

THESE DE DOCTORAT de l'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS VI)
ECOLE DOCTORALE COMPLEXITE DU VIVANT

présentée par

Emilie WARRICK

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Caractérisation et correction génétique des cellules cutanées de patients atteints de xeroderma pigmentosum de groupe C : un rôle pour XPC au-delà de la NER ?

Directeur de thèse : Dr. Thierry Magnaldo

Soutenue le 28 mai 2010 devant le jury composé de :

Pr. Jean-Jacques Panthier

Dr. Olivier Danos

Dr. Nicolas Fortunel

Pr. Marie-Françoise Avril

Pr. Michèle Reboud

Dr. Françoise Bernerd

Dr. Thierry Magnaldo

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	19
La peau	21
A. Structure de la peau	23
I. Le derme	23
II. La jonction dermo-épidermique.....	25
III. L'épiderme.....	27
III.1. Organisation fonctionnelle de l'épiderme	27
III.1.a. La couche basale.....	27
III.1.b. Les couches spineuses.....	27
III.1.c. Les couches granuleuses.....	29
III.1.d. Les couches cornées.....	29
III.2. Les autres cellules de l'épiderme	31
III.2.a. Les mélanocytes	31
III.2.b. Les cellules de Langerhans	31
III.2.c. Les cellules de Merkel.....	33
IV. Les annexes cutanées.....	33
IV.1. Le follicule pilo-sébacé	33
IV.2. Les glandes sudoripares	34
B. Les cellules souches kératinocytaires	34
I. Définition et caractéristiques des cellules souches tissulaires.....	34
II. Mise en évidence des cellules souches kératinocytaires <i>in vitro</i>	35
III. Localisation des cellules souches <i>in vivo</i>	37
III.1. Organisation fonctionnelle des kératinocytes de la couche basale	37
III.2. Les cellules souches du follicule pileux	41
IV. Caractérisation des cellules souches : à la recherche de marqueurs spécifiques	42
IV.1. Marqueurs des cellules souches folliculaires	42
IV.2. Marqueurs des cellules souches interfolliculaires	43
IV.2.a. Marqueurs de surface	43
IV.2.b. Sélection de progéniteurs épidermiques par exclusion de colorant	43
IV.2.c. Marqueurs intracellulaires : l'exemple de p63.....	45
C. Les cancers de la peau.....	47
I. Cancers cutanés non-mélanomes : carcinomes baso- et spino-cellulaires.....	47
I.1. Epidémiologie et facteurs de risque.....	47
I.2. Pathogénèse clinique et moléculaire	48
I.3. Traitement	49
II. Mélanomes malins	49
II.1. Epidémiologie et facteurs de risque.....	49
II.2. Pathogénèse clinique et moléculaire	51
II.3. Dépistage et traitement	51
III. Syndromes de prédisposition.....	52
Les ultraviolets et leurs effets sur la peau	55
A. Effets des UV sur l'ADN : lésions et mutations	57
I. Lésions induites par les UVC et les UVB sur l'ADN	57
I.1. Les CPD	57
I.2. Les 6-4 PP	58

II. Lésions induites par les UVA	58
II.1. Photo-sensibilisateurs et espèces réactives de l'oxygène	58
II.2. Oxydation de la guanine.....	59
II.3. Dimères de pyrimidine induits par les UVA.....	59
III. Lésions induites par la lumière solaire	61
III.1. Comment simuler le spectre solaire ?	61
III.2. Les CPD, les 6-4 PP et leur isomère de Dewar.....	61
III.3. Induction de la 8-oxoG par la lumière solaire	63
IV. Mutagénèse photo-induite	63
IV.1. Mutations induites par les UVB et les UVC : nature et mécanisme de formation.....	65
IV.2. Mutations induites par les UVA	67
IV.3. Mutations induites par la lumière solaire.....	67
B. Effets cellulaires des UV.....	69
I. Transduction du signal de réponse aux UV à partir de la membrane plasmique	69
I.1. Activation des récepteurs membranaires	69
I.2. Transduction du signal par les MAPK	70
I.3. Les effecteurs de la réponse cellulaire : exemple de la famille AP-1	71
I.3.a. Description des facteurs de transcription AP-1.....	71
I.3.b. Activation des facteurs de transcription AP-1.....	71
I.3.c. Les gènes cibles des complexes AP-1 et leur rôle dans la tumorigénèse	73
II. La réponse cellulaire liée à la détection des dommages sur l'ADN.....	73
II.1. Détection des lésions par les senseurs de l'ADN et transduction du signal.....	75
II.2. p53 au cœur des points de contrôle du cycle cellulaire.....	77
II.3. « Better dead than wrong » : l'apoptose induite par les UV.....	77
C. Effets tissulaires des UV	79
I. Erythème et cellules « coup de soleil »	79
II. Pigmentation induite par les UV	80
III. Immunosuppression induite par les UV	80
IV. Photovieillissement	81
IV.1. Caractéristiques cliniques et biochimiques du photovieillissement.....	81
IV.2. Les MMPs et leur rôle dans le photovieillissement	81
IV.2.a. Description des MMPs	81
IV.2.b. Régulation post-traductionnelle des MMPs	83
IV.2.c. MMPs, UV et photovieillissement	86
V. Photocarcinogénèse.....	87
Réparation de L'ADN et Xeroderma Pigmentosum	91
A. La réparation par excision de nucléotides (NER)	91
I. Reconnaissance de la lésion	93
I.1. GGR : un rôle majeur de la protéine XPC dans la reconnaissance des lésions.....	93
I.1.a. Rôle du complexe XPC-RAD23B-Centrine 2 dans la GGR	93
I.1.b. Rôle du complexe UV-DDB et des ubiquitine-ligases dans la régulation de la GGR	97
I.2. TCR : reconnaissance des dommages par le blocage de l'ARN polymérase	99
II. Ouverture de l'ADN autour de la lésion	100
III. Assemblage du complexe de pré-incision	101
IV. Excision du fragment lésé	102
V. Synthèse répllicative	102
VI. NER et contrôle du cycle cellulaire.....	103
B. Le xeroderma pigmentosum et les autres maladies de la NER	104
I. Descriptions génétique et clinique du xeroderma pigmentosum.....	104
I.1. Historique	104

I.2. Les groupes « classiques » : XP-A à XP-G.....	105
I.2.a. Caractéristiques communes.....	105
I.2.b. Hétérogénéité du tableau clinique en fonction des groupes de complémentation : lien avec les caractéristiques génétiques et cellulaires.....	109
I.2.c. Le groupe XP-C.....	115
I.3. Le cas particulier du groupe variant XP-V.....	124
I.4. Mutagénèse dans les tumeurs cutanées chez les patients XP.....	125
II. Traitement du XP.....	127
Thérapie génique et application aux génodermatoses.....	131
A. Présentation générale de la thérapie génique.....	131
I. Les différentes stratégies de thérapie génique.....	131
II. Les différentes techniques de transfert de gènes.....	135
II.1. Thérapie génique <i>in vivo</i> ou <i>ex vivo</i> ?.....	135
II.2. Vecteurs non viraux.....	137
II.3. Vecteurs viraux.....	137
II.3.a. Les rétrovirus.....	138
II.3.b. Les adénovirus.....	147
II.3.c. Les virus associés aux adénovirus.....	148
B. Thérapie génique cutanée.....	149
I. La peau : une cible privilégiée pour la thérapie génique.....	149
II. Choix de la stratégie en fonction de l'application.....	150
II.1. Thérapie génique non permanente.....	150
II.2. Thérapie génique des désordres systémiques.....	150
II.3. Correction génétique des génodermatoses.....	151
II.3.a. Cahier des charges.....	151
II.3.b. Quel vecteur et quelle approche pour la correction génétique des génodermatoses ?.....	151
III. Avancées dans la thérapie génique des génodermatoses.....	152
III.1. Thérapie génique des ichthyoses et des épidermolyses bulleuses.....	152
III.2. Thérapie génique du xeroderma pigmentosum.....	155
Objectifs de la thèse.....	161
A. Caractérisation des cellules cutanées issues de patients XP-C : un rôle pour la protéine XPC au-delà de la NER ?.....	161
B. Correction génétique <i>ex vivo</i> des kératinocytes XP-C.....	164
I. Quelles sont les exigences à respecter pour envisager un protocole de thérapie génique cutanée <i>ex vivo</i> pour les patients XP-C ?.....	164
II. Développement d'une stratégie de sélection compatible avec ces exigences.....	165
III. Application à la correction génétique des kératinocytes XP-C.....	167
RESULTATS.....	169
A. Caractérisation des cellules cutanées issues de patients XP-C : un rôle pour la protéine XPC au-delà de la NER ?.....	171
I. Article n°1 : Les fibroblastes issus de patients atteints de xeroderma pigmentosum de groupe C surexpriment la métalloprotéinase matricielle 1.....	171
II. Analyse du profil d'expression génique des kératinocytes XP-C.....	173
II.1. Objectif.....	173
II.2. Stratégie expérimentale.....	173
II.3. Résultats.....	173

