des préparations autoradiographiques (Lehmann et al, 2011).

Fibroblastes irradiés aux UV et incubés avec de la 3H-Thymidine, précurseur radioactif de l'ADN. La coloration reflète la quantité de précurseurs incorporés lors de la synthèse d'ADN non programmée, pour la réparation des lésions provoquées par les UV. Les petits grains noirs correspondent à des foyers de réparation où de la thymidine tritiée a été incorporée lors de l'étape de resynthèse de la NER. Par rapport aux cellules normales (à gauche), les cellules d'un patient XP (à droite) montrent moins de grains et, par conséquent, une diminution de la capacité d'effectuer l'UDS.



✓ Mesure de l'hypersensibilité cellulaire aux rayons ultraviolets (UV)

Les cellules extraites du patient XP et mises en culture sont irradiées par des doses croissantes d'UV afin de mesurer l'hypersensibilité cellulaire aux UV. Une courbe de survie cellulaire post-exposition aux UV reflète la capacité des protéines de réparation de l'ADN d'une cellule à réparer les dommages provoqués par les UV. Par comparaison aux cellules normales, les cellules XP, dont la réparation par excision de nucléotides (NER) est déficiente, sont hypersensibles à la mort cellulaire induite par les UV (figure 15).

Les cellules XP-V, dont le système de réparation de l'ADN par NER est fonctionnel, présentent une courbe de survie cellulaire post-UV normale ou quasi-normale. Il est à noter que l'incubation de ces cellules en présence de caféine dans le milieu de culture potentialise leur destruction par les UV. Ceci permet de différencier les cellules XP-V des cellules normales (Bootsma et al, 1998; Van Steeg & Kraemer, 1999; Kraemer, 2003).

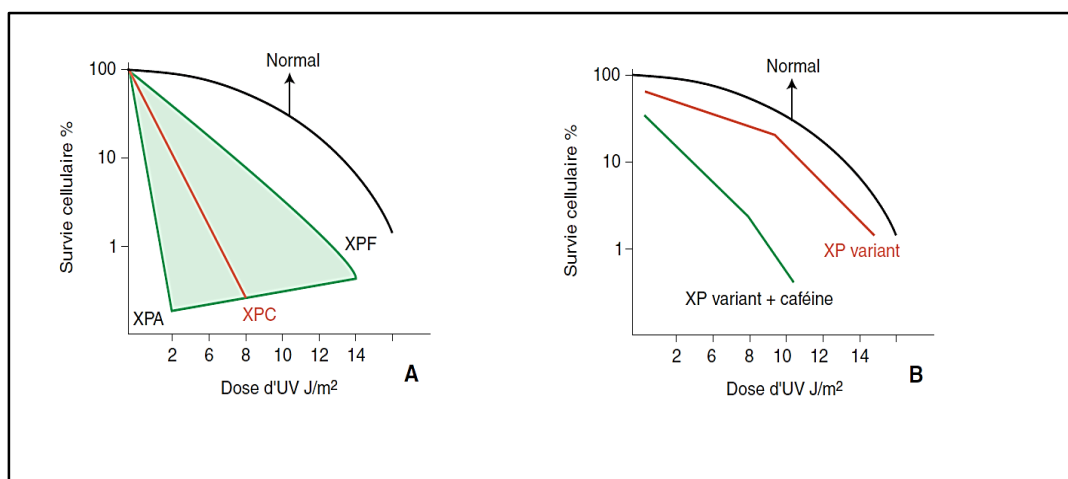


Figure 15 : Test de la survie cellulaire après irradiation aux rayons UV (Zghal et al, 2006). A : au cours du XP classique. B : au cours du XP variant (avant et après l'ajout de la caféine).

✓ Le test HCR

La réactivation de cellules hôtes (HCR, « *Host Cell Reactivation* ») est basée sur la transfection de cellules dites « hôtes » avec un plasmide non répliquatif et sur la mesure d'une activité enzymatique. Le plasmide contient un gène rapporteur endommagé par les UV. Le test HCR a été adapté pour co-transfecter deux vecteurs dans la cellule hôte : le premier vecteur porte le gène rapporteur, le deuxième contient la séquence d'un gène XP. Cette méthode permet entre autres de connaître le groupe de complémentation auquel appartient le patient XP (Carreau et al, 1995; Francis & Rainbow, 1999).



La méthode HCR offre plusieurs avantages. En effet, ce test permet la mesure de l'activité de réparation de pratiquement tous les systèmes de réparation (BER, NER, la réparation des mésappariements, la réversion directe) à partir du moment où la lésion introduite inhibe l'expression ou l'activité de la protéine rapportrice (Slebos & Taylor, 2001; Spivak & Hanawalt, 2006).

4.2. Diagnostic de biologie moléculaire

Grâce aux progrès de la biologie moléculaire, il est désormais possible d'identifier aisément les mutations des gènes XP soit par PCR-RFLP en utilisant plusieurs enzymes de restriction ou bien par PCR-SSCP (single-strand conformation polymorphism) pour détecter de nouvelles mutations ponctuelles. Elle nécessite l'utilisation de la radioactivité (Orita et al, 1989).

D'autres techniques plus performantes telles que le séquençage et la RT-PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction) sont utilisées dans plusieurs laboratoires de biologie moléculaire. Ces techniques sont très sensibles.

5. Hétérogénéité génétique (les groupes de complémentation)

Le syndrome XP est caractérisé par une hétérogénéité génétique. Par conséquence, en fonction du gène affecté et en fonction de la mutation au sein d'un même gène, il existe une hétérogénéité clinique (sévérité du défaut de réparation, fréquence d'apparition de cancer et présence d'anomalies neurologiques). Il existe sept groupes de complémentation chez les patients XP classiques (XP-A à XP-G) et un groupe XP variant (XP-V) (tableau II).

5.1. XP-A

Avec XP-C et XP-D, le groupe de complémentation A (XP-A) représente 90% des patients XP. Il correspond à une forme sévère de *xeroderma pigmentosum*, localisée essentiellement au Japon (Stary & Sarasin, 2002). Les patients sont déficients pour la GGR et la TCR et la plupart d'entre eux présentent des lésions typiques du XP (photosensibilité de la peau avec sensation de brûlure, taches de rousseur, et cancers de la peau) associées à des anomalies du système nerveux central et périphérique, parfois très sévères (détérioration cognitive, dysarthrie, troubles de l'équilibre, aréflexie). Des retards de croissance et du développement sexuel peuvent également être observés chez ces patients (Kanda et al, 1990; Lai et al, 2013). Ce groupe sera plus développé dans la partie suivante.

5.2. XP-B

Le groupe de complémentation B (XP-B) est extrêmement rare de *Xeroderma pigmentosum*. Il a été décrit chez moins de 10 familles. XP-B est due à des mutations dans le gène *XPB* (*ERCC3*), impliqué dans le mécanisme de réparation par NER. Certains patients XP-B présentent les



caractéristiques classiques du XP avec une gravité variable et de légères anomalies neurologiques. D'autres ont un phénotype XP/CS, ils combinent les caractéristiques classiques du XP avec des manifestations systémiques et neurologiques du CS telles que petite taille, perte d'audition bilatérale et hyperréflexie (Wang et al, 1996; Oh et al, 2006; Oh et al, 2007).

5.3. XP-C

Le groupe de complémentation C (XP-C) est le plus fréquent de *xeroderma pigmentosum* dans la population caucasienne. Les patients souffrent uniquement de problèmes de peau, il est très rare qu'ils développent des troubles neurologiques (Friedberg, 2001; Lehmann, 2003). Les cellules XP-C sont moins sensibles à l'effet cytotoxique des UV et des produits chimiques carcinogènes que les autres groupes de complémentations. La maladie est due à des mutations dans le gène *XPC* qui code pour une protéine XPC jouant un rôle de reconnaissance du dommage uniquement dans la GGR. Le fait que la protéine ne soit pas impliquée dans la TCR expliquerait pourquoi les patients XP-C ne développent pas de troubles neurologiques (Sugasawa et al, 1998; Volker et al, 2001). Dans la partie suivante, on va apporter plus de détails concernant ce groupe de complémentation.

5.4. XP-D

Le groupe D constitue une forme cliniquement hétérogène qui présente les manifestations typiques du XP associées ou non à des anomalies neurologiques de gravité variable. Les patients XP-D sont plus nombreux que les XP-B. L'affection est provoquée par des mutations au niveau du gène *XPB*. Elle regroupe des formes XP classiques, mais aussi des formes combinées XP/CS et des XP/TTD et des mutations dans le gène *XPB* conduisent à la trichothiodystrophie seule. Ainsi, ce groupe est très complexe (Taylor et al, 1997; van Hoffen et al, 1999; Lehmann, 2001).

5.5. XP-E

Les patients du groupe E présentent des symptômes légers du XP en comparaison avec les autres groupes ; ils ont un développement neurologique normal. Les patients XP-E sont retrouvés en Europe et au Japon. La maladie est due à des mutations dans le gène *XPD* (*DDB2*). Le facteur DDB est une protéine hétérodimérique composée des sous-unités DDB1 et DDB2. Une mutation de cette protéine impacte le processus de reconnaissance des dommages et donc la réparation de l'ADN (Tang & Chu, 2002; Rapić-Otrin et al, 2003; Stoyanova et al, 2008).

5.6. XP-F

Ce sixième groupe de complémentation, découvert en 1979, est de sévérité généralement moyenne. La maladie est due à des mutations dans le gène *XPF*. La majorité des patients du groupe F ont été identifiés au Japon. Ils représentent des symptômes qui sont relativement légers



comparés aux autres groupes de complémentation. L'apparition de cancer est assez tardive et seulement deux patients présentaient des déficiences neurologiques survenues tardivement (Arase et al, 1979; Matsumura et al, 1998; Tan et al, 2012).

5.7. XP-G

Ce groupe de complémentation est une forme rare et cliniquement très hétérogène. Les symptômes cliniques sont très variables suivant les patients : cela va de légers problèmes de peau à des formes beaucoup plus sévères associées à des graves troubles neurologiques. Comme TFIH, XPG aurait un rôle dans le couplage réparation-transcription de l'ADN. Certains patients du groupe G présentent des formes combinées XP/CS (de Laat et al, 1999; Zafeiriou et al, 2001; Lalle et al, 2002). Les mutations dans le gène *XPG* conduisant à une protéine XPG inactivée sont responsables de la forme XP seule, alors que les mutations conduisant à une protéine XPG hautement tronquée voire inexistante sont responsables de la forme combinée XP/CS (Nospikel et al, 1997; Okinaka et al, 1997).

5.8. XP-V

Le XP-V est observé chez 20% des patients XP. Comme les patients XP classiques, les patients du groupe variant souffrent également d'une hypersensibilité aux rayons UV, y compris une fréquence accrue de cancers cutanés (Kannouche & Sary, 2003; Lehmann, 2005). Cependant, les patients XP-V sont très rarement atteints d'anomalies neurologiques. Si les cellules XP-V ne sont pas déficientes pour le processus de réparation par NER, elles le sont pour la réplication des ADN endommagés par les ultraviolets. (Cleaver, 1972; Svoboda et al, 1998; Sary & Sarasin, 2002). La forme variante du syndrome XP résulte de mutations dans le gène *POLH* (ou *XPV*) codant pour l'ADN polymérase η (Pol η) (Masutani et al, 1999; Yamada et al, 2000). Cette dernière est impliquée dans la synthèse translésionnelle de l'ADN (Cordonnier & Fuchs, 1999; Broughton et al, 2002). En absence de Pol η , les cellules XP-V deviennent hypermutagènes (Maher et al. 1976; Cordonnier & Fuchs 1999). Cependant, les dommages peuvent être pris en charge par des mécanismes moins fidèles conduisant à une forte probabilité d'erreur d'appariements lors de la polymérisation (Cordonnier & Fuchs, 1999; Washington et al, 1999).

**Tableau II** : Caractéristiques des différents groupes de *xeroderma pigmentosum*. Adapté de (Kraemer & DiGiovanna; Zghal et al, 2006).

Groupe de complémentation	Fréquence	Gravité	UDS	Activité NER		Gène	Localisation chromosomique	Phénotype
				TCR	GGR			
XP-A	élevée	G	<5%	D	D	<i>XPA</i>	9q22.33	XP
XP-B	très rare	M	3-40%	D	D	<i>XPB</i>	2q14.3	XP/SC, TTD
XP-C	élevée	M/G	15-30%	N	D	<i>XPC</i>	3p25.1	XP
XP-D	intermédiaire	M	15-50%	D	D	<i>XPD</i>	19q13.32	XP, XP/SC, TTD
XP-E	rare	M	≥50%	?	?	<i>XPE</i>	11p11.2	XP
XP-F	rare	V	15-30%	D	D	<i>XPF</i>	16p13.12	XP
XP-G	rare	M/G	<5-25%	D	D	<i>XPG</i>	13q33.1	XP, XP/SC
XP-V	élevée	V	N	N	N	<i>XPV</i>	6p21.1	XP

D : déficient ; N : normal ; G : grave ; M : moyenne ; V : variable.



6. Traitement

À l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement curatif permettant de soigner les malades XP. La prise en charge repose essentiellement sur les mesures préventives (photoprotection et détection précoce) afin de ralentir au maximum l'évolution de la maladie et les traitements symptomatiques destinés à la prise en charge des lésions.

6.1. Photoprotection

L'utilisation de la photoprotection peut améliorer le pronostic cutané et ophtalmique et retarder ainsi l'apparition de tumeurs. La photoprotection horaire consiste à éviter l'exposition solaire entre 8 et 18 heures, voir mener une vie nocturne, surtout en période estivale. Le port de chapeau, de vêtements longs couvrant toutes les parties du corps, combinaison anti-UV, de gants et de lunettes filtrants les UV est indispensable si le soleil ne peut-être totalement évité.

Cette photoprotection doit être optimale, complétée par des produits topiques de protection solaire. La pose de filtres anti-UV sur les vitres des véhicules, sur les fenêtres des habitations et des salles de classe dans les écoles est indispensable. Ces filtres doivent d'ailleurs exister dans toutes les salles de consultation et d'hospitalisation où ces patients sont pris en charge (Lehmann, 2003).

6.2. Prévention des complications secondaires

La vitamine D, essentielle au développement et à la consolidation des os notamment, est produite dans la peau par une réaction impliquant une exposition aux rayonnements UV. Cependant, les enfants XP protégés des rayons du soleil très précocement présentent de faibles concentrations sériques en 25-hydroxy-vitamine D (figure 16). Ils deviennent alors plus sensibles aux fractures osseuses. La prise de vitamine D par voie orale est ainsi recommandée chez les patients ayant une faible concentration sérique de vitamine D (Sollitto et al, 1997; Cannell & Hollis, 2008; Ali et al, 2009).

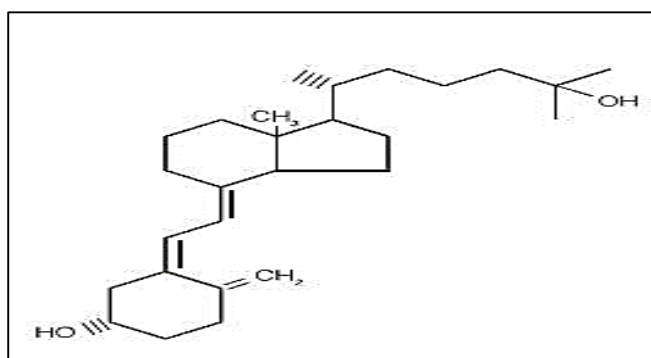


Figure 16 : 25-hydroxy vitamine D.

<http://static.enzolifesciences.com/fileadmin/files/formula/bml-dm100.gif>



6.3. Prise en charge des lésions, traitements symptomatiques

6.3.1. Prise en charge des lésions cutanées

Selon les recommandations de la HAS « *haute autorité de santé* » (Annexe 06), le traitement chirurgical doit toujours être envisagé en première intention en cas de tumeur cutanée. La prescription des autres traitements doit être envisagée et/ou discutée cas par cas, en fonction de la situation clinique.

➤ **Chirurgie**

La chirurgie reste le principal traitement des tumeurs cutanées malignes. Il doit être aussi précoce que possible pour limiter au maximum le préjudice lié aux cicatrices. Etant donné que plusieurs interventions chirurgicales sont souvent nécessaires, l'enlèvement de peau saine est au maximum minimisé. La chirurgie réparatrice est difficile à réaliser vu la mauvaise qualité du tissu sous-jacent (Bernerd et al, 2001a; Moussaid et al, 2004; Zghal et al, 2006).

➤ **Cryothérapie**

La cryochirurgie est une alternative intéressante à la chirurgie chez les patients atteints de XP en raison de sa rapidité d'exécution et de son caractère économe en capital cutané. Elle permet de traiter plusieurs tumeurs au cours d'une même séance. Elle serait le traitement de choix pour les carcinomes de petite taille au cours du XP. Elle consiste à appliquer un froid extrême grâce à un petit dispositif relié à une source d'azote ou d'argon à -190°C. Elle se pratique sous anesthésie locale et n'implique pas obligatoirement une destruction complète de la cible, elle s'adresse, donc, à des lésions bénignes et prémaligènes (kératoses) (Brzezinski, 2012; Strumia, 2016).

➤ **Chimiothérapie**

La chimiothérapie est exceptionnellement utilisée comme un traitement palliatif dans les carcinomes spinocellulaires évolués. Cette thérapie consiste à administrer au malade un médicament cytotoxique ciblant les cellules tumorales. C'est un traitement adjuvant effectué exceptionnellement pour diminuer le volume tumoral en préopératoire ou pour traiter un grand nombre de carcinomes épidermoïdes chez l'enfant. La plupart des cellules XP présentent une hypersensibilité aux drogues antitumorales. La dose à administrer sera définie en concertation entre les cancérologues et les dermatologues (Williams & Klein, 1970; Khader et al, 2005).

➤ **Autres traitements topiques locaux**

Les plus grandes surfaces de peau endommagées par le soleil peuvent être traitées avec des traitements de terrain tels que les préparations topiques de 5-fluoro-uracile (médicament anticancéreux) ou d'imiquimod (molécule immunostimulante possédant une action antitumorale).



- **5-Fluorouracile (5-FU) :** est utilisé en complément de la chirurgie sur les lésions précancéreuses à type de kératose actinique. Il s'agit d'un dérivé fluoré de l'uracile, synthétisé en 1957 par Heidelberger et *al.* (Duschinsky et al, 1957; Heidelberger et al, 1960). Le 5-FU est un antimétabolite actif qui inhibe la fonction de la thymidilate synthase. Celle-ci a pour fonction la méthylation d'une désoxyuridine monophosphate (dUMP) en désoxythymidine monophosphate (dTMP). Cette dernière étant une des quatre bases essentielles de l'ADN, elle est indispensable à la synthèse de l'ADN. Les processus de réplication vont donc se retrouver bloqués au niveau de la cellule (Santi et al, 1974; Pinedo & Peters, 1988; Diasio & Harris, 1989).
- **L'Imiquimod topique à 5% :** c'est un immunomodulateur par augmentation locale de la production d'interféron. Il est utilisé essentiellement pour les lésions superficielles surtout les petits carcinomes basocellulaires multiples du visage. Il a aussi été proposé comme traitement préventif ainsi diverses études ont soutenu son aptitude à prévenir les lésions cutanées bénignes et malignes du XP en stimulant le système immunitaire du sujet (Giannotti et al, 2003).

Par ailleurs, l'électrocoagulation et le curetage sont deux méthodes simples et très utiles pour traiter des dermatoses pour lesquelles un contrôle histologique est inutile. Plus rarement, le rasoir à dermatome ou la dermabrasion sont utilisés pour enlever les couches superficielles les plus endommagées de l'épiderme (Nelson et al, 1995; Barnaby et al, 1997). Cette procédure à double intérêt esthétique et préventif, permet de régénérer la peau à partir des cellules issues des follicules et des glandes, et elle serait donc relativement protégée des UV.

➤ **Radiothérapie**

La radiothérapie (connue également sous les noms radiation, thérapie par rayons X ou irradiation) fait appel à l'administration de rayons à puissance énergétique élevée pour détruire les cellules cancéreuses. Les rayons sont orientés très précisément sur la tumeur afin d'éviter d'endommager les autres parties du corps. Ils agissent de manière directe ou indirecte sur l'ADN (Morère et al, 2011). Elle est rarement indiquée, le plus souvent lorsque l'exérèse chirurgicale est impossible ou alors en complément de celle-ci. Les individus atteints de XP sont généralement sensibles à la thérapie utilisant des rayons X. De ce fait, lorsque la radiothérapie est indiquée, une dose initiale faible est conseillée afin de tester l'hypersensibilité clinique (Salah et al, 2011; Arlett et al, 2014).



6.3.2. Prise en charge des complications ophtalmologiques

➤ *Traitement des complications oculaires non tumorales*

Les troubles trophiques et irritatifs des conjonctives et de la cornée se traitent par l'utilisation de topiques cicatrisants et/ou vitaminiques, de larmes artificielles et de gels. Des collyres à base de méthylcellulose ou des lentilles de contact souples ont été utilisés pour maintenir l'humidité de la cornée et pour protéger contre les traumatismes mécaniques chez les personnes dont les paupières sont déformées (Somen et al, 2015).

➤ *Traitement des tumeurs oculaires*

Exérèse chirurgicale, kératoplasties, greffes, cryothérapie ou radiothérapie sont réalisées en fonction du type et du siège de la tumeur (Somen et al, 2015). La greffe de la cornée permet de restaurer la vision chez les personnes présentant une kératite sévère avec opacité cornéenne. Toutefois, le traitement immunosuppresseur nécessaire pour prévenir le rejet de la greffe peut augmenter le risque de cancer de la peau. Les tumeurs des paupières, de la conjonctive et de la cornée, sont habituellement traitées chirurgicalement.

6.4. Thérapies en investigation

6.4.1. Utilisation du bactériophage T4 endonucléase

Une étude de Tanaka et *al.* a rapporté la capacité du bactériophage T4 endonucléase V à faire une incision en 5' d'une lésion CPD. Le fragment d'ADN résultant est ensuite reconnu puis éliminé par une 5'-3' exonucléase. Une ADN polymérase utilise le simple brin non endommagé comme modèle pour combler la brèche générée et une ADN ligase vient ensuite relier le fragment d'ADN néosynthétisé au brin parental (Tanaka et al, 1975).

L'application de T4N5 liposome lotion (qui est préparé en mélangeant des liposomes T4N5 dans une lotion hydrogel 1% [Lipo Chemical, Inc.]), à la suite des dommages induits par les UVB, a montrée une augmentation de réparation des CPD sur le site d'application (Yarosh et al, 1996; Yarosh, 2002). Le taux de kératoses actiniques et de carcinomes baso-cellulaires a été diminué jusqu'à 30% dans le groupe traité en réduisant la promotion et la progression tumorale. Ainsi, il peut-être un outil utile pour empêcher la nouvelle apparence de la kératose actinique ou d'autres tumeurs cutanées chez les patients XP. Le traitement était également capable de réduire le taux de certaines molécules immunosuppressives, telles que l'interleukine-10 (IL-10) et le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α) (Wolf et al, 2000; Yarosh et al, 2001).



6.4.2. Utilisation des photolyases

Il existe chez certaines espèces une autre voie de réparation de l'ADN « la photoréactivation » impliquant des enzymes redox nommées photolyases. Ces enzymes monomériques, absentes chez l'humain, sont capables de réparer les lésions de type cyclobutane. Les photolyases sont prometteuses car elles se lient spécifiquement aux CPD et les suppriment lors de l'exposition à la lumière. Les longueurs d'onde de 300 à 500 nm convertissent les pyrimidines à leur forme monomère (Stege et al, 2000; Essen & Klar, 2006).

Une étude clinique menée par Stege et *al.* (Stege et al, 2000) a montré que l'application topique de la photolyase sur la peau humaine offre une protection contre les dommages induits par les UVB et empêche la formation d'érythème de rayonnement associée. D'autres études cliniques réalisées chez des patients ayant des kératoses actiniques ont montré que l'application de la photolyase combinée avec des filtres de protection solaire est associée à une amélioration du champ de cancérisation (Puig-Butillé et al, 2013; Puviani et al, 2013).

Enfin, l'amélioration notée chez les patients atteints de *xeroderma pigmentosum* favorise une utilisation ultérieure de la photolyase en tant que traitement topique qui pourrait réduire le nombre de cancers de la peau chez ces patients atteints (Giustini et al, 2014). D'autres études sont à mener pour s'assurer de l'efficacité et de l'innocuité de cette molécule, qui pourrait constituer une modalité de traitement d'avenir des tumeurs photo-induites humaines.



III. Génétique du *Xeroderma pigmentosum* A et C

1. Revue sur XPA

1.1. Gène XPA

Le gène *XPA* humain ([MIMID* 611153](#)) est localisé sur le bras long du chromosome 9 en 9q22.33 (Lam et al, 2005). Il contient 6 exons et 5 introns codants pour un ARNm de 1,4 kb. L'expression de *XPA* est extrêmement faible dans les fibroblastes : 5 à 8 molécules d'ARNm codant pour la protéine XPA sont présentes dans chaque cellule (Layher & Cleaver, 1997).

1.2. Protéine XPA

XPA est une protéine à doigt de zinc de 31 kDa comprenant 273 acides aminés, qui présente 95% de similitude avec la protéine murine. Elle interagit avec l'ADN au niveau de la région centrale (codée par les exons III, IV et V). Il se crée des interactions hydrophobes entre XPA et les bases aromatiques anormalement exposées à la surface de l'hélice. Le doigt de zinc, codé par l'exon III, est retrouvé au niveau du domaine central de la protéine (Tanaka et al, 1990; Batty & Wood, 2000; Bartels & Lambert, 2007) ; il est formé de quatre cystéines (figure 17). Ce doigt de zinc ainsi que le domaine d'interaction avec ERCC1 apparaissent très importants pour que XPA puisse agir en tant que facteur processif. Cette propriété est particulièrement nécessaire lorsque l'ADN est présent sous forme de nucléosome (Feng et al, 1997; Bartels & Lambert, 2007).

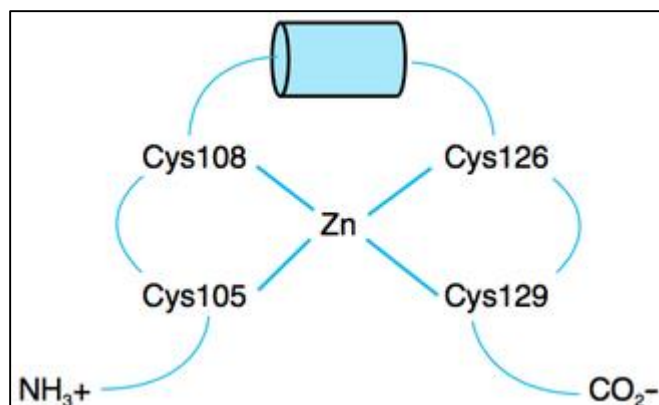


Figure 17 : Modèle du motif à doigts de zinc trouvés dans le domaine de liaison avec l'ADN de la protéine XPA (Morita et al, 1996).

La protéine XPA a une localisation majoritaire dans le cytoplasme et pénètre dans le noyau pour réparer l'ADN après un stress génotoxique. Elle possède une séquence NLS (Nuclear Localization Sequence) localisée dans la partie N-terminale de la protéine. L'interaction de XPA au niveau de cette séquence d'adressage avec des protéines de transport permettrait son passage



du cytoplasme vers le noyau. Par exemple, l'interaction avec XAB1 permettrait l'adressage de la protéine vers le noyau (Nitta et al, 2000; Fung et al, 2008).

1.3. Différentes interactions de la protéine XPA

La protéine XPA présente une faible affinité pour l'ADN comparativement à d'autres facteurs de la NER comme XPC ou DDB2. Cependant, XPA a une meilleure affinité pour l'ADN double brin par rapport au simple brin (Robins et al, 1991; Batty & Wood, 2000; Hermanson-Miller & Turchi, 2002). Les expériences de retard sur gel (*mobility shift assay*) et de photoblanchiment montrent que XPA se fixe préférentiellement sur de l'ADN endommagé par rapport à de l'ADN intact (Jones & Wood, 1993; Rademakers et al, 2003; Camenisch et al, 2007). Deux résidus lysine (aux positions 141 et 179) semblent très importants pour la fixation de XPA par des interactions électrostatiques avec l'ADN (Camenisch et al, 2007).

De plus, la protéine XPA interagit avec de nombreuses protéines du NER comme RPA, TFIIH et ERCC1 (figure 18) et semble avoir un rôle clé dans le contrôle de l'assemblage précis du complexe de pré-incision (Gillet & Schärer, 2006).

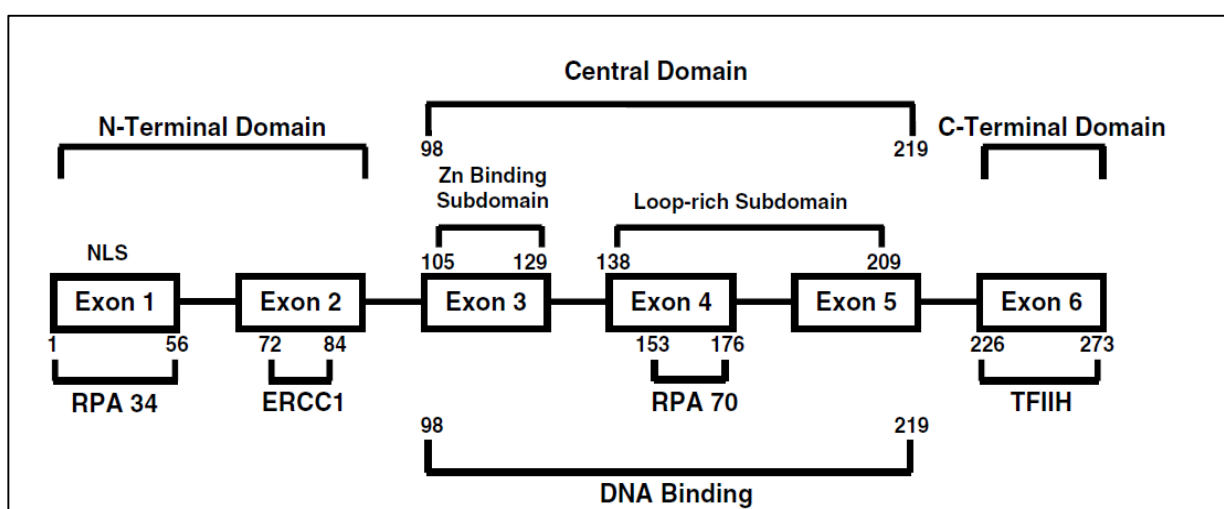


Figure 18 : Différents domaines de la protéine XPA et les différentes interactions de XPA avec les autres protéines de la NER (Bartels & Lambert, 2007).

1.4. Différentes mutations dans le gène XPA

Différentes mutations dans le gène *XPA* ont été recensées. Ce groupe de complémentation présente une hétérogénéité génotypique et phénotypique tout comme les autres groupes de complémentation. Les patients XP-A les plus sévèrement atteints présentent des mutations homozygotes (sur les deux allèles) dans la région du gène qui permet la fixation de la protéine XPA à l'ADN (domaine central : exons III, IV et V) (Bartels & Lambert, 2007). La plupart des mutations du gène *XPA* observées chez les patients Japonais sont des délétions et des mutations



au niveau l'intron III modifiant l'épissage alternatif de l'ARNm ce qui conduit à une protéine XPA tronquée et non-fonctionnelle (Satokata et al, 1992).

Il existe des patients moins atteints où la mutation est généralement en dehors de la région de fixation à l'ADN. C'est le cas par exemple de patients Tunisiens où la mutation est située dans l'exon 6. D'autres patients XP-A « légers » présentent une mutation qui provoque lors de l'épissage alternatif une production d'une faible quantité de protéine XPA normale (Mimaki et al, 1996; Sato et al, 1996; Sidwell et al, 2006).

1.5. Corrélation génotype/phénotype

Une analyse de mutation réalisée en 1998 sur des lignées de cellules XP-A issues de 19 patients Américains et Européens, a permis la mise en évidence d'une corrélation entre le phénotype des patients et leur génotype (States et al, 1998).

Les patients présentant les tableaux cliniques les plus sévères souvent associés à des complications neurologiques sévères sont ceux qui ont des mutations dans les exons III et IV, ainsi que dans l'exon V (perte totale de la fonction protéique). Les enfants atteints de faibles désordres neurologiques présentent des mutations permettant l'expression d'une protéine XPA partiellement fonctionnelle (insertion de nucléotides ou mutations ponctuelles dans l'exon VI) (CLEAVER, 1997).

2. Revue sur XPC

2.1. Gène XPC

Le gène *XPC* humain ([MIMID*613208](#)) est situé sur le bras court du chromosome 3 (3p25.1). Il s'étend sur 33 kb. Il est composé de 16 exons (82–882 bp) and 15 introns (0.08–5.4 kb) (figure 19) (Khan et al, 2002; Sugasawa, 2008). Le gène *XPC* est transcrit en un ARN messager (ARNm) de 3729 bp ([NM_004628](#)). Il a une homologie relative avec le produit du gène de réparation d'ADN chez la levure, RAD4 (Masutani et al, 1994).

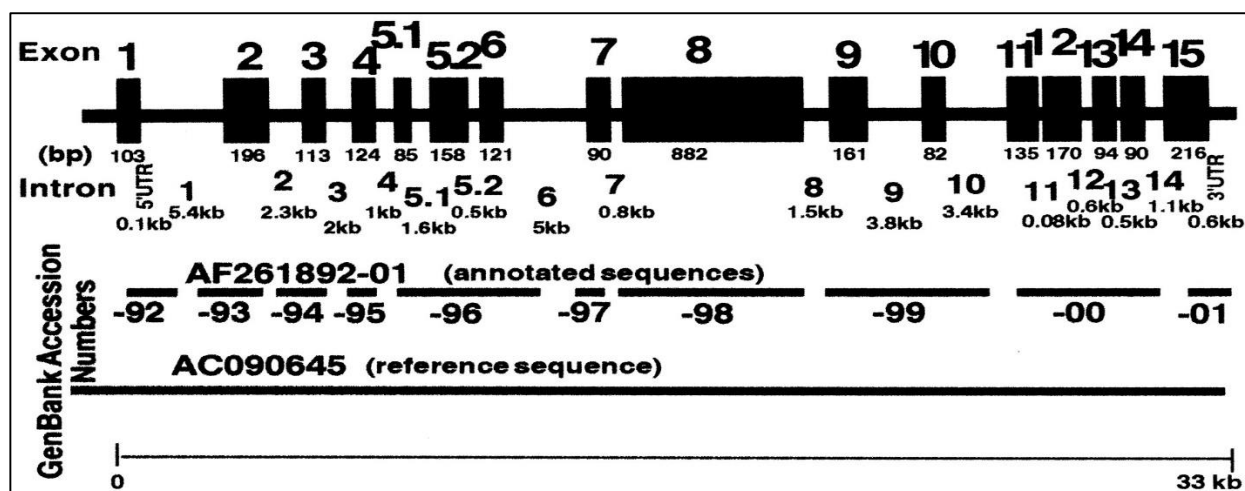


Figure 19 : Structure du gène *XPC* humain (Khan et al, 2002).

2.2. Protéine XPC

Le gène *XPC* code pour une protéine de 125 kDa et de 940 acides aminés, impliquée uniquement dans la voie de réparation GGR. La protéine XPA existe sous la forme d'un hétérotrimère avec les protéines hHR23B et la centrine 2 (Araki et al, 2001; Hu et al, 2005).

Pour accomplir son rôle dans la reconnaissance des lésions et le déclenchement du NER, la protéine XPC doit interagir avec plusieurs partenaires. Ses domaines d'interaction avec l'ADN et différents facteurs protéiques sont tous situés dans sa partie C-terminale (Li et al, 1997; Uchida et al, 2002; Popescu et al, 2003) (figure 20).

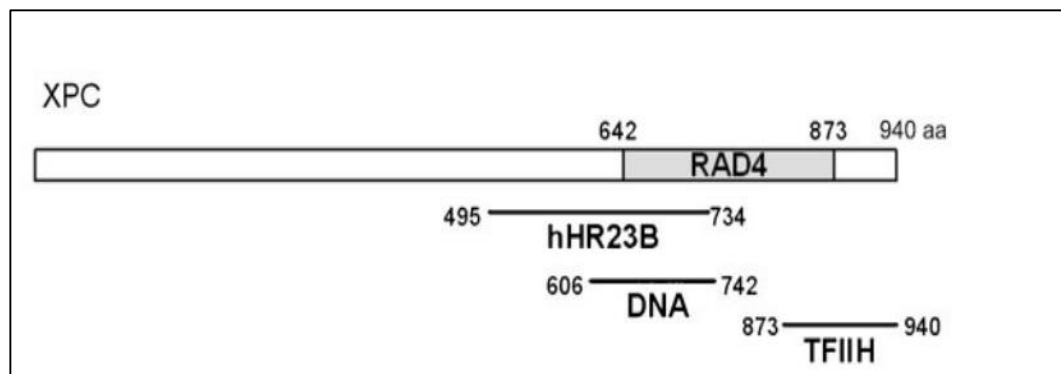


Figure 20 : Domaines d'interaction connus entre XPC et l'ADN ou ses partenaires protéiques.

Ils sont situés dans la moitié C-terminale de XPC. Les domaines de liaison à hHR23B et l'ADN se chevauchent, ainsi que les domaines d'interaction avec la centrine 2 et TFIIH. La région homologue avec la protéine Rad4 est représentée en gris. D'après (Lu et al, 2007).



2.3. Fonction de la protéine XPC

La recherche intense sur XPC dans les dernières années a conduit à la découverte des différentes fonctions de XPC principalement dans la NER comme capteur de dommages à l'ADN, dans l'homéostasie redox et point de contrôle du cycle cellulaire (figure 21) (Melis et al, 2011; Melis et al, 2013). Fait intéressant, une nouvelle étude menée par Lubin et *al.* a élucidé l'interactome de XPC en utilisant une levure de criblage double hybride à haut débit « *high-throughput Yeast Two Hybrid screening* ». L'organisation catégorielle des interacteurs de XPC identifiés est la suivante : 12% avaient un rôle dans la réparation de l'ADN et la réplication, 14% avaient des rôles dans la protéolyse et des modifications post-traductionnelles, 8% avaient un rôle dans la régulation de la transcription, 20% avaient des rôles dans la transduction du signal et la majorité 32% avaient des rôles dans le métabolisme (Lubin et al, 2013).

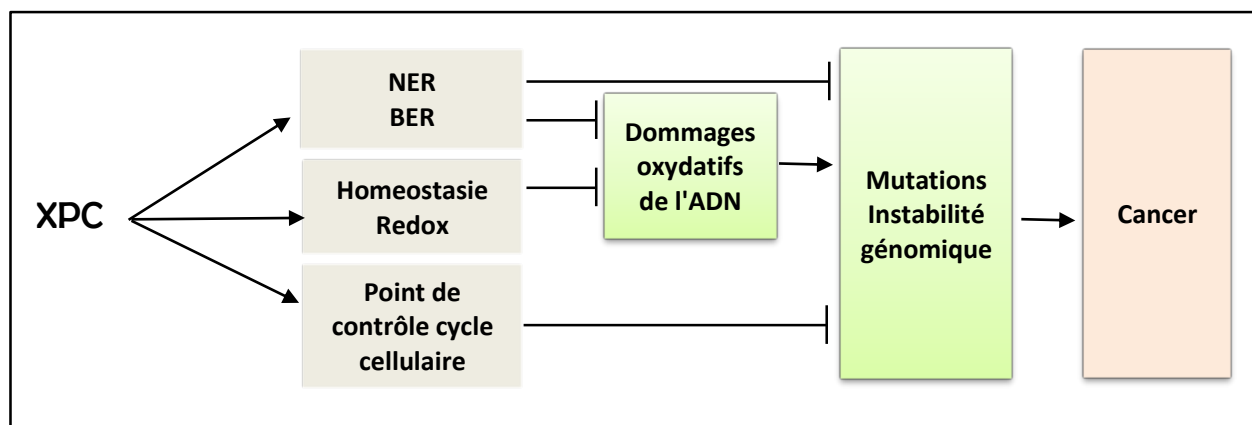


Figure 21 : Fonctions de XPC et son rôle dans l'inhibition des dommages oxydatifs de l'ADN, l'instabilité génomique et le cancer. Tirée de (Melis et al, 2011).

2.4. Mutations du gène XPC

Dans ce gène, 46 mutations ont été décrites, les plus fréquentes sont : des délétions (36,9%), des substitutions (34,7%), des mutations d'épissage (19,5%), et des insertions (8,6%). Les mutations du site d'épissage ont été décrites dans les introns 2, 5, 1, 8, 9 et 11 (Cartault et al, 2011).

IV. Conseil Génétique

Lorsqu'un diagnostic de *xeroderma pigmentosum* est posé, le conseil génétique est essentiel. Il s'agit de fournir au patient et à sa famille les informations nécessaires pour une meilleure prise en charge génétique. Il faut évaluer les risques génétiques et clarifier le statut génétique des membres de la famille. Pour plus d'informations, consultez le site d' « Orphanet » (www.orphanet.fr).

➤ Conseils aux membres de la famille

Il faut rappeler que pour cette maladie de transmission autosomique récessive, il existe différentes situations dans lesquelles un conseil génétique doit être proposé aux familles :

✓ Prise en charge des couples à risque de $\frac{1}{4}$

Dans cette situation, les deux parents sont hétérozygotes (porteurs asymptomatiques de l'une des deux mutations génétiques qui causent le XP) (figure 22). Dans la très grande majorité des cas, il s'agit de couples qui ont donné naissance à un enfant atteint lors d'une précédente grossesse. Il peut également s'agir de couples qui ont été identifiés à la suite d'un dépistage réalisé dans les familles à risque où la naissance d'un enfant atteint a déclenché une recherche des porteurs chez les apparentés.

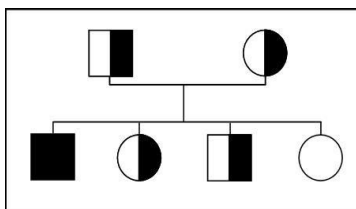


Figure 22 : Représentation d'un couple à risque de $\frac{1}{4}$.

A chaque naissance, le risque de récurrence pour le couple de porteurs sains d'avoir un enfant malade est donc de 25%. L'enfant a par ailleurs 50% de chance d'être porteur asymptomatique et 25% de chances d'être totalement sain et non porteur de la mutation (homozygote sain). En d'autres termes, si l'enfant est sain, la probabilité pour qu'il soit porteur de la mutation est de $\frac{2}{3}$. Enfin, chaque autre membre de la famille apparenté aux parents d'un patient XP présente 50% de risque d'être porteur.

Une information complète sera transmise aux familles XP sur la maladie, sur le risque de récurrence à chaque grossesse et une possibilité de diagnostic prénatal, s'ils le souhaitent, leur sera proposé.



La gravité de la maladie et l'absence de traitement efficace justifient le recours au diagnostic prénatal pour les couples à risque (parents ayant déjà un enfant atteint de XP ou un cas de XP dans la fratrie) ; il peut-être réalisé soit par amniocentèse ou biopsie de trophoblaste chez le fœtus. Le diagnostic génétique préimplantatoire (DPI) peut également être proposé aux familles pour lesquelles les mutations pathogènes ont été identifiées.

✓ **Prise en charge des couples à risque de $\frac{1}{2}$**

Les descendants d'un individu XP sont obligatoirement hétérozygotes pour une mutation causant la maladie. Ces personnes sont cliniquement normales. Les descendants d'un individu XP et d'un individu hétérozygote XP (cliniquement normal) auront une probabilité de $\frac{1}{2}$ d'avoir le XP (figure 23). Ceci s'observe particulièrement dans les populations présentant une mutation fondatrice ou un fort taux de consanguinité.

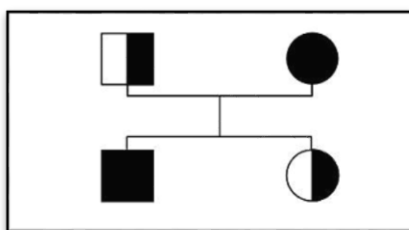


Figure 23 : Représentation d'un couple à risque de $\frac{1}{2}$.

➤ **Détection des porteurs**

La réalisation des tests de génétique moléculaire pour identifier les porteurs parmi les membres de la famille à risque est possible pour les mutations de certains gènes impliqués dans le XP et si les mutations ont été identifiées dans la famille. Le dépistage des porteurs pour les partenaires d'individus déjà identifiés comme porteurs est également possible pour certains gènes impliqués dans le XP.

Toutefois, le dépistage des porteurs de mutations dans des gènes pour lesquels les essais ne sont pas disponibles en laboratoire de routine peuvent être disponibles auprès des laboratoires qui proposent des tests personnalisés.

Dans tous les cas, le moment optimal pour la détermination du risque génétique, la clarification du statut de porteur, et la discussion de la disponibilité du dépistage prénatal est avant la grossesse. Il convient d'offrir un conseil génétique, y compris l'examen des risques potentiels



pour l'enfant à naître et les options de reproduction- pour les jeunes adultes qui sont touchés, porteurs, ou qui sont à risque d'être porteurs.

A noter que des banques d'ADN (généralement extrait de globules blancs), ou des banques de cellules sont constituées pour une éventuelle utilisation future et des essais thérapeutiques. Comme il est probable que les méthodologies de tests, la compréhension des gènes, des mutations et des maladies s'améliorent avec le temps, la conservation de l'ADN de personnes touchées dans de telles banques est à prendre en considération et à proposer aux individus concernés. Par exemple, Généthon (<http://www.genethon.fr/>) est une organisation française qui offre cette possibilité de stockage d'ADN et de cellules afin de réaliser des thérapies géniques pour les maladies rares.

Chapitre II

Problématique et objectifs



En raison de la gravité du XP, de sa fréquence relativement augmentée par les mariages consanguins, de nombreuses études ont été menées afin de permettre la compréhension de cette photodermatose prénéoplasique ainsi que l'implication du système NER. En effet, la réparation de l'ADN regroupe un ensemble de mécanismes faisant intervenir un grand nombre de protéines et/ou de nombreuses interactions entre les différentes voies de réparation qui ont été mises en évidence.

Le diagnostic du XP est difficile et on a souvent recours à des explorations photobiologiques telles que l'UDS pour éliminer d'autres pathologies photosensibilisantes. Ce test UDS requiert plus d'une semaine avant d'avoir des résultats quelques fois difficilement interprétables. En revanche, le diagnostic par des outils de biologie moléculaire est fiable et rapide.

Dans ce travail de thèse, nous avons effectué une étude moléculaire des gènes *XPA* et *XPC* dans un échantillon d'enfants atteints du XP et leurs parents originaires de l'Ouest Algérien. Nous avons tout d'abord recherché la mutation R228X chez deux cas XP en raison des troubles neurologiques, par l'exploration du gène *XPA*.

Nous avons également développé un outil rapide pour une analyse de routine qui nous a permis d'étudier la délétion (p.Val548Ala fsX25) chez les 17 cas ne présentant aucune anomalie neurologique.

A cet effet, nous nous sommes intéressés à la comparaison de la fréquence de ces mutations dans notre population avec celles obtenues dans les pays du bassin méditerranéen afin de confirmer ou infirmer ce qui a été rapporté précédemment par la littérature.

Enfin, nous nous sommes intéressés au rôle éventuel de *XPC* dans l'induction de l'expression de ses partenaires après la reconnaissance des lésions de l'ADN.

Chapitre III

*Population d'étude et
Méthodes*



I. Population d'étude

Notre travail a été effectué sur une population de dix-neuf (19) familles avec au minimum un enfant atteint de *Xeroderma pigmentosum*. Notre échantillon est constitué de 58 sujets : 19 cas index (deux sujets présentaient des troubles neurologiques), 31 parents et 8 frères et sœurs atteints de XP. Les patients et leurs parents ont été recrutés au niveau du service d'ophtalmologie de l'hôpital pédiatrique de Canastel Canastel-Oran, Algérie, sous la direction du Professeur MAHMOUDI Khadidja. L'ensemble des sujets inclus dans cette étude sont originaires de l'Ouest Algérien, d'âge compris entre 4 et 25 ans (figure 24).



Figure 24 : Répartition géographique des familles XP incluses dans cette étude. Les familles des patients XP sont définies par des points rouges.

La consanguinité chez les parents existait dans toutes les familles à l'exception de la famille originaire de la wilaya de Chlef ceci dit, les parents proviennent de la même commune ou dechra.

Après recueil du questionnaire retraçant les informations personnelles (Annexe 01), un volume de 15ml de sang a été prélevé par sujet sur une solution d'Ethylène Diamine Tétra Acétique (EDTA). Sur chaque fiche de renseignements figurait le numéro d'identification du sujet et la date du prélèvement.

Dans la présente étude, les parents ont été désignés par la mention « M » ou « P » selon le sexe suivie d'un numéro de famille correspondant. Les patients sont désignés par la mention « XP » suivie d'un numéro d'identification correspondant.

1. Fiche clinique et exploration

En annexe 01, est présenté un exemple de fiche clinique. En effet, un questionnaire détaillé a été dressé pour chaque malade. Celui-ci commence par les informations personnelles et les antécédents familiaux. Ensuite, nous avons pris en compte l'âge d'apparition des premiers signes



de la maladie et si toutefois, il y avait des moyens de protection contre les UV. La représentation des généalogies des familles recrutées a été établie selon les informations fournies par les patients et leurs parents (annexe 03). Ce questionnaire était accompagné d'un formulaire de consentement éclairé signé par toutes les personnes participant à cette étude (Annexe 02).

L'examen clinique a été surtout basé sur les signes symptomatiques que présentaient les sujets atteints. Des mesures anthropométriques ont été réalisées (Taille, poids), ces mesures ont permis de calculer l'IMC (Indice de Masse Corporelle) selon l'équation de Quetelet. De plus, des mesures de la pression artérielle ont été effectuées pour tous les sujets avant le prélèvement sanguin. Les valeurs de la pression artérielle systolique et diastolique des PAS et PAD, ont été mesurées sur le bras droit sur un sujet en position assise, en utilisant un sphygmomanomètre à mercure norme.

Un autre patient (code XP1417 ; sexe féminin ; âge 18 ans ; phénotype modéré) issu d'une famille consanguine originaire de la wilaya de Mascara, nécessitait un diagnostic plus approfondi pour confirmer la présence d'une atteinte XP. Nous avons suivi les mêmes paramètres d'exploration et de prélèvement des autres patients XP.

II. Méthodes

1. Méthodes d'exploration génétique

Nous avons procédé par deux stratégies selon le profil des patients, c'est-à-dire la présence ou l'absence de troubles neurologiques et en essayant de corrélérer le phénotype avec son génotype probable.

Dans le cas de notre travail nous avons exploré les deux gènes les plus fréquemment mutés dans les pays du Maghreb « *XPA* et *XPC* ».

La stratégie élaborée chez les sujets qui présentaient des atteintes neurologiques et leurs parents a porté sur la détection de la mutation (c.682C>T, p.Arg228X) par une réaction d'amplification en chaîne «PCR» (*Polymerase Chain Reaction*) suivie d'une digestion du produit d'amplification par une enzyme de restriction sur gel d'agarose « RFLP » (*Restriction Fragment Length Polymorphism*).

La deuxième technique a concerné les individus ne présentant pas d'anomalies neurologiques et leurs parents. Elle a consisté à rechercher la mutation (c.1643_1644delTG ou p.Val548AlafsX25) par une analyse de séquence (séquençage).

Le patient XP1417, censé être un cas XP, a fait l'objet d'étude par les deux techniques (PCR-RFLP et PCR-Séquençage) notamment une exploration des exons 10 et 11 au niveau du gène *XPV*



par la technique PCR-Séquençage dans le but de rechercher les mutations les fréquentes. Les détails sont donnés dans l'annexe 04.

2. Extraction d'ADN génomique et dosage

L'extraction d'ADN génomique a été réalisée à partir de 15ml de sang total dans le laboratoire de génétique moléculaire et cellulaire (USTO-Oran) en utilisant le kit d'extraction Stratagene (Agilent Technologie, France) selon les recommandations du fournisseur (Annexe 05). Ce kit commercial permet l'isolement de l'ADN de manière non toxique. Une modification du protocole d'extraction par kit Stratagene par « Salting Out » était nécessaire. Cette technique est basée sur le traitement des lysats cellulaires par des solutions salines associées à la protéinase K (enzyme protéolytique) (Miller et al, 1988).

Il est préférable de s'assurer de la pureté de l'ADN en utilisant la méthode du dosage spectrophotométrique basée sur la capacité de l'ADN à absorber des rayonnements UV à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop (NanoDrop Technologies, USA).

L'estimation de la concentration des ADN est déterminée par la mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 260nm « *nanomètre* ». Sachant qu'une unité de densité optique (DO) correspond à une concentration de 50 µg/ml d'ADN (Kaplan et Delpech, 1993). Ainsi, il est possible d'évaluer la concentration d'ADN d'un échantillon par la formule suivante :

$$C \text{ µg/ml} = DO_{260} \times 50 \times \text{Facteur de la dilution.}$$

Une deuxième lecture à 280nm est nécessaire pour mettre en évidence une éventuelle contamination par les protéines ou par les sels lors de l'extraction.

Avoir un ADN pur signifie que le rapport des densités optiques : $R = \frac{DO \text{ à } 260\text{nm}}{DO \text{ à } 280\text{nm}}$ doit être compris entre 1,5 et 2. Un rapport inférieur à 1,5 détecte une contamination protéique. Alors qu'une valeur supérieure à 2 signifie une contamination par les sels, dans ce cas un lavage par l'éthanol est envisagé.

3. Analyse génétique

3.1. Première approche : Détection de la mutation (c.682C>T, p.Arg228X)

L'exploration de la mutation c.682C>T, p.Arg228X a été réalisée par la technique de génotypage PCR-RFLP dans le Service de biochimie, Pôle de Biologie et Pathologie à Hôpital Pellegrin, Bordeaux (France).

Dans cette technique, un gène cible est amplifié par une paire d'amorces spécifiques. L'ADN est ensuite digéré par une enzyme de restriction. Les fragments d'ADN ainsi obtenus,



nommés fragments de restriction, sont ensuite séparés selon leur taille par électrophorèse sur gel d'agarose.

➤ Principe de la PCR

La technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) est une méthode d'amplification enzymatique permettant de fabriquer de multiples copies d'un segment spécifique d'ADN, même à partir d'une faible quantité de matrice initiale. Cet outil de biologie moléculaire a été mis au point en 1985 par Karry Mullis et ses collaborateurs (Saiki et al, 1985; Mullis et al, 1986).

La réaction de polymérisation en chaîne est une procédure rapide assurée par l'activité polymérasique 5'-3' d'une ADN polymérase thermorésistante (*Taq* polymérase), extraite d'une bactérie thermo-résistante dénommée «*Thermus aquaticus*». Il s'agit de réaliser une succession de réactions de répllication par un procédé d'extension de deux amorces oligonucléotidiques spécifiques bornant la séquence à amplifier d'une matrice double brin d'ADN. Chaque réaction met en œuvre deux amorces dont les extrémités 3' pointent l'une vers l'autre. La taille des oligonucléotides utilisés comme amorces est généralement comprise entre 18 et 25 bases.

La réaction PCR s'effectue *in vitro* dans un appareil « thermocycleur », constituée d'une succession de cycles, comportant chacun trois principales étapes : la dénaturation de l'ADN double brin, l'hybridation ou anelage des amorces et enfin l'extension ou l'élongation des amorces (figure 25).

✓ **Etape 01** : Dénaturation de l'ADN double brin (de 92°C à 94°C) :

Cette étape consiste à chauffer l'échantillon pour déshybrider les deux brins d'ADN en rompant les liaisons d'hydrogène. Les deux brins monocaténaire de l'ADN peuvent alors servir de matrice.

✓ **Etape 02** : Hybridation des amorces (entre 45°C et 65°C) :

Le mélange est alors refroidi, ce qui permet aux amorces de s'hybrider au niveau de leurs séquences cibles.

✓ **Etape 03** : Elongation des amorces (de 70 °C à 72°C) :

L'ADN polymérase (*Taq* polymérase) synthétise deux nouveaux brins à partir des deux amorces respectives en incorporant les dNTP (Désoxynucléotides triphosphates) pour former une chaîne complémentaire à celle sur laquelle s'est fixée l'amorce complémentaires de la séquence de la matrice. Cette synthèse s'effectue dans le sens 5'→3'. Chaque double hélice produite permet d'amorcer la synthèse de 2 nouveaux brins et la quantité d'ADN dans l'échantillon croît exponentiellement. Les trois étapes de la PCR sont ainsi répétées *n* fois, il en résulte à la fin 2^{*n*} copies de l'ADN cible.

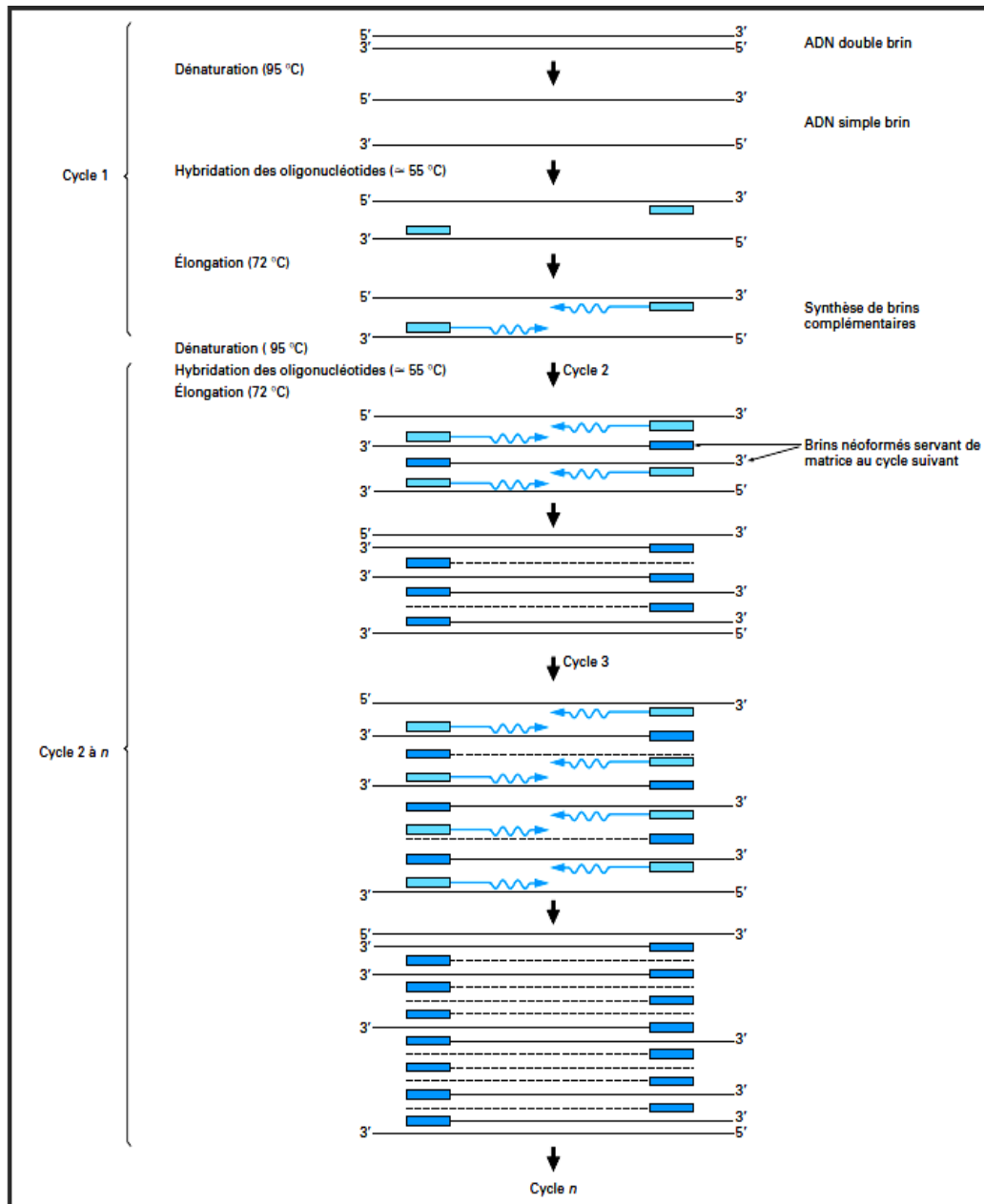


Figure 25 : Principe de la PCR (Tagu & Moussard, 2003).

➤ Principe de RFLP

La technique Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP) est une technique basée sur la présence ou non de sites de restriction. Elle consiste à comparer les profils de migration électrophorétique des produits de digestion de l'ADN génomique par des enzymes de restriction (Everett & Andersen, 1999; Ruiz et al, 2000). Les enzymes ont la particularité de couper l'ADN partout où ils détectent une séquence de nucléotides spécifiques. Une enzyme peut évidemment couper à plusieurs endroits le long de la séquence d'ADN amplifiée.



- **Choix des oligonucléotides de PCR :**

La région encadrant la mutation c.682C>T, p.Arg228X (figure 26), a été amplifiée par le couple d'amorces donné dans le tableau III.

Tableau III : Séquences des amorces encadrant la mutation c.682C>T, p.Arg228X.

	Séquences des amorces	Température d'hybridation	Taille de l'amplicon
Amorce sens	3'TACATGGCTGAAAGCTTGAT5'	52°C	351pb
Amorce anti-sens	5'GGGTTTCATTCATCTATG3'		

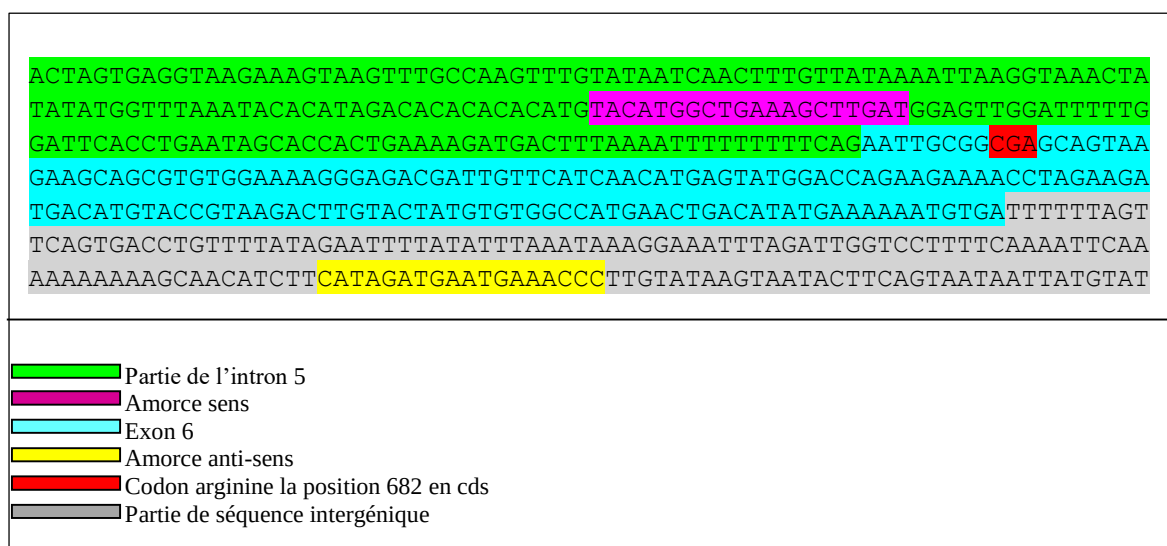


Figure 26 : Séquence d'ADN avec amorces encadrant la région d'intérêt (la position 682).

- **Amplification de la région d'intérêt**

L'ADN génomique, concentré à 50 ng/μl, a été amplifié dans un mélange réactionnel d'un volume final de 50 μl contenant 1X du tampon de PCR, 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de chaque dNTP, 10 pmol de chaque amorce, et une unité (U) de *Taq* polymérase (Invitrogen).

- **Programme d'amplification**

Pour chaque série d'amplification, il est nécessaire de réaliser en parallèle un témoin négatif ne contenant pas d'ADN pour détecter toute contamination des réactifs utilisés. L'amplification a été réalisée dans un *Primus* thermocycleur (MWG Biotech AG, Germany) selon le programme comprenant trois étapes : une étape de dénaturation initiale à 95°C pendant 10 minutes, suivie de 35 cycles de 95 ° C pendant 30 secondes, 52 ° C pendant 30 secondes et 72 ° C pendant 30 secondes. La réaction est parachevée par une étape d'élongation à 72°C pendant 5 minutes afin de terminer l'élongation de tous les brins d'ADN néo-synthétisés.



Les produits de l'amplification ont ensuite été purifiés sur des colonnes *illustra MicroSpin G-50* (GE Healthcare Life Sciences), en suivant les instructions données par le fournisseur pour enlever l'excès de sels, d'amorces et de dNTPs non incorporés lors de la polymérisation.

- **Test d'amplification**

Le contrôle de l'amplification du fragment cible a été effectué par migration électrophorétique sur gel d'agarose à 2% en présence de bromure d'éthidium (BET) (1g d'agarose standard) dans 100 ml de TBE1/X [tris à 0,089M/ EDTA à 0,25mM /acide borique à 0,089M/ pH =8]. Un marqueur de taille (100pb, Biolab New-England) a été utilisé pour déterminer la taille des fragments d'ADN amplifiés. Les résultats ont été visualisés sous UV grâce à la fluorescence du BET incorporé dans le gel. Le gel a été photographié à l'aide d'un appareil polaroid adapté sous les UV d'un transilluminateur.

- **Choix de l'enzyme de restriction**

Les produits d'amplification ont été soumis à l'étude du polymorphisme de restriction. Les amplimères de tailles 351pb ont été digérés par l'enzyme de restriction HphI (New England Biolabs, USA) conformément aux instructions du fabricant et séparés sur gel d'agarose à 2%. Cet enzyme coupe au niveau du site de restriction GGTGA(8/7)^ et génère deux fragments de 320pb et 31pb en présence de l'allèle normal (allèle C). Cependant, la substitution C>T crée un nouveau site et l'enzyme va donc couper en deux positions ce qui génère trois fragments de taille 245pb, 75pb et 31pb ce qui correspond à l'allèle muté (allèle T), selon la carte de restriction suivante :

Allèles	C	T
Carte de restriction		

Les résultats attendus sur le gel électrophorétique vont nous révéler trois génotypes distincts : les individus homozygotes pour l'allèle 682C (2 bandes : 320pb et 31pb), les individus homozygotes pour l'allèle 682T (3 bandes : 245pb, 75pb et 31pb), et les individus hétérozygotes (4 bandes : 320pb 245pb, 75pb et 31pb) (figure 27).

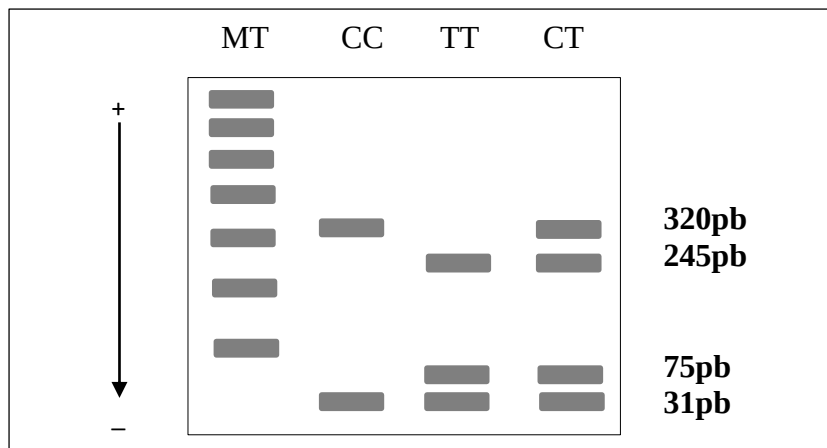


Figure 27 : Représentation schématique des profils électrophorétiques attendus après la digestion des ADN par HpaI.