II.4. Conclusions.....	177
II.5. Matériel et Méthodes	179
B. Correction génétique <i>ex vivo</i> des kératinocytes XP-C.....	183
I. Article n° 2 : Les kératinocytes XP-C corrigés permettent la régénération <i>in vivo</i> , après greffe chez la souris immunodéficiente, d'une peau humaine capable de réparer les lésions induites par les UV.....	183
II. Effet global de la correction génétique : analyse du profil d'expression génique des kératinocytes XP-C génétiquement corrigés.....	187
II.1. Objectif	187
II.2. Stratégie expérimentale	187
II.3. Résultats	189
II.4. Conclusions.....	189
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	191
A. Les cellules cutanées issues de patients XP-C présentent des anomalies à l'état stable : hypothèses sur leurs causes et leurs conséquences	193
I. Un rôle des fibroblastes dans la prédisposition des patients XP-C aux cancers cutanés ?	193
I.1. Implication du stroma dans la tumorigénèse.....	193
I.2. Les fibroblastes XP-C surexpriment constitutivement la MMP-1 : conséquences sur la carcinogénèse cutanée.....	195
I.3. Les fibroblastes XP-C pourraient-ils être des « pré-CAF » ?	196
II. Les kératinocytes XP-C présentent également de nombreuses anomalies à l'état stable	197
II.1. Comment lier les altérations observées dans les kératinocytes XP-C à la pathologie XP-C ?	197
II.2. Perspectives concernant la caractérisation des kératinocytes XP-C.....	206
II.3. Un stress latent dans les kératinocytes XP-C ?.....	207
III. Quelle pourrait être l'origine du stress latent expliquant l'accumulation d'anomalies à l'état stable dans les cellules XP-C ?	207
III.1. Un rôle des dommages oxydatifs dans la pathologie XP-C ?	207
III.2. Une dérégulation mitochondriale pourrait-elle être au centre des anomalies observées dans les cellules XP-C ?.....	211
III.3. Implications concernant le vieillissement chez les patients XP-C	216
B. Réflexions autour de la NER, de la différenciation et du caractère « souche »	219
C. Quel(s) traitement(s) peut-on proposer aux patients XP-C ?	222
I. La thérapie génique cutanée <i>ex vivo</i> des patients XP-C : espoir ou réalité ?.....	222
I.1. Le transfert de gènes permet la correction des principales anomalies des kératinocytes XP-C : implications pour la photocarcinogénèse	222
I.2. Quel protocole de thérapie génique pour les patients XP-C ?	223
I.3. Les limites de la thérapie génique cutanée <i>ex vivo</i>	233
II. Des approches pharmacologiques ciblées pourraient également être proposées aux patients XP-C.....	234
D. Conclusion.....	237
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	239
ANNEXES	277

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Structure de la peau.	21
Figure 2 : Structure du derme.	22
Figure 3 : La jonction dermo-épidermique.....	24
Figure 4 : Histologie et structure de l'épiderme.	26
Figure 5 : Formation de l'enveloppe cornée.	28
Figure 6 : Unité épidermique de mélanisation.....	30
Figure 7 : Le follicule pilo-sébacé et le cycle pileux.	32
Figure 8 : Les 3 types de colonies formées par les kératinocytes en culture.....	36
Figure 9 : Autogreffe d'épithélia de culture chez un patient sévèrement brûlé.....	36
Figure 10 : Le modèle de l'unité épidermique de prolifération (EPU).	38
Figure 11 : Un nouveau modèle de renouvellement de l'épiderme ?	39
Figure 12 : Les différents compartiments de cellules souches dans la peau.	40
Figure 13 : Aspects macroscopiques et histologiques de différents types de carcinomes basocellulaires.....	46
Figure 14 : Aspects macroscopiques et histologiques des carcinomes spinocellulaires et de leurs précurseurs.....	46
Figure 15 : Modèle de Clark.	50
Figure 16 : Règle ABCDE.	50
Figure 17 : Le spectre électromagnétique solaire.....	54
Figure 18 : Pénétration des rayonnements UV dans la peau.....	54
Figure 19 : Lésions induites par les UV dans l'ADN.	56
Figure 20 : Oxydation de la guanine.....	60
Figure 21 : Théorie de la mutagenèse somatique.....	62
Figure 22 : Proposition de mécanisme pour la mutagenèse induite par les UV.....	64
Figure 23 : Activation des MAP kinases et des facteurs de transcription AP-1 par les UV.	68
Figure 24 : Les facteurs de transcription AP-1 et leurs éléments de réponse.	72
Figure 25 : Réponse cellulaire liée à la présence de dommages sur l'ADN : points de contrôle G1/S et G2/M.	74
Figure 26 : Mécanismes de régulation et d'activation de p53.....	76
Figure 27 : Structure des MMPs.....	85
Figure 28 : Effets des UV sur la peau et implications pour la photo-carcinogénèse cutanée.....	88
Figure 29 : Lésions de l'ADN et mécanismes de réparation.....	90
Figure 30 : Mécanisme de la réparation par excision de nucléotides (NER).....	92
Figure 31 : Structure cristallographique de la liaison à l'ADN de Rad4, l'orthologue de XPC chez la levure.....	95
Figure 32 : Interaction entre le complexe UV-DDB et le complexe XPC-RAD23B-centrine 2.	98
Figure 33 : Incidence des cancers cutanés en fonction de l'âge chez les individus XP.	106
Figure 34 : Recouvrement génétique du xeroderma pigmentosum, du syndrome de Cockayne et de la trichothiodystrophie.	112
Figure 35 : Le gène et la protéine XPC. (A) Organisation du gène XPC. (B) Domaines fonctionnels de la protéine XPC.....	116
Figure 36 : Ensemble des mutations décrites chez les patients XP-C.	120
Figure 37 : Réparation des dimères de pyrimidine chez les souris XPC +/+ et XPC -/-.	122
Figure 38 : Profil des mutations observées dans le gène p53 des tumeurs XP et non-XP.	126
Figure 39 : Mécanisme de mutagenèse chez les patients XP.....	126
Figure 40 : Différentes stratégies de thérapie génique.....	132
Figure 41 : Thérapie génique <i>in vivo</i> et <i>ex vivo</i>	134
Figure 42 : Structure et génome d'un gammarétrovirus.....	139
Figure 43 : Cycle de réplication des rétrovirus.....	140