3.2. Deuxième approche : Détection de la mutation (c.1643_1644delTG ou p.Val548AlafsX25)

L'exploration de la mutation c.1643_1644delTG a été réalisée après amplification par PCR en séquençant les fragments amplifiés dans le Service de biochimie, Pôle de Biologie et Pathologie à Hôpital Pellegrin, Bordeaux (France). Ce séquençage est suivi d'une analyse bioinformatique par deux logiciels : SeqScape (Applied Biosystem) et GeneScan (Applied Biosystem).

➤ Principe du séquençage

D'après Sanger et *al.* (Sanger et al, 1992), la réaction de séquençage est basée sur le principe d'une réaction cyclique (dénaturation, hybridation, élongation). Le fragment à séquencer est utilisé comme matrice d'une synthèse nucléotidique réalisée par une ADN polymérase. Cette réaction est établie, dans un même tube, en présence des quatre précurseurs désoxyribonucléotides (dNTP) et d'une faible quantité des quatre analogues portant quatre fluorochromes différents, les didésoxyribonucléotides (ddNTP). Lors de la polymérisation, ces derniers s'incorporent au hasard, ce qui arrête la synthèse. En effet, ces ddNTP sont dépourvus de groupement hydroxyle en 3' et ne peuvent pas former une liaison phosphodiester 3'-5' (Sanger et al, 1977).

Les fragments néosynthétisés, de longueurs variées, sont ensuite séparés en fonction de leur taille par électrophorèse capillaire. La migration des fragments fluorescents au travers d'une cellule de détection permet au système optique laser du séquenceur de collecter la fluorescence portée par chacun de ces fragments et de transmettre ces informations à un ordinateur. Il devient alors possible de déterminer pour chacun des quatre fluorochromes utilisés, la taille des fragments obtenus et d'en déduire la séquence nucléotidique du fragment analysé.



a. Identification de la mutation (c.1643_1644delTG ou p.Val548Ala fsX25) : Analyse par SeqScape

- Choix des amorces**

	Séquences des amorces	Température d'hybridation	Taille de l'amplicon
Amorce 8.1S	3'CTAGCTGGTGACTTAACCCT5'	55°C	550pb
Amorce 8.2AS	5'TCTTGGACCCAGCCTTTGTC3'		
Amorce 8.3S	3'CTCCAACGCAGAGGAAAGCC5'	55°C	570pb
Amorce 8.4AS	5'GTGCTGGGCATATATAAGGTG3'		

Les amorces données ci-dessus ont été choisies afin de procéder à une analyse bioinformatique par le logiciel SeqScape. L'amplification a été réalisée dans un mélange réactionnel d'un volume final de 50 µl contenant 50 ng d'ADN génomique, 1X du tampon de PCR, 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de chaque dNTP, 10 pmol de chaque amorce, et une unité (U) de *Taq* DNA polymérase (Invitrogen). La réaction de PCR a été effectuée dans un *Primus* thermocycleur (MWG Biotech AG, Germany) selon un programme bien défini (Tableau IV).

Tableau IV : Programme de la PCR.

Etapes	Cycle (s)	Température	Temps
Etape 1 : Dénaturation	1	95°C	10 min
Etape 2 : Dénaturation Hybridation Elongation	35	95°C 55°C 72°C	30 s 30 s 1 min } x35
Etape 3 : Elongation finale	1	72°C	5 min

Le contrôle de l'amplification a été réalisé par électrophorèse sur gel d'agarose concentré à 2%, par une migration à 100 Volts (V) pendant 20 minutes. Les produits de l'amplification ont été ensuite purifiés sur des colonnes *illustra MicroSpin G-50* (GE Healthcare Life Sciences) selon les recommandations du fabricant.

- Réaction de séquence**

L'étape du séquençage consiste en une réaction de séquence. Au cours d'une PCR non conventionnelle, on obtient de nombreuses copies d'ADN de différentes tailles du fragment



d'ADN à séquencer. La taille du fragment d'ADN dépend du nombre de dNTP qui seront polymérisés par la *Taq* polymérase avant qu'un ddNTP ne vient s'incorporer à la séquence d'ADN.

Les réactions de séquençage ont été réalisées à l'aide du kit BigDye® Terminator v3.1 Sequencing (Applied Biosystem). Ce coffret contient le mélange ou « Mix » déjà prêt à l'emploi. Il s'agit du Mix de séquence (Big dye-Terminator cycle sequencing Ready Reaction Kit) fourni par Applied BioSystem. Ce Mix contient les réactifs suivants : les dNTPs, les ddNTPs, $MgCl_2$, un tampon Tris HCL pH=9 et l'*AmpliTaq* polymérase. Un volume de 5,9 μ l d'amplimère purifié est utilisé pour la réaction de séquence, avec 0,125X du réactif BigDye Terminator (Applied Biosystem, Foster City, Etats-Unis), 0,75X de tampon du BigDye Terminator (Applied Biosystem, Foster City, Etats-Unis), 0,32 pM/ μ l d'amorces, complété par de l'eau à 10 μ l.

Après l'ajout des différents réactifs, la réaction de séquence est réalisée selon le programme suivant : une dénaturation initiale de 95°C pendant 5 minutes, suivie de 25 cycles de réaction de séquence (96°C 10 s, 50°C 30 s et 60°C 4min).

- **Purification des produits de réaction de séquence**

La purification est une étape qui sert à éliminer les excès de Mix et d'amorces utilisés précédemment pour la réaction de séquence, celle-ci se fait en plusieurs étapes. Cette purification repose sur l'addition du mélange contenant (125 mM EDTA, 3M d'acétate de sodium et de l'Ethanol) au produit de réaction de séquence. Ce mélange est incubé à température ambiante pendant 15 minutes puis centrifugé à 2 000g pendant 45 minutes à 4°C. Le culôt est ensuite repris dans 10 μ l de Hi-Di formamide (Applied Biosystem, Foster City, Etats-Unis).

- **Electrophorèse capillaire**

L'électrophorèse capillaire est réalisée sur un séquenceur automatique *ABI 3500xL Dx Genetic Analyzer* (Applied Biosystem, Etats-Unis). Les réactions de séquences chargées sur ces différents capillaires sont ensuite plongées dans des tampons de migration où une électrophorèse est effectuée. Ceci permet la lecture des ddNTPs incorporées à la fin des fragments d'ADN. Les fragments migrent le long du capillaire dans le POP-7 (Applied Biosystem, Etats-Unis) à une vitesse qui dépendra de leurs tailles (les petits fragments migreront plus vite que les gros). Chacun de ddNPT est marqué d'un fluorophore différent. Cela permet une lecture de notre séquence sur électrophérogramme.



b. Identification de la mutation (c.1643_1644delTG ou p.Val548Ala fsX25) : Analyse par GeneScan

Afin de faire une analyse par le deuxième logiciel GeneScan (Applied Biosystem), une nouvelle amplification par PCR de la région d'ADN encadrant la mutation c.1643_1644delTG est réalisée grâce à un couple d'amorces marqué par un fluorochrome (6-FAM, 6-Carboxyfluorescein), indiqué dans le tableau suivant :

Tableau V : Liste des oligonucléotides

	Séquences des amercs	Température d'hybridation	Taille de l'amplicon
Amorce sens	3'(6FAM)GCATAGCTGGTATAGACCAG5'	60°C	194pb (cas normal) / 192pb (cas muté)
Amorce anti-sens	5'gtttctTCGTACCTCTGTGTGACATC3'		

Le volume final de la PCR était de 50 µL, contenant 100ng d'ADN génomique, 1X du tampon de PCR, 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de chaque dNTP, 0,2µM de chaque amorce et 1,25 U de *l'AmpliTaQ Gold™* DNA Polymérase. La réaction de la PCR a été faite suivant ce programme : dénaturation initiale à 95°C pendant 10 minutes, suivie par 25 cycles de (30 s à 94°C, 30 s à 60°C, 30 s à 72°C) et 5 minutes pour une extension finale à 72°C permettant d'achever l'élongation de tous les brins d'ADN néo-synthétisés.

Le contrôle d'amplification s'effectue par électrophorèse sur gel d'agarose concentré à 2%. La migration est réalisée à 100 V pendant 15 minutes. Les produits de l'amplification sont ensuite purifiés sur des colonnes *illustra MicroSpin G-50* (GE Healthcare Life Sciences) conformément aux indications du fabricant.

Après la purification, 1µl de produits PCR est mélangé à 10 µl de formamide et 0,5 µl du marqueur de taille *GeneScan 350 Rox* (Applied Biosystem). Ces fragments sont alors analysés par électrophorèse capillaire sur le séquenceur *ABI 3500xL Dx Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Etats-Unis). Les données sont transférées vers le logiciel « 3500 Series Data Collection Software ».

• Analyse bioinformatique

Les électrophorégrammes obtenus sont analysés et alignés par le logiciel SeqScape® v2.7 (Applied Biosystem, Etats-Unis). Ce dernier détecte les différences possibles entre la séquence à étudier et la séquence de référence contenue dans les banques de données (Blast, Basic Local Alignment Search Tool) (www.ncbi.nlm.gov/blast). Il permet de mettre en évidence les mutations faux sens, les insertions ou délétions d'un ou de plusieurs nucléotides et ceci à l'état homozygote



ou hétérozygote. Le résultat est rendu sous forme de tracé constitué de pics de différentes couleurs (A en vert, T en rouge, C en noir et le G en bleu) correspondant à chacune des bases de la séquence analysée (figure 28).



Figure 28 : Interface du logiciel SeqScape.

Une deuxième analyse de séquence est réalisée par le logiciel GeneScan® (Applied Biosystem). Il permet à la fois d'aligner les profils de pics des échantillons entre eux par le marqueur de taille GeneScan- 350 Rox et aussi de déterminer la surface relative de chaque pic. La migration des pics de chaque électrophorégramme est tout d'abord normalisée en utilisant le standard interne GeneScan- 350 Rox (Applied Biosystem) qui co-migre avec chaque échantillon. La surface totale des profils est normalisée de sorte que l'abondance relative de chaque pic puisse être comparée entre les profils (figure 29).



Figure 29 : Interface du logiciel Genescan.

http://projects.nfstc.org/pdi/Subject06/images/pdi_s06_m01_02.1.jpg

Chapitre IV

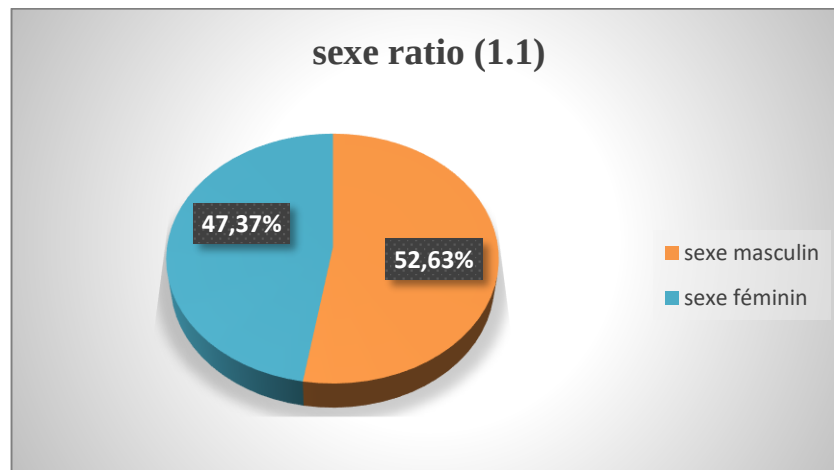
Résultats et discussion



I. Résultats

1. Description de la population d'étude

Dans cette étude, 19 cas index (avec différentes présentations cliniques, voir tableau VI) ont été rapportées, dix sujets de sexe masculin avec un pourcentage de 52,63% et neuf sujets de sexe féminin avec un pourcentage de 47,37% soit un sexe ratio (M/F) = 1,1.



L'âge moyen des patients était de 11 ans tandis que l'âge moyen d'apparition des premiers symptômes de la maladie était de 16,5 mois avec des extrêmes allant de 2 mois jusqu'à 36 mois.

La consanguinité était retrouvée dans 94,73% des familles, elle était du 1^{er} degré chez 88,89% de ces cas et du 2^{ème} degré dans un seul cas. La photophobie et la photosensibilité cutanée étaient des signes constants chez tous nos malades XP. De plus, tous les malades avaient une atteinte cutanée faite d'un état poikilodermie-like ou des ulcérations cutanées.

Le cancer de la peau a été décrit dans 73,68% des patients et le cancer oculaire a été rapporté chez 63,15%. Le siège de ces tumeurs était facial dans 100% des cas. Les symptômes neurologiques ont été observés chez 2 cas (XP03, XP05), outre les données sont indiquées dans le tableau VI.

La photoprotection topique et vestimentaire a été recommandée dans tous les cas et assurée par l'association « *des enfants de la lune* ». Le seul traitement préconisé pour les tumeurs était chirurgical et il consistait à l'exérèse complète de la masse tumorale avec marge de sécurité, soit au service de dermatologie, d'ophtalmologie ou d'ORL.


Tableau VI : Caractéristiques cliniques des dix-neuf cas index atteints de XP.

Patient (code)	Région d'origine	Sexe	Age (ans)	Age d'apparition des premiers signes (mois)	Consanguinité	Symptômes cliniques			
						Photophobie	Lésions cutanées	cancers	Troubles neurologiques
XP01	Nord-Ouest	H	17	12	1 ^{er} D	+	+	++	-
XP02	Nord-Ouest	F	12	7	1 ^{er} D	+	+	+++	-
XP03	Nord-Ouest	F	7	2	1 ^{er} D	+	+	-	+
XP04	Nord-Ouest	F	15	12	1 ^{er} D	+	+	+	-
XP05	Nord-Ouest	H	8	3	1 ^{er} D	+	+	+	+
XP06	Nord-Ouest	H	11	24	2 ^{�me} D	+	+	++	-
XP07	Nord-Ouest	H	15	12	1 ^{er} D	+	+	+++	-
XP08	Nord-Ouest	F	10	36	1 ^{er} D	+	+	+	-
XP09	Nord-Ouest	H	14	8	1 ^{er} D	+	+	+++	-
XP10	Nord-Ouest	F	13	36	1 ^{er} D	+	+	+++	-
XP11	Nord-Ouest	H	23	12	1 ^{er} D	+	+	+++	-
XP12	Ouest	H	4	24	1 ^{er} D	+	+	-	-
XP13	Nord-Ouest	H	10	12	1 ^{er} D	+	+	-	-
XP14	Nord-Ouest	F	4	12	1 ^{er} D	+	+	+	-
XP15	Nord-Ouest	F	6	18	1 ^{er} D	+	+	++	-
XP16	Nord-Ouest	H	15	36	1 ^{er} D	+	+	+++	-
XP17	Ouest	H	25	12	A.C	+	+	+++	-
XP18	Sud-Ouest	F	6	24	1 ^{er} D	+	+	-	-
XP19	Ouest	F	6	11	2 ^{�me} D	+	+	-	-

H : homme , F: femme.

1^{er} : premier degré de consanguinité, 2^{ me} : second degré de consanguinité et A.C : absence de consanguinité.

- : Absence de symptômes cliniques, + : présence de symptômes cliniques.

2. Résultats de l'amplification

Les résultats de différentes amplifications des régions d'intérêt des deux gènes ont révélé après électrophorèse sur gel d'agarose la présence des bandes correspondant aux tailles attendues (figure 30).

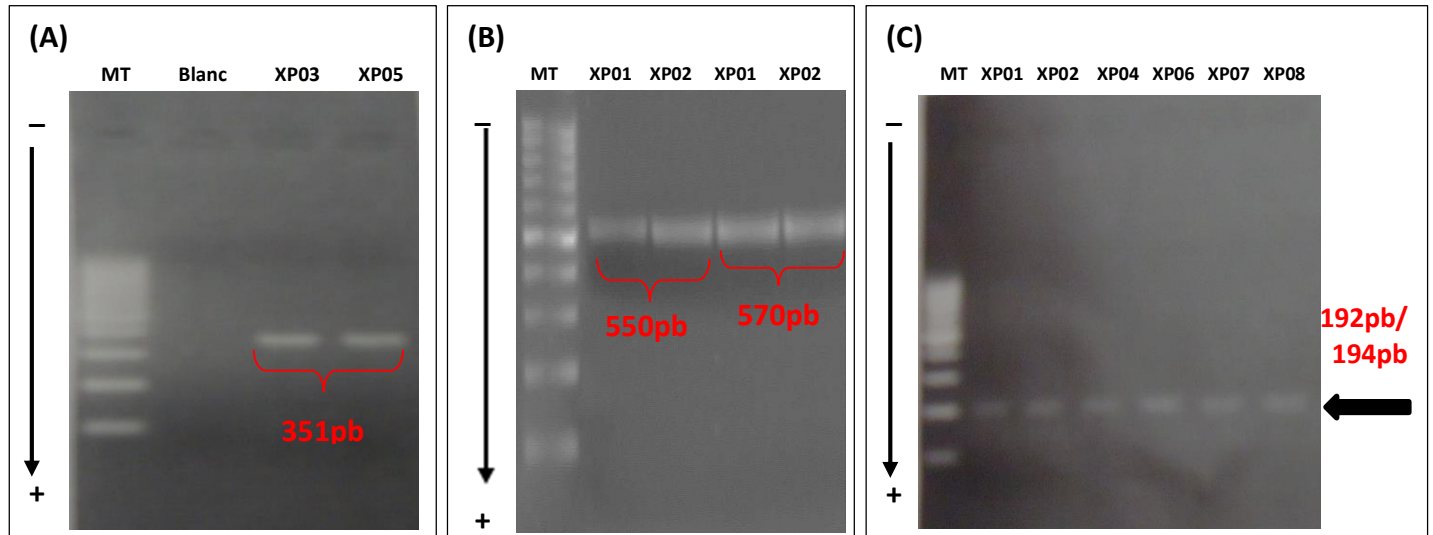


Figure 30 : Tests d'amplification obtenus pour quelques échantillons.

(A) : Test d'amplification de l'exon 6 du gène *XPA*. (B) : Test d'amplification de l'exon 9 du gène *XPC* avec deux couples d'amorces. (C) : Test d'amplification de l'exon 9 du gène *XPC* avec un seul couple d'amorces. (MT : Marqueur de taille de 100pb ; XP01, XP02... XP08 : Sujets atteints de XP).

3. Résultat de la digestion enzymatique

La figure montre le profil électrophorétique de produits de PCR obtenu après digestion par l'enzyme de restriction *HphI*. Le résultat de cette digestion a révélé la présence des bandes correspondant aux tailles attendues (figure 31). Cependant, la bande de taille 31pb a migré rapidement à travers le gel et elle a disparu.

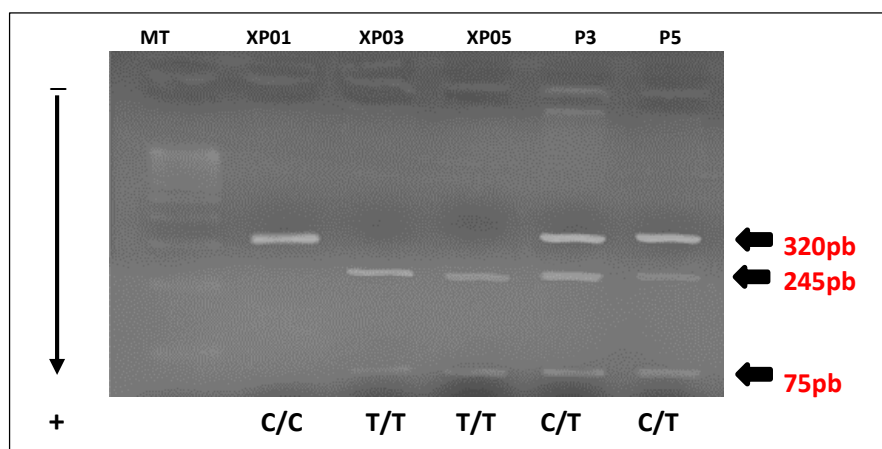


Figure 31 : Profil électrophorétique de restriction (RFLP) obtenus à partir des produits d'amplification de la région d'intérêt du gène *XPA*. (MT : Marqueur de taille de 100pb ; XP01, XP03 et XP05 : sujets atteints de XP ; P3, P5 : Parents des sujets XP).



4. Résultats de l'analyse des mutations par le logiciel SeqScape

Le résultat de l'analyse de séquence par le logiciel SeqScape est donné dans la figure 32. L'analyse est représentée sous forme de pics de différentes couleurs correspondant chacun à une base azotée.

La figure (32. a) représente la séquence correspondante à une région dans le neuvième exon du gène *XPC* encadrant la mutation « c.1643_1644delTG ». La séquence d'acides aminés (NP.004679.3) (code d'une seule lettre) est donnée ci-dessous de la séquence de référence (NM_004628.4) surlignée en vert. L'alignement des séquences obtenu par ce logiciel nous a permis de distinguer trois génotypes possibles. Les électrophorégrammes des trois génotypes sont définis dans la figure 32 par : (b) homozygote pour l'allèle normal « individu sain » ; (c) homozygote pour l'allèle muté « cas XP » ; (d) hétérozygote « parent de patient XP ».

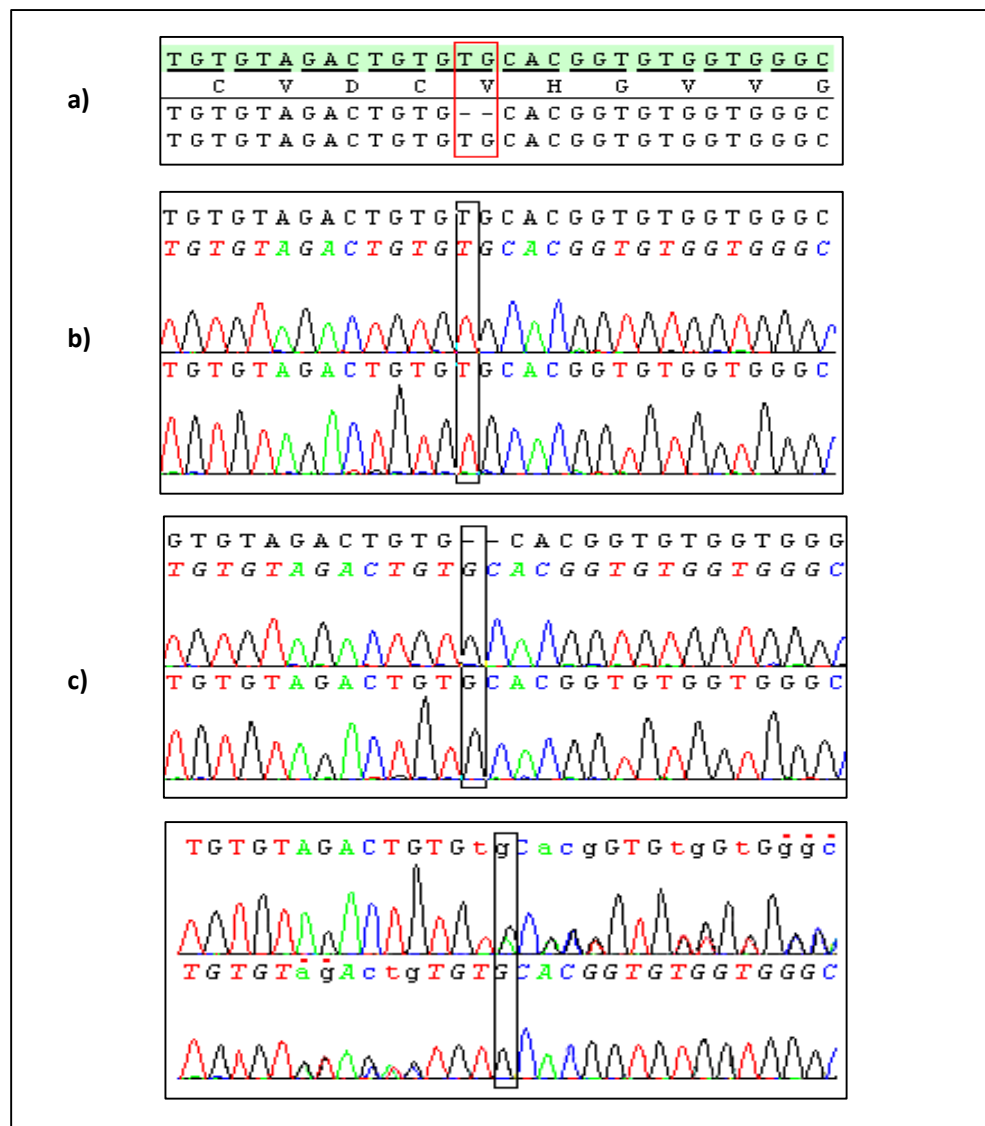


Figure 32 : Exemple de résultat de l'analyse de la mutation c.1643_1644delTG par le logiciel SeqScape.



5. Résultats de l'analyse des mutations par le logiciel GeneScan

Le résultat de l'analyse de séquence par le logiciel GeneScan est représenté dans la figure 33. L'analyse des fragments est donnée sous forme de pics de couleur bleue par la présence du fluorochrome « 6-FAM ». Sur l'électrophorégramme, chaque produit PCR est représenté en fonction de sa taille en pb (axe des abscisses) et de son intensité de fluorescence en unité arbitraire (axe des ordonnées).

Les électrophorégrammes obtenus par ce logiciel ont révélé trois génotypes possibles pour la mutation c.1643_1644delTG : (a) homozygote normal « individu sain », (b) homozygote muté « patient XP » et hétérozygote « parent de patient XP (c) (figure 33).

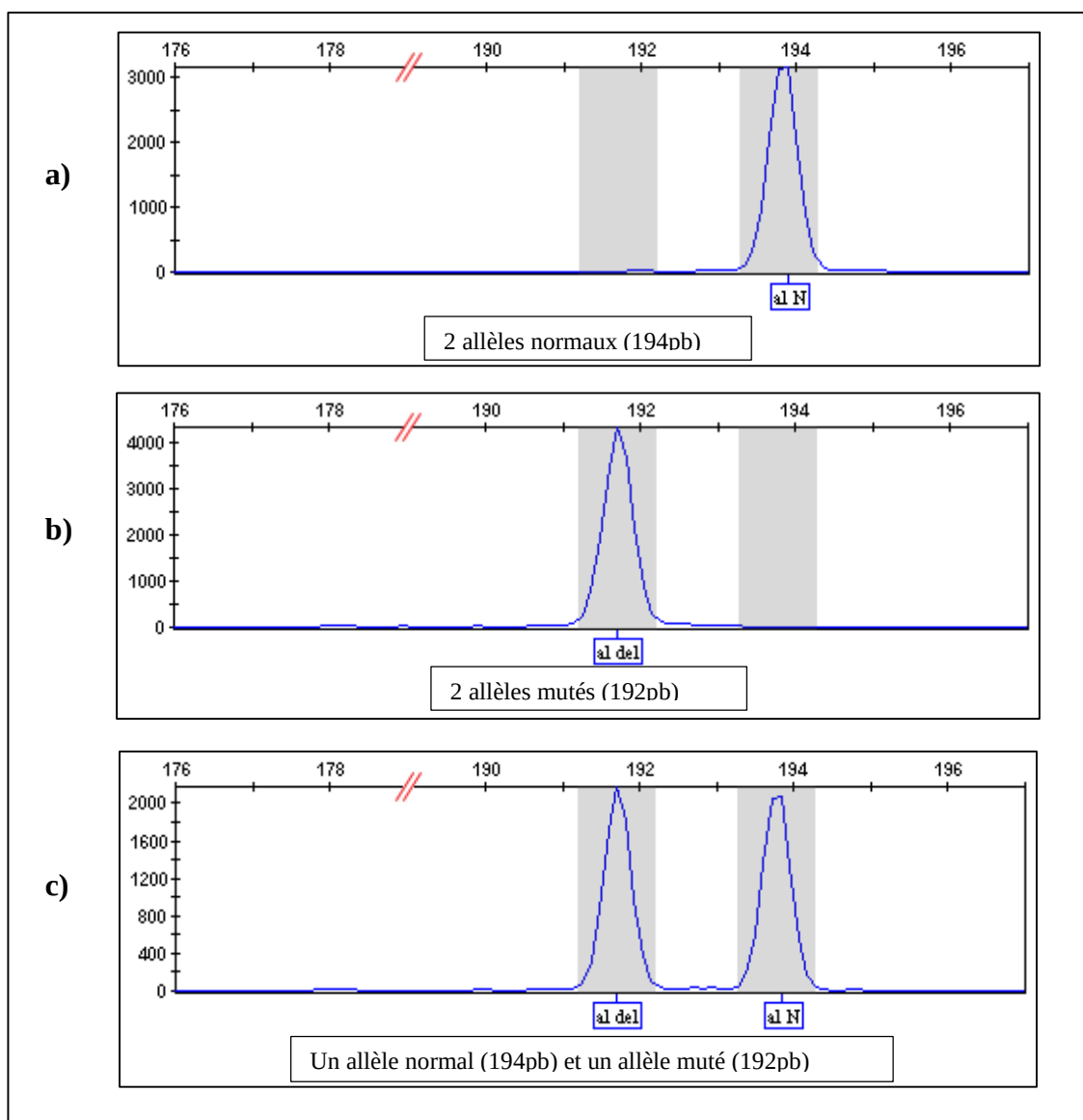


Figure 33 : Exemple de résultat de l'analyse de la mutation c.1643_1644delTG par le logiciel GeneScan.



6. Impact de la mutation c.682C>T du gène XPA

Les résultats de l'analyse par PCR-RFLP ont montré que les deux patients (XP03 et XP05) portaient la mutation R228X à l'état homozygote, et leurs parents étaient hétérozygotes pour cette mutation.

Cette mutation correspond à une transition C à T, conduisant à une substitution d'une arginine (CGA) en codon stop à la position 228 (figure 34), il en résulte une protéine tronquée de 227 acides aminés (Lehmann et al, 2015).

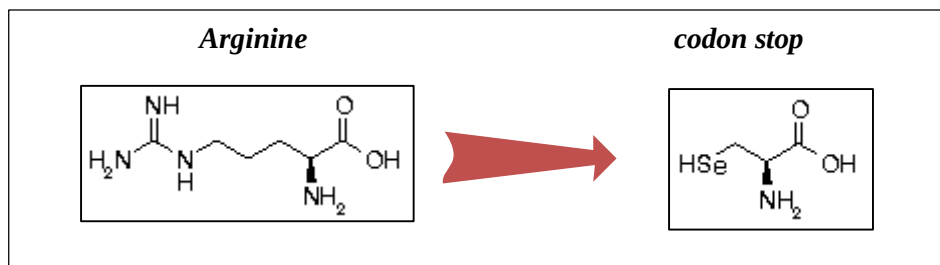


Figure 34 : Structure de l'arginine et du codon stop (UGA).

<http://www.sipp.org/reference/sipp6/DNA/>

L'arrêt prématuré de la traduction dans l'exon 6 provoque la perte majoritaire de l'extrémité carboxy-terminale (226-276) de la protéine XPA indispensable pour l'interaction avec le facteur de transcription TFIIH (figure 35). L'absence de cette interaction XPA-TFIIH, essentielle pour la réaction d'excision, explique la défaillance du système de réparation d'ADN (Messaoud et al, 2010; Messaoud et al, 2012).

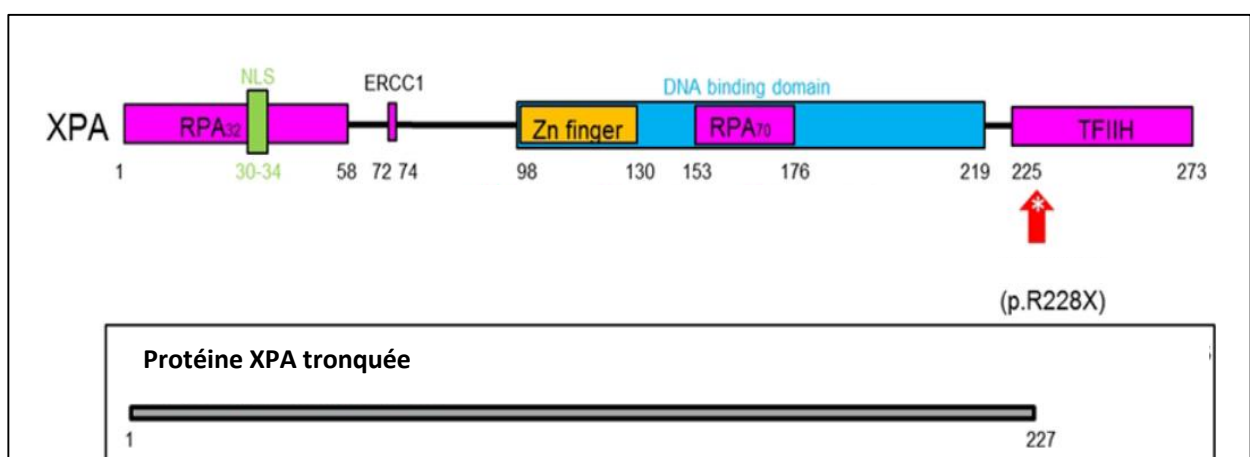


Figure 35 : Impact de la mutation R228X chez les patients XP-A, modifiée à partir de l'illustration de (Lehmann et al, 2015). La position de la mutation R228X est donnée par une flèche rouge.



7. Impact de la mutation c.1643_1644delTG du gène XPC

Les résultats de l'analyse des séquences ont montré que les 17 cas analysés pour la mutation (p.Val548AlafsX25) étaient homozygotes pour la délétion de 2pb. Cette délétion était observée à l'état hétérozygote chez les parents. Une confirmation de ces résultats par une étude de leurs frères et sœurs a également montré qu'ils étaient homozygotes pour la même mutation.