Figure 44 : Production de vecteurs rétroviraux pour le transfert de gènes.....	142
Figure 45 : Génome du lentivirus HIV-1.	146
Figure 46 : Principe des vecteurs SIN.	146
Figure 47 : Premier essai clinique de correction génétique <i>ex vivo</i> de l'épidermolyse bulleuse jonctionnelle (Mavilio et al., 2006).	154
Figure 48 : Correction génétique <i>ex vivo</i> des kératinocytes XP-C.	156
Figure 49 : Peaux reconstruites <i>in vitro</i>	160
Figure 50 : Peaux reconstruites <i>in vitro</i> à partir de kératinocytes et de fibroblastes XP-C.....	162
Figure 51 : Stratégie de sélection CD24.	166
Figure 52 : Niveau d'ARNm de CXCL12 dans les fibroblastes contrôles (WT) et XP-C.	178
Figure 53 : Stratégie d'analyse du profil d'expression génique des kératinocytes XP-C après correction génétique.	186
Figure 54 : Rôles des fibroblastes associés aux carcinomes (CAF) dans le processus tumoral.	194
Figure 55 : Rôles de l'enzyme ALDH1A1 dans la cornée.	200
Figure 56 : Principales fonctions biologiques dérégulées dans les kératinocytes XP-C.	202
Figure 57 : Construction de vecteurs rétroviraux portant un shRNA dirigé contre <i>XPC</i>	208
Figure 58 : Un rôle des dommages oxydatifs dans la pathologie XP-C ?	210
Figure 59 : Chaîne de transport des électrons.	210
Figure 60 : Quantification de la quantité d'ADN mitochondrial et du niveau d'expression des complexes de la CTE dans les kératinocytes XP-C.	212
Figure 61 : Le profil d'expression de la protéine XPC dans l'épiderme corrèle-t-il avec l'activité de la NER ?	218
Figure 62 : Stratégie de thérapie génique <i>ex vivo</i> permettant l'évaluation complète des cellules en termes de biosécurité et d'efficacité de la correction génétique.	228

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Composition du derme papillaire et du derme réticulaire et profil de sécrétion des composants de la MEC par les fibroblastes des deux régions du derme.....	22
Tableau 2 : Marqueurs permettant l'enrichissement des cellules souches de l'épiderme interfolliculaire.	44
Tableau 3 : Mutations induites par les UVA et la lumière solaire simulée (SSL).....	66
Tableau 4 : Phototypes cutanés.	78
Tableau 5 : Modifications histologiques et manifestations cliniques du photovieillissement.	82
Tableau 6 : Les métalloprotéinases matricielles et leurs substrats.	84
Tableau 7 : Composants de la NER.....	96
Tableau 8 : Caractéristiques cliniques et cellulaires des différents groupes de complémentation XP.	110
Tableau 9 : Désordres génétiques liés à une désorganisation structurale ou fonctionnelle de la peau.	130
Tableau 10 : Les différents vecteurs viraux utilisés pour le transfert de gènes.....	136
Tableau 11 : Caractéristiques des souches cellulaires utilisées pour le crible génomique et sa validation.....	172
Tableau 12 : Résultats de la validation du crible génomique par RT-QPCR.	174
Tableau 13 : Gènes dont le niveau d'ARNm est normalisé après réintroduction du gène <i>XPC</i> dans les kératinocytes XP-C.....	188
Tableau 14 : Résumé des résultats du crible génomique discutés dans ce chapitre.....	198
Tableau 15 : Gènes codant pour des protéines mitochondriales dérégulés dans les kératinocytes XP-C.....	214

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Mécanisme de rétro-transcription du génome rétroviral.

Annexe 2 : Revue publiée dans le Journal de la Société de Biologie (2008)

Annexe 3 : Revue publiée dans Médecine/Sciences (2008)

Annexe 4 : Analyse ontologique des résultats du crible génomique (Gene Ontology)

Annexe 5 : Amorces Taqman® utilisées pour la validation du crible génomique

ABBREVIATIONS

5-mC	Cytosine méthylée en position C5
6-4 PP	Pyrimidine (6-4)-pyrimidone
8-oxoG	8-oxo-7,8-dihydroguanine
AAF	N-acétoxy-2-acétylamino fluorène
AAV	<i>Adeno-Associated Virus</i>
ADNmt	ADN mitochondrial
AP-1	<i>Activation protein 1</i>
ARE	<i>Antioxidant response element</i>
ATF	<i>Activating transcription factor</i>
ATM	<i>Ataxia-telangiectasia mutated</i>
ATR	<i>ATM and Rad3 related</i>
BED	Dose biologique efficace (<i>biologically efficient dose</i>)
BER	Réparation par excision de bases (<i>Base Excision Repair</i>)
BrdU	Bromodéoxyuridine
CBC	Carcinome basocellulaire
CCNM	Cancers cutanés non-mélanomes
CMV	Cytomégalovirus
CPD	Dimère cyclobutanique de pyrimidines
CRE	<i>c-AMP responsive element</i>
CS	Syndrome de Cockayne
CSC	Carcinome spinocellulaire
CSE	Cellules souches embryonnaires
CTE	Chaîne de transport des électrons
EBD	Epidermolyse bulleuse dystrophique
EBJ	Epidermolyse bulleuse jonctionnelle
EBS	Epidermolyse bulleuse simplex
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ERK	<i>Extra-cellular signal-regulated kinase</i>
GGR	Réparation du génome global (<i>Global Genome Repair</i>)
HD	Hémidesmosomes
HIF	<i>Hypoxia-Inducible factor</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HR	<i>Homologous Recombination</i>
HRE	<i>Hypoxia responsive element</i>
IRES	<i>Internal Ribosome Entry Site</i>
JDE	Jonction dermo-épidermique
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
KA	Kératose actinique
LRCs	<i>Label retaining cells</i>
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
MAF	<i>Musculoaponeurotic fibrosarcoma</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MARE	<i>MAF responsive element</i>

MEC	Matrice extracellulaire
MED	Dose érythémale minimale (<i>minimal erythematol dose</i>)
MEF	Fibroblastes embryonnaires murins (<i>Murine Embryonic Fibroblasts</i>)
miRNA	Micro-ARN
MM	Mélanome malin
MMLV	<i>Moloney's Murine Leukemia Virus</i>
MMPs	Métalloprotéinases matricielles
MMR	<i>MisMatch Repair</i>
MT-MMP	<i>Membrane-type MMP</i>
NER	Réparation par excision de nucléotides (<i>Nucleotide Excision Repair</i>)
NHEJ	<i>Non Homologous End Joining</i>
OGG1	8-oxoguanine glycosylase
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
ROS	Espèces réactives de l'oxygène (<i>reactive oxygen species</i>)
SAPK	<i>Stress-activated protein kinases</i>
SBC	<i>Sunburn cells</i>
SCID	<i>Severe Combined ImmunoDeficiency</i>
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
SIN	<i>Self-Inactivating</i>
SP	<i>Side population</i>
SSL	<i>Sun-simulated light</i>
TCF	<i>Ternary complex factors</i>
TCR	Réparation couplée à la transcription (<i>Transcription Coupled Repair</i>)
TDG	<i>Thymine DNA glycosylase</i>
TIMPs	<i>Tissue Inhibitors of MetalloProteinases</i>
TLS	Synthèse translésionnelle (<i>translesional synthesis</i>)
TPA	12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate
TRE	<i>TPA-responsive element</i>
TTD	Trichothiodystrophie
UDS	<i>Unscheduled DNA Synthesis</i>
UPE	Unité de prolifération épidermique
UV	Rayonnements ultraviolets
UV-DDB	<i>UV-Damaged DNA-Binding protein</i>
VSV-G	<i>Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein</i>
WT	<i>Wild type</i>
XP	Xeroderma pigmentosum
XP-C	XP groupe de complémentation C
XPC/XPC	Gène/protéine associés au groupe XP-C

PREAMBULE

Les carcinomes cutanés (CC) sont les cancers les plus fréquents chez l'homme et leur constante augmentation représente un problème de santé publique. Les rayonnements ultraviolets (UV) contenus dans la lumière solaire constituent le facteur étiologique majeur de la cancérogénèse cutanée. Ils introduisent des lésions dans l'ADN qui, si elles ne sont pas réparées, peuvent induire l'apparition de mutations. Le xeroderma pigmentosum (XP) est une maladie génétique rare caractérisée par une prédisposition sévère au développement de tumeurs cutanées (CC et mélanomes) dans les zones photo-exposées. D'un point de vue moléculaire, le XP est lié à une mutation dans l'un des gènes XP (*XPA* à *XPG*), qui codent tous pour des protéines impliquées dans le système de réparation des lésions induites par les UV. Cette hétérogénéité génétique se manifeste par la diversité des présentations cliniques de la maladie : les patients des 7 groupes de complémentation (XP-A à XP-G) présentent ainsi un panel de symptômes plus ou moins sévères. Un nombre croissant d'évidences montrent que certaines protéines XP ont un rôle dans la cellule à l'état stable, en dehors de la réparation des lésions UV-induites, qui pourrait contribuer à l'hétérogénéité cellulaire et clinique de la maladie. Il n'existe actuellement aucun traitement curatif pour les patients XP. Une photoprotection très stricte, accompagnée d'une surveillance dermatologique régulière, demeurent à ce jour les meilleurs moyens de prévention des cancers cutanés. Toutefois, les patients XP pourraient bénéficier d'une approche de thérapie génique cutanée *ex vivo*, qui consiste à amplifier en culture les cellules XP et à les corriger par transfert de gène, avant de reconstruire *ex vivo* un tissu avec des propriétés normales pouvant être greffé chez le patient. En Europe Occidentale, en Afrique du Nord et en Amérique du Nord, 50 à 60 % des malades XP appartiennent au groupe XP-C. Les patients XP-C sont en généralement épargnés des manifestations neurologiques observées dans d'autres groupes de complémentation XP. Ils sont donc les candidats les plus adaptés à la thérapie tissulaire basée sur le transfert de gène *ex vivo*.

Dans ce cadre, nos objectifs sont (1) de mieux comprendre l'impact de l'absence à long terme de la protéine XPC (qui fait défaut chez les patients XP-C) pour définir sa(ses) fonction(s) dans la cellule à l'état stable ; (2) d'apporter des éléments de connaissance permettant de proposer un traitement pharmacologique ciblé aux patients XP-C ; (3) de développer une approche de correction génétique par transfert de gène compatible avec les perspectives de greffe chez les patients XP-C.

L'introduction de ce manuscrit est divisée en quatre chapitres. Le premier chapitre présente la peau dans ses aspects physiologique (organisation structurale et fonctionnelle) et pathologique (les cancers cutanés). Nous mettrons aussi l'accent sur les cellules souches de la peau, puisqu'elles

constituent la cible des approches de thérapie génique cutanée *ex vivo*. Dans un deuxième chapitre, les effets moléculaires, cellulaires et tissulaires des UV sont décrits, afin de comprendre l'ensemble des événements menant au développement des cancers cutanés photo-induits. Le troisième chapitre concerne la description du système de réparation de l'ADN par excision de nucléotides, au sein duquel le rôle de la protéine XPC est mis en avant. L'hétérogénéité génétique, cellulaire et clinique de la pathologie XP est ensuite décrite pour mieux définir les caractéristiques propres au groupe XP-C. L'introduction se termine par une présentation du principe et des techniques actuelles de thérapie génique, tout d'abord d'un point de vue général, puis dans l'optique d'une thérapie génique ciblant la peau.

Les résultats obtenus au cours de cette thèse sont exposés en deux parties. La première partie concerne la caractérisation des cellules XP-C à l'état stable, c'est-à-dire en l'absence d'exposition UV. La deuxième partie décrit nos avancées dans le cadre de la correction génétique par transfert de gène des kératinocytes XP-C.

Dans la discussion, les résultats concernant la caractérisation des cellules XP-C sont replacés dans le contexte de la pathologie XP-C, à la lumière des points détaillés dans l'introduction. Les perspectives de traitement pour les patients XP-C sont ensuite discutées en mettant l'accent sur les éléments à prendre en compte dans l'optique d'un essai clinique de thérapie génique cutanée *ex vivo* chez les patients XP-C.

INTRODUCTION

LA PEAU

Définition (Larousse) : Organe constituant le revêtement extérieur du corps de l'homme et de beaucoup d'animaux. *Familier.* Corps, intégrité physique, vie : Défendre sa peau.

La peau est l'enveloppe de notre organisme, un revêtement à l'interface entre notre environnement et nos organes internes qui nous protège contre les agressions physiques, chimiques et biologiques extérieures. La peau est l'organe le plus étendu du corps humain – sa surface est estimée entre 1,5 et 2 m² et son poids représenterait 12 à 15% du poids total d'un individu – mais c'est aussi l'un des plus complexes et des plus polyvalents. Outre son rôle protecteur, la peau est le siège du toucher, elle assure la régulation hydrique et thermique du corps, joue un rôle essentiel dans la surveillance immunitaire et reflète également nos émotions et notre état de santé. Il n'est donc pas étonnant que le terme « peau » soit devenu un synonyme de « vie » : notre enveloppe corporelle est bien plus qu'un simple emballage.

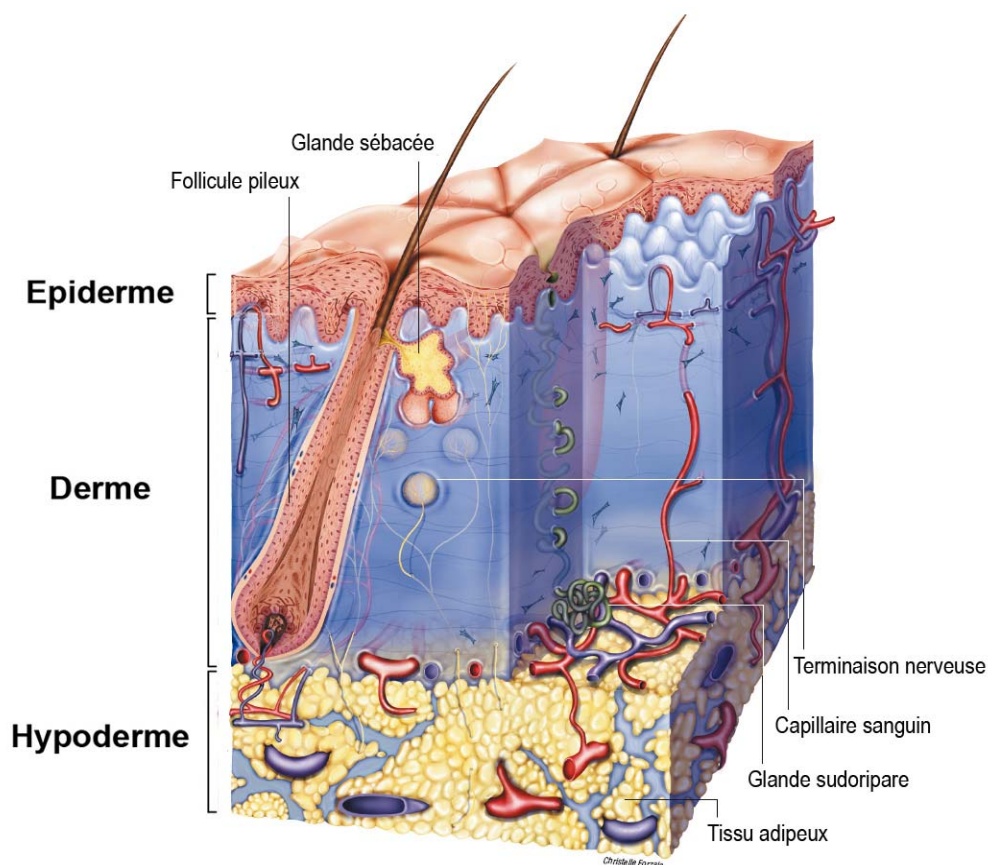


Figure 1 : Structure de la peau.