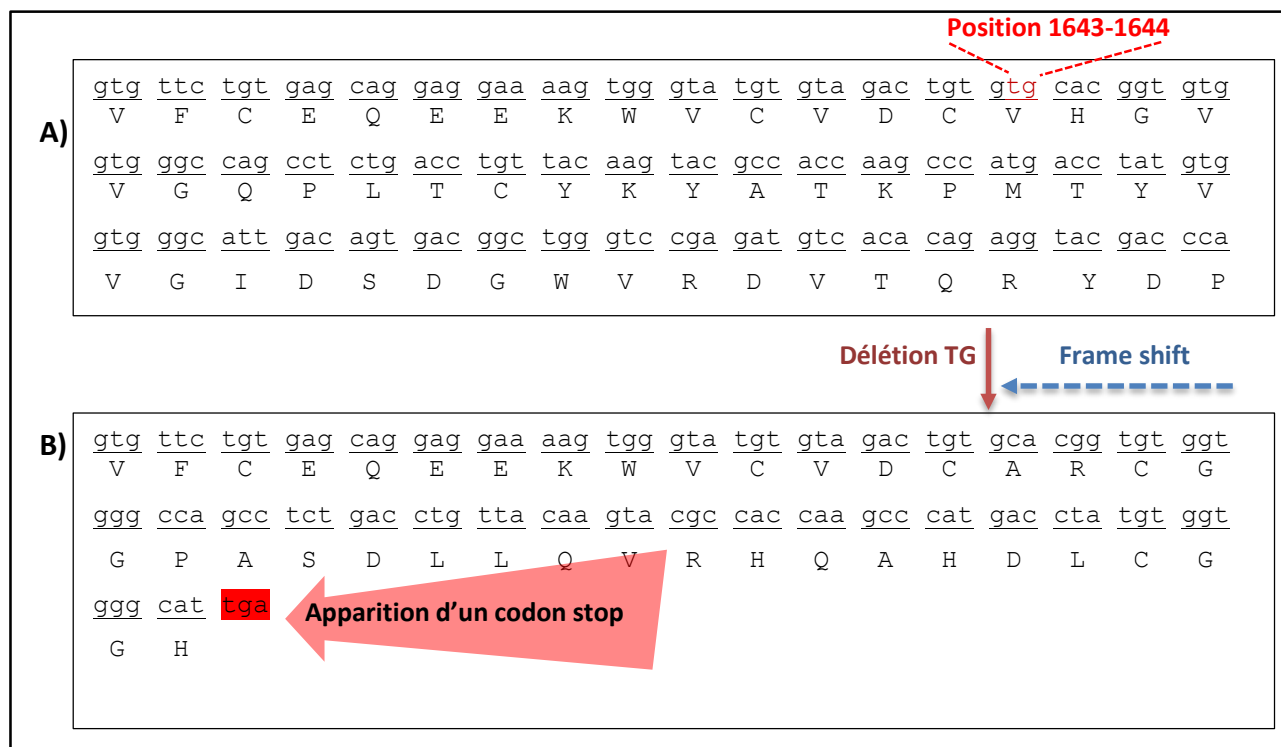


Figure 36 : Séquence d'ADN provenant de l'exon 09 du gène XPC. **A** : une partie de l'exon 9 du gène XPC non délété, la position 1643-1644 est donnée en couleur rouge. **B** : une partie de l'exon 9 du gène XPC présentant une délétion de 2pb en position 1643-1644, et le codon stop, généré après 25 résidus, est en box rouge.

La délétion de 2pb au niveau du codon de la valine en position 548, provoque un décalage du cadre de lecture responsable de l'apparition d'un codon stop prématuré (25 résidus en aval), conduisant ainsi à une protéine XPC tronquée non fonctionnelle (figure 36). En effet, les capacités d'interaction entre cette protéine XPC et les molécules d'ADN, hH23B, CETN2 et TFIIH, qui sont nécessaires pour la réparation des dommages d'ADN, sont altérées (figure 37).

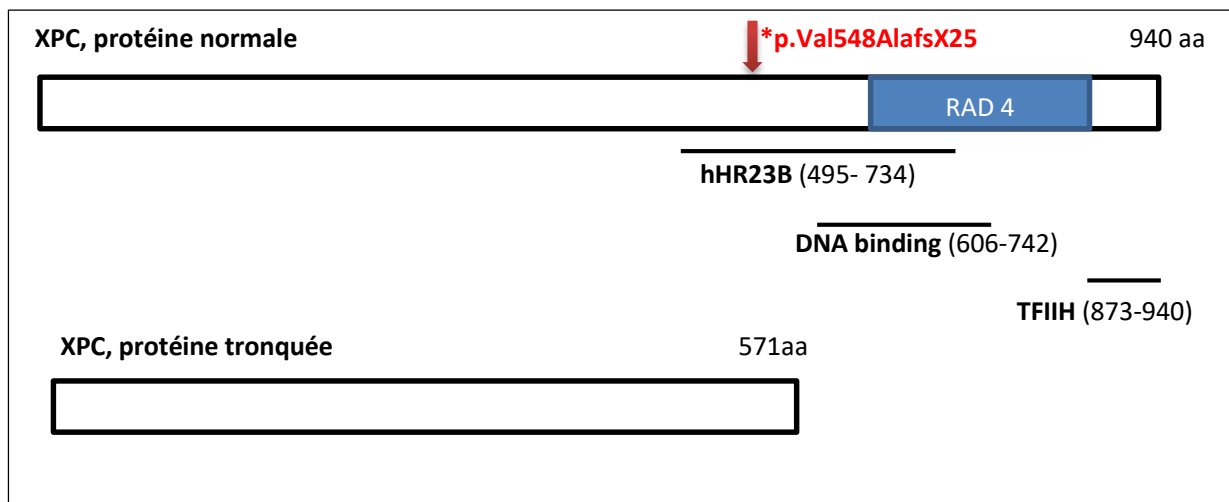


Figure 37 : Impact de la mutation c.1643_1644delTG chez les patients XP-C. La position de la délétion est indiquée par un astérisque en couleur rouge.

L'ensemble des résultats de l'étude des deux mutations des gènes *XPA* et *XPC* a fait l'objet d'un article original intitulé : « **Diagnosis of Xeroderma Pigmentosum groups A and C by detection of two prevalent mutations in West Algerian population : A rapid genotyping tool of the frequent mutation c.1643_1644delTG XPC** ». Cet article est publié dans la revue *Biomed Research International*, 2016.



Hindawi Publishing Corporation
BioMed Research International
Volume 2016, Article ID 2180946, 7 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2016/2180946>



Research Article

Diagnosis of Xeroderma Pigmentosum Groups A and C by Detection of Two Prevalent Mutations in West Algerian Population: A Rapid Genotyping Tool for the Frequent XPC Mutation c.1643_1644delTG

Salima Bensenouci,¹ Lotfi Louhibi,¹ Hubert De Verneuil,^{2,3} Khadidja Mahmoudi,⁴ and Nadhira Saidi-Mehtar¹

¹Laboratoire de Génétique Moléculaire et Cellulaire, Département de Génétique Moléculaire Appliquée, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université des Sciences et de la Technologie d'Oran-Mohamed Boudiaf (USTO-MB), BP 1505, El M'naouer, 31000 Oran, Algeria

²INSERM U1035, Biothérapies des Maladies Génétiques et Cancers, Université de Bordeaux, 146 rue Léo Saignat, 33000 Bordeaux Cedex, France

³Service de Biochimie, Pôle de Biologie et Pathologie, Hôpital Pellegrin, Place Amélie Raba-Léon, 33000 Bordeaux Cedex, France

⁴Service d'Ophthalmologie, Hôpital Pédiatrique de Canastel, rue du 1er Novembre, Bir El Djir, 31130 Oran, Algeria

Correspondence should be addressed to Salima Bensenouci; salima.bensenouci@gmail.com

Received 4 September 2015; Revised 13 November 2015; Accepted 28 January 2016

Academic Editor: Paul W. Doetsch

Copyright    2016 Salima Bensenouci et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Xeroderma pigmentosum (XP) is a rare autosomal recessive disorder. Considering that XP patients have a defect of the nucleotide excision repair (NER) pathway which enables them to repair DNA damage caused by UV light, they have an increased risk of developing skin and eyes cancers. In the present study, we investigated the involvement of the prevalent *XPA* and *XPC* genes mutations—nonsense mutation (c.682C>T, p.Arg228X) and a two-base-pair (2 bp) deletion (c.1643_1644delTG or p.Val548Ala fsX25), respectively—in 19 index cases from 19 unrelated families in the West of Algeria. For the genetic diagnosis of *XPA* gene, we proceeded to PCR-RFLP. For the *XPC* gene, we validated a routine analysis which includes a specific amplification of a short region surrounding the 2 bp deletion using a fluorescent primer and fragment sizing (GeneScan size) on a sequencing gel. Among the 19 index cases, there were 17 homozygous patients for the 2 bp deletion in the *XPC* gene and 2 homozygous patients carrying the nonsense *XPA* mutation. Finally, *XPC* appears to be the major disease-causing gene concerning *xeroderma pigmentosum* in North Africa. The use of fragment sizing is the simplest method to analyze this 2 bp deletion for the DNA samples coming from countries where the mutation c.1643_1644delTG of *XPC* gene is prevalent.

1. Introduction

Xeroderma pigmentosum (XP, OMIM 278700–278780) is a rare inherited autosomal recessive disorder characterized by an inability to repair DNA damage caused by ultraviolet (UV) light [1, 2] which induces skin cancers [3, 4] and other skin manifestations including poikiloderma, skin atrophy, telangiectasia, actinic keratoses, angiomas, and keratoacanthomas. XP patients may also have ocular manifestations, like

photophobia, conjunctivitis, keratitis, ectropion, and entropion [5]. Neurologic symptoms such as mental deterioration, sensorineural deafness, hyporeflexia, and ataxia are found in severe forms of the disease [1, 6]. XP affects both sexes equally [7] with an incidence of 1/1 000 000 births in the USA and Europe [8], 1/20 000–100 000 in Japan [9, 10], and 1/10 000–30 000 in North Africa [11–14].

XP is found in all races worldwide and caused by defect in seven complementation groups (XP-A to XP-G) involved



in NER system [15]. Four complementation groups (XP-A, XP-B, XP-D, and XP-G) exhibit neurological manifestations [16]. XP-C, XP-E, and XP-F patients rarely develop neurological disorders [17, 18]. Two different mechanisms of DNA repair can be distinguished: the Global Genome Repair (GGR) recognizes and removes lesions throughout the entire genome [19] while the Transcription-Coupled Repair (TCR) is specific to DNA damage occurring at transcribed strands of active genes [20]. Twenty per cent of XP patients present a normal NER system (XP-V) but a defective DNA polymerase η gene (POLH) [21]. XP-C and XP-A are the most prevalent groups in North Africa and Southern Europe [22, 23].

Xeroderma pigmentosum complementation group C (MIM ID #278720) is caused by mutations in the *XPC* gene (MIMID* 613208) and the most frequent mutation is a 2 bp deletion (c.1643_1644delTG, p.Val548AlafsX25) [13]. This gene is located on chromosome 3 (3p25) and contains 16 exons encoding for *xeroderma pigmentosum* group C (XPC) protein (GenBank accession number AC090645). This protein recognizes the damaged bases at the beginning of GGR pathway and it binds to HR23B to form the stable XPC-HR23B complex [24], which leads to the recruitment of TFIIH involved in the subsequent unwinding of the DNA double helix in concert with the proteins XPG, XPA, and replication protein A (RPA) [25].

Xeroderma pigmentosum complementation group A (MIM ID #278700) is caused by mutations in the *XPA* gene (MIMID* 611153) and the most frequent mutation is a nonsense mutation (c.682C>T, p.Arg228X) [26]. This gene is located on chromosome nine (9q34.1) [27] and consists of 6 exons that encodes for a 273-amino-acid Zn²⁺-finger protein [28]. The XPA protein plays a crucial role in both GGR and TCR pathways. The complex XPA-RPA provides the verification of the lesion and the binding to the single stranded DNA, so that the NER factors stay positioned around the lesion [29].

In the present study, we aimed to screen and detect for the first time the most common mutations in *XPA* and *XPC* genes presented in unrelated XP patients from the West of Algeria with clinical features of XP. Knowledge of these mutations is important for genetic counseling. Here, we used a new useful tool for rapid genotyping of the prevalent mutation of *XPC* gene.

2. Materials and Methods

2.1. Subjects. In this study, we collected 58 DNA samples from 19 unrelated XP families originated from Western Algeria. Among them, there were 19 index cases, 31 parents, and 8 siblings suffering from XP. Recruitment of patients with clinical diagnoses of XP disorder was provided at the Ophthalmology Department, Children's Hospital of Canastel, Oran (Algeria).

2.2. Methods. Informed signed consent for genetic investigation was obtained from all patients or from their parents in case of minors. Families were interviewed using a

structured questionnaire to collect information about family history, consanguinity, affected members, and associated diseases. The clinical data of XP patients are summarized in Table 1.

2.2.1. DNA Extraction. DNA was isolated from peripheral blood leukocyte using STRATAGENE kit reagents (Agilent Technologies Division) according to the manufacturer's instructions at the Laboratory of Molecular and Cellular Genetics.

2.2.2. XPA Genotyping. To detect the previously reported nonsense mutation in exon 6 of the *XPA* gene (p.Arg228X), we used the following primers for the PCR reaction: forward primer 5'-TAC ATG GCT GAA AGC TTG AT-3' and reverse primer 5'-GGG TTT CAT TCA TCT ATG-3'. The fragments were amplified by PCR in a volume of 50 μ L containing 50 ng of DNA, 1x PCR buffer, 0.2 mM of each dNTP, 2.5 mM MgCl₂, 10 pmol of each one of the primers, and 1U of Taq polymerase. PCR was performed using a Primus thermal cycler and the program included 95°C for 10 min, 35 cycles of 95°C for 30 s, 52°C for 30 s, and 72°C for 30 s. The cycles were followed by a final step of 72°C for 5 min. The PCR products were then subjected to RFLP analysis. Digestion of the PCR products was carried out according to the manufacturer's instructions. 5 μ L of the PCR products was digested overnight with 5U of HphI at 37°C. The digestion products were separated on 2% agarose gel. The restriction enzyme HphI (New England Biolabs, USA) was used to distinguish the R228X mutation in which the gain of an HphI restriction site occurs in the mutant allele. The wild-type (C) has two bands (320 bp and 31 bp fragments); however, the mutant allele (T) has three bands (245 bp, 75 bp, and 31 bp fragments).

2.2.3. XPC Genotyping. Specific amplification of the short region surrounding the deletion of two bases in exon 9 of the *XPC* gene was provided by two primers: a fluorescent forward primer 5'-(6FAM)GCATAGCTGGTATAGACCAG-3' and a reverse primer 5'-gttcttTCGTACCTCTGTGTGACATC-3', which generates a fragment of 194 bp (normal allele) or 192 bp (deleted allele). PCR was performed in Primus thermal cycler using a final volume of 50 μ L containing 100 ng of DNA, 1x PCR buffer, 0.2 mM dNTPs, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 μ M of each one of the primers, and 1.25 U of Taq polymerase. PCR was performed as follows: 95°C for 10 min, 25 cycles of 94°C for 30 s, 30 s at 60°C, 30 s at 72°C, and a final step at 72°C for 5 min. The PCR products were checked on a 2% agarose gel. A step of purification and dilution was ensured for the PCR product with the addition of 90% formamide and 350 Rox marker in the loading dye. The fluorescent PCR products were separated on an automatic sequencer (ABI 3500, Applied Biosciences). Allele calling by fragment size analysis was performed with the aid of GeneScan software (Applied Biosciences). We also amplified the same exon 9 of *XPC* with different primers and sequencing products were analyzed by SeqScape software (Applied Biosciences).



TABLE 1: Clinical features of the nineteen patients with *xeroderma pigmentosum*.

Patient (code)	Region of origin in Algeria	Sex	Age	Age of onset (months)	Consanguinity	Clinical symptoms			
						Photophobia	Skin lesions	Tumors	Neurological abnormalities
XP01	Northwest	M	17	12	1stD	+	+	++	–
XP02	Northwest	F	12	7	1stD	+	+	+++	–
XP03	Northwest	F	7	2	1stD	+	+	–	+
XP04	Northwest	F	15	12	1stD	+	+	+	–
XP05	Northwest	M	8	3	1stD	+	+	+	+
XP06	Northwest	M	11	24	2ndD	+	+	++	–
XP07	Northwest	M	15	12	1stD	+	+	+++	–
XP08	Northwest	F	10	36	1stD	+	+	+	–
XP09	Northwest	M	14	8	1stD	+	+	+++	–
XP10	Northwest	F	13	36	1stD	+	+	+++	–
XP11	Northwest	M	23	12	1stD	+	+	+++	–
XP12	Middle West	M	4	24	1stD	+	+	–	–
XP13	Northwest	M	10	12	1stD	+	+	–	–
XP14	Northwest	F	4	12	1stD	+	+	+	–
XP15	Northwest	F	6	18	1stD	+	+	++	–
XP16	Northwest	M	15	36	1stD	+	+	+++	–
XP17	Middle West	M	25	12	AC	+	+	+++	–
XP18	Southwest	F	6	24	1stD	+	+	–	–
XP19	Middle West	F	6	11	2ndD	+	+	–	–

1stD: consanguinity first degree; 2ndD: consanguinity second degree; AC: absence of consanguinity.
 –: absence of clinical symptoms; +: presence of clinical symptoms.

3. Results

3.1. Clinical Findings. All investigated patients presented photophobia, skin photosensitivity, poikiloderma, and xeroderma with a mean age of 11 years. We registered consanguinity in 94.73% (18/19) of families. Among them, 88.89% were of the first degree and 11.11% of the second degree. XP symptoms had begun at a mean age of 16.5 months (range 2–36 months). Skin cancer was described in 73.68% of patients and ocular cancer was reported in 63.15%. Sex ratio (M/F) was 1.1, with different clinical presentations. Neurological symptoms were observed in 2 out of 19 patients. Besides data indicated in Table 1, we had also registered familial medical history, height, weight, and different common parameters.

3.2. Genotyping of XP-A Patients by PCR-RFLP and DNA Visualization by Gel Electrophoresis. Two XP patients (XP03 and XP05; see Table 1) who presented a clinical diagnosis of XP-A (association of different symptoms including neurological ones) were genotyped for the prevalent mutation *XPA* (p.Arg228X) in Pellegrin Hospital (Bordeaux). To detect the nonsense mutation in exon 6 of the *XPA* gene, we examined the HphI RFLP in the amplified exon 6 DNA fragments (351 bp). The C-to-T transition in exon 6 leads to a conversion of an arginine residue (CGA codon) to a stop codon (TGA) at amino acid 228. DNA from normal subjects who have a normal *XPA* allele gives a profile of two bands (320 bp and 31 bp fragments). In contrast, DNA from a XP patient with the

homozygous mutation in exon 6 gives a profile of three bands (245 bp, 75 bp, and 31 bp fragments) caused by the creation of a new cleavage site for HphI in the 320 bp fragment by the nonsense mutation. After loading on 2% agarose gel, we found that both patients checked for the R228X mutation presented a profile homozygous for the mutant allele (T/T). Their parents were heterozygous carriers (C/T) with a profile of four bands (320 bp, 245 bp, 75 bp, and 31 bp fragments), confirming that these two patients are homozygous for the nonsense mutation at codon 228 and belong to the XP-A subclass.

3.3. Genotyping of XP-C Patients by Fragment Size and Sequence Analyses. Seventeen XP patients without neurological troubles (and their parents) were genotyped for the prevalent *XPC* mutation (c.1643_1644delTG, p.Val548AlafsX25) in Pellegrin Hospital. The GeneScan analysis performed for all samples tested showed three possible genotypes: wild-type (194 bp), heterozygous (192 and 194 bp), and homozygous (192 bp) for the deletion (Figure 1). All 17 index cases were homozygous for the 2 bp deletion. This deletion is responsible for a frame shift causing the occurrence of a premature stop codon 25 residues downstream; then we checked for the same mutation on their siblings and found that they were also homozygous for the 2 bp deletion. These results were confirmed by amplification of the fragment and sequencing: the presence of the deletion was identified by the SeqScape software (Applied Biosciences) (Figures 2 and 3).

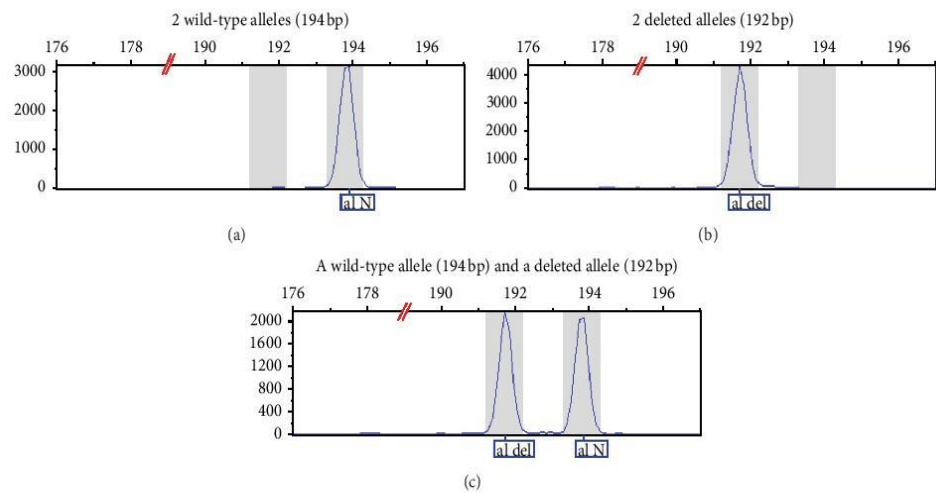


FIGURE 1: Characterization of the 2 bp deletion in exon 9 of the *XPC* gene. Fragment sizing analysis from electropherograms (GeneScan software) showed three possible profiles for the c.1643_1644delTG mutation: wild-type (a); homozygous deleted (b); heterozygous (c) profile.

T	G	T	G	T	A	G	A	C	T	G	T	G	C	A	C	G	G	T	G	T	G	G	G	C	
C				V		D		C		V		H				G		V		V		G			
T	G	T	G	T	A	G	A	C	T	G	T	G	-	-	C	A	C	G	G	T	G	T	G	G	C
T	G	T	G	T	A	G	A	C	T	G	T	G	T	G	C	A	C	G	G	T	G	T	G	G	C

FIGURE 2: The corresponding sequence in the ninth exon of the *XPC* gene. The deduced amino acid sequence (NP_004619.3) in single letter code is shown below the reference sequence (NM_004628.4, highlighted in green). The 2 bp deletion is determined by a red rectangle.

4. Discussion

We report here a DNA analysis for 19 unrelated XP families. Our study focused on two frequent mutations, the frame shift mutation (c.1643_1644delTG, p.Val548AlafsX25), located in exon 9 of the *XPC* gene, and the nonsense mutation (c.682C>T) in exon 6 of the *XPA* gene, both already described. *XPA* mutations were present in 2 of 19 (10.5%) patients with the same nonsense mutation, c.682C>T (p.Arg228X), and *XPC* mutations were identified in 17 of 19 (89.5%) with the common *XPC* mutation, c.1643_1644delTG, present at the homozygous state in all XP-C patients. Obviously, there is a correlation between the phenotype and genotype, which highlights the importance of the precocious diagnosis in these patients and an early full protection against sun-exposure to allow them to have almost a normal life. The analysis of both parents (13 cases/19) or one parent (5 cases/19) showed that they were heterozygous carriers for the same mutation. In addition, the eight siblings suffering from XP were all homozygous for the frame shift mutation.

Molecular investigation of Soufir et al. [22] on 66 unrelated families from the Maghreb region showed that 85% of patients had mutations in the *XPC* gene; among them 87% shared the founder mutation (c.1643_1644delTG). 12% of XP

patients had mutations in the *XPA* gene with a frequency of the mutation (c.682C>T) about 87.5%.

The *XPA* protein plays a central role in the first steps of NER and contains specific binding sites for other NER proteins such as DNA damage-binding protein 2 (DDB2) and RPA [30]. Hence, the severity of clinical manifestations decreases while the mutation moves from the N terminal to the C terminal of the protein, with the exception of the cases where splice site mutations permit the synthesis of small amount of normal protein [31]. Since the nonsense mutation is located on the sixth, N-terminal exon, we can speculate that most of the mRNA of the *XPA* gene would be produced, and it does not affect the major function of the *XPA* gene [32]. Of interest, the c.682C>T mutation occurs outside of the important domains such as the DNA-binding domain (exons 2–5, residues 98–219) and the zinc-finger motif (residues 105–129), but the *XPA*-TFIIH interaction region (residues 226–273 aa) essential for the excision reaction is lost, which explains the defective DNA repair system [26, 33, 34]. Therefore, the moderate phenotype of Tunisian XP-A patients may be explained by a residual DNA-binding activity of mutant *XPA* protein in comparison with the Japanese XP-A patients who had a splicing mutation at intron 3 at the homozygous state [26, 32]. A recent study of Tunisian XP-A patients showed

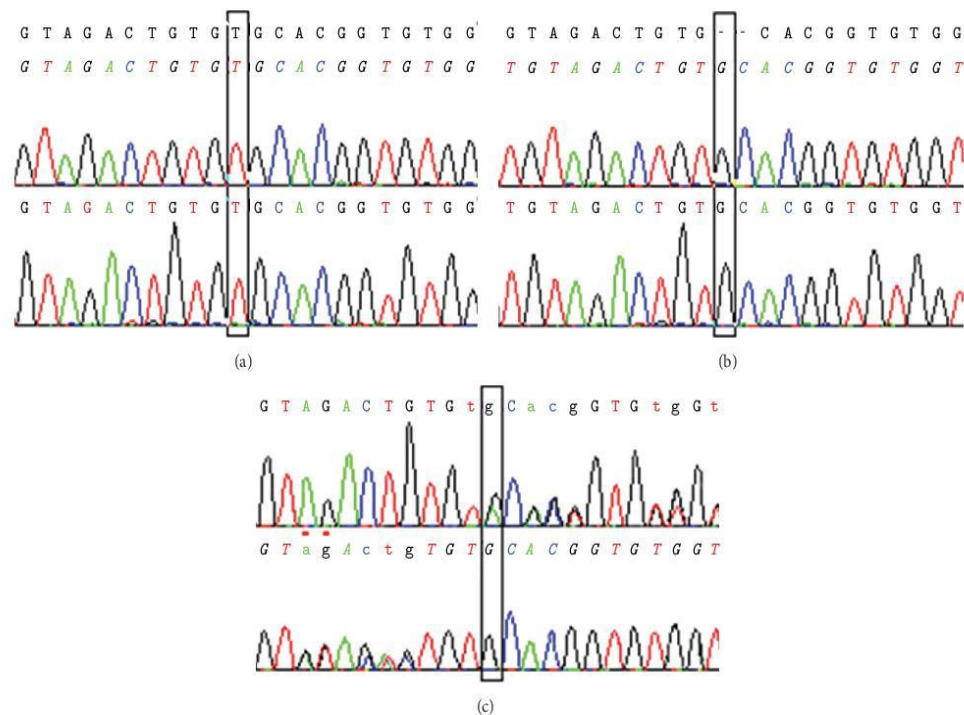


FIGURE 3: Sequence analysis of genomic DNA confirming the 2 bp deletion in the *XPC* gene. The alignment of sequences was obtained with the SeqScape software. The black rectangle indicates the position of the 2 bp deletion. Electropherograms show the three profiles: wild-type (a); homozygous deleted (b); heterozygous (c). For the c profile, because of the presence of both alleles, the two sequences (wild-type and deleted) were superimposed after the deletion.

the presence of a recurrent mutation R228X with a founder effect by haplotype analysis [26]. The R228X mutation was described in North Africa patients [22, 26, 32, 35].

The deficient XP-C human cells lead to a reduction of the cisplatin repair and increased mutagenesis [36]. This protein is a major factor in damage recognition to initiate global genome NER. The presence of the common 2 bp deletion leads to a premature termination codon and absence of normal XPC protein [37]. Indeed, it affects interaction capacities between XPC protein, HR23B, CETN2 (centrin-2 protein), and TFIIH molecules, which are necessary for DNA damage recognition [22]. The DNA repair ability was found to be only 20% of proficient normal cells with the presence of this previous mutation [38]. This same mutation was described by Ben Rekaya et al. [39] in 100% of 14 XP-C families from different regions of Tunisia and also in two other African patients with XP [40]. Interestingly, Mahindra et al. [41] also described the *XPC* mutation in two brother patients from North Sudan. Furthermore, the molecular analysis of 24 Moroccan patients showed that 17 were homozygous for the c.1643_1644delTG mutation [42]. Most XP-C African patients with delTG mutation in both alleles have similar clinical features consisting of photosensitivity, pigmentary lesions, and early onset of skin cancer without neurological

involvement as our XP-C patients [22, 39, 41]. However, two patients were reported to be homozygous for the delTG but with neurological involvement [22].

Many studies showed that the mutation c.1643_1644delTG was spread in North Africa such as in Egypt, Italy, and Spain, which attracted the eyes of the researchers to the possibility of having the same ancestor. Soufir et al. proved the presence of a founder effect in the Mediterranean region using mathematical tools based on microsatellites haplotyping. They also showed that this common ancestor mutation was carried about 1250 years ago corresponding to 50 generations and approximately when Muslims from Arabia invaded Europe.

5. Conclusion

The high frequency of the founder mutation in XP patients from North Africa simplified the molecular diagnosis. In Algeria, the molecular investigation of XP confirmed that *XPC* and *XPA* genes were the most frequent with the mutations *XPC*-p.Val548AlafsX25 and *XPA*-R228X. Early diagnosis and full protection against sun-exposure are essential for preventing skin cancer and preserving vision in XP patients and can save lives.



It is important to do simple screening tests in risk families to detect heterozygous carriers for gene counseling, especially in communities with high marriage consanguinity. Moreover, prenatal diagnosis is greatly simplified when the molecular defect is easily accessible with the knowledge of the prevalent mutation in a given population, as observed in XP-C and XP-A patients.

Considering the efforts and costs required for the unscheduled DNA synthesis on cultured fibroblasts, we therefore recommend the use of DNA fragment sizing as the simplest and faster method for screening in XP diagnosis. In the population tested for this study, the high level of consanguinity, the large families with numerous siblings affected, and a high rate of premature death lead to the conclusion that the disease is clearly a major health concern. This simple screening test in risk families may greatly facilitate genetic counseling in exposed families as well as early management of affected patients. Furthermore, early diagnosis may improve prognosis of the disease, with extensive protection against the sun.

Competing Interests

The authors report that they have no competing interests relevant to the subject of this paper.

Acknowledgments

The authors wish to thank Dr. C  cile GED and Pr. Alain Taieb for their contribution to this study. They would like to thank the patients and their families as well as the patient support group "Children of the Moon in Algeria" for their collaboration and special thanks are due to one of the most active members of the group Laid Nouredine. They also thank the staff of Bordeaux CHU for their help and technical assistance.