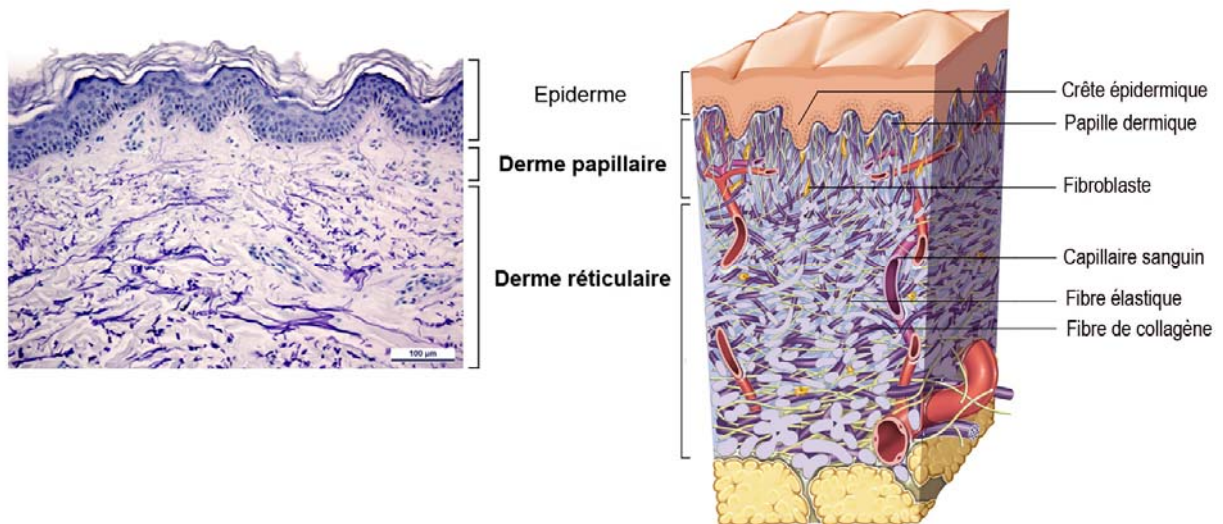


Figure 2 : Structure du derme.

Le derme est constitué d'une matrice extracellulaire dense sécrétée par les fibroblastes. Les capillaires sanguins présents dans le derme assurent les échanges métaboliques de l'épiderme. La présence de papilles dermiques à l'interface entre l'épiderme et le derme papillaire augmente la surface d'échange entre ces deux compartiments.

Composant de la MEC	Expression		Sécrétion (culture en monocouche)	
	Derme papillaire	Derme réticulaire	Fibroblastes papillaires	Fibroblastes réticulaires
Collagène I	++	++	++	++
Collagène III	++	+	++	++
Collagène IV	++ (JDE)	-	+	+
Collagène V	++	++	++	++
Collagène VI	++ (JDE)	+	++	++
Collagène XII	++	+/-	++	++
Collagène XIV	+/-	++	-	-
Collagène XVI	++ (JDE)	-	++	+
Tenascine C	++ (JDE)	-	++	++
Tenascine X	+	++	nd	nd
Versicane	+	++	+	++
Décorine	++	+	++	+

Tableau 1 : Composition du derme papillaire et du derme réticulaire et profil de sécrétion des composants de la MEC par les fibroblastes des deux régions du derme.

++ exprimé (sécrété) ; + faiblement exprimé (sécrété) ; +/- peu ou pas exprimé (sécrété) ; - pas exprimé (sécrété) ; JDE, présent du niveau de la jonction dermo-épidermique ; nd, non déterminé. (D'après : Sorrell and Caplan, 2004)

A. Structure de la peau

La peau est constituée de deux compartiments principaux : l'épiderme, un épithélium stratifié en contact direct avec l'environnement, et le derme, un mésenchyme support et nourricier qui donne à la peau ses propriétés mécaniques. Sous le derme se trouve un tissu adipeux, l'hypoderme, qui sert de réserve énergétique et de couche isolante pour l'organisme. La peau contient également des structures spécialisées, appelées annexes cutanées, comme les follicules pilo-sébacés et les glandes sudoripares (figure 1).

I. Le derme

Le derme est un tissu conjonctif qui constitue pour l'épiderme un support souple et élastique (figure 2). Il contient un riche réseau vasculaire qui assure les échanges métaboliques de l'épiderme, dépourvu de vascularisation. Les cellules majoritaires du derme sont les fibroblastes qui synthétisent et organisent une matrice extracellulaire (MEC) dense, constituée principalement de collagènes (collagènes de type I et III), de fibres d'élastine, de glycoprotéines (fibronectines, téna-scines) et de protéoglycanes (versican, décorine) (pour revue voir : Sorrell and Caplan, 2004). Le derme contient également un vaste réseau de cellules circulantes – cellules dendritiques, mastocytes, macrophages – qui assurent la surveillance immunitaire.

Deux régions peuvent être distinguées au sein du derme : le derme papillaire situé immédiatement sous l'épiderme et le derme réticulaire situé en profondeur (figure 2). La frontière entre le derme papillaire et l'épiderme est caractérisée par la présence de projections du derme dans l'épiderme, appelées papilles dermiques, alternant avec des prolongements épidermiques dans le derme, appelées crêtes épidermiques. Cette structure augmente de façon significative la surface d'échange entre le derme et l'épiderme. Un plexus vasculaire, le *rete subpapillare*, marque la limite inférieure du derme papillaire (environ 300 à 400 µm sous la surface de l'épiderme). Des capillaires s'étendent depuis ce plexus et se projettent dans les papilles dermiques pour apporter les nutriments nécessaires à l'épiderme. Le derme réticulaire s'étend du *rete subpapillare* au *rete cutaneum*, un plexus vasculaire plus profond qui marque la frontière entre le derme et l'hypoderme, le tissu adipeux soutenant le derme. Les annexes cutanées, comme les follicules pilo-sébacés et les glandes sudoripares, s'enfoncent dans le derme réticulaire et l'hypoderme.

Le derme papillaire et le derme réticulaire diffèrent par la composition et l'organisation de la MEC (tableau 1). Le derme papillaire contient de fines fibrilles de collagène et des microfibrilles élastiques orientées perpendiculairement à la jonction entre le derme et l'épiderme. Le derme réticulaire contient des paquets de fibres de collagène plus épaisses, entourés par des fibres

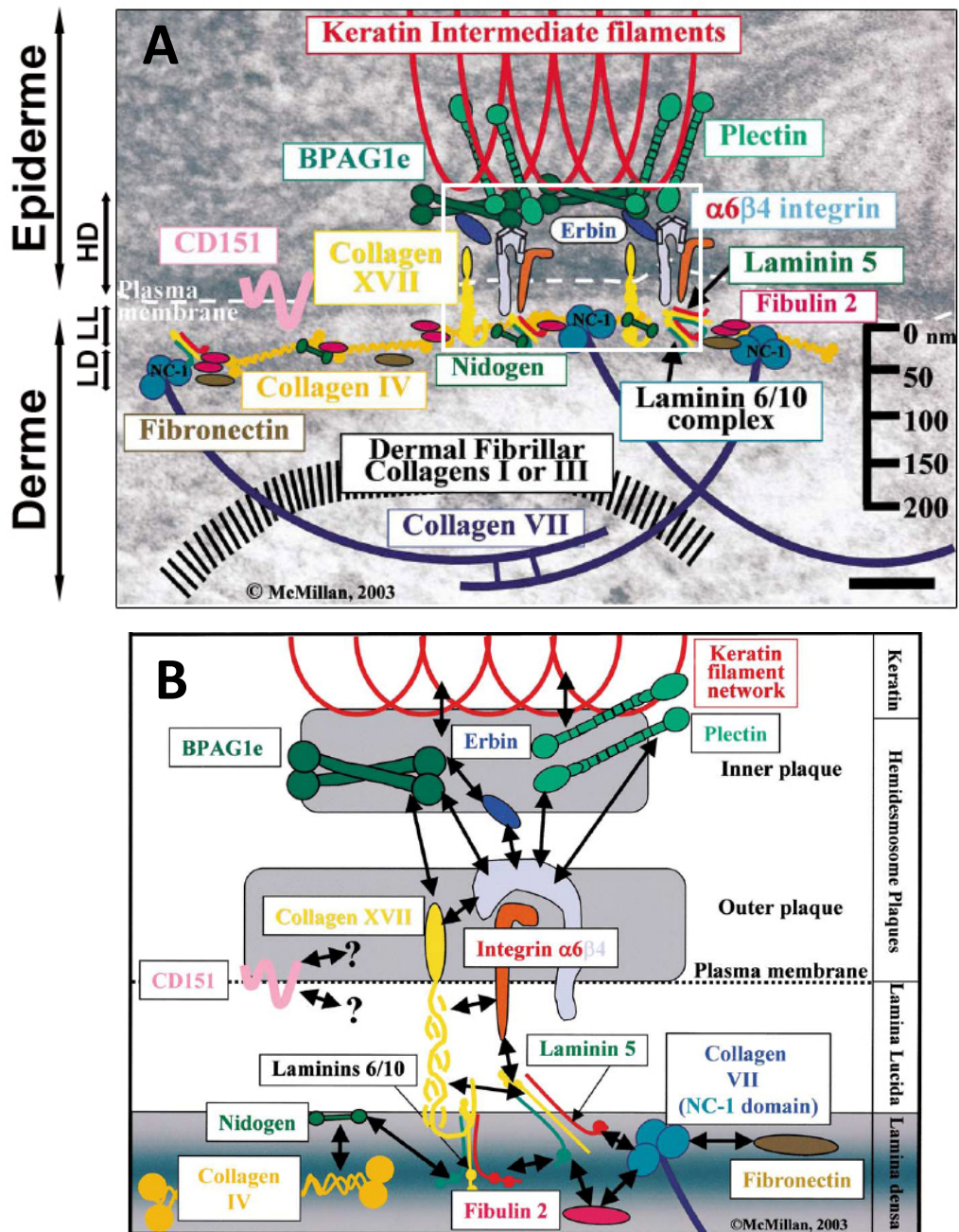


Figure 3 : La jonction dermo-épidermique.

(A) Représentation schématique des principaux composants de la JDE sur une image de microscopie électronique faisant apparaître les hémidesmosomes (HD) (zone sombre au dessus de la membrane plasmique), la *lamina lucida* (LL) (zone claire sous la membrane plasmique) et la *lamina densa* (LD) (zone sombre sous la LL). (B) Agrandissement de la zone encadrée sur la figure A. Au niveau des HD, le cytosquelette de kératines des kératinocytes basaux est lié, via les protéines Erbin et BPAG1e, aux intégrines $\alpha6\beta4$ et au collagène XVII qui interagissent avec les fibrilles de laminine 5 à la frontière LL/LD. La laminine 5 forme des complexes avec les laminines 6 et 10 qui se fixent au nidogène, lui-même capable d'interagir avec les fibres de collagène IV présentes dans la LD. La laminine 5 interagit également avec les domaines NC-1 du collagène VII, directement ou par l'intermédiaire de la fibuline. Le collagène VII est ancré au niveau de la LD via la liaison de ses domaines NC-1 à la fibronectine. (D'après : McMillan et al., 2003)

élastiques matures organisées parallèlement à la surface de l'épiderme. La densité de fibroblastes est plus élevée dans le derme papillaire que dans le derme réticulaire. En culture, la capacité de prolifération des fibroblastes papillaires est plus élevée que celle des fibroblastes réticulaires et les profils de sécrétion des composants de la MEC de ces deux populations de fibroblastes sont différents (tableau 1). (Sorrell et al., 2004; Sorrell and Caplan, 2004).

Les fibroblastes sécrètent des facteurs de croissance et des cytokines qui régulent la prolifération et la différenciation des kératinocytes de l'épiderme, tels que le KGF-1 (keratinocyte growth factor appelé également fibroblast growth factor 7, FGF7) ou le GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) (Maas-Szabowski et al., 1999; Szabowski et al., 2000). L'expression de ces protéines est régulée par la sécrétion d'interleukine 1 (IL-1) par les kératinocytes. Le derme et l'épiderme sont donc engagés dans un dialogue paracrine régulant finement l'homéostasie cutanée.

II. La jonction dermo-épidermique

La jonction dermo-épidermique (JDE) (en anglais : *basement membrane zone*) constitue l'interface entre le derme et l'épiderme. Elle assure l'intégrité structurale de la peau en maintenant la cohésion entre les deux compartiments cutanés et en permettant la propagation des forces mécaniques (Burgeson and Christiano, 1997; McMillan et al., 2003). Elle constitue également la zone d'échanges entre les kératinocytes de l'épiderme et les fibroblastes du derme.

Le JDE est formée par un réseau complexe de protéines et de fibres d'ancrage. L'analyse en microscopie électronique permet de distinguer trois zones (figure 3) : (1) les hémidesmosomes (HD), sont des structures d'adhérence situées au pôle basal de la membrane plasmique des kératinocytes formant la couche la plus profonde de l'épiderme (la couche basale). Ces structures assurent la liaison entre le cytosquelette des kératinocytes basaux et les composants de la JDE, notamment grâce aux intégrines $\alpha 6\beta 4$; (2) la *lamina lucida* est traversée par des filaments d'ancrage, comme la laminine 332 (anciennement appelée laminine 5) et le collagène XVII, qui relie les HD à (3) la *lamina densa*. Cette zone est constituée par un réseau dense de petites molécules d'adhésion (nidogène, fibronectine) liant les filaments d'ancrage aux fibrilles d'ancrage : le collagène IV et le collagène VII. Le collagène VII forme un vaste réseau dans le derme superficiel, sous la JDE, où il se mêle aux fibres de collagène I et III.

La synthèse et l'organisation des composants de la JDE sont régulées par de fines interactions entre les kératinocytes et les fibroblastes (Marionnet et al., 2006; Smola et al., 1998).

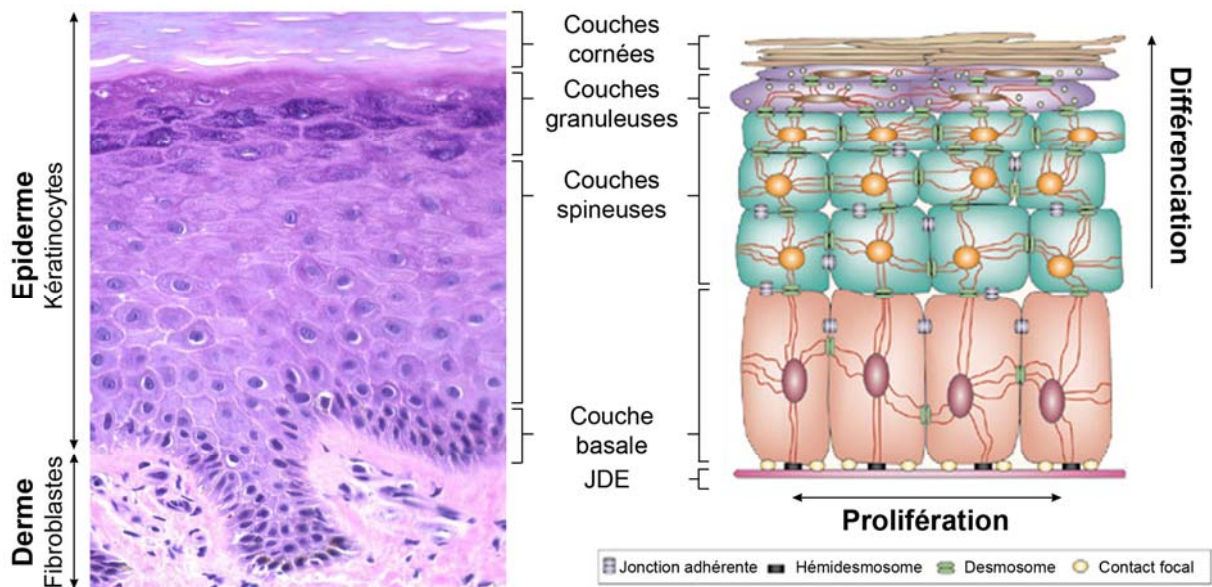


Figure 4 : Histologie et structure de l'épiderme.