References

- [1] K. H. Kraemer, M. M. Lee, and J. Scotto, "Xeroderma pigmentosum. Cutaneous, ocular, and neurologic abnormalities in 830 published cases," *Archives of Dermatology*, vol. 123, no. 2, pp. 241-250, 1987.
- [2] L. Daya-Grosjean and A. Sarasin, "The role of UV induced lesions in skin carcinogenesis: an overview of oncogene and tumor suppressor gene modifications in xeroderma pigmentosum skin tumors," *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 571, no. 1-2, pp. 43-56, 2005.
- [3] A. G. Abdou, A. H. Maraee, E. M. M. El-Sayed, and N. F. Elnaidany, "Immunohistochemical expression of ezrin in cutaneous basal and squamous cell carcinomas," *Annals of Diagnostic Pathology*, vol. 15, no. 6, pp. 394-401, 2011.
- [4] J. Albores-Saavedra, A. M. Schwartz, D. E. Henson et al., "Cutaneous angiosarcoma. Analysis of 434 cases from the surveillance, epidemiology, and end results program, 1973-2007," *Annals of Diagnostic Pathology*, vol. 15, no. 2, pp. 93-97, 2011.
- [5] D. Bootsma, K. H. Kraemer, J. E. Cleaver, and J. H. Hoeijmakers, "Nucleotide excision repair syndromes: xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome, and trichothiodystrophy," *The Genetic Basis of Human Cancer*, vol. 2, pp. 211-237, 1998.
- [6] M. Kaposi and F. Hebra, *On Diseases of the Skin, Including the Exanthemata*, New Sydenham Society, London, UK, 1875.
- [7] R. E.   nl  , M. N. Ko  , H. Orbay, and   .   ens  z, "Two extreme conditions of xeroderma pigmentosum," *Journal of Craniofacial Surgery*, vol. 17, no. 6, pp. 1240-1242, 2006.
- [8] W. J. Kleijer, V. Laugel, M. Berneburg et al., "Incidence of DNA repair deficiency disorders in western Europe: xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy," *DNA Repair*, vol. 7, no. 5, pp. 744-750, 2008.
- [9] Y. Hirai, Y. Kodama, S.-I. Moriwaki et al., "Heterozygous individuals bearing a founder mutation in the XPA DNA repair gene comprise nearly 1% of the Japanese population," *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 601, no. 1-2, pp. 171-178, 2006.
- [10] S.-I. Moriwaki and K. H. Kraemer, "Xeroderma pigmentosum-Bridging a gap between clinic and laboratory," *Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine*, vol. 17, no. 2, pp. 47-54, 2001.
- [11] B. Fazaa, M. Zghal, C. Bailly et al., "Melanoma in xeroderma pigmentosum: 12 cases," *Annales de Dermatologie et de Venerologie*, vol. 128, no. 4, pp. 503-506, 2001.
- [12] M. L. Khatri, M. Bemghazil, M. Shafi, and A. Machina, "Xeroderma pigmentosum in Libya," *International Journal of Dermatology*, vol. 38, no. 7, pp. 520-524, 1999.
- [13] L. Moussaid, H. Benchikhi, E.-H. Boukind et al., "Cutaneous tumors during xeroderma pigmentosum in Morocco: study of 120 patients," *Annales de Dermatologie et de Venerologie*, vol. 131, no. 1, pp. 29-33, 2004.
- [14] Z. Mohamed, E. F. Nadia, F. Becima et al., "Xeroderma pigmentosum. Cutaneous, ocular, and neurologic abnormalities in 49 Tunisian cases," *Tunisie Medicale*, vol. 83, no. 12, pp. 760-763, 2005.
- [15] M. Hayashi, T. Ohto, K. Shioda, and R. Fukatsu, "Lesions of cortical GABAergic interneurons and acetylcholine neurons in xeroderma pigmentosum group A," *Brain & Development*, vol. 34, no. 4, pp. 287-292, 2012.
- [16] J. E. Cleaver, E. T. Lam, and I. Revet, "Disorders of nucleotide excision repair: the genetic and molecular basis of heterogeneity," *Nature Reviews Genetics*, vol. 10, no. 11, pp. 756-768, 2009.
- [17] K. H. Kraemer, "Sunlight and skin cancer: another link revealed," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, no. 1, pp. 11-14, 1997.
- [18] E. C. Friedberg, *DNA Repair And Mutagenesis*, American Society for Microbiology, Washington, DC, USA, 2006.
- [19] L. Guarente, L. Partridge, and D. C. Wallace, *Molecular Biology of Aging*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2008.
- [20] C. P. Selby and A. Sancar, "Molecular mechanism of transcription-repair coupling," *Science*, vol. 260, no. 5104, pp. 53-58, 1993.
- [21] A. Sary and A. Sarasin, "The genetics of the hereditary xeroderma pigmentosum syndrome," *Biochimie*, vol. 84, no. 1, pp. 49-60, 2002.
- [22] N. Soufir, C. Ged, A. Bourillon et al., "A prevalent mutation with founder effect in xeroderma pigmentosum group C from north Africa," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 130, no. 6, pp. 1537-1542, 2010.
- [23] M. Ben Rekaya, M. Jerbi, O. Messaoud et al., "Further evidence of mutational heterogeneity of the XPC gene in tunisian



- families: a spectrum of private and ethnic specific mutations," *BioMed Research International*, vol. 2013, Article ID 316286, 7 pages, 2013.
- [24] K. Sugawara, J. M. Y. Ng, C. Masutani et al., "Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair," *Molecular Cell*, vol. 2, no. 2, pp. 223–232, 1998.
- [25] A. Uchida, K. Sugawara, C. Masutani et al., "The carboxy-terminal domain of the XPC protein plays a crucial role in nucleotide excision repair through interactions with transcription factor IIH," *DNA Repair*, vol. 1, no. 6, pp. 449–461, 2002.
- [26] O. Messaoud, M. Ben Rekaya, W. Cherif et al., "Genetic homogeneity of mutational spectrum of group-A xeroderma pigmentosum in Tunisian patients," *International Journal of Dermatology*, vol. 49, no. 5, pp. 544–548, 2010.
- [27] K. Tanaka, N. Miura, I. Satokata et al., "Analysis of a human DNA excision repair gene involved in group A xeroderma pigmentosum and containing a zinc-finger domain," *Nature*, vol. 348, no. 6296, pp. 73–76, 1990.
- [28] H. Asahina, I. Kuraoka, M. Shirakawa et al., "The XPA protein is a zinc metalloprotein with an ability to recognize various kinds of DNA damage," *Mutation Research-DNA Repair*, vol. 315, no. 3, pp. 229–237, 1994.
- [29] I. L. Hermanson-Miller and J. J. Turchi, "Strand-specific binding of RPA and XPA to damaged duplex DNA," *Biochemistry*, vol. 41, no. 7, pp. 2402–2408, 2002.
- [30] M. Asmuss, L. H. F. Mullenders, A. Eker, and A. Hartwig, "Differential effects of toxic metal compounds on the activities of Fpg and XPA, two zinc finger proteins involved in DNA repair," *Carcinogenesis*, vol. 21, no. 11, pp. 2097–2104, 2000.
- [31] O. Messaoud, M. Ben Rekaya, H. Ouragini et al., "Severe phenotypes in two Tunisian families with novel XPA mutations: evidence for a correlation between mutation location and disease severity," *Archives of Dermatological Research*, vol. 304, no. 2, pp. 171–176, 2012.
- [32] C. Nishigori, M. Zghal, T. Yagi, S. Imamura, M. R. Komoun, and H. Takebe, "High prevalence of the point mutation in exon 6 of the xeroderma pigmentosum group A-complementing (XPAC) gene in xeroderma pigmentosum group A patients in Tunisia," *American Journal of Human Genetics*, vol. 53, no. 5, pp. 1001–1006, 1993.
- [33] J. C. States, E. R. McDuffie, S. P. Myrand, M. McDowell, and J. E. Cleaver, "Distribution of mutations in the human xeroderma pigmentosum group A gene and their relationships to the functional regions of the DNA damage recognition protein," *Human Mutation*, vol. 12, no. 2, pp. 103–113, 1998.
- [34] K. Amr, O. Messaoud, M. El Darouti, S. Abdelhak, and G. El-Kamah, "Mutational spectrum of Xeroderma pigmentosum group A in Egyptian patients," *Gene*, vol. 533, no. 1, pp. 52–56, 2014.
- [35] J. E. Cleaver, L. H. Thompson, A. S. Richardson, and J. C. States, "A summary of mutations in the UV-sensitive disorders: xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome, and trichothiodystrophy," *Human Mutation*, vol. 14, no. 1, pp. 9–22, 1999.
- [36] Z. Chen, X. Susan, J. Yang, and G. Wang, "Defining the function of XPC protein in psoralen and cisplatin-mediated DNA repair and mutagenesis," *Carcinogenesis*, vol. 24, no. 6, pp. 1111–1121, 2003.
- [37] H. R. Rezvani, C. Ged, B. Bouadjar, H. de Verneuil, and A. Taieb, "Catalase overexpression reduces UVB-induced apoptosis in a human xeroderma pigmentosum reconstructed epidermis," *Cancer Gene Therapy*, vol. 15, no. 4, pp. 241–251, 2008.
- [38] F. Chavanne, B. C. Broughton, D. Pietra et al., "Mutations in the XPC gene in families with xeroderma pigmentosum and consequences at the cell, protein, and transcript levels," *Cancer Research*, vol. 60, no. 7, pp. 1974–1982, 2000.
- [39] M. Ben Rekaya, O. Messaoud, F. Talmoudi et al., "High frequency of the V548A fs X572 XPC mutation in Tunisia: implication for molecular diagnosis," *Journal of Human Genetics*, vol. 54, no. 7, pp. 426–429, 2009.
- [40] S. G. Khan, K.-S. Oh, T. Shahnavi et al., "Reduced XPC DNA repair gene mRNA levels in clinically normal parents of xeroderma pigmentosum patients," *Carcinogenesis*, vol. 27, no. 1, pp. 84–94, 2006.
- [41] P. Mahindra, J. J. DiGiovanna, D. Tamura et al., "Skin cancers, blindness, and anterior tongue mass in African brothers," *Journal of the American Academy of Dermatology*, vol. 59, no. 5, pp. 881–886, 2008.
- [42] M. A. Senhaji, O. Abidi, S. Nadifi et al., "C.1643-1644delTG XPC mutation is more frequent in Moroccan patients with xeroderma pigmentosum," *Archives of Dermatological Research*, vol. 305, no. 1, pp. 53–57, 2013.



II. Discussion

Comme exposé précédemment dans ce travail, le XP est une pathologie très hétérogène au niveau clinique et génétique avec une prise en charge extrêmement difficile. Le XP est une maladie héréditaire rare à transmission autosomique récessive. Son incidence et sa fréquence sont difficiles à déterminer et varie d'un pays à l'autre. De nombreux cas restent non identifiés. A travers le monde le nombre des malades est estimé entre 3 000 et 4 000. La pathogénie du XP s'explique par la mutation de l'un des gènes codant pour l'une des protéines impliquées dans les différentes étapes du système NER. Ainsi, ce système se trouve totalement inefficace ou du moins partiellement. Vu que la NER est le principal responsable de la réparation des lésions de l'ADN causées par les UV comme les CPD et 6-4PP, il s'en suit que chaque exposition aux rayons UV conduit à la formation de dommages de l'ADN qui ne seront pas réparés et qui conduiront les cellules détentrices de cet ADN endommagé à l'apoptose.

La gravité de cette pathologie réside dans le fait que ces distorsions de l'ADN peuvent conduire aussi à la mutation des oncogènes et gènes suppresseurs des tumeurs et ainsi être responsables de l'apparition de multiples tumeurs. C'est à la base de cette étiopathogénie que s'expliquent les différentes manifestations cliniques du XP qui toucheront la peau, les yeux, le système nerveux et d'autres atteintes moins fréquentes.

En Algérie, bien qu'il n'y ait pas de données épidémiologiques précises à disposition, l'XP est soupçonné d'être relativement fréquente en raison du taux élevé de consanguinité et l'endogamie.

Le principal objectif de cette étude était la caractérisation de notre population *via* l'exploration des mutations les plus communes responsables du XP chez 19 familles non apparentées. A noter que tous les patients inclus dans cette étude présentaient les critères diagnostiques classiques du XP. A cet effet, une stratégie d'étude moléculaire a été établie.

Cette stratégie consiste dans un premier temps en la recherche de la mutation c.682C> T (p.Arg228X) par une PCR-RFLP. Dans un second temps, les individus qui ne présentaient aucuns troubles neurologiques ont fait l'objet d'une étude par le biais d'une PCR suivie d'un séquençage et analyse par des logiciels pour la détection de la mutation c.1643_1644delTG (p.Val548AlafsX25).

Pour l'exploration de cette délétion, nous avons adopté une technique récente qu'est l'analyse de fragments par GeneScan. Cependant, il est important de souligner non seulement l'originalité de cette technique mais surtout sa facilité d'exécution. Un gain de temps était presque inestimable dans cette procédure en deux étapes avec un minimum de manipulation des produits de PCR (simple dilution) par rapport à la multi étapes manuelles du pré-séquençage qui nécessite des manipulations fastidieuses telles que la purification des produits de PCR, le réglage de la



réaction de séquençage, et la purification de cette réaction avant le chargement sur le gel du séquençage. Néanmoins, il faut connaître la mutation pour pouvoir utiliser cette technique et surtout, il faut que la mutation génère un changement au niveau de la taille du fragment d'ADN.

L'étude la plus récente d'un laboratoire installé au Maroc signale toujours l'utilisation de séquençage automatisé classique pour le diagnostic de la delTG (Senhaji et al, 2013). D'autres méthodes sont bien adaptées à la détection de celle-ci, y compris le pyroséquençage et la discrimination allélique par PCR en temps réel. Le premier a les mêmes réserves que le séquençage classique : manipulation fastidieuse et le coût élevé, et n'a pas été décrit dans ce cadre. Le second est bien équipé pour les études épidémiologiques, comme décrit récemment (Doubaj et al, 2012) : L'utilisation de sondes Taqman assure un haut débit en une seule étape d'analyse sans manipulation post-PCR. Toutefois, des coûts plus élevés sont attendus de l'instrumentation et les consommables (thermocycleur en temps réel, des sondes TaqMan et réactifs), tandis que les profils hétérozygotes devaient être vérifiés par un séquençage automatisé. Le principal problème de cette méthode est son coût, sinon cette technique est intéressante et efficace à grande échelle puisqu'elle est entièrement automatisée.

Nos résultats rapportent la présence de la mutation non-sens c.682C> T (p.Arg228X) à une fréquence de 10,5% (2 sur 19 patients), tandis que la mutation c.1643_1644delTG (p.Val548AlafsX25) présentait une fréquence de 89,5% (17 des 19 patients). L'analyse des deux parents a montré qu'ils étaient porteurs hétérozygotes pour la même mutation présente chez l'enfant XP. En outre, les huit frères et sœurs atteints de XP portaient également ces mutations à l'état homozygote. Nos résultats sont en accord avec ceux précédemment rapportés.

L'étude moléculaire de Soufir et ses collaborateurs portée sur 66 familles non apparentées de différents pays notamment du pays du Maghreb a montré que 85% des patients avaient des mutations au niveau du gène *XPC*, parmi eux 87% portaient la mutation (c.1643_1644delTG). Cependant, 12% des patients XP présentaient des mutations dans le gène *XPA* avec une fréquence de la mutation (c.682C> T) de 87, 5% (Soufir et al, 2010).

Afin de confirmer que le patient XP1417 est atteint de XP, nous avons procédé à différentes techniques. L'étude de ce patient n'a révélé aucun résultat sachant qu'on a cherché à détecter les deux mutations précédemment décrites et qu'il a fait l'objet d'investigation supplémentaire réalisée par l'exploration de quelques régions du gène *XPV* en se focalisant sur la recherche des points chauds. Pour expliquer ces résultats, les hypothèses retenues sont les suivantes : (a) Un diagnostic non définitif du XP basé sur l'avis d'un seul médecin traitant tandis qu'il faut revenir aux autres médecins de différentes spécialités (dermatologue, ophtalmologue, neurologue et dentiste). (b) L'absence de test biologique permettant de cerner le groupe de complémententation XP déficient et donc rechercher la mutation causale à son niveau. (c) L'information récoltée à partir



du diagnostic clinique du patient XP1417 (phénotype modéré, âge 18 ans lors du prélèvement) nous amène à croire qu'il pourrait appartenir au groupe XP variant, la mutation causale se situerait donc dans les régions non explorées du gène *XPV*. (d) Le patient XP1417 serait peut-être atteint d'une autre génodermatose telle que le CS.

- **Mutation non-sens c.682C> T (p.Arg228X)**

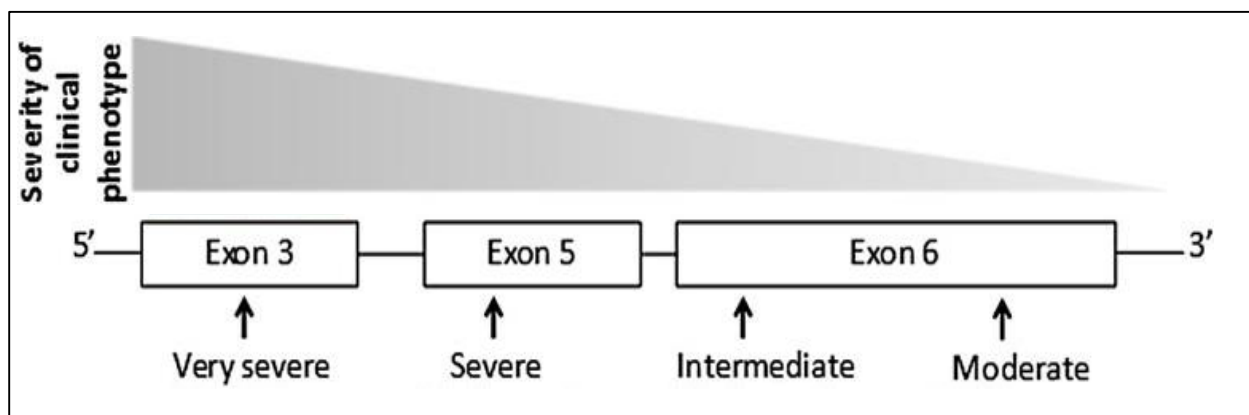
Concernant la mutation c.682C> T qui se produit au niveau de l'exon 6 codant pour la partie carboxy-terminale, nous avons pu la mettre en évidence chez les deux patients XP qui présentaient des troubles neurologiques. Cette mutation est une substitution d'une arginine par un codon stop en position 228, à l'origine d'une protéine tronquée de 227 aa peu fonctionnelle sans l'extrémité C-terminale par rapport à la protéine XPA normale de 273 aa. En fait, la protéine XPA est impliquée dans la réparation par excision de nucléotide (NER), cette protéine agit au niveau de plusieurs étapes, de la reconnaissance du dommage jusqu'à la resynthèse par l'intermédiaire de son interaction avec RPA.

Les rôles de XPA ne sont pas tous connus, mais elle semble avoir un rôle important dans le contrôle de l'assemblage précis du complexe de pré-incision. Cette protéine permettrait aussi l'identification du brin portant la lésion (Jones & Wood, 1993) ainsi que l'amélioration de la spécificité de la fixation de RPA au niveau de lésions de l'ADN (Vasquez et al, 2002). Des expériences sur de l'ADN isolé montrent que XPA pourrait agir en tant qu'un régulateur négatif en inhibant l'activité hélicase de RPA (Missura et al, 2001). D'autres travaux sur les cellules déficientes pour XPA irradiées par des UV qui sont bloquées pour la réplication de leur ADN, suggèrent que la protéine XPA aurait un rôle dans l'activation de point de contrôle suite à l'absence du signal pour ATR « *Ataxia Télangiectasia and Rad3-related kinase* » pour la mise en place de la cascade de signalisation (Bomgarden et al, 2006). De plus, XPA serait impliqué dans le mécanisme de HGPS « *progeria ou syndrome de Hutchinson-Gilford*, maladie qui se manifeste par un vieillissement accéléré » (Liu et al, 2008). Une découverte récente suggère que la déficience de XPA peut conduire à un dysfonctionnement mitochondrial (Fang et al, 2014).

L'étude de Messaoud et son équipe affirme la présence d'une corrélation entre le phénotype et le génotype en dépend du site et/ou le type de mutation au niveau du gène *XPA*. Plus particuliers, ils ont mis en évidence une corrélation entre la gravité de la maladie et l'emplacement de la mutation avec un gradient décroissant (de 5' vers 3' du gène *XPA*) (figure 38). De ce fait, la sévérité des signes cliniques diminue tandis que la position de la mutation se déplace à partir du N-terminal au C terminal de la protéine, à l'exception des cas où des mutations du site de jonction permettent la synthèse d'une petite quantité de protéine normale (Messaoud et al, 2012). Il



semblerait que la protéine XPA a une longue demi-vie, et une quantité diminuée de cette dernière n'entraîne pas forcément une hypersensibilité des cellules aux radiations UV, vu que peu de



protéines XPA suffisent pour que la réparation ait lieu (K berle et al, 2006).

Figure 38 : Corrélation entre le site mutationnel et la gravité de la maladie (Messaoud et al, 2012). Les flèches correspondent au site mutationnel.

Il est intéressant de noter que la mutation R228X se produit en dehors de la région de liaison d'ADN (98-219 aa). En effet, des mutations dans cette région sont généralement associées à un phénotype sévère, surtout si elles se produisent dans le domaine à doigt de zinc, crucial pour l'activité de liaison à l'ADN (Asahina et al, 1994). Par conséquent, la protéine XPA mutante (227 aa) peut avoir une activité de fixation à l'ADN, ce qui pourrait expliquer le phénotype modéré observé chez les patients XP-A Tunisiens (en présence de la mutation R228X) par rapport au phénotype sévère des patients XP-A Japonais qui ont une mutation d'épissage commune au niveau de l'intron 3 (Sidwell et al, 2006; Messaoud et al, 2010; Fassihi et al, 2016).

Les travaux de Nishigori et ses collaborateurs mentionnent que la plupart (84%) de l'ARNm du gène *XPA* serait produit étant donné que la mutation non-sens est située sur le sixième exon codant pour le carboxy-terminal et qu'il n'a aucune incidence sur la fonction majeure de la protéine XPA (Nishigori et al, 1993).

En outre, les anomalies neurologiques observées chez les patients XP-A sont dues à la réparation insuffisante des dommages oxydatifs de l'ADN dans le système nerveux central, où le taux de production des espèces réactives de l'oxygène est la plus élevée (Rass et al, 2007).

Un point essentiel concernant l'extrémité carboxy-terminale de la protéine XPA, elle correspond au domaine d'interaction avec le facteur de transcription TFIIH qui représente un espace d'interaction protéine-protéine de 48 aa (Bartels & Lambert, 2007). En plus de jouer un rôle dans l'ouverture des brins d'ADN dans le système de réparation de l'ADN par la NER avec son activité hélicase, TFIIH participe également à l'initiation de la transcription de gènes médiée



par l'ARN polymérase II, avec cette même activité hélicase (Hwang et al, 1996; Watanabe et al, 2000).

Cette même mutation R228X, décrite comme étant la plus fréquente des mutations au niveau du gène *XPA* avec un taux de récurrence de 87,5% dans l'étude de Soufir et al. a été rapportée auparavant dans la population du Nord Africain avec similarité des résultats (Nishigori et al, 1993; Cleaver et al, 1999). L'identification de la mutation R228X chez des familles de différentes origines ethniques, laisse croire qu'il s'agirait d'un point chaud dans le gène *XPA*, ou encore un allèle ancestral commun. L'étude des patients XP-A Tunisiens a révélé par l'analyse des haplotypes, la présence d'un effet fondateur pour cette mutation récurrente (Messaoud et al, 2010).

Chez la population Japonaise, trois patients rapportés étaient hétérozygotes composites pour la mutation R228X et pour la mutation d'épissage de l'intron 3 (IVS3-1G>C). Il s'agit de la mutation la plus fréquente chez les patients japonais. Cette dernière se situe au niveau de l'intron 3 modifiant l'épissage alternatif de l'ARNm ce qui conduit à une protéine XPA tronquée et non-fonctionnelle. Une autre mutation non-sens sur l'exon 3 (codon stop en position 116 à la place d'une tyrosine) a été également décrite dans cette population (Satokata et al, 1992).

Une mutation non-sens dans l'exon 4 (codon stop 207 au lieu d'une arginine) a été mise en évidence chez un patient Palestinien et un patient Tunisien ayant les mêmes symptômes cliniques et les anomalies neurologiques (Satokata et al, 1992). Ces patients n'expriment pas la protéine XPA (pas de détection de la protéine chez ces patients par western blot) et ne peuvent réparer les photoproduits. Ils sont extrêmement sensibles aux UV et le test UDS donne une réparation quasi-nulle (Jones et al, 1992; Kobayashi et al, 1998).

Généralement, les patients Tunisiens sont les moins atteints en présence de mutation en dehors de la région de fixation à l'ADN (mutation située dans l'exon 6). Cependant, Messaoud et al. ont décrit une nouvelle mutation non-sens sur l'exon 3 (codon stop 111 au lieu d'un résidu d'acide glutamique) soupçonnée de conduire à une protéine tronquée dépourvue du domaine de liaison à l'ADN. Ces patients présentent des symptômes cliniques sévères similaires aux patients Japonais qui ont la mutation touchant le site d'épissage de l'intron 3 (Messaoud et al, 2012).

L'analyse de la fonction de XPA sur XP129, révertant UV-résistant de la souche XP12ROSV (fibroblastes SV40 transformés, dérivés de patient XP-A de phénotype sévère en présence d'une mutation non-sens R207G), a permis l'estimation de la réparation d'ADN. En effet, une mutation dans le domaine central conduit à une réparation des CPDs très faible par rapport au témoin. Néanmoins, une faible quantité de protéine XPA fonctionnelle permet la restauration d'une activité de réparation presque comparable à celle du témoin (révertant XP129). Les mutations dans le domaine de fixation à TFIIH (délétion de 46 acides aminés en C-terminal de XPA, une arginine 244 à la place d'une histidine et une sérine 264 à la place d'une cystéine) conduisent à



des taux de réparation variables. Une mutation dans le domaine de fixation à la sous-unité p34 de RPA (délétion de 36 acides aminés en N-terminal de XPA) affecte partiellement la réparation alors qu'une mutation dans le domaine d'interaction avec ERCC1 (délétion de 78 à 84 acides aminés) a pour conséquence une très forte diminution du niveau de réparation (Kobayashi et al, 1998).

- **Mutation (c.1643_1644delTG, p.Val548AlafsX25)**

Nous avons pu mettre en évidence cette délétion chez les 17 patients XP à l'état homozygote qui ne présentaient aucune déficience neurologique par l'analyse de fragments et confirmé par l'analyse de séquence. Concernant la mutation (c.1643_1644delTG, p.Val548AlafsX25), qui représente la délétion d'un dinucléotide TG (delTG) située au milieu de l'exon 9 du gène *XPC*, elle conduit à l'expression d'une protéine XPC tronquée, inactive et indétectable d'une séquence de 571 aa non fonctionnelle au lieu d'une protéine XPC normale de 940 aa.

Nous avons rapporté dans le chapitre I, les différents rôles de la protéine XPC. En effet, cette protéine jouant un rôle uniquement pendant le GGR, ne reconnaîtrait pas directement le dommage mais plutôt le changement de conformation de la double hélice au niveau de la lésion. XPC aurait également une préférence pour l'ADN simple brin et se fixerait sur le brin non endommagé en face de la lésion (Gunz et al, 1996; Buterin et al, 2005; Maillard et al, 2008). De plus, en se fixant au niveau du brin complémentaire, XPC permet d'orienter le complexe d'incision pour que le brin non endommagé ne soit pas accidentellement incisé (Wood, 1999).

XPC, complexé à HR23B, interviendrait aussi dans l'élimination des mésappariements G/T réparés par le BER. Ce complexe interagit directement avec la thymine DNA glycosylase (TDG) qui initie le BER des mésappariements G/T générés spontanément par la désamination de la 5-méthylcytosine. Il permettrait le départ de la TDG des sites abasiques qui résultent de l'excision du mésappariement, contribuant ainsi à la diminution de la mutagénèse spontanée (Shimizu et al, 2003). Un autre rôle de XPC dans la protection contre les dommages oxydatifs a été évoqué. Toutefois, les fibroblastes et kératinocytes déficients pour la protéine XPC sont plus sensibles à un traitement par le bromate de potassium (KBrO₃) que les cellules normales favorisant ainsi l'incapacité des cellules XP-C à réparer les lésions engendrées par le traitement oxydant (D'Errico et al, 2006).

Dans la protéine XPC humaine, la région N-terminale est responsable d'une association avec XPA dans laquelle le segment TGD de la protéine XPC humaine est séparée en deux parties individuelles par une insertion désordonnée d'environ 180 résidus. Toutefois, la queue C-terminale de la protéine XPC contient des domaines qui interagissent avec Centrine 2 (résidus 847-863) et TFIIH (résidus 816-940) (Clement et al, 2010).



XPC joue également un rôle important dans l'induction de nombreux gènes de régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose après un traitement au cisplatine. XPC est elle-même induite suite à une exposition aux rayons UVC. Cette induction est rendue possible grâce au rôle du facteur de transcription p53 en se fixant au niveau des promoteurs respectifs des gènes *XPC* et *DDB2* (Adimoolam & Ford, 2002; Wang et al, 2004). XPC, est donc impliquée dans la réponse cellulaire aux agents génotoxiques, induit l'expression de nombreux gènes du métabolisme cellulaire dont ses deux partenaires. En effet, une protéine de reconnaissance des dommages est un bon candidat initiateur de processus de signalisation. La présence des lésions est ainsi insuffisante pour augmenter certains transcrits : c'est la reconnaissance des lésions par XPC qui serait à l'origine de l'activation transcriptionnelle de nombreux gènes de la réponse cellulaire à des agents génotoxiques comme les UV ou le cisplatine. Une étude transcriptomique comparative entre des fibroblastes normaux et déficients en XPC traités au cisplatine, a permis de mettre en évidence 861 gènes différentiellement exprimés. Les produits de ces gènes sont impliqués principalement dans le cycle cellulaire, la prolifération, la transduction du signal et la réparation de l'ADN comme CDK2 « *Cyclin-dependent kinase 2* », la cycline E et PCNA (Wang et al, 2004).

L'expérience de l'équipe de Mu, où le dommage est soit inséré dans une structure duplex soit dans une structure « pseudo transcriptionnelle » avec une bulle formée autour de la lésion, montre que XPC est indispensable pour la réparation du dimère inséré dans le duplex, mais n'est pas requis pour la réparation de ce même dommage inséré cette fois au niveau d'une bulle. Ainsi, lorsque la distorsion de l'ADN est suffisante, la reconnaissance par XPC devient inutile ; les autres facteurs de la NER peuvent venir se fixer sur l'ADN sans son intervention (Mu & Sancar, 1997; Wood, 1999).

La mutation (c.1643_1644delTG) décrite par Soufir et ses collaborateurs dans 87% des patients XP-C Maghrébins (Soufir et al, 2010), a été identifiée par l'équipe de Ben chez 100% des 14 familles XP-C de différentes régions de la Tunisie (Ben Rekaya et al, 2009) et également chez deux autres patients africains avec XP (Khan et al, 2006). Cette mutation delTG a également décrit chez deux patients frères du Nord Soudan (Mahindra et al, 2008). En outre, l'analyse moléculaire des 24 patients du Maroc a montré que 17 étaient homozygotes pour la mutation c.1643_1644delTG (Senhaji et al, 2013). La plupart des patients XP-C Africains qui portent la mutation delTG dans les deux allèles ont des caractéristiques cliniques similaires constituées de photosensibilité, des lésions pigmentaires et l'apparition précoce des cancers de la peau sans l'atteinte neurologique, comme c'est le cas chez les patients XP-C de cette étude. Cependant, certains patients XPC présentaient des symptômes neurologiques tels que l'hyperactivité et des traits autistiques (Khan et al, 1998; Soufir et al, 2010) et le lupus érythémateux systémique (Hananian & Cleaver, 1980). Un autre patient XP-C (XP21BE) a été identifié avec des anomalies



neurologiques, mais cette neuropathologie pourrait être causée par un autre défaut génétique autre que l'altération du fonctionnement de XPC (Khan et al, 2009).

La capacité de réparation de l'ADN induite par cette mutation a été constatée dans seulement 20% des cellules normales compétentes (Chavanne et al, 2000). Quoique, les résultats de Soufir et ses collaborateurs suggèrent que le taux de réparation de l'ADN est inférieur à 10% des cellules normales et peut-être totalement complété au niveau normal par transduction du gène *XPC* par des rétrovirus recombinants (Soufir et al, 2010).

De nombreuses études ont montré que la mutation c.1643_1644delTG a été étendue dans l'Afrique du Nord, l'Italie et l'Espagne, qui a attiré l'attention des chercheurs sur la possibilité d'avoir le même ancêtre. Soufir et ses collaborateurs ont prouvé la présence d'un effet fondateur dans la région méditerranéenne en utilisant des outils mathématiques basés sur Haplotypes microsatellites. Ils ont également montré que cette mutation ancêtre commune remontée à environ 1250 ans, correspondant à 50 générations et historiquement quand les musulmans de l'Arabie ont envahi l'Europe (Soufir et al, 2010).

D'autres études ont révélé que les dommages d'ADN persistant en absence de XPC entraînaient le raccourcissement des télomères ; ainsi XPC est nécessaire pour maintenir la longueur des télomères. Le défaut de réparation de l'ADN et le raccourcissement des télomères provoqueraient une sénescence répllicative ou mort cellulaire (Stout & Blasco, 2013).

Par ailleurs, la perte allélique de *XPC* pourrait être un événement précoce dans la transformation maligne pulmonaire qui favoriserait la formation subséquente de mutations induites par les carcinogènes pulmonaires. L'apparition tardive des effets néfastes sur la santé dus à des tumeurs pulmonaires chez les souris KO XPC suggère que poumon ou d'autres tumeurs internes entraînés par des dommages oxydatifs à l'ADN serait apparente que chez les patients XP-C plus âgés (Hollander et al, 2005). De plus, il a été observé que XPC pouvait être hyperméthylé et ainsi inactivé dans le cancer du poumon. Cette inactivation est liée à l'occurrence de mutation de p53 lors de la tumorigenèse (Wu et al, 2007). Il existe également une corrélation entre une réduction de l'expression de XPC, la réparation de l'ADN, et la progression du cancer de la vessie en relation avec le statut de p53 (Chen et al, 2007).

Dernièrement, Dupuy et ses collaborateurs ont fourni une approche alternative pour guérir les cellules défectueuses XP-C (Dupuy et al, 2013). Dans leur étude, ils ont décrit une correction ciblée de la mutation delTG dans les cellules XP-C. L'approche utilisée dans l'étude a été fondée sur des nucléases ciblées dont le principe de la capacité des nucléases modifiées, y compris méganucléase et TALE nucléases pour générer une cassure double brin précise en un lieu



spécifique et promouvoir la recombinaison homologue ciblée (HR) avec une matrice de réparation d'ADN exogène (Urnov et al, 2010; Daboussi et al, 2012). Ils ont montré que le traitement par déméthylation ainsi que l'utilisation de TALENTM insensible à la méthylation CpG permet une correction réussie de la mutation delTG. Une telle correction génétique conduit à la réexpression de la totalité de la protéine XPC et à la récupération de la capacité de NER, attestée par l'UVC résistance des cellules corrigées. La totalité de la protéine XPC a été régulièrement exprimée au fil du temps, ce qui démontre la stabilité de la correction génétique. Enfin, NER secours a été confirmé par le taux de survie cellulaire après différentes expositions aux UV. Cependant, l'utilisation d'un traitement de déméthylation, 5-aza-dC⁵ « 5-aza-2'-deoxycytidine » (Épidémiologie, 2013), imposait un effet délétère sur les cellules modifiées qui peut représenter un obstacle pour son application dans les kératinocytes primaires pour la correction génétique (Dupuy et al, 2013).

Enfin, la nature ciblée de la correction génique assistée par nucléase offre un avantage majeur par rapport aux stratégies de thérapie génique classiques à l'aide des rétrovirus recombinants. La correction génique assistée par nucléase permet au gène fonctionnel de bénéficier du contexte chromosomique naturel et des régions régulatrices connues pour jouer un rôle clé dans la mise au point de l'expression génique. Cela est particulièrement vrai pour la région du promoteur de XPC, qui montre la présence des éléments régulateurs situés 1.700pb en amont du site du déclenchement de la transcription (Xu et al, 2012). De même, la thérapie génique utilisant des nucléases a permis à la protéine XPC à s'exprimer de nouveau en totalité à un niveau compatible avec la normale UV-dépendante dans la réparation des dommages de l'ADN. Dans le cas contraire, la surexpression de XPC pourrait être préjudiciable en raison de sa capacité polyvalente de reconnaître les distorsions physiologiques dans la double hélice de l'ADN et de se lier aux mésappariements de l'ADN avec une haute affinité. Comme par exemple, lorsque XPC-GFP « *green fluorescent protein* » ou HA-RAD4 étaient surexprimés dans les fibroblastes murins ou dans la levure respectivement, une dégradation rapide de ces protéines par le protéasome a été observée (Lommel et al, 2002; Ng et al, 2003). Enfin, une expression stable de la protéine a été observée ce qui a indiqué que l'expression de la XPC corrigée n'a pas été régulée à la baisse avec le temps, ceci suggère que les approches nucléase-ciblées ne sont pas susceptibles de déclencher le silençage épigénétique du gène corrigé, tel que rapporté dans la complémentation en utilisant des approches rétrovirales (GRAM et al, 1998; Dupuy et al, 2013).

⁵ 5-aza-dC : analogue de la 2'-deoxycytidine, agent déméthylant connu sous le nom commercial la décitabine ou le Dacogen®. Il est utilisé dans le traitement des syndromes myélodysplasiques (Épidémiologie, 2013).