L'épiderme est un épithélium stratifié au sein duquel quatre compartiments peuvent être identifiés. La couche la plus profonde de l'épiderme, la couche basale, contient les kératinocytes prolifératifs responsables du renouvellement permanent du tissu. Les kératinocytes basaux adhèrent à la jonction dermo-épidermique (JDE) grâce aux hémidesmosomes et aux contacts focaux. Lorsqu'ils cessent de proliférer, les kératinocytes de la couche basale s'engagent dans le processus de différenciation, se détachent de la JDE et migrent vers les couches supérieures de l'épiderme où ils forment respectivement les couches spineuses, granuleuses et cornées. (D'après : Fuchs and Raghavan, 2002)

III. L'épiderme

III.1. Organisation fonctionnelle de l'épiderme

L'épiderme est un épithélium stratifié squameux d'origine ectodermique (Hertle et al., 1991). Les kératinocytes qui le composent sont organisés en quatre compartiments correspondant à des stades progressifs de différenciation (figure 4).

III.1.a. La couche basale

La couche basale est la couche la plus profonde de l'épiderme. Elle est constituée d'une assise unique de kératinocytes de forme pseudo-cylindrique, exprimant principalement les kératines K5 et K14 (Nelson and Sun, 1983)¹. Les kératines sont des éléments essentiels du cytosquelette des kératinocytes. Elles jouent un rôle majeur dans l'intégrité structurale de l'épiderme en raison de leur implication dans la formation des desmosomes, qui relient entre eux les kératinocytes des différentes couches de l'épiderme, et des hémidesmosomes, qui ancrent les kératinocytes de la couche basale à la JDE.

La couche basale constitue le réservoir des cellules prolifératives responsables du renouvellement permanent du tissu et de sa régénération en cas de lésion. Il est donc admis que les cellules souches de l'épiderme inter-folliculaire auraient une niche, encore mal définie, au sein de cette couche (voir §B de ce chapitre).

Lorsqu'elles cessent de proliférer, les cellules de la couche basale s'engagent dans le processus de différenciation, se détachent de la JDE et migrent progressivement de la couche basale vers la surface de l'épiderme. Elles subissent alors des modifications morphologiques et biochimiques qui permettent de distinguer successivement les couches spineuses, granuleuses et cornées.

III.1.b. Les couches spineuses

Dans les couches spineuses, les kératinocytes cessent d'exprimer les kératines K5 et K14 et induisent l'expression de la paire de kératines K1 et K10 qui constituent des marqueurs de différenciation précoces (Fuchs and Green, 1980). L'expression de la kératine K9 – qui forme un hétérodimère avec K1 – est spécifiquement induite au niveau des paumes et des plantes de pied (Langbein et al., 1993). Ces kératines s'organisent en larges faisceaux autour du noyau et convergent

¹ La famille des **kératines**, qui compte 54 gènes, est un sous-ensemble de la famille des filaments intermédiaires (pour revue voir : Moll et al., 2008). Les kératines épithéliales de type I (acide, K9 à K24) forment des hétérodimères avec les kératines de type II (basique, K1 à K8). Les hétérodimères de kératines s'associent en proto-filaments et huit proto-filaments forment les filaments intermédiaires du cytosquelette des kératinocytes.

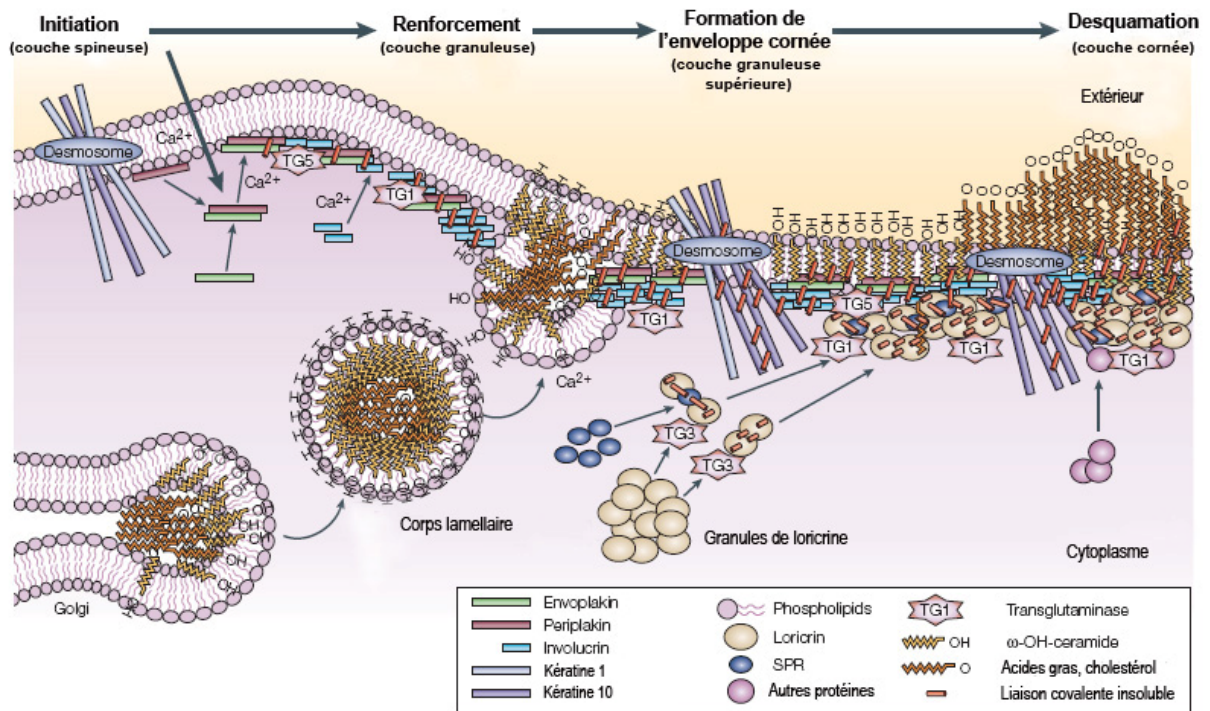


Figure 5 : Formation de l'enveloppe cornée.

La première étape de la formation de l'enveloppe cornée débute dans les couches spinieuses avec la formation des corps lamellaires riches en lipides. Dans les couches granuleuses, les transglutaminases 1 et 5 (TG1, TG5) lient de façon covalente l'envolplakine, la périplakine et l'involucrine au niveau de la membrane plasmique. Cette structure protéique est ensuite renforcée par l'ancrage de complexes de loricrine et de petites protéines riches en proline (SPRs, small proline-rich proteins) formés sous l'action des transglutaminases 1 et 3. Parallèlement à la formation de cette enveloppe protéique dense, les corps lamellaires fusionnent avec la membrane plasmique et extrudent leur contenu lipidique dans l'espace intercellulaire. La membrane plasmique est progressivement enrichie en acides gras et en céramides. Le cornéocyte, stade terminal de la différenciation du kératinocyte, est une cellule plate, morte, enveloppée d'une épaisse couche protéique et lipidique appelée enveloppe cornée, et baignant dans un ciment intercellulaire lipidique. (D'après : Candi et al., 2005)

en périphérie vers les desmosomes, renforçant la structure de la cellule et la cohésion du tissu. La rétraction de la membrane plasmique entre les desmosomes donne aux kératinocytes un aspect épineux dont les couches spineuses tirent leur nom.

La production de nouvelles organelles peut être observée dans les kératinocytes spineux les plus superficiels : ce sont les corps lamellaires (ou kératinosomes), des vésicules sécrétoires issus de l'appareil de Golgi riches en lipides et en enzymes.