Chapitre V

Conclusion et perspectives



Le XP est une maladie très hétérogène par sa présentation clinique et cellulaire du fait d'une hétérogénéité génétique (sept groupes de complémentation en plus du XP-V), elle regroupe des manifestations dermatologiques et oculaires avec un risque élevé aux néoplasies cutanéo-muqueuses, l'atteinte neurologique est parfois rapportée. Le XP est une maladie autosomique récessive, ce qui explique sa relative fréquence dans les régions où il y a une forte consanguinité ainsi que la taille des familles qui est importante comme dans notre contexte. La prise en charge doit être précoce et globale, médicale et sociale avec un suivi régulier pour réduire la morbidité et la mortalité.

Il s'agit là d'une problématique commune à l'ensemble des maladies rares que les équipes de recherche ont longtemps délaissé en raison de leur faible incidence dans la population générale.

Au cours de ce travail de thèse, les altérations des deux gènes *XPA* et *XPC* responsables de la maladie *xeroderma pigmentosum* dans un échantillon de 19 cas index appartenant à 19 familles non apparentées ont été caractérisées. Seul le patient XP1417 nécessiterait des analyses plus approfondies fondées sur un diagnostic bien établi.

Après avoir comparé nos résultats avec ceux rapportés dans différentes études des populations voisines, nous avons constaté qu'il était intéressant d'élargir l'effectif de la population étudiée pour appuyer nos résultats concernant la fréquence des mutations et le taux de consanguinité évoqués dans ce travail.

Bien que notre échantillon soit réduit, nous avons pu révéler que la mutation (p.Val548AlafsX25) était la cause majeure de cette pathologie dans notre population.

Lors de notre étude, nous avons également constaté que le diagnostic de cette pathologie héréditaire dans les services de pédiatrie reposait sur les signes cliniques souvent au stade très avancé en absence de tous tests biologiques ou génétiques. Les données moléculaires que nous venons d'évoquer sont de nature à attirer l'attention sur la nécessité d'intégrer une analyse de routine dans des explorations chez les familles à risque, afin de permettre un diagnostic précoce. A travers ce travail, nous voulons souligner certaines recommandations :

- La méconnaissance de la pathologie explique en partie le diagnostic tardif ce qui limite l'efficacité de la prise en charge, d'où l'intérêt d'une éducation sur la maladie et d'une sensibilisation auprès de la population et des médecins.
- L'ensoleillement de notre pays, le niveau socio-économique bas des malades, l'absence de traitement curatif et le pronostic sombre de cette maladie nécessitent la réduction de la survenue de nouveaux cas par un planning familial ciblé.
- La réalisation des conventions ou des réseaux pluridisciplinaires comprenant médecins généralistes, pédiatres, généticiens, dermatologues, ophtalmologues, neurologues,



dentistes, psychologues semble plus que nécessaire, afin de permettre une meilleure prise en charge des patients et de leurs proches.

De cette étude, nous recommandons vivement l'utilisation de l'analyse de fragments, c'est la méthode la plus simple et la plus rentable pour le diagnostic XP, dans des échantillons d'ADN provenant de pays où la mutation c.1643_1644delTG du gène *XPC* est connue pour être répandue. Le niveau élevé de consanguinité et la grande taille des familles avec plus d'un frère affecté ainsi qu'un taux élevé de décès prématuré, fournissent une démonstration claire que la maladie est un problème de santé majeur. La disponibilité d'un simple test de dépistage dans les familles à risque est justifiée et peut grandement faciliter le conseil génétique dans les familles exposées et aider à promouvoir la prise en charge précoce des patients touchés.

La suite logique de ce travail, serait donc de proposer un test génétique aux individus issus de familles à risque afin de mettre en place une stratégie de prévention à travers le conseil génétique pour l'identification des hétérozygotes et le diagnostic prénatal.

Annexes



Annexe 01 : FICHE PATIENT
Etude de la maladie « Xeroderma Pigmentosum »

Date du prélèvement :
 Jour mois année

Famille répertoriée sous le numéro :
 Numéro d'identification du Patient :

Données personnelles

Nom:.....

Sexe : M ☐ F ☐

Prénom:

Date de naissance :
 Jour mois année

Scolarité:

Adresse :

wilaya :

N° de téléphone :

Données générales

Taille : cm

Poids : Kg

IMC :

TA :

Dates d'apparitions des premiers signes :
 Jour mois année

Tabagisme : Fumeur ☐ Non fumeur ☐

Prise en charge: Absente ☐ Présente ☐

Si vous cochez la 2^{ème} case, veuillez préciser l'organisme

Types de protections utilisées :

- | | | |
|------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 1. Casquette ou autres | ☐ oui | ☐ non |
| 2. Lunette | ☐ oui | ☐ non |
| 3. Crème antisolaire | ☐ oui | ☐ non |
| 4. Combinaison filtre | ☐ oui | ☐ non |
| 5. Films anti UV | ☐ oui | ☐ non |

**Les parents**

Nom de mère: Profession:

Niveau d'instruction: N° : |_|_|_|_|

Nom du père: Profession:.....

Niveau d'instruction: N° : |_|_|_|_|

Consanguinité : Présente ☐ Absente ☐Les parents sont : Cousins germains ☐ Cousins lointains ☐Pas apparentés ☐

Avez-vous un antécédent ou un membre dans votre famille atteint de cette maladie ?

Oui ☐ Non ☐

Si c'est oui, préciser le lien de parenté.

.....

Arbre généalogique

Examens cliniques

Nom du médecin traitant :

Numéro du dossier du patient :

Date de la première consultation :

--

--

--	--	--	--	--

jour
mois
année

Etat d'avancement de la maladie : Modéré ☐ Intermédiaire ☐ Sévère ☐

Les lésions siègent au niveau : Face ☐ Cou ☐ Tronc ☐ Avant-bras ☐

Autres endroits ☐

Troubles neurologiques : Absence ☐ Présence ☐

Troubles oculaires : Absence ☐ Présence ☐

Cancers cutanés : Absence ☐ Présence ☐

Associations avec d'autres maladies :

➤ Le syndrome de Cockayne (SC) : ☐ Oui ☐ Non.

➤ la trichothiodystrophie (TTD) : ☐ Oui ☐ Non.

Avez-vous déjà subi une intervention chirurgicale ? Oui ☐ Non ☐

Si c'est oui, préciser : ☐ Sous locale, ☐ Bloc.

Détails de l'intervention (date, type affection ou lésion, évolution, traitement, situation actuelle) :

- Si l'un de ces membres de votre famille est décédé, veuillez préciser la cause et l'âge du décès

Autres remarques

.....

.....

.....

.....

Signature du médecin :



Annexe 02 : Formulaire de consentement pour participation à une étude scientifique

Titre d'étude

Etude moléculaire de la maladie Xeroderma Pigmentosum dans la région de l'Ouest Algérien

Je, soussigné(e), (Nom et prénom) :né(e)le
demeurant à

Consens par la présente à participer à une étude scientifique concernant le *xeroderma pigmentosum* utilisant un test d'ADN.

Le but, la nature ainsi que les bénéfices de cette étude m'ont été expliqués de façon détaillée et je permets à cet effet le prélèvement sanguin sur moi-même.

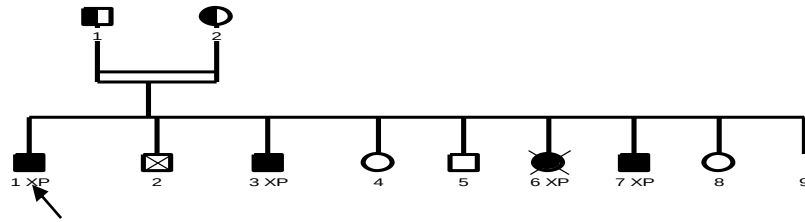
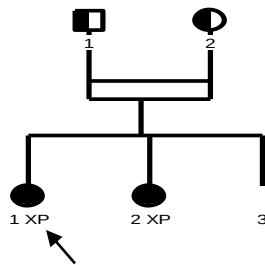
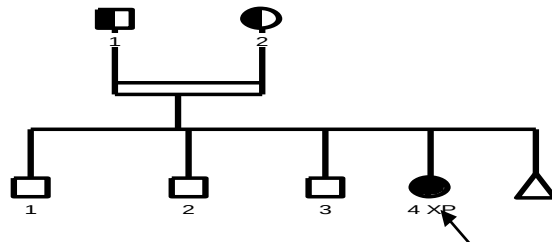
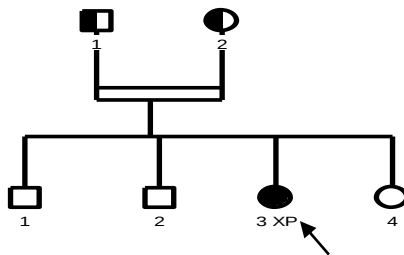
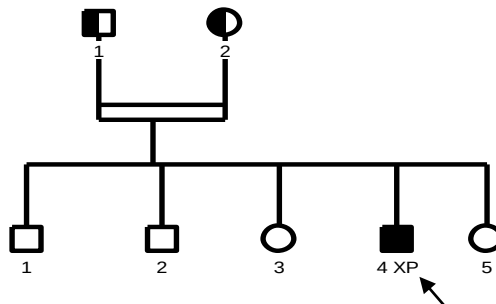
Ma participation est totalement volontaire. Je peux refuser de participer ou me retirer de l'étude à tout moment.

Les données médicales me concernant resteront strictement confidentielles. Je n'autorise leur consultation, y compris la consultation de mon dossier médical, que par les personnes habilitées dans le cadre de cette recherche.

J'accepte également que mes échantillons biologiques soient conservés et utilisés à des fins de recherche médicale, dans le cadre de la maladie désignée ci-dessus, sans limitation de temps.

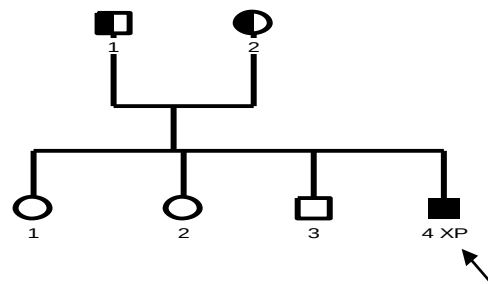
Fait àLe.....

Signature

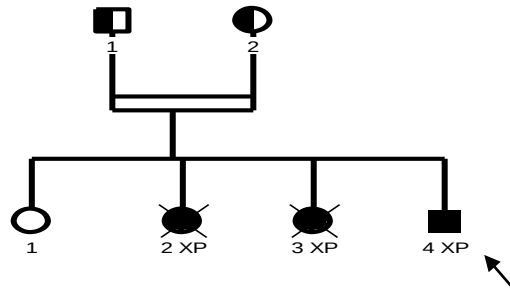
**Annexe 03 : Arbres généalogiques****Famille 1****Famille 2****Famille 3****Famille 4****Famille 5**



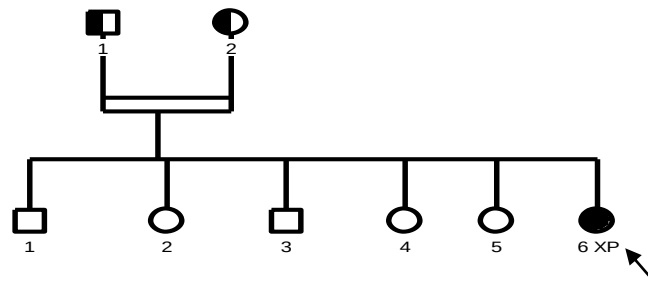
Famille 6



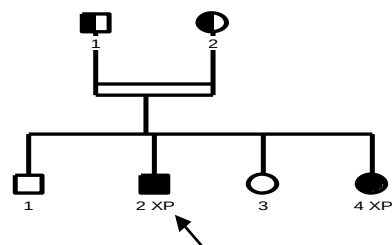
Famille 7



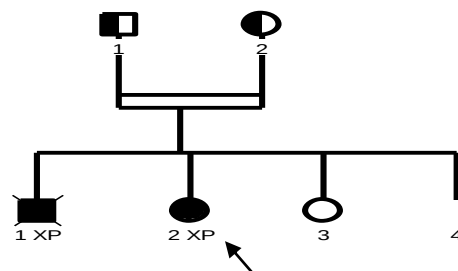
Famille 8



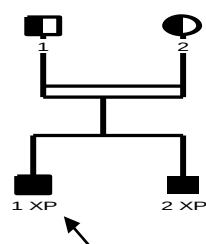
Famille 9



Famille 10

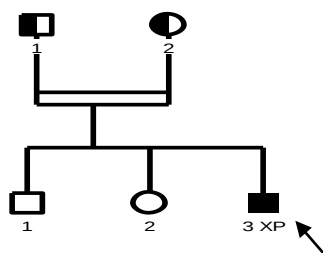


Famille 11

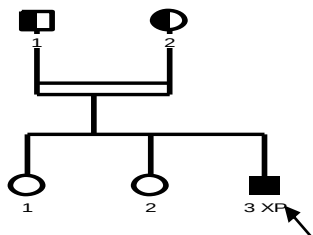




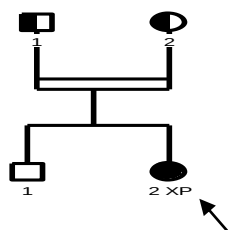
Famille 12



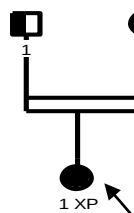
Famille 13



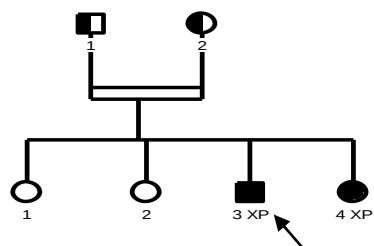
Famille 14



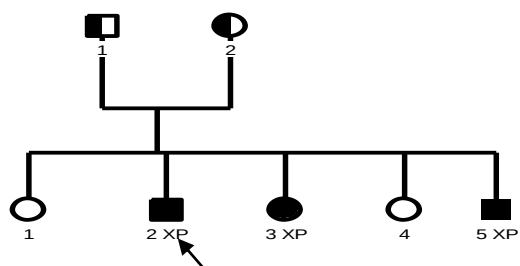
Famille 15



Famille 16

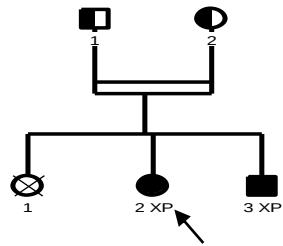


Famille 17

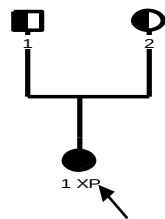




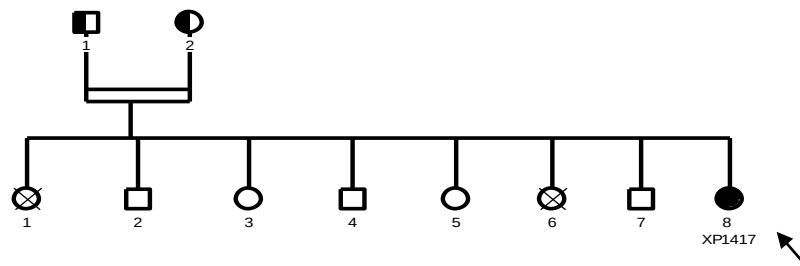
Famille 18



Famille 19



Famille du pateint XP1417





Annexe 04 : information sur le patient XP1417

Le patient XP1417 : est suspecté d'atteinte XP en présence d'une photophobie avec de légères atteintes cutanées (absence de tumeurs cutanées).

Exploration d'une région du gène *XPV* :

Après l'obtention d'un résultat négatif pour les deux mutations (delTG et R228X) citées précédemment, nous avons procédé à la recherche des mutations fréquentes connues au niveau des exons 10 et 11 du gène *XPV* (figure 01).

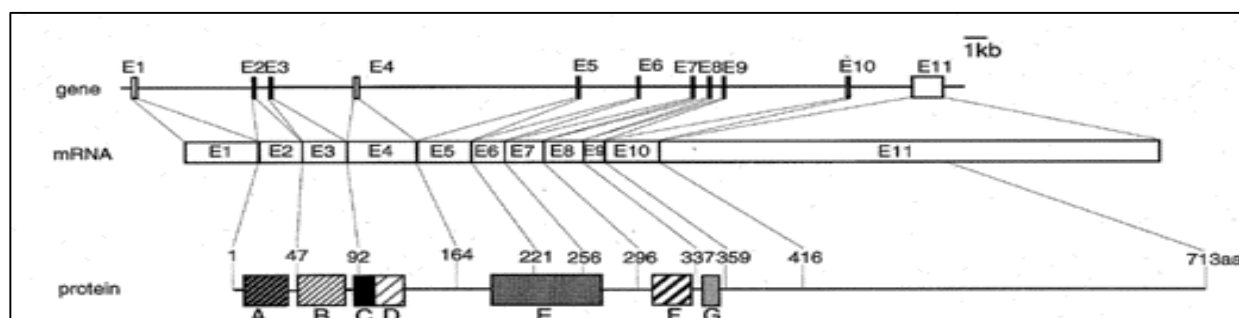


Figure 01 : Structure du gène *XPV* et son produit.

Choix des amorces :

	Séquences	Taille de l'amplicon	Région
Amorce 10S	3'GTACCTAGAATTCAGATGCTC5'	285pb	Exon 10
Amorce 10AS	5'CAGAGCTAAGAATCATCATC3'		
Amorce 11S.a	3'CTGTGGCAGAACCAGAATGC5'	664pb	Exon 11
Amorce 11AS.a	5'TAGCTTCGACACCCCTTCAC3'		
Amorce 11S.b	3'CCATGGTCCAACGTAAAGC5'	636pb	Exon 11
Amorce 11AS.b	5'AAGAGATGGGACCGTAACTC3'		

Amplification :

L'ADN génomique, concentré à 50 ng/μl, a été amplifié dans un mélange réactionnel d'un volume final de 50 μl contenant 1X du tampon de PCR, 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 10 pmol de chaque amorce, et une unité (U) de *Taq* polymérase (Invitrogen).



Programme PCR :

Nombre de cycle		Température	Temps
1cycle (dénaturation)		95°C	10 min
10 cycles -0.5°C par cycle	Dénaturation Hybridation Elongation	95 °C 60 à 55°C 72°C	30s 30s 45s ou 1 min 30s
25 cycles	Dénaturation Hybridation Elongation	95 °C 55 °C 72°C	30s 30s 45s ou 1 min 30s
1 cycle (élongation)		72°C	5min
1 cycle (arrêt)		8°C	1 min

Résultat de l'amplification :

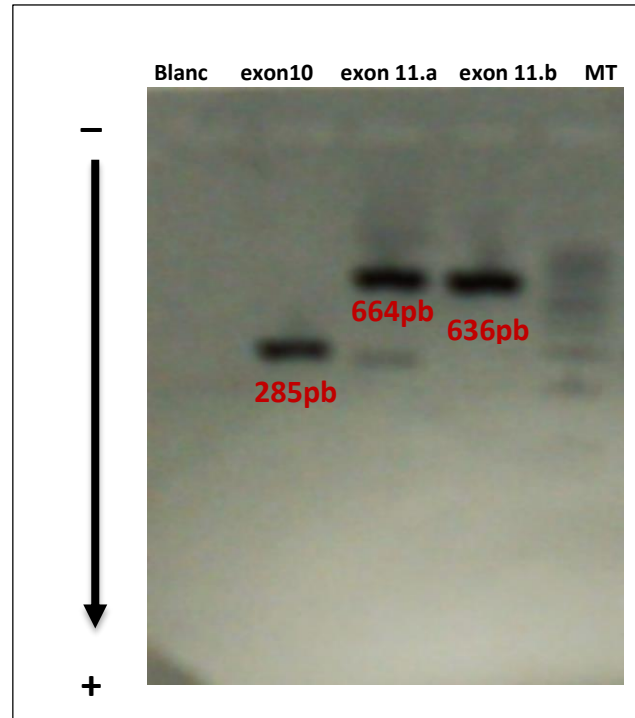


Figure 02 : test d'amplification des exons 10 et 11 du gène *XPV*.

Blanc : témoin négatif.MT : marqueur de taille de 100pb

**Annexe 05 : Extraction de l'ADN par le kit Stratagene****Jour 1**

- Décongeler les prélèvements à **température ambiante du laboratoire**
- Compléter avec la Solution de Lyse des Rouges (SLR) 1X jusqu'à 30 ml
- Mélanger par retournements
- **Agitation 10 mn sur le Rotamix, de 20 trs/mn**, ou agiter très violemment
- Mettre dans la glace pendant 15min
- **Centrifuger 6 mn à 4°C, 3000 trs/min**
- Vider le surnageant
- Recommencer 1 ou 2 fois le lavage (mettre dans la glace à chaque fois ; le temps que la centrifugation d'une série d'échantillons soit terminée)
- vider le surnageant
- Laver les culots avec la 15 ml de la solution suivante (une fois) :
 - ✓ 2.5 ml de la solution 1 du kit
 - ✓ 5 ml d'eau
 - ✓ 7.5 ml de SLR 1X
- Agitation sur **le rotamix pendant 10 mn, ou agiter très violemment**
- Centrifuger **6 mn à 4°C, à vitesse maximale entre 5300 trs/min et 6000 trs/min**
Refaire un lavage si nécessaire
- **Vider les surnageants** (au maximum, si le culot ne se détache pas retourner le falcon sur papier)
- Reprendre les culots avec **1,5 ml de solution 2**
- Ajouter **4 µl de pronase** (protéinase K 225ng/µl)
- **Remise en suspension des culots** avec une **pipette Pasteur** stérile
- **Incuber une nuit à 37°C, au bain-marie**

Jour 2

- Laisser les tubes **15 min à température ambiante**
- Mettre les tubes **10mn dans la glace**
- Ajouter **500µl de solution 3** dans chaque Falcon
- **Agiter et bien homogénéiser**, laissez **dans la glace** pendant environ **30 min**
- Répartir **1.5 ml / eppendorf**
- Centrifuger **15 mn à 4°C, 10000 trs/min**



- Mettre **2 µl de Rnase** (à -20°C) dans **falcon 15ml**
- **Transférer les surnageants dans les falcons contenant la Rnase et agiter**
- Incuber **15 mn** à 37°C , au **bain marie**
- Ajouter **4 ml d'éthanol absolu** à -20°C
- **Agiter doucement** par retournements
- **Laver les méduses** à l'aide d'une pipette pasteur dans deux bains **d'éthanol à 70°**
- puis un bain **d'éthanol absolu**
- Déposer la **méduse dans un eppendorf**
- **Sécher pendant 30 mn**
- Réhydrater par du **TE 1X** (entre 100 et 400 µl, selon la taille de la méduse. Tapoter l'eppendorf pour agiter).
- Laisser se réhydrater à **4°** .



HAUTE AUTORITÉ DE SANTÉ

LISTE DES ACTES ET PRESTATIONS - AFFECTION DE LONGUE DURÉE

XERODERMA PIGMENTOSUM

PROTOCOLE NATIONAL DE DIAGNOSTIC ET DE SOINS
POUR UNE MALADIE RARE

Actualisation juillet 2009

Ce document est téléchargeable sur
www.has-sante.fr

Haute Autorité de Santé
2 avenue du Stade de France - F 93218 Saint-Denis La Plaine CEDEX
Tél. :+33 (0)1 55 93 70 00 - Fax :+33 (0)1 55 93 74 00



Sommaire

1.	Avertissement.....	4
2.	Liste des actes et prestations.....	5
2.1	Actes médicaux et paramédicaux	5
2.2	Biologie	7
2.3	Actes techniques.....	8
2.4	Traitements	9
2.5	Dispositifs	10

Mise à jour des PNDS / ALD

Le Protocole National de Diagnostic et de Soins (PNDS) pour le Xeroderma pigmentosum a été élaboré par le centre de référence labellisé, avec le soutien méthodologique de la Haute Autorité de Santé (HAS), en application des dispositions du Plan national maladies rares 2005–2008.

Dans le cadre de sa mission relative aux affections de longue durée, la HAS valide le PNDS. Ce dernier ainsi que la liste des actes et prestations (LAP) qui en découle sont révisés tous les 3 ans. Dans l'intervalle, la LAP est actualisée au minimum une fois par an et disponible sur le site internet de la HAS (www.has-sante.fr).

1. Avertissement

La loi n° 2004-810 du 13 août 2004 relative à l'assurance maladie, a créé la Haute Autorité de santé et a précisé ses missions, notamment dans le domaine des affections de longue durée (article R.161-71 du code de la sécurité sociale).

En son article 6, elle modifie l'article L.322-3 du code de la sécurité sociale qui définit les circonstances d'exonération du ticket modérateur pour l'assuré et, l'article L.324-1 du même code qui précise les obligations en cas d'affection de longue durée, notamment celle d'établir un protocole de soins de façon conjointe, entre le médecin et le médecin conseil de la sécurité sociale. Ce protocole est signé par le patient ou son représentant légal.

Conformément à ses missions, fixées par le décret n°2004-1139 du 26 octobre 2004, la Haute Autorité de santé formule des recommandations sur les actes et prestations nécessités par le traitement des affections mentionnées à l'article L.324-1 pour lesquelles la participation de l'assuré peut-être limitée ou supprimée, en application du 3° de l'article L.322-3.



2. Liste des actes et prestations

2.1 Actes médicaux et paramédicaux

Professionnels	Situations particulières
Médecin généraliste	Tous les patients en coordination avec le centre de référence
Dermatologue, dermatologue pédiatrique, pédiatre	Tous les patients, bilan initial, suivi, événements intercurrents
Généticien, biologiste agréé	Nourrissons, enfants et adolescents Pour génotypage
Ophthalmologue	Tous les patients, bilan initial, suivi, événements intercurrents Si traitement par rétinoïde
Neurologue	Si atteinte neurologique Bilan initial si groupes de complémentation A, B, D et G
Chirurgien	Si atteinte cutanée néoplasique et/ou séquelle Si néoplasie oculaire
Autre spécialiste (Hématologue, ORL, stomatologue)	En fonction des complications
Radiothérapeute	Après discussion pluridisciplinaire En conformité avec le Plan cancer Si atteinte néoplasique, cutanée et/ou autre
Cancérologue	Après discussion pluridisciplinaire En conformité avec le Plan cancer Si atteinte néoplasique, cutanée et/ou autre
Anesthésiste	Si intervention chirurgicale
Masseur-kinésithérapeute	En fonction des séquelles, fonctionnelles, neurologiques...
Infirmier(ère)	Si traitement à domicile en coordination avec le centre de référence
Psychiatre	Si nécessaire, selon la prise en charge psychologique
Psychologue	Tous les patients (prestation dont le remboursement n'est possible que dans le cadre de structure hospitalière et de réseaux)

Professionnels	Situations particulières
Psychomotricien	Si nécessaire, selon la prise en charge psychologique (prestation dont le remboursement n'est possible que dans le cadre de structure hospitalière et de réseaux)
Ergothérapeute	Adaptation au domicile Si forme neurologique (prestation dont le remboursement n'est possible que dans le cadre de structure hospitalière et de réseaux)
Orthophoniste	En fonction des complications

L'éducation thérapeutique constitue une dimension de l'activité de certains professionnels. Elle doit veiller à l'implication du patient (et de sa famille chez l'enfant) ayant une maladie Xeroderma pigmentosum : intelligibilité de sa maladie, maîtrise des gestes techniques et aménagement du mode de vie. Elle comporte :

- Une information, qui porte sur la connaissance de la maladie, les thérapeutiques disponibles, les effets indésirables possibles des traitements reçus par le patient, les signes d'aggravation motivant une consultation spécialisée, la planification des examens de routine ou de dépistage de complications éventuelles et leurs résultats.
- Un apprentissage des gestes techniques.
- Une éducation physique et/ou une pratique sportive adaptée.

Ces actions d'éducation thérapeutique requièrent le concours de différents professionnels de santé, qui peuvent intervenir au moyen d'actes individuels auprès des patients ou par une éducation de groupe. La coordination des différents professionnels est préférable à la juxtaposition d'interventions isolées.



2.2 Biologie

Examens	Situations particulières
Unscheduled DNA synthesis	Pour tous les patients Acte hors NABM dont la prise en charge est possible dans le cadre des centres de référence
Génotype	Détermination du génotype chez certains patients Acte hors NABM dont la prise en charge est possible dans le cadre des centres de référence
Examens biologiques de suivi	Si radiothérapie, chimiothérapie. Selon suivi recommandé (cf. recommandations HAS, cancers cutanés)
Hémogramme y compris plaquettes	Tous les patients, 2 fois par an
Bilan phosphocalcique	Tous les patients, une fois par an

NABM : Nomenclature des actes de biologie médicale

2.3 Actes techniques

Actes	Situations particulières
Imagerie (Tomodensitométrie, IRM...)	Selon symptômes, sur avis spécialisé (dermatologue, neurologue, ophtalmologue...) Bilan d'extension, de récurrence
Audiogramme	Selon contexte Bilan initial (si groupes de complémentation A, B, D et G) Suivi si atteinte
Électroencéphalogramme	Si forme neurologique
Potentiels évoqués	Si forme neurologique
Électromyogramme	Si forme neurologique
Biopsie neuromusculaire	Si forme neurologique
Examen ophtalmologique du segment antérieur	Selon contexte



2.4 Traitements

Traitements pharmacologiques 1	Situations particulières
Vitamine D	Tous les patients
5 fluoro-uracile topique	Si lésion précancéreuse cutanée
Aminolévulinate de méthyle	Si lésion précancéreuse cutanée
Imiquimod 5 %	Sur avis spécialisé (pour carcinome basocellulaire)
Topiques cicatrisants ou vitaminiques	Si troubles trophiques de la cornée
Autres traitements	Situations particulières
Produits topiques de protection solaire sous forme de crème, indice de protection 50+	Tous les patients (prestation dont le remboursement n'est pas prévu par la législation). « En instance d'admission au remboursement à titre dérogatoire article L.162-17-2-1, l'inscription définitive à ce titre ne devant intervenir qu'une fois l'arrêté publié »
Larmes artificielles ou gels	Tous les patients
Émoullients cutanés	Tous les patients
Cryothérapie	Si lésions pré-épithéliomateuses
Dermabrasion	Sur avis spécialisé, accord préalable
Photothérapie dynamique	Sur avis spécialisé, accord préalable

1 Les guides mentionnent généralement une classe thérapeutique. Le prescripteur doit s'assurer que les médicaments prescrits appartenant à cette classe disposent d'une indication validée par une autorisation de mise sur le marché (AMM).

2.5 Dispositifs

Dispositifs et autres matériels	Situations particulières
Lunettes de soleil couvrantes	Tous les patients (prestation dont le remboursement n'est pas prévu par la législation) « En instance d'admission au remboursement à titre dérogatoire article L.162-17-2-1, l'inscription définitive à ce titre ne devant intervenir qu'une fois l'arrêté publié »
Filtres anti-UV	Tous les patients (prestation dont le remboursement n'est pas prévu par la législation)
Protection vestimentaire Masque Gants	Tous les patients (prestation dont le remboursement n'est pas prévu par la législation) « En instance d'admission au remboursement à titre dérogatoire article L.162-17-2-1, l'inscription définitive à ce titre ne devant intervenir qu'une fois l'arrêté publié »
Sources lumineuses sans UV	Tous les patients (prestation dont le remboursement n'est pas prévu par la législation)
Dosimètre	Tous les patients (prestation dont le remboursement n'est pas prévu par la législation)



Dans le cas d'une prescription hors AMM, celle-ci doit faire l'objet d'une information complémentaire spécifique pour le patient.



HAS

Toutes les publications de l'HAS sont téléchargeables sur
www.has-sante.fr

Références bibliographiques



A

Adimoolam S, Ford JM (2002) p53 and DNA damage-inducible expression of the xeroderma pigmentosum group C gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**: 12985-12990

Ahnesorg P, Smith P, Jackson SP (2006) XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell* **124**: 301-313

Ali J, Mukasa Y, Coulson I (2009) Xeroderma pigmentosum: early diagnostic features and an adverse consequence of photoprotection. *Clinical and experimental dermatology* **34**: 442-443

Andressoo J-O, Hoeijmakers JH, Mitchell JR (2006) Nucleotide excision repair disorders and the balance between cancer and aging. *Cell cycle* **5**: 2886-2888

Araki M, Masutani C, Takemura M, Uchida A, Sugawara K, Kondoh J, Ohkuma Y, Hanaoka F (2001) Centrosome protein centrin 2/caltractin 1 is part of the xeroderma pigmentosum group C complex that initiates global genome nucleotide excision repair. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 18665-18672

Arase S, Kozuka T, Tanaka K, Ikenaga M, Takebe H (1979) A sixth complementation group in xeroderma pigmentosum. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **59**: 143-146

Araújo SJ, Tirode F, Coin F, Pospiech H, Syväoja JE, Stucki M, Hübscher U, Egly J-M, Wood RD (2000) Nucleotide excision repair of DNA with recombinant human proteins: definition of the minimal set of factors, active forms of TFIIH, and modulation by CAK. *Genes & development* **14**: 349-359

Arlett CF, Plowman PN, Rogers P, Parris C, Abbaszadeh F, Green M, McMillan T, Bush C, Foray N, Lehmann A (2014) Clinical and cellular ionizing radiation sensitivity in a patient with xeroderma pigmentosum. *The British journal of radiology*



Asahina H, Kuraoka I, Shirakawa M, Morita EH, Miura N, Miyamoto I, Ohtsuka E, Okada Y, Tanaka K (1994) THE XPA PROTEIN IS A ZINC METALLOPROTEIN WITH AN ABILITY TO RECOGNIZE VARIOUS KINDS OF DNA-DAMAGE. *Mutation Research-DNA Repair* **315**: 229-237

B

Barnaby JW, Styles AR, Cockerell CJ (1997) Actinic Keratoses. *Drugs & aging* **11**: 186-205

Bartels CL, Lambert MW (2007) Domains in the XPA protein important in its role as a processivity factor. *Biochemical and biophysical research communications* **356**: 219-225

Batty DP, Wood RD (2000) Damage recognition in nucleotide excision repair of DNA. *Gene* **241**: 193-204

Beard WA, Prasad R, Wilson SH (2006) Activities and mechanism of DNA polymerase β . *Methods in enzymology* **408**: 91-107

Ben Rekaya M, Jerbi M, Messaoud O, Ben Brick AS, Zghal M, Mbarek C, Chadli-Debbiche A, Jones M, Mokni M, Boussen H (2013) Further Evidence of Mutational Heterogeneity of the XPC Gene in Tunisian Families: A Spectrum of Private and Ethnic Specific Mutations. *BioMed research international* **2013**

Ben Rekaya M, Messaoud O, Talmoudi F, Noura S, Ouragini H, Amouri A, Boussen H, Boubaker S, Mokni M, Mokthar I, Abdelhak S, Zghal M (2009) High frequency of the V548A fs X572 XPC mutation in Tunisia: implication for molecular diagnosis. *Journal of Human Genetics* **54**: 426-429

Bennett RA, Wilson DM, Wong D, Demple B (1997) Interaction of human apurinic endonuclease and DNA polymerase β in the base excision repair pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**: 7166-7169



Beogo R, Andonaba J, Bouletreau P, Sawadogo HT, Traore A (2012) Xeroderma pigmentosum révélé par des carcinomes épidermoïdes multiples de la face chez un enfant. *Revue de Stomatologie et de Chirurgie Maxillo-faciale* **113**: 50-52

Bernerd F, Asselineau D, Sarazin A, Magnaldo T (2001a) Reconstruction in vitro de peau de patients atteints de xeroderma pigmentosum.

Bernerd F, Asselineau D, Vioux C, Chevallier-Lagente O, Bouadjar B, Sarasin A, Magnaldo T (2001b) Clues to epidermal cancer proneness revealed by reconstruction of DNA repair-deficient xeroderma pigmentosum skin in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**: 7817-7822

Bolderson E, Tomimatsu N, Richard DJ, Boucher D, Kumar R, Pandita TK, Burma S, Khanna KK (2009) Phosphorylation of Exo1 modulates homologous recombination repair of DNA double-strand breaks. *Nucleic acids research*: gkp1164

Bomgardner RD, Lupardus PJ, Soni DV, Yee MC, Ford JM, Cimprich KA (2006) Opposing effects of the UV lesion repair protein XPA and UV bypass polymerase η on ATR checkpoint signaling. *The EMBO Journal* **25**: 2605-2614

Bootsma D, Kraemer KH, Cleaver JE, Hoeijmakers JH (1998) Nucleotide excision repair syndromes: xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome, and trichothiodystrophy. *The genetic basis of human cancer* **2**: 211-237

Bradsher J, Auriol J, de Santis LP, Iben S, Vonesch J-L, Grummt I, Egly J-M (2002) CSB is a component of RNA pol I transcription. *Molecular Cell* **10**: 819-829

Bregman DB, Halaban R, Van Gool AJ, Henning KA, Friedberg EC, Warren SL (1996) UV-induced ubiquitination of RNA polymerase II: a novel modification deficient in Cockayne syndrome cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**: 11586-11590

Bridges BA (1998) UV-induced mutations and skin cancer: how important is the link? *Mutat Res* **422**: 23-30



Broughton BC, Cordonnier A, Kleijer WJ, Jaspers NG, Fawcett H, Raams A, Garritsen VH, Stary A, Avril M-F, Boudsocq F (2002) Molecular analysis of mutations in DNA polymerase η in xeroderma pigmentosum-variant patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**: 815-820

Brown TC, Jiricny J (1987) A specific mismatch repair event protects mammalian cells from loss of 5-methylcytosine. *Cell* **50**: 945-950

Brugmans L, Kanaar R, Essers J (2007) Analysis of DNA double-strand break repair pathways in mice. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **614**: 95-108

Brzezinski P (2012) Cryotherapy as a alternative treatment in keratoakanthoma. Own experienc. *Dermatologia Praktyczna* **22**

Budd ME, Campbell JL (1995) DNA polymerases required for repair of UV-induced damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **15**: 2173-2179

Buterin T, Meyer C, Giese B, Naegeli H (2005) DNA quality control by conformational readout on the undamaged strand of the double helix. *Chemistry & biology* **12**: 913-922

C

Cadet J, Douki T, Frelon S, Sauvaigo S, Pouget J-P, Ravanat J-L (2002) Assessment of oxidative base damage to isolated and cellular DNA by HPLC-MS/MS measurement 1, 2. *Free Radical Biology and Medicine* **33**: 441-449

Cadet J, Douki T, Gasparutto D, Ravanat J-L (2003) Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **531**: 5-23

Cai L, Roginskaya M, Qu Y, Yang Z, Xu Y, Zou Y (2007) Structural characterization of human RPA sequential binding to single-stranded DNA using ssDNA as a molecular ruler. *Biochemistry* **46**: 8226-8233



Camenisch U, Dip R, Vitanescu M, Naegeli H (2007) Xeroderma pigmentosum complementation group A protein is driven to nucleotide excision repair sites by the electrostatic potential of distorted DNA. *DNA Repair* **6**: 1819-1828

Cannell JJ, Hollis BW (2008) Use of vitamin D in clinical practice. *Alternative Medicine Review* **13**: 6

Carreau M, Eveno E, Quilliet X, Chevalier-Lagente O, Benoit A, Tanganelli B, Stefanini M, Vermeulen W, Hoeijmakers JH, Sarasin A (1995) Development of a new easy complementation assay for DNA repair deficient human syndromes using cloned repair genes. *Carcinogenesis* **16**: 1003-1009

Cartault F, Nava C, Malbrunot A-C, Munier P, Hebert J-C, N'guyen P, Djeridi N, Pariaud P, Pariaud J, Dupuy A (2011) A new XPC gene splicing mutation has lead to the highest worldwide prevalence of xeroderma pigmentosum in black Mahori patients. *DNA Repair* **10**: 577-585

Cavallini B, Huet J, Plassat J-L, Sentenac A, Egly J-M (1988) A yeast activity can substitute for the HeLa cell TATA box factor.

Chavanne F, Broughton BC, Pietra D, Nardo T, Browitt A, Lehmann AR, Stefanini M (2000) Mutations in the XPC gene in families with xeroderma pigmentosum and consequences at the cell, protein, and transcript levels. *Cancer Research* **60**: 1974-1982

Chen DS, Herman T, Demple B (1991) Two distinct human DNA diesterases that hydrolyze 3'-blocking deoxyribose fragments from oxidized DNA. *Nucleic acids research* **19**: 5907-5914

Chen Z, Yang J, Wang G, Song B, Li J, Xu Z (2007) Attenuated expression of xeroderma pigmentosum group C is associated with critical events in human bladder cancer carcinogenesis and progression. *Cancer Research* **67**: 4578-4585

Christmann M, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B (2003) Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* **193**: 3-34



Cleaver EJ (1997) The DNA damage-recognition problem in human and other eukaryotic cells: the XPA damage binding protein. *Biochemical Journal* **328**: 1-12

Cleaver J (1968) Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum.

Cleaver J (1972) Xeroderma pigmentosum: variants with normal DNA repair and normal sensitivity to ultraviolet light. *Journal of Investigative Dermatology* **58**: 124-128

Cleaver JE (2001) Xeroderma pigmentosum: the first of the cellular caretakers. *Trends in biochemical sciences* **26**: 398-401

Cleaver JE, Thompson LH, Richardson AS, States JC (1999) A summary of mutations in the UV-sensitive disorders: Xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome, and trichothiodystrophy. *Human Mutation* **14**: 9-22

Clement FC, Camenisch U, Fei J, Kaczmarek N, Mathieu N, Naegeli H (2010) Dynamic two-stage mechanism of versatile DNA damage recognition by xeroderma pigmentosum group C protein. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **685**: 21-28

Coin F, De Santis LP, Nardo T, Zlobinskaya O, Stefanini M, Egly J-M (2006) p8/TTD-A as a repair-specific TFIIH subunit. *Molecular Cell* **21**: 215-226

Coin F, Oksenyich V, Mocquet V, Groh S, Blattner C, Egly JM (2008) Nucleotide excision repair driven by the dissociation of CAK from TFIIH. *Molecular Cell* **31**: 9-20

Cooper GM, François C (1999) *La cellule: Une approche moléculaire*: De Boeck Supérieur.

Cordonnier AM, Fuchs RP (1999) Replication of damaged DNA: molecular defect in xeroderma pigmentosum variant cells. *Mutation Research/DNA Repair* **435**: 111-119

Cromie GA, Connelly JC, Leach DR (2001) Recombination at double-strand breaks and DNA ends: conserved mechanisms from phage to humans. *Molecular Cell* **8**: 1163-1174



D

D'Errico M, Parlanti E, Teson M, De Jesus BMB, Degan P, Calcagnile A, Jaruga P, Bjørås M, Crescenzi M, Pedrini AM (2006) New functions of XPC in the protection of human skin cells from oxidative damage. *The EMBO Journal* **25**: 4305-4315

Daboussi F, Zaslavskiy M, Poirot L, Loperfido M, Gouble A, Guyot V, Leduc S, Galetto R, Grizot S, Oficjalska D (2012) Chromosomal context and epigenetic mechanisms control the efficacy of genome editing by rare-cutting designer endonucleases. *Nucleic acids research* **40**: 6367-6379

Daya-Grosjean L, Sarasin A (2005) The role of UV induced lesions in skin carcinogenesis: an overview of oncogene and tumor suppressor gene modifications in xeroderma pigmentosum skin tumors. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **571**: 43-56

de Boer J, Hoeijmakers JH (2000) Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis* **21**: 453-460

de Laat WL, Jaspers NG, Hoeijmakers JH (1999) Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes & development* **13**: 768-785

De Sanctis C, Cacchione A (1932) L'idiozia xerodermica. *Riv Sper Freniatr* **56**: 1

De Weerd-Kastelein E, Keijzer W, Bootsma D (1972) Genetic heterogeneity of xeroderma pigmentosum demonstrated by somatic cell hybridization. *Nature* **238**: 80-83

Diasio RB, Harris BE (1989) Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. *Clin Pharmacokinet* **16**: 215-237

Dickerson RE, Geis I (1983) *Hemoglobin: structure, function, evolution, and pathology*, Vol. 1983: Benjamin-Cummings Publishing Company.

DiGiovanna JJ, Kraemer KH (2012) Shining a light on xeroderma pigmentosum. *Journal of Investigative Dermatology* **132**: 785-796



Dip R, Camenisch U, Naegeli H (2004) Mechanisms of DNA damage recognition and strand discrimination in human nucleotide excision repair. *DNA Repair* **3**: 1409-1423

Dollfus H, Porto F, Caussade P, Speeg-Schatz C, Sahel J, Grosshans E, Flament J, Sarasin A (2003) Ocular manifestations in the inherited DNA repair disorders. *Surv Ophthalmol* **48**: 107-122

Doubaj Y, LAARABI FZ, Chafai Elalaoui S, Barkat A, Sefiani A (2012) Carrier frequency of the recurrent mutation c. 1643_1644delTG in the XPC gene and birth prevalence of the xeroderma pigmentosum in Morocco. *The Journal of dermatology* **39**: 382-384

Dupuy A, Valton J, Leduc S, Armier J, Galetto R, Gouble A, Lebuhotel C, Stary A, Pâques F, Duchateau P (2013) Targeted gene therapy of xeroderma pigmentosum cells using meganuclease and TALEN™. *PLoS One* **8**: e78678

Duschinsky R, Pleven E, Heidelberger C (1957) THE SYNTHESIS OF 5-FLUOROPYRIMIDINES. *Journal of the American Chemical Society* **79**: 4559-4560

E

Egly J-M, Coin F (2011) A history of TFIIH: two decades of molecular biology on a pivotal transcription/repair factor. *DNA Repair* **10**: 714-721

Egly J (1993) Dernière heure: BTF2/TFII-H, un facteur général de transcription à activité hélicase est impliqué dans les réparatoses.

Épidémiologie O (2013) Syndrome myélodysplasique. *Goldman's Cecil Medicine Cancérologie*: 67

Essen L, Klar T (2006) Light-driven DNA repair by photolyases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* **63**: 1266-1277



Evans E, Moggs JG, Hwang JR, Egly JM, Wood RD (1997) Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors. *The EMBO Journal* **16**: 6559-6573

Everett KD, Andersen AA (1999) Identification of nine species of the Chlamydiaceae using PCR-RFLP. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **49**: 803-813

F

Fagbemi AF, Orelli B, Schärer OD (2011) Regulation of endonuclease activity in human nucleotide excision repair. *DNA Repair* **10**: 722-729

Fang EF, Scheibye-Knudsen M, Brace LE, Kassahun H, SenGupta T, Nilsen H, Mitchell JR, Croteau DL, Bohr VA (2014) Defective mitophagy in XPA via PARP-1 hyperactivation and NAD⁺/SIRT1 reduction. *Cell* **157**: 882-896

Fassihi H, Sethi M, Fawcett H, Wing J, Chandler N, Mohammed S, Craythorne E, Morley AM, Lim R, Turner S (2016) Deep phenotyping of 89 xeroderma pigmentosum patients reveals unexpected heterogeneity dependent on the precise molecular defect. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**: E1236-E1245

Fazaa B, Zghal M, Bailly C, Zeglaoui F, Goucha S, Mokhtar I, Kharfi M, Ezzine N, Kamoun MR (2001) Melanoma in xeroderma pigmentosum: 12 cases. *Annales De Dermatologie Et De Venereologie* **128**: 503-506

Feng S, Parrish DD, Lambert MW (1997) A processive versus a distributive mechanism of action correlates with differences in ability of normal and xeroderma pigmentosum group A endonucleases to incise damaged nucleosomal DNA. *Carcinogenesis* **18**: 279-286

Fousteri M, Mullenders LH (2008) Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. *Cell research* **18**: 73-84

Francis MA, Rainbow AJ (1999) UV-enhanced reactivation of a UV-damaged reporter gene suggests transcription-coupled repair is UV-inducible in human cells. *Carcinogenesis* **20**: 19-26



Friedberg EC (2001) How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nature Reviews Cancer* **1**: 22-33

Fromme JC, Verdine GL (2004) Base excision repair. *Advances in protein chemistry* **69**: 1-41

Fu T-J, Tse-Dinh Y-C, Seeman NC (1994) Holliday Junction Crossover Topology. *Journal of Molecular Biology* **236**: 91-105

Fujiwara Y, Masutani C, Mizukoshi T, Kondo J, Hanaoka F, Iwai S (1999) Characterization of DNA recognition by the human UV-damaged DNA-binding protein. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 20027-20033

Fung MK, Han H-Y, Leung SC, Cheung HW, Cheung AL, Wong Y-C, Ling M-T, Wang X (2008) MAD2 interacts with DNA repair proteins and negatively regulates DNA damage repair. *Journal of molecular biology* **381**: 24-34

G

Genschel J, Modrich P (2003) Mechanism of 5'-directed excision in human mismatch repair. *Molecular Cell* **12**: 1077-1086

Gerard M, Fischer L, Moncollin V, Chipoulet J-M, Chambon P, Egly J-M (1991) Purification and interaction properties of the human RNA polymerase B (II) general transcription factor BTF2. *Journal of Biological Chemistry* **266**: 20940-20945

Giannotti B, Vanzi L, Difonzo E, Pimpinelli N (2003) The treatment of basal cell carcinomas in a patient with xeroderma pigmentosum with a combination of imiquimod 5% cream and oral acitretin. *Clinical and experimental dermatology* **28**: 33-35

Giglia-Mari G, Coin F, Ranish JA, Hoogstraten D, Theil A, Wijgers N, Jaspers NG, Raams A, Argentini M, Van Der Spek P (2004) A new, tenth subunit of TFIIH is responsible for the DNA repair syndrome trichothiodystrophy group A. *Nature genetics* **36**: 714-719



Gillet LC, Schärer OD (2006) Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. *Chemical reviews* **106**: 253-276

Giustini S, Miraglia E, Berardesca E, Milani M, Calvieri S (2014) Preventive long-term effects of a topical film-forming medical device with ultra-high UV protection filters and DNA repair enzyme in Xeroderma Pigmentosum: A retrospective study of eight cases. *Case reports in dermatology* **6**: 222-226

Graham JM, Anyane-Yeboa K, Raams A, Appeldoorn E, Kleijer WJ, Garritsen VH, Busch D, Edersheim TG, Jaspers NG (2001) Cerebro-Oculo-Facio-Skeletal Syndrome with a Nucleotide Excision–Repair Defect and a Mutated XPD Gene, with Prenatal Diagnosis in a Triplet Pregnancy. *The American Journal of Human Genetics* **69**: 291-300

GRAM GJ, NIELSEN SD, HANSEN J-ES (1998) Spontaneous silencing of humanized green fluorescent protein (hGFP) gene expression from a retroviral vector by DNA methylation. *Journal of hematotherapy* **7**: 333-341

Griffiths AJ (2006) *Introduction à l'analyse génétique*: De Boeck Supérieur.

Gunz D, Hess MT, Naegeli H (1996) Recognition of DNA adducts by human nucleotide excision repair Evidence for a thermodynamic probing mechanism. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 25089-25098

H

Hall H, Gurský J, Nicodemou A, Rybanská I, Kimlíčková E, Piršel M (2006) Characterization of ERCC3 mutations in the Chinese hamster ovary 27-1, UV24 and MMC-2 cell lines. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **593**: 177-186

Hananian J, Cleaver J (1980) Xeroderma pigmentosum exhibiting neurological disorders and systemic lupus erythematosus. *Clinical genetics* **17**: 39-45

Hanawalt PC (2002) Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. *oncogene* **21**: 8949-8956



Hanawalt PC, Spivak G (2008) Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. *Nature reviews Molecular cell biology* **9**: 958-970

Heidelberger C, Ghobar A, Baker RK, Mukherjee KL (1960) Studies on Fluorinated Pyrimidines X. In Vivo Studies on Tumor Resistance. *Cancer Research* **20**: 897-902

Henning KA, Li L, Iyer N, McDaniel LD, Reagan MS, Legerski R, Schultz RA, Stefanini M, Lehmann AR, Mayne LV (1995) The Cockayne syndrome group A gene encodes a WD repeat protein that interacts with CSB protein and a subunit of RNA polymerase II TFIIH. *Cell* **82**: 555-564

Hermanson-Miller IL, Turchi JJ (2002) Strand-specific binding of RPA and XPA to damaged duplex DNA. *Biochemistry* **41**: 2402-2408

Heyer W-D, Li X, Rolfsmeier M, Zhang X-P (2006) Rad54: the Swiss Army knife of homologous recombination? *Nucleic acids research* **34**: 4115-4125

Hirai Y, Kodama Y, Moriwaki S-I, Noda A, Cullings HM, MacPhee DG, Kodama K, Mabuchi K, Kraemer KH, Land CE, Nakamura N (2006) Heterozygous individuals bearing a founder mutation in the XPA DNA repair gene comprise nearly 1% of the Japanese population. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **601**: 171-178

Hoeijmakers JH (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* **411**: 366-374

Hollander MC, Philburn RT, Patterson AD, Velasco-Miguel S, Friedberg EC, Linnoila RI, Fornace AJ (2005) Deletion of XPC leads to lung tumors in mice and is associated with early events in human lung carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 13200-13205

Hsieh P (2001) Molecular mechanisms of DNA mismatch repair. *Mutation Research/DNA Repair* **486**: 71-87



Hu Z, Wang Y, Wang X, Liang G, Miao X, Xu Y, Tan W, Wei Q, Lin D, Shen H (2005) DNA repair gene XPC genotypes/haplotypes and risk of lung cancer in a Chinese population. *International journal of cancer* **115**: 478-483

Huang J, Dynan WS (2002) Reconstitution of the mammalian DNA double-strand break end-joining reaction reveals a requirement for an Mre11/Rad50/NBS1-containing fraction. *Nucleic acids research* **30**: 667-674

Hwang JR, Moncollin V, Vermeulen W, Seroz T, van Vuuren H, Hoeijmakers JH, Egly JM (1996) A 3'→ 5' XPB helicase defect in repair/transcription factor TFIIH of xeroderma pigmentosum group B affects both DNA repair and transcription. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 15898-15904

I

Itin PH, Sarasin A, Pittelkow MR (2001) Trichothiodystrophy: update on the sulfur-deficient brittle hair syndromes. *Journal of the American Academy of Dermatology* **44**: 891-924

Ito S, Kuraoka I, Chymkowitch P, Compe E, Takedachi A, Ishigami C, Coin F, Egly J-M, Tanaka K (2007) XPG stabilizes TFIIH, allowing transactivation of nuclear receptors: implications for Cockayne syndrome in XP-G/CS patients. *Molecular Cell* **26**: 231-243

Itoh M, Hayashi M, Shioda K, Minagawa M, Isa F, Tamagawa K, Morimatsu Y, Oda M (1999) Neurodegeneration in hereditary nucleotide repair disorders. *Brain Dev* **21**: 326-333

J

Johnson RE, Kondratick CM, Prakash S, Prakash L (1999) hRAD30 mutations in the variant form of xeroderma pigmentosum. *Science* **285**: 263-265

Jones CJ, Cleaver JE, Wood RD (1992) Repair of damaged DNA by extracts from a xeroderma pigmentosum complementation group A revertant and expression of a protein absent in its parental cell line. *Nucleic acids research* **20**: 991-995



Jones CJ, Wood RD (1993) Preferential binding of the xeroderma pigmentosum group A complementing protein to damaged DNA. *Biochemistry* **32**: 12096-12104

Jun SH, Kim TG, Ban C (2006) DNA mismatch repair system. *FEBS Journal* **273**: 1609-1619

K

Kadyrov FA, Dzantiev L, Constantin N, Modrich P (2006) Endonucleolytic function of MutL α in human mismatch repair. *Cell* **126**: 297-308

Kanaar R, Hoeijmakers JH, van Gent DC (1998) Molecular mechanisms of DNA double-strand break repair. *Trends in cell biology* **8**: 483-489

Kanda T, Oda M, Yonezawa M, Tamagawa K, Isa F, Hanakago R, Tsukagoshi H (1990) Peripheral neuropathy in xeroderma pigmentosum. *Brain* **113**: 1025-1044

Kannouche P, Strydom A (2003) Xeroderma pigmentosum variant and error-prone DNA polymerases. *Biochimie* **85**: 1123-1132

Kapetanaki MG, Guerrero-Santoro J, Bisi DC, Hsieh CL, Rapić-Otrin V, Levine AS (2006) The DDB1-CUL4A/DDB2 ubiquitin ligase is deficient in xeroderma pigmentosum group E and targets histone H2A at UV-damaged DNA sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 2588-2593

Kaposi M, Hebra F (1875) On diseases of the skin, including the exanthemata. *London: New Sydenham Society*

Karimi-Busheri F, Daly G, Robins P, Canas B, Pappin DJ, Sgouros J, Miller GG, Fakhrai H, Davis EM, Le Beau MM (1999) Molecular characterization of a human DNA kinase. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 24187-24194

Keijzer W, Jaspers N, Abrahams P, Taylor A, Arlett C, Zelle B, Takebe H, Kinmont P, Bootsma D (1979) A seventh complementation group in excision-deficient xeroderma pigmentosum. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **62**: 183-190



Khader A, Gritli S, Boussen I, Oueslati Z, Ferjaoui M, Noura R, Ladgham A, Boussen H (2005) [Topical and systemic chemotherapy with 5-fluorouracil in facial carcinoma secondary to xeroderma pigmentosum]. *La Tunisie médicale* **83**: 672-674

Khan SG, Levy HL, Legerski R, Quackenbush E, Reardon JT, Emmert S, Sancar A, Li L, Schneider TD, Cleaver JE (1998) Xeroderma Pigmentosum Group C Splice Mutation Associated with Autism and Hypoglycinemia1. *Journal of Investigative Dermatology* **111**: 791-796

Khan SG, Muniz-Medina V, Shahlavi T, Baker CC, Inui H, Ueda T, Emmert S, Schneider TD, Kraemer KH (2002) The human XPC DNA repair gene: arrangement, splice site information content and influence of a single nucleotide polymorphism in a splice acceptor site on alternative splicing and function. *Nucleic acids research* **30**: 3624-3631

Khan SG, Oh K-S, Emmert S, Imoto K, Tamura D, DiGiovanna JJ, Shahlavi T, Armstrong N, Baker CC, Neuburg M (2009) XPC initiation codon mutation in xeroderma pigmentosum patients with and without neurological symptoms. *DNA Repair* **8**: 114-125

Khan SG, Oh KS, Shahlavi T, Ueda T, Busch DB, Inui H, Emmert S, Imoto K, Muniz-Medina V, Baker CC, DiGiovanna JJ, Schmidt D, Khadavi A, Metin A, Gozukara E, Slor H, Sarasin A, Kraemer KH (2006) Reduced XPC DNA repair gene mRNA levels in clinically normal parents of xeroderma pigmentosum patients. *Carcinogenesis* **27**: 84-94

Kleijer WJ, Laugel V, Berneburg M, Nardo T, Fawcett H, Gratchev A, Jaspers NG, Sarasin A, Stefanini M, Lehmann AR (2008) Incidence of DNA repair deficiency disorders in western Europe: Xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *DNA Repair* **7**: 744-750

Kobayashi T, Takeuchi S, Saijo M, Nakatsu Y, Tanaka K, Morioka H, Otsuka E, Wakasugi M, Nikaido O (1998) Mutational analysis of a function of xeroderma pigmentosum group A (XPA) protein in strand-specific DNA repair. *Nucleic acids research* **26**: 4662-4668



Köberle B, Roginskaya V, Wood RD (2006) XPA protein as a limiting factor for nucleotide excision repair and UV sensitivity in human cells. *DNA Repair* **5**: 641-648

Kraemer K (2003) Cellular hypersensitivity and DNA repair. *Fitzpatrick's dermatology in general medicine* (Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, eds): 351-358

Kraemer KH (1997) Sunlight and skin cancer: Another link revealed. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 11-14

Kraemer KH, DiGiovanna JJ *Xeroderma Pigmentosum*.

Kraemer KH, DiGiovanna JJ, Moshell AN, Tarone RE, Peck GL (1988) Prevention of skin cancer in xeroderma pigmentosum with the use of oral isotretinoin. *New England Journal of Medicine* **318**: 1633-1637

Kraemer KH, Lee M-M, Andrews AD, Lambert WC (1994) The role of sunlight and DNA repair in melanoma and nonmelanoma skin cancer: the xeroderma pigmentosum paradigm. *Archives of Dermatology* **130**: 1018-1021

Kraemer KH, Lee MM, Scotto J (1987) XERODERMA-PIGMENTOSUM - CUTANEOUS, OCULAR, AND NEUROLOGIC ABNORMALITIES IN 830 PUBLISHED CASES. *Archives of Dermatology* **123**: 241-250

Kulaksız G, Reardon JT, Sancar A (2005) Xeroderma pigmentosum complementation group E protein (XPE/DDB2): purification of various complexes of XPE and analyses of their damaged DNA binding and putative DNA repair properties. *Molecular and Cellular Biology* **25**: 9784-9792

Kuluncsics Z, Perdiz D, Brulay E, Muel B, Sage E (1999) Wavelength dependence of ultraviolet-induced DNA damage distribution: involvement of direct or indirect mechanisms and possible artefacts. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **49**: 71-80

L

Lacave R, Larsen CJ, Robert J (2005) *Cancérologie fondamentale*: John Libbey Eurotext.



Lahue R, Au K, Modrich P (1989) DNA mismatch correction in a defined system. *Science(Washington)* **245**: 160-164

Lai J-P, Liu Y-C, Alimchandani M, Liu Q, Aung PP, Matsuda K, Lee C-CR, Tsokos M, Hewitt S, Rushing EJ, Tamura D, Levens DL, DiGiovanna JJ, Fine HA, Patronas N, Khan SG, Kleiner DE, Oberholtzer JC, Quezado MM, Kraemer KH (2013) The influence of DNA repair on neurological degeneration, cachexia, skin cancer and internal neoplasms: autopsy report of four xeroderma pigmentosum patients (XP-A, XP-C and XP-D). *Acta Neuropathologica Communications* **1**: 4-4

Laine J-P, Egly J-M (2006) When transcription and repair meet: a complex system. *TRENDS in Genetics* **22**: 430-436

Lalle P, Nospikel T, Constantinou A, Thorel F, Clarkson SG (2002) The founding members of xeroderma pigmentosum group G produce XPG protein with severely impaired endonuclease activity. *Journal of Investigative Dermatology* **118**: 344-351

Lam C-W, Cheung KK-T, Luk N-M, Chan SW, Lo K-K, Tong S-F (2005) DNA-based diagnosis of xeroderma pigmentosum group C by whole-genome scan using single-nucleotide polymorphism microarray. *Journal of Investigative Dermatology* **124**: 87-91

Layher SK, Cleaver JE (1997) Quantification of XPA gene expression levels in human and mouse cell lines by competitive RT-PCR. *Mutation Research/DNA Repair* **383**: 9-19

Legerski R, Peterson C (1992) Expression cloning of a human DNA repair gene involved in xeroderma pigmentosum group C.

Lehmann A (1982) Three complementation groups in Cockayne syndrome. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **106**: 347-356



Lehmann A, Norris P (1989) DNA repair and cancer: speculations based on studies with xeroderma pigmentosum, Cockayne's syndrome and trichothiodystrophy. *Carcinogenesis* **10**: 1353-1356

Lehmann A, Stevens S (1980) A rapid procedure for measurement of DNA repair in human fibroblasts and for complementation analysis of xeroderma pigmentosum cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **69**: 177-190

Lehmann AR (2001) The xeroderma pigmentosum group D (XPD) gene: one gene, two functions, three diseases. *Genes & development* **15**: 15-23

Lehmann AR (2003) DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *Biochimie* **85**: 1101-1111

Lehmann AR (2005) Replication of damaged DNA by translesion synthesis in human cells. *FEBS letters* **579**: 873-876

Lehmann AR, Arlett CF, Broughton BC, Harcourt SA, Steingrimsdottir H, Stefanini M, Taylor AMR, Natarajan A, Green S, King MD (1988) Trichothiodystrophy, a human DNA repair disorder with heterogeneity in the cellular response to ultraviolet light. *Cancer Research* **48**: 6090-6096

Lehmann AR, McGibbon D, Stefanini M (2011) Xeroderma pigmentosum. *Orphanet J Rare Dis* **6**: 70

Lehmann J, Schubert S, Schäfer A, Laspe P, Haenssle H, Ohlenbusch A, Gratchev A, Emmert S (2015) A novel mutation in the XPA gene results in two truncated protein variants and leads to a severe XP/neurological symptoms phenotype. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* **29**: 2479-2482

Leibeling D, Laspe P, Emmert S (2006) Nucleotide excision repair and cancer. *Journal of molecular histology* **37**: 225-238

Lewin B, Sanlaville C (1998) *Gènes VI*: De Boeck Supérieur.



Li J, Uchida T, Todo T, Kitagawa T (2006) Similarities and Differences between Cyclobutane Pyrimidine Dimer Photolyase and (6-4) Photolyase as Revealed by Resonance Raman Spectroscopy ELECTRON TRANSFER FROM THE FAD COFACTOR TO ULTRAVIOLET-DAMAGED DNA. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 25551-25559

Li L, Lu X, Peterson C, Legerski R (1997) XPC interacts with both HHR23B and HHR23A in vivo. *Mutation Research/DNA Repair* **383**: 197-203

Lindahl T (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* **362**: 709-715

Lindahl T, Rydberg B, Hjelmgren T, Olsson M, Jacobsson A (1982) Cellular defense mechanisms against alkylation of DNA. In *Molecular and Cellular Mechanisms of Mutagenesis*, pp 89-102. Springer

Lindenbaum Y, Dickson D, Rosenbaum P, Kraemer K, Robbins J, Rapin I (2001) Xeroderma pigmentosum/cockayne syndrome complex: first neuropathological study and review of eight other cases. *European Journal of Paediatric Neurology* **5**: 225-242

Liu Y, Wang Y, Rusinol AE, Sinensky MS, Liu J, Shell SM, Zou Y (2008) Involvement of xeroderma pigmentosum group A (XPA) in progeria arising from defective maturation of prelamin A. *The FASEB Journal* **22**: 603-611

Lodish H, Darnell JE, François C (1997) *Biologie moléculaire de la cellule*: De Boeck Université.

Lommel L, Ortolan T, Chen L, Madura K, Sweder KS (2002) Proteolysis of a nucleotide excision repair protein by the 26S proteasome. *Current genetics* **42**: 9-20

Lu C-C, Chen Y-C, Wang J-T, Yang P-W, Chen M-R (2007) Xeroderma pigmentosum C is involved in Epstein–Barr virus DNA replication. *Journal of General Virology* **88**: 3234-3243

Lubin A, Zhang L, Chen H, White VM, Gong F (2013) A human XPC protein interactome—a resource. *International journal of molecular sciences* **15**: 141-158



M

MacInnes M, Dickson J, Hernandez R, Learmonth D, Lin G, Mudgett J, Park M, Schauer S, Reynolds R, Strniste G (1993) Human ERCC5 cDNA-cosmid complementation for excision repair and bipartite amino acid domains conserved with RAD proteins of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular and Cellular Biology* **13**: 6393-6402

Macpherson P, Humbert O, Karran P (1998) Frameshift mismatch recognition by the human MutS α complex. *Mutation Research/DNA Repair* **408**: 55-66

Mahindra P, DiGiovanna JJ, Tamura D, Brahim JS, Hornyak TJ, Stern JB, Lee C-CR, Khan SG, Brooks BP, Smith JA, Driscoll BP, Montemarano AD, Sugarman K, Kraemer KH (2008) Skin cancers, blindness, and anterior tongue mass in African brothers. *Journal of the American Academy of Dermatology* **59**: 881-886

Maillard O, Camenisch U, Blagoev KB, Naegeli H (2008) Versatile protection from mutagenic DNA lesions conferred by bipartite recognition in nucleotide excision repair. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **658**: 271-286

Mallery DL, Tanganelli B, Colella S, Steingrimsdottir H, van Gool AJ, Troelstra C, Stefanini M, Lehmann AR (1998) Molecular analysis of mutations in the CSB (ERCC6) gene in patients with Cockayne syndrome. *The American Journal of Human Genetics* **62**: 77-85

Martin P, Manley P, Depew W, Blakeman J (1987) Isotretinoin-associated proctosigmoiditis. *Gastroenterology* **93**: 606-609

Masutani C, Araki M, Sugasawa K, Van der Spek P, Yamada A, Uchida A, Maekawa T, Bootsma D, Hoeijmakers J, Hanaoka F (1997) Identification and characterization of XPC-binding domain of hHR23B. *Molecular and Cellular Biology* **17**: 6915-6923

Masutani C, Kusumoto R, Yamada A, Dohmae N, Yokoi M, Yuasa M, Araki M, Iwai S, Takio K, Hanaoka F (1999) The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase η . *Nature* **399**: 700-704



Masutani C, Sugasawa K, Yanagisawa J, Sonoyama T, Ui M, Enomoto T, Takio K, Tanaka K, Van der Spek P, Bootsma D (1994) Purification and cloning of a nucleotide excision repair complex involving the xeroderma pigmentosum group C protein and a human homologue of yeast RAD23. *The EMBO Journal* **13**: 1831

Matsumoto Y, Kim K (1995) Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair. *Science* **269**: 699-702

Matsumura Y, Nishigori C, Yagi T, Imamura S, Takebe H (1998) Characterization of molecular defects in xeroderma pigmentosum group F in relation to its clinically mild symptoms. *Human molecular genetics* **7**: 969-974

Matsunaga T, Mu D, Park C-H, Reardon JT, Sancar A (1995) Human DNA repair excision nuclease analysis of the roles of the subunits involved in dual incisions by using anti-XPG and anti-ERCC1 antibodies. *Journal of Biological Chemistry* **270**: 20862-20869

Meira LB, Graham JM, Greenberg CR, Busch DB, Doughty AT, Ziffer DW, Coleman DM, Savre-Train I, Friedberg EC (2000) Manitoba aboriginal kindred with original cerebro-oculo-facio-skeletal syndrome has a mutation in the Cockayne syndrome group B (CSB) gene. *The American Journal of Human Genetics* **66**: 1221-1228

Melis JP, Luijten M, Mullenders LH, van Steeg H (2011) The role of XPC: implications in cancer and oxidative DNA damage. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **728**: 107-117

Melis JP, van Steeg H, Luijten M (2013) Oxidative DNA damage and nucleotide excision repair. *Antioxidants & redox signaling* **18**: 2409-2419

Messaoud O, Ben Rekaya M, Cherif W, Talmoudi F, Boussen H, Mokhtar I, Boubaker S, Amouri A, Abdelhak S, Zghal M (2010) Genetic homogeneity of mutational spectrum of group-A xeroderma pigmentosum in Tunisian patients. *International Journal of Dermatology* **49**: 544-548



Messaoud O, Ben Rekaya M, Ouragini H, Benfadhel S, Azaiez H, Kefi R, Gouider-Khouja N, Mokhtar I, Amouri A, Boubaker MS, Zghal M, Abdelhak S (2012) Severe phenotypes in two Tunisian families with novel XPA mutations: evidence for a correlation between mutation location and disease severity. *Archives of Dermatological Research* **304**: 171-176

Mimaki T, Nitta M, Saijo M, Tachi N, Minami R, Tanaka K (1996) Truncated XPA protein detected in atypical group A xeroderma pigmentosum. *Acta Paediatrica* **85**: 511-513

Missura M, Buterin T, Hindges R, Hübscher U, Kaspárková J, Brabec V, Naegeli H (2001) Double-check probing of DNA bending and unwinding by XPA–RPA: an architectural function in DNA repair. *The EMBO Journal* **20**: 3554-3564

Morère JF, Mornex F, Soulières D (2011) *Thérapeutique du cancer*: Springer.

Morita EH, Ohkubo T, Kuraoka I, Shirakawa M, Tanaka K, Morikawa K (1996) Implications of the zinc-finger motif found in the DNA-binding domain of the human XPA protein. *Genes to Cells* **1**: 437-442

Moser J, Kool H, Giakzidis I, Caldecott K, Mullenders LH, Foustier MI (2007) Sealing of chromosomal DNA nicks during nucleotide excision repair requires XRCC1 and DNA ligase III α in a cell-cycle-specific manner. *Molecular Cell* **27**: 311-323

Moser J, Volker M, Kool H, Alekseev S, Vrieling H, Yasui A, van Zeeland AA, Mullenders LH (2005) The UV-damaged DNA binding protein mediates efficient targeting of the nucleotide excision repair complex to UV-induced photo lesions. *DNA Repair* **4**: 571-582

Moussaid L, Benchikhi H, Boukind EH, Sqalli S, Mouaki N, Kadiri F, Lakhdar H (2004) Cutaneous tumors during xeroderma pigmentosum in Morocco: study of 120 patients. *Annales De Dermatologie Et De Venereologie* **131**: 29-33

Moussala M, Behar-Cohen F, D'Hermies F, Bisseck A, Renard G (2000) Le xeroderma pigmentosum et ses manifestations oculaires. A propos du premier cas camerounais. *JOURNAL FRANCAIS D OPHTALMOLOGIE* **23**: 369-374



Mu D, Sancar A (1997) Model for XPC-independent transcription-coupled repair of pyrimidine dimers in humans. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 7570-7573

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, Vol. 51, pp 263-273.

N

Neisser A (1883) Ueber das „Xeroderma pigmentosum “(Kaposi), Liodermia essentialis cum Melanosi et Telangiectasia. *Archives of Dermatological Research* **10**: 47-62

Nelson BR, Fader DJ, Gillard M, Baker SR, Johnson TM (1995) The role of dermabrasion and chemical peels in the treatment of patients with xeroderma pigmentosum. *Journal of the American Academy of Dermatology* **32**: 623-626

Ng JM, Vermeulen W, van der Horst GT, Bergink S, Sugasawa K, Vrieling H, Hoeijmakers JH (2003) A novel regulation mechanism of DNA repair by damage-induced and RAD23-dependent stabilization of xeroderma pigmentosum group C protein. *Genes & development* **17**: 1630-1645

Nishi R, Okuda Y, Watanabe E, Mori T, Iwai S, Masutani C, Sugasawa K, Hanaoka F (2005) Centrin 2 stimulates nucleotide excision repair by interacting with xeroderma pigmentosum group C protein. *Molecular and Cellular Biology* **25**: 5664-5674

Nishigori C, Zghal M, Yagi T, Imamura S, Komoun MR, Takebe H (1993) HIGH PREVALENCE OF THE POINT MUTATION IN EXON-6 OF THE XERODERMA-PIGMENTOSUM GROUP-A-COMPLEMENTING (XPAC) GENE IN XERODERMA-PIGMENTOSUM GROUP-A PATIENTS IN TUNISIA. *American Journal of Human Genetics* **53**: 1001-1006

Nishino T, Komori K, Ishino Y, Morikawa K (2003) X-ray and biochemical anatomy of an archaeal XPF/Rad1/Mus81 family nuclease: similarity between its endonuclease domain and restriction enzymes. *Structure* **11**: 445-457



Nitta M, Saijo M, Kodo N, Matsuda T, Nakatsu Y, Tamai H, Tanaka K (2000) A novel cytoplasmic GTPase XAB1 interacts with DNA repair protein XPA. *Nucleic acids research* **28**: 4212-4218

Nocentini S (1999) Rejoining kinetics of DNA single-and double-strand breaks in normal and DNA ligase-deficient cells after exposure to ultraviolet C and gamma radiation: an evaluation of ligating activities involved in different DNA repair processes. *Radiation research* **151**: 423-432

Norgauer J, Idzko M, Panther E, Hellstern O, Herouy Y (2003) Xeroderma pigmentosum. *Eur J Dermatol* **13**: 4-9

Nouspikel T, Lalle P, Leadon SA, Cooper PK, Clarkson SG (1997) A common mutational pattern in Cockayne syndrome patients from xeroderma pigmentosum group G: implications for a second XPG function. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**: 3116-3121

O

O'Donovan A, Davies AA, Moggs JG, West SC, Wood RD (1994) XPG endonuclease makes the 3' incision in human DNA nucleotide excision repair.

Oh K-S, Imoto K, Boyle J, Khan SG, Kraemer KH (2007) Influence of XPB helicase on recruitment and redistribution of nucleotide excision repair proteins at sites of UV-induced DNA damage. *DNA Repair* **6**: 1359-1370

Oh KS, Khan SG, Jaspers N, Raams A, Ueda T, Lehmann A, Friedmann PS, Emmert S, Gratchev A, Lachlan K (2006) Phenotypic heterogeneity in the XPB DNA helicase gene (ERCC3): xeroderma pigmentosum without and with Cockayne syndrome. *Human Mutation* **27**: 1092-1103

Okinaka RT, Perez-Castro AV, Sena A, Laubscher K, Strniste GF, Park MS, Hernandez R, MacInnes MA, Kraemer KH (1997) Heritable genetic alterations in a xeroderma pigmentosum group G/Cockayne syndrome pedigree. *Mutation Research/DNA Repair* **385**: 107-114



Orelli B, McClendon TB, Tsodikov OV, Ellenberger T, Niedernhofer LJ, Schärer OD (2010) The XPA-binding domain of ERCC1 is required for nucleotide excision repair but not other DNA repair pathways. *Journal of Biological Chemistry* **285**: 3705-3712

Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **86**: 2766-2770

P

Payne A, Chu G (1994) Xeroderma pigmentosum group E binding factor recognizes a broad spectrum of DNA damage. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **310**: 89-102

Pfeifer GP (1997) Invited Review Formation and Processing of UV Photoproducts: Effects of DNA Sequence and Chromatin Environment. *Photochemistry and photobiology* **65**: 270-283

Pinedo HM, Peters GF (1988) Fluorouracil: biochemistry and pharmacology. *J Clin Oncol* **6**: 1653-1664

Pollitt R, Jenner F, Davies M (1968) Sibs with mental and physical retardation and trichorrhexis nodosa with abnormal amino acid composition of the hair. *Archives of disease in childhood* **43**: 211-216

Popescu A, Miron S, Blouquit Y, Duchambon P, Christova P, Craescu CT (2003) Xeroderma pigmentosum group C protein possesses a high affinity binding site to human centrin 2 and calmodulin. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 40252-40261

Puig-Butillé JA, Malvehy J, Potrony M, Trullas C, Garcia-García F, Dopazo J, Puig S (2013) Role of CPI-17 in restoring skin homeostasis in cutaneous field of cancerization: effects of topical application of a film-forming medical device containing photolyase and UV filters. *Experimental dermatology* **22**: 494-496



Puviani M, Barcella A, Milani M (2013) Efficacy of a photolyase-based device in the treatment of cancerization field in patients with actinic keratosis and non-melanoma skin cancer. *G Ital Dermatol Venereol* **148**: 693-698

R

Rademakers S, Volker M, Hoogstraten D, Nigg AL, Moné MJ, van Zeeland AA, Hoeijmakers JH, Houtsmuller AB, Vermeulen W (2003) Xeroderma pigmentosum group A protein loads as a separate factor onto DNA lesions. *Molecular and Cellular Biology* **23**: 5755-5767

Ramkumar HL, Brooks BP, Cao X, Tamura D, DiGiovanna JJ, Kraemer KH, Chan C-C (2011) Ophthalmic Manifestations and Histopathology of Xeroderma Pigmentosum: Two Clinicopathological Cases and a Review of the Literature. *Survey of Ophthalmology* **56**: 348-361

Rapić-Otrin V, Navazza V, Nardo T, Botta E, McLenigan M, Bisi DC, Levine AS, Stefanini M (2003) True XP group E patients have a defective UV-damaged DNA binding protein complex and mutations in DDB2 which reveal the functional domains of its p48 product. *Human molecular genetics* **12**: 1507-1522

Rass U, Ahel I, West SC (2007) Defective DNA repair and neurodegenerative disease. *Cell* **130**: 991-1004

Rastogi RP, Kumar A, Tyagi MB, Sinha RP (2010) Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *Journal of nucleic acids* **2010**

Reardon JT, Bessho T, Kung HC, Bolton PH, Sancar A (1997) In vitro repair of oxidative DNA damage by human nucleotide excision repair system: Possible explanation for neurodegeneration in Xeroderma pigmentosum patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 9463-9468

Reeves WH, Sthoeger ZM (1989) Molecular cloning of cDNA encoding the p70 (Ku) lupus autoantigen. *Journal of Biological Chemistry* **264**: 5047-5052



Riberio DT, Nigro RG, Di Mascio P, Menck CF (1992) Singlet oxygen induced mutation spectrum in mammalian cells. *Nucleic acids research* **20**: 4319-4323

Riedl T, Hanaoka F, Egly JM (2003) The comings and goings of nucleotide excision repair factors on damaged DNA. *The EMBO Journal* **22**: 5293-5303

Robert J (2011) *Signalisation cellulaire et cancer: un manuel pour les étudiants et les oncologues*: Springer.

Robins P, Jones CJ, Biggerstaff M, Lindahl T, Wood RD (1991) Complementation of DNA repair in xeroderma pigmentosum group A cell extracts by a protein with affinity for damaged DNA. *The EMBO Journal* **10**: 3913

Rochette P (2005) Cartographie des dimères cyclobutyliques de pyrimidines (DCP) induits par les UVA et étude des effets de certains gènes de réparation des mésappariements et du gène P53 muté sur la réparation par excision de nucléotides des DCP. *Résumé*: 03

Rolig RL, McKinnon PJ (2000) Linking DNA damage and neurodegeneration. *Trends Neurosci* **23**: 417-424

Rottach A, Leonhardt H, Spada F (2009) DNA methylation-mediated epigenetic control. *Journal of cellular biochemistry* **108**: 43-51

Ruban J-M, Baggio E (2004) Chirurgie des malpositions palpébrales congénitales de l'enfant. *Journal français d'ophtalmologie* **27**: 304-326

Ruiz A, Poblet M, Mas A, Guillamon J (2000) Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16S rDNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**: 1981-1987



Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354

Sakaguchi K, Ishibashi T, Uchiyama Y, Iwabata K (2009) The multi-replication protein A (RPA) system—a new perspective. *FEBS Journal* **276**: 943-963

Salah HB, Bahri M, Turki H, Abdelmoula M, Frikha M, Daoud J (2011) Radiothérapie des cancers cutanés au cours du xeroderma pigmentosum. *Cancer/Radiothérapie* **15**: 400-403

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74**: 5463-5467

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1992) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology* **24**: 104-108

Santi DV, McHenry CS, Sommer H (1974) Mechanism of interaction of thymidylate synthetase with 5-fluorodeoxyuridylate. *Biochemistry* **13**: 471-481

Sarasin A (1999) The molecular pathways of ultraviolet-induced carcinogenesis. *Mutat Res* **428**: 5-10

Sato M, Nishigori C, Yagi T, Takebe H (1996) Aberrant splicing and truncated-protein expression due to a newly identified XPA gene mutation. *Mutation Research/DNA Repair* **362**: 199-208

Satokata I, Tanaka K, Miura N, Narita M, Mimaki T, Satoh Y, Kondo S, Okada Y (1992) Three nonsense mutations responsible for group A xeroderma pigmentosum. *Mutation Research/DNA Repair* **273**: 193-202

Schaeffer L, Roy R, Humbert S, Moncollin V, Vermeulen W, Hoeijmakers J, Chambon P, Egly J-M (1993) DNA repair helicase: a component of BTF2 (TFIIH) basic transcription factor. *Science* **260**: 58-63



Schärer OD (2003) Chemistry and biology of DNA repair. *Angewandte Chemie International Edition* **42**: 2946-2974

Schlissel MS (2002) Does artemis end the hunt for the hairpin-opening activity in V (D) J recombination? *Cell* **109**: 1-4

Scicchitano DA, Olesnick EC, Dimitri A (2004) Transcription and DNA adducts: what happens when the message gets cut off? *DNA Repair* **3**: 1537-1548

Senhaji MA, Abidi O, Nadifi S, Benchikhi H, Khadir K, Ben Rekaya M, Eloualid A, Messaoud O, Abdelhak S, Barakat A (2013) c.1643_1644delTG XPC mutation is more frequent in Moroccan patients with xeroderma pigmentosum. *Archives of Dermatological Research* **305**: 53-57

Shimizu Y, Iwai S, Hanaoka F, Sugawara K (2003) Xeroderma pigmentosum group C protein interacts physically and functionally with thymine DNA glycosylase. *The EMBO Journal* **22**: 164-173

Shivji MK, Kenny MK, Wood RD (1992) Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair. *Cell* **69**: 367-374

Sidwell R, Sandison A, Wing J, Fawcett H, Seet JE, Fisher C, Nardo T, Stefanini M, Lehmann A, Cream J (2006) A novel mutation in the XPA gene associated with unusually mild clinical features in a patient who developed a spindle cell melanoma. *British Journal of Dermatology* **155**: 81-88

Sijbers AM, de Laat WL, Ariza RR, Biggerstaff M, Wei Y-F, Moggs JG, Carter KC, Shell BK, Evans E, de Jong MC (1996) Xeroderma pigmentosum group F caused by a defect in a structure-specific DNA repair endonuclease. *Cell* **86**: 811-822

Slebos RJ, Taylor JA (2001) A novel host cell reactivation assay to assess homologous recombination capacity in human cancer cell lines. *Biochemical and biophysical research communications* **281**: 212-219



Sollitto RB, Kraemer KA, DiGiovanna JD (1997) Normal vitamin D levels can be maintained despite rigorous photoprotection: six years' experience with xeroderma pigmentosum. *Journal of the American Academy of Dermatology* **37**: 942-947

Somen M, Jawahirlal BA, Misra N, Padghan D (2015) Advanced squamous cell carcinoma of cornea in a child with Xeroderma Pigmentosa. *Nigerian Journal of Ophthalmology* **23**: 67

Soufir N, Ged C, Bourillon A, Austerlitz F, Chemin C, Sary A, Armier J, Pham D, Khadir K, Roume J, Hadj-Rabia S, Bouadjar B, Taieb A, de Verneuil H, Benchiki H, Grandchamp B, Sarasin A (2010) A Prevalent Mutation with Founder Effect in Xeroderma Pigmentosum Group C from North Africa. *Journal of Investigative Dermatology* **130**: 1537-1542

Spirio L, Olschwang S, Groden J, Robertson M, Samowitz W, Joslyn G, Gelbert L, Thliveris A, Carlson M, Otterud B, et al. (1993) Alleles of the APC gene: an attenuated form of familial polyposis. *Cell* **75**: 951-957

Spivak G, Hanawalt PC (2006) Host cell reactivation of plasmids containing oxidative DNA lesions is defective in Cockayne syndrome but normal in UV-sensitive syndrome fibroblasts. *DNA Repair* **5**: 13-22

Staresincic L, Fagbemi AF, Enzlin JH, Gourdin AM, Wijgers N, Dunand-Sauthier I, Giglia-Mari G, Clarkson SG, Vermeulen W, Schärer OD (2009) Coordination of dual incision and repair synthesis in human nucleotide excision repair. *The EMBO Journal* **28**: 1111-1120

Sary A, Sarasin A (2002) The genetics of the hereditary xeroderma pigmentosum syndrome. *Biochimie* **84**: 49-60

States JC, McDuffie ER, Myrand SP, McDowell M, Cleaver JE (1998) Distribution of mutations in the human xeroderma pigmentosum group A gene and their relationships to the functional regions of the DNA damage recognition protein. *Human Mutation* **12**: 103-113



Stege H, Roza L, Vink AA, Grewe M, Ruzicka T, Grether-Beck S, Krutmann J (2000) Enzyme plus light therapy to repair DNA damage in ultraviolet-B-irradiated human skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**: 1790-1795

Stout GJ, Blasco MA (2013) Telomere length and telomerase activity impact the UV sensitivity syndrome xeroderma pigmentosum C. *Cancer Research* **73**: 1844-1854

Stoyanova T, Yoon T, Kopanja D, Mokyr MB, Raychaudhuri P (2008) The xeroderma pigmentosum group E gene product DDB2 activates nucleotide excision repair by regulating the level of p21Waf1/Cip1. *Molecular and Cellular Biology* **28**: 177-187

Strumia R (2016) Keratoacanthoma. In *Dermatological Cryosurgery and Cryotherapy*, pp 685-687. Springer

Sugasawa K (2008) Xeroderma pigmentosum genes: functions inside and outside DNA repair. *Carcinogenesis* **29**: 455-465

Sugasawa K, Masutani C, Uchida A, Maekawa T, Van der Spek P, Bootsma D, Hoeijmakers J, Hanaoka F (1996) HHR23B, a human Rad23 homolog, stimulates XPC protein in nucleotide excision repair in vitro. *Molecular and Cellular Biology* **16**: 4852-4861

Sugasawa K, Ng JMY, Masutani C, Iwai S, van der Spek PJ, Eker APM, Hanaoka F, Bootsma D, Hoeijmakers JHJ (1998) Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Molecular Cell* **2**: 223-232

Sugasawa K, Okamoto T, Shimizu Y, Masutani C, Iwai S, Hanaoka F (2001) A multistep damage recognition mechanism for global genomic nucleotide excision repair. *Genes & development* **15**: 507-521

Svejstrup JQ (2002) Mechanisms of transcription-coupled DNA repair. *Nature reviews Molecular cell biology* **3**: 21-29



Svejstrup JQ, Vichi P, Egly J-M (1996) The multiple roles of transcription/repair factor TFIIH. *Trends in biochemical sciences* **21**: 346-350

Svoboda DL, Briley LP, Vos J-MH (1998) Defective bypass replication of a leading strand cyclobutane thymine dimer in xeroderma pigmentosum variant cell extracts. *Cancer Research* **58**: 2445-2448

I

Tagu D, Moussard C (2003) *Principes des techniques de biologie moléculaire*: Institut National de la Recherche Agronomique.

Takebe H, Nishigori C, Tatsumi K (1989) Melanoma and other skin cancers in xeroderma pigmentosum patients and mutation in their cells. *Journal of Investigative Dermatology* **92**

Tan LJ, Saijo M, Kuraoka I, Narita T, Takahata C, Iwai S, Tanaka K (2012) Xeroderma pigmentosum group F protein binds to Eg5 and is required for proper mitosis: implications for XP-F and XFE. *Genes to Cells* **17**: 173-185

Tanaka K, Miura N, Satokata I, Miyamoto I, Yoshida MC, Satoh Y, Kondo S, Yasui A, Okayama H, Okada Y (1990) ANALYSIS OF A HUMAN DNA EXCISION REPAIR GENE INVOLVED IN GROUP-A XERODERMA-PIGMENTOSUM AND CONTAINING A ZINC-FINGER DOMAIN. *Nature* **348**: 73-76

Tanaka K, Sekiguchi M, Okada Y (1975) Restoration of ultraviolet-induced unscheduled DNA synthesis of xeroderma pigmentosum cells by the concomitant treatment with bacteriophage T4 endonuclease V and HVJ (Sendai virus). *Proceedings of the National Academy of Sciences* **72**: 4071-4075

Tang J, Chu G (2002) Xeroderma pigmentosum complementation group E and UV-damaged DNA-binding protein. *DNA Repair* **1**: 601-616



Tapias A, Auriol J, Forget D, Enzlin JH, Schärer OD, Coin F, Coulombe B, Egly J-M (2004) Ordered conformational changes in damaged DNA induced by nucleotide excision repair factors. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 19074-19083

Taylor EM, Broughton BC, Botta E, Stefanini M, Sarasin A, Jaspers NG, Fawcett H, Harcourt SA, Arlett CF, Lehmann AR (1997) Xeroderma pigmentosum and trichothiodystrophy are associated with different mutations in the XPD (ERCC2) repair/transcription gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**: 8658-8663

Thompson L, Limoli C. (2003) Origin, recognition, signaling, and repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells. Eureka.com and Kluwer Academic. Plenum, New York, NY.

Tomkinson AE, Chen L, Dong Z, Leppard JB, Levin DS, Mackey ZB, Motycka TA (2001) Completion of base excision repair by mammalian DNA ligases. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **68**: 151-164

U

Uchida A, Sugawara K, Masutani C, Dohmae N, Araki M, Yokoi M, Ohkuma Y, Hanaoka F (2002) The carboxy-terminal domain of the XPC protein plays a crucial role in nucleotide excision repair through interactions with transcription factor IIH. *DNA Repair* **1**: 449-461

Uematsu N, Weterings E, Yano K-i, Morotomi-Yano K, Jakob B, Taucher-Scholz G, Mari P-O, van Gent DC, Chen BP, Chen DJ (2007) Autophosphorylation of DNA-PKCS regulates its dynamics at DNA double-strand breaks. *The Journal of cell biology* **177**: 219-229

Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD (2010) Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet* **11**: 636-646

V

Vagamon B, Dupuy A, Fontaine J, Guitera-Rovel P, Lebbe C, Morel P, Rybojad M (2003) Ichtyose acquise circonée révélatrice d'une tuberculose ganglionnaire. In *Annales De Dermatologie Et De Venereologie*, Vol. 130, pp 635-637.



van Hoffen A, Kalle WH, de Jong-Versteeg A, Lehmann AR, van Zeeland AA, Mullenders LH (1999) Cells from XP-D and XP-D-CS patients exhibit equally inefficient repair of UV-induced damage in transcribed genes but different capacity to recover UV-inhibited transcription. *Nucleic acids research* **27**: 2898-2904

Van Steeg H, Kraemer KH (1999) Xeroderma pigmentosum and the role of UV-induced DNA damage in skin cancer. *Molecular medicine today* **5**: 86-94

Van Vuuren A, Appeldoorn E, Odijk H, Yasui A, Jaspers N, Bootsma D, Hoeijmakers J (1993) Evidence for a repair enzyme complex involving ERCC1 and complementing activities of ERCC4, ERCC11 and xeroderma pigmentosum group F. *The EMBO Journal* **12**: 3693

Vasquez KM, Christensen J, Li L, Finch RA, Glazer PM (2002) Human XPA and RPA DNA repair proteins participate in specific recognition of triplex-induced helical distortions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**: 5848-5853

Volker M, Moné MJ, Karmakar P, van Hoffen A, Schul W, Vermeulen W, Hoeijmakers JH, van Driel R, van Zeeland AA, Mullenders LH (2001) Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo. *Molecular Cell* **8**: 213-224

W

Wakasugi M, Reardon JT, Sancar A (1997) The non-catalytic function of XPG protein during dual incision in human nucleotide excision repair. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 16030-16034

Wang G, Chuang L, Zhang X, Colton S, Dombkowski A, Reiners J, Diakiw A, Xu XS (2004) The initiative role of XPC protein in cisplatin DNA damaging treatment-mediated cell cycle regulation. *Nucleic acids research* **32**: 2231-2240

Wang XW, Vermeulen W, Coursen JD, Gibson M, Lupold SE, Forrester K, Xu G, Elmore L, Yeh H, Hoeijmakers J (1996) The XPB and XPD DNA helicases are components of the p53-mediated apoptosis pathway. *Genes & development* **10**: 1219-1232



Washington MT, Johnson RE, Prakash S, Prakash L (1999) Fidelity and processivity of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase η . *Journal of Biological Chemistry* **274**: 36835-36838

Watanabe Y, Fujimoto H, Watanabe T, Maekawa T, Masutani C, Hanaoka F, Ohkuma Y (2000) Modulation of TFIIH-associated kinase activity by complex formation and its relationship with CTD phosphorylation of RNA polymerase II. *Genes to Cells* **5**: 407-423

Watson JD, Crick FH (1953) Molecular structure of nucleic acids. *Nature* **171**: 737-738

Weber CA, Salazar EP, Stewart SA, Thompson LH (1988) Molecular cloning and biological characterization of a human gene, ERCC2, that corrects the nucleotide excision repair defect in CHO UV5 cells. *Molecular and Cellular Biology* **8**: 1137-1146

Weeda G, van Ham R, Masurel R, Westerveld A, Odijk H, De Wit J, Bootsma D, Van Der Eb A, Hoeijmakers J (1990) Molecular cloning and biological characterization of the human excision repair gene ERCC-3. *Molecular and Cellular Biology* **10**: 2570-2581

Wei Y-F, Robins P, Carter K, Caldecott K, Pappin D, Yu G-L, Wang R-P, Shell BK, Nash RA, Schär P (1995) Molecular cloning and expression of human cDNAs encoding a novel DNA ligase IV and DNA ligase III, an enzyme active in DNA repair and recombination. *Molecular and Cellular Biology* **15**: 3206-3216

Westerveld A, Hoeijmakers J, Van Duin M, De Wit J, Odijk H, Pastink A, Wood R, Bootsma D (1984) Molecular cloning of a human DNA repair gene. *Nature* **310**: 425-429

Williams AC, Klein E (1970) Experiences with local chemotherapy and immunotherapy in premalignant and malignant skin lesions. *Cancer* **25**: 450-462

Wilson DM, Barsky D (2001) The major human abasic endonuclease: formation, consequences and repair of abasic lesions in DNA. *Mutation Research/DNA Repair* **485**: 283-307



Wolf P, Müllegger RR, Soyer HP, Hofer A, Smolle J, Horn M, Cerroni L, Hofmann-Wellenhof R, Kerl H, Maier H (2000) Topical treatment with liposomes containing T4 endonuclease V protects human skin in vivo from ultraviolet-induced upregulation of interleukin-10 and tumor necrosis factor- α . *Journal of Investigative Dermatology* **114**: 149-156

Wood RD (1999) DNA damage recognition during nucleotide excision repair in mammalian cells. *Biochimie* **81**: 39-44

Wu Y, Chang JT, Cheng Y-W, Wu T, Chen C, Lee H (2007) Xeroderma pigmentosum group C gene expression is predominantly regulated by promoter hypermethylation and contributes to p53 mutation in lung cancers. *oncogene* **26**: 4761-4773

X

Xu K, Wu X, Tompkins JD, Her C (2012) Assessment of anti-recombination and double-strand break-induced gene conversion in human cells by a chromosomal reporter. *Journal of Biological Chemistry* **287**: 29543-29553

Y

Yamada A, Masutani C, Iwai S, Hanaoka F (2000) Complementation of defective translesion synthesis and UV light sensitivity in xeroderma pigmentosum variant cells by human and mouse DNA polymerase η . *Nucleic acids research* **28**: 2473-2480

Yang Z, Roginskaya M, Colis LC, Basu AK, Shell SM, Liu Y, Musich PR, Harris CM, Harris TM, Zou Y (2006) Specific and efficient binding of xeroderma pigmentosum complementation group A to double-strand/single-strand DNA junctions with 3'-and/or 5'-ssDNA branches. *Biochemistry* **45**: 15921-15930

Yarosh D, Klein J, Kibitel J, Alas L, O'Connor A, Cummings B, Grab D, Gerstein D, Gilchrest B, Ichihashi M (1996) Enzyme therapy of xeroderma pigmentosum: safety and efficacy testing of T4N5 liposome lotion containing a prokaryotic DNA repair enzyme. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine* **12**: 122-130



Yarosh D, Klein J, O'Connor A, Hawk J, Rafal E, Wolf P, Group XPS (2001) Effect of topically applied T4 endonuclease V in liposomes on skin cancer in xeroderma pigmentosum: a randomised study. *The Lancet* **357**: 926-929

Yarosh DB (2002) Enhanced DNA repair of cyclobutane pyrimidine dimers changes the biological response to UV-B radiation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **509**: 221-226

Yokoi M, Masutani C, Maekawa T, Sugasawa K, Ohkuma Y, Hanaoka F (2000) The xeroderma pigmentosum group C protein complex XPC-HR23B plays an important role in the recruitment of transcription factor IIH to damaged DNA. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 9870-9875

Z

Zafeiriou DI, Thorel F, Andreou A, Kleijer WJ, Raams A, Garritsen VH, Gombakis N, Jaspers NG, Clarkson SG (2001) Xeroderma pigmentosum group G with severe neurological involvement and features of Cockayne syndrome in infancy. *Pediatric research* **49**: 407-412

Zghal M, Fazaa B, Kamoun M (2006) Xeroderma pigmentosum. *EMC (Elsevier SAS, Paris) Dermatologie* **10**: 98-660

Zou Y, Liu Y, Wu X, Shell SM (2006) Functions of human replication protein A (RPA): from DNA replication to DNA damage and stress responses. *Journal of cellular physiology* **208**: 267-273



Résumé

Le *Xeroderma pigmentosum* (XP) est une maladie héréditaire rare, caractérisée par une hypersensibilité aux rayons UV due à des altérations de la voie de réparation par excision de nucléotides (NER). Les patients XP ont un risque élevé de développer des cancers cutanés et ophtalmologiques, certains présentent également des troubles neurologiques.

Sa transmission sur le mode autosomique récessif explique sa relative fréquence dans les pays où la consanguinité est élevée et la taille des familles est grande, tels que les pays du Maghreb.

À ce jour, huit gènes (*XPA* à *XPG* et *XPV*) sont responsables de la maladie. Parmi eux, les gènes *XPA* et *XPC* décrits comme les plus fréquemment mutés chez les patients XP dans les pays du Maghreb.

Cette présente étude consiste à l'exploration de deux mutations qui par la littérature semblent les plus fréquentes dans les pays du Nord Africain : Mutation non-sens (c.682C> T, p.Arg228X) siégeant au niveau du gène *XPA*, et une délétion de deux paires de bases (c.1643_1644delTG ou p.Val548AlafsX25) au niveau du gène *XPC*. L'étude s'est portée sur 19 familles non apparentées et l'exploration des mutations a été réalisée par différentes techniques de biologie moléculaire (PCR-RFLP, PCR-séquençage).

L'analyse bio-informatique a montré que parmi les 19 cas index, 17 cas présentaient la mutation delTG (délétion de 2pb) à l'état homozygote. Les deux cas restant ne présentaient pas de délétion mais portaient la mutation non-sens R228X à l'état homozygote.

Les résultats obtenus ont révélé que la mutation (p.Val548AlafsX25) est la cause majeure du *xeroderma pigmentosum* dans les familles Algériennes.

La conception d'une méthode simple pour permettre le diagnostic moléculaire précis, aurait un impact important sur l'amélioration de la prise en charge des patients et de leurs proches. Cela pourrait également contribuer à moyen terme à la mise en place d'un programme « conseil génétique » pour les familles à risque.

A long terme, les résultats obtenus contribueront au dépistage des porteurs asymptomatiques pour diminuer la fréquence d'hétérozygotie ainsi que la fréquence de cette maladie.

Mots clés : *Xeroderma pigmentosum*, *XPA*, *XPC*, système NER, mutation, Ouest Algérien.