III.1.c. Les couches granuleuses

Les kératinocytes des couches granuleuses se distinguent par la présence de nombreuses granulations cytoplasmiques : les granules de kératohyaline. Elles sont majoritairement composées de profilaggrine, le précurseur de la filaggrine. La maturation de la profilaggrine en filaggrine par protéolyse intervient lors de la transition de la cellule granuleuse vers la couche cornée. La filaggrine (**filament aggregation protein**) induit l'aggrégation des filaments intermédiaires de kératine, provoquant l'affaissement du cytosquelette et l'aplatissement progressif de la cellule (Lynley and Dale, 1983).

L'augmentation du calcium intracellulaire dans les couches suprabasales induit la formation d'une enveloppe protéique et lipidique dense, appelée enveloppe cornée, au niveau de la membrane plasmique des cellules (figure 5). Elle est formée par la liaison covalente de nombreuses protéines de structure sous l'action de transglutaminases spécifiques, dépendantes du calcium (pour revue voir : Candi et al., 2005; Kalinin et al., 2001). La plupart des gènes codant pour les protéines de l'enveloppe cornée (notamment la loricrine, l'involucrine et la profilaggrine) sont localisés sur un cluster de 1,9 Mpb situé dans la région 1q21 du chromosome 1, appelée « complexe de différenciation épidermique » (Mischke et al., 1996).

Parallèlement à la formation de ce réseau protéique, les corps lamellaires accumulés par les kératinocytes fusionnent avec la membrane plasmique pour déverser leur contenu lipidique dans l'espace intercellulaire. Ce processus permet le remplacement progressif de la membrane plasmique par des céramides et des acides gras (figure 5).

III.1.d. Les couches cornées

Le stade ultime de la différenciation du kératinocyte est une cellule plate, morte, appelée cornéocyte. Les organelles intracellulaires, et notamment le noyau, y ont été dégradées par protéolyse au cours d'un processus qui diffère toutefois de l'apoptose conventionnelle (Eckhart et al., 2000; Lippens et al., 2000). Les cornéocytes sont constitués principalement de filaments de kératines enchâssés dans l'enveloppe cornée. Ils sont en outre entourés d'un réseau dense de lipides insolubles qui confère à la peau sa faible perméabilité. Des peptides antimicrobiens comme les

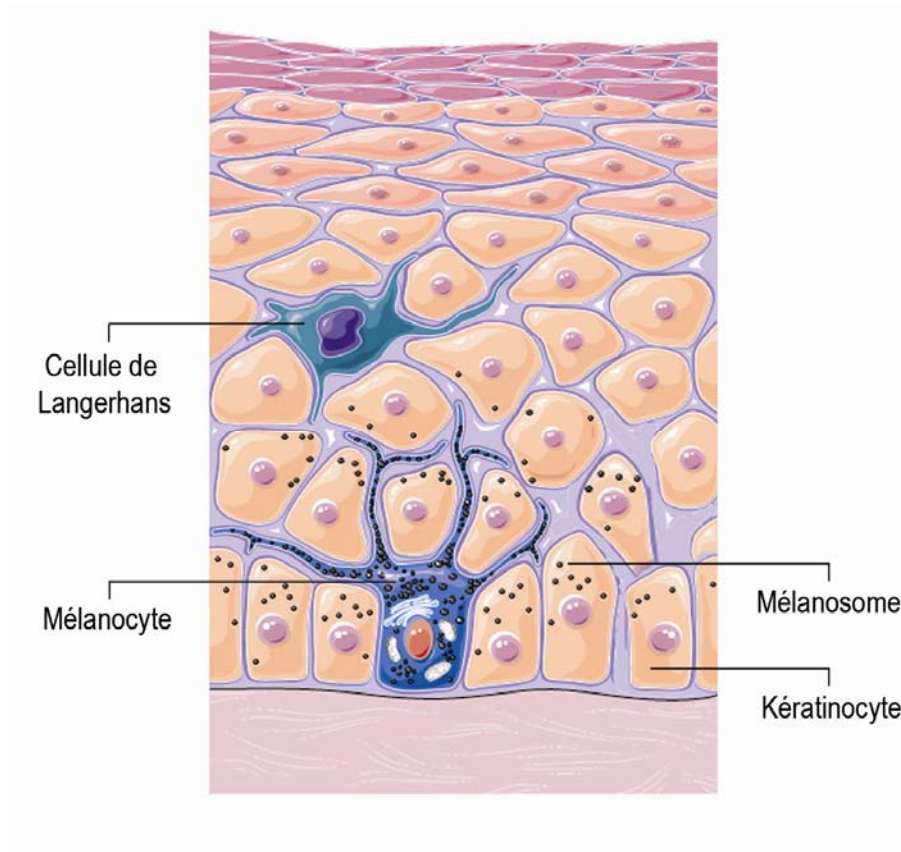


Figure 6 : Unité épidermique de mélanisation.

Les mélanocytes sont situés à la jonction entre le derme et l'épiderme. On compte environ un mélanocyte pour dix kératinocytes basaux. Le mélanocyte étend ses dendrites vers les couches suprabasales de l'épiderme pour distribuer les mélanosomes à une quarantaine de kératinocytes. Les mélanosomes se placent en ombrelle au dessus du noyau des kératinocytes pour le protéger des effets néfastes du rayonnement ultraviolet contenu dans la lumière solaire.

défensives sont présents dans ce ciment intercornéocytaire (Ali et al., 2001). L'organisme est ainsi protégé contre les pertes d'eau massives (déshydratation) et contre l'invasion par des éléments nocifs de l'environnement (molécules chimiques, bactéries,...).

Les cornéocytes sont éliminés continuellement de la surface de la peau par desquamation. Ce processus résulte de la protéolyse des cornéodesmosomes reliant entre eux les cornéocytes. Il est finement régulé par un équilibre entre protéases et anti-protéases spécifiques (Candi et al., 2005). La perte progressive des cornéocytes par desquamation étant compensée par la prolifération des cellules de la couche basale, l'épiderme se renouvelle entièrement tous les 30 à 40 jours. Ce renouvellement permanent assure l'intégrité de la fonction barrière de la peau.

III.2. Les autres cellules de l'épiderme

III.2.a. Les mélanocytes

Les mélanocytes sont les cellules pigmentaires de la peau. Elles dérivent de la crête neurale. Elles sont localisées au niveau de la couche basale de l'épiderme – où on compte environ 1 mélanocyte pour 10 kératinocytes – et étendent leurs dendrites vers les kératinocytes adjacents de la couche basale et des couches suprabasales (figure 6) (pour revue voir : Brenner and Hearing, 2008; Yamaguchi et al., 2007). Les mélanocytes synthétisent la mélanine dans une organelle spécialisée appelée mélanosome. Il existe deux types de mélanine : l'eumélanine, de couleur brune/noire, et la phéomélanine, de couleur orange. Tous les individus synthétisent les deux types de mélanine, mais le ratio entre l'une et l'autre détermine la couleur de la peau (Wakamatsu et al., 2006). Les mélanosomes migrent dans les dendrites des mélanocytes et sont transférés aux kératinocytes où ils forment une « couverture » protectrice au dessus du noyau. Chaque mélanocyte distribue la mélanine qu'il synthétise à 35-40 kératinocytes : c'est l' « unité épidermique de mélanisation ». La mélanine, et particulièrement l'eumélanine, protège la cellule des effets délétères de la lumière solaire en absorbant une partie de ces rayonnements, limitant ainsi leur pénétration dans l'épiderme.

III.2.b. Les cellules de Langerhans

Les cellules de Langerhans sont les cellules dendritiques présentatrices d'antigène qui peuplent l'épiderme (pour revue voir (Merad et al., 2008)). Ce sont des leucocytes qui dérivent de la moelle osseuse. Ces cellules représentent 3 à 5% des cellules épidermiques et sont liées aux kératinocytes par la E-cadhérine (Tang et al., 1993). Suite à un stimulus inflammatoire, l'expression de la E-cadhérine est diminuée et les cellules de Langerhans quittent l'épiderme pour rejoindre les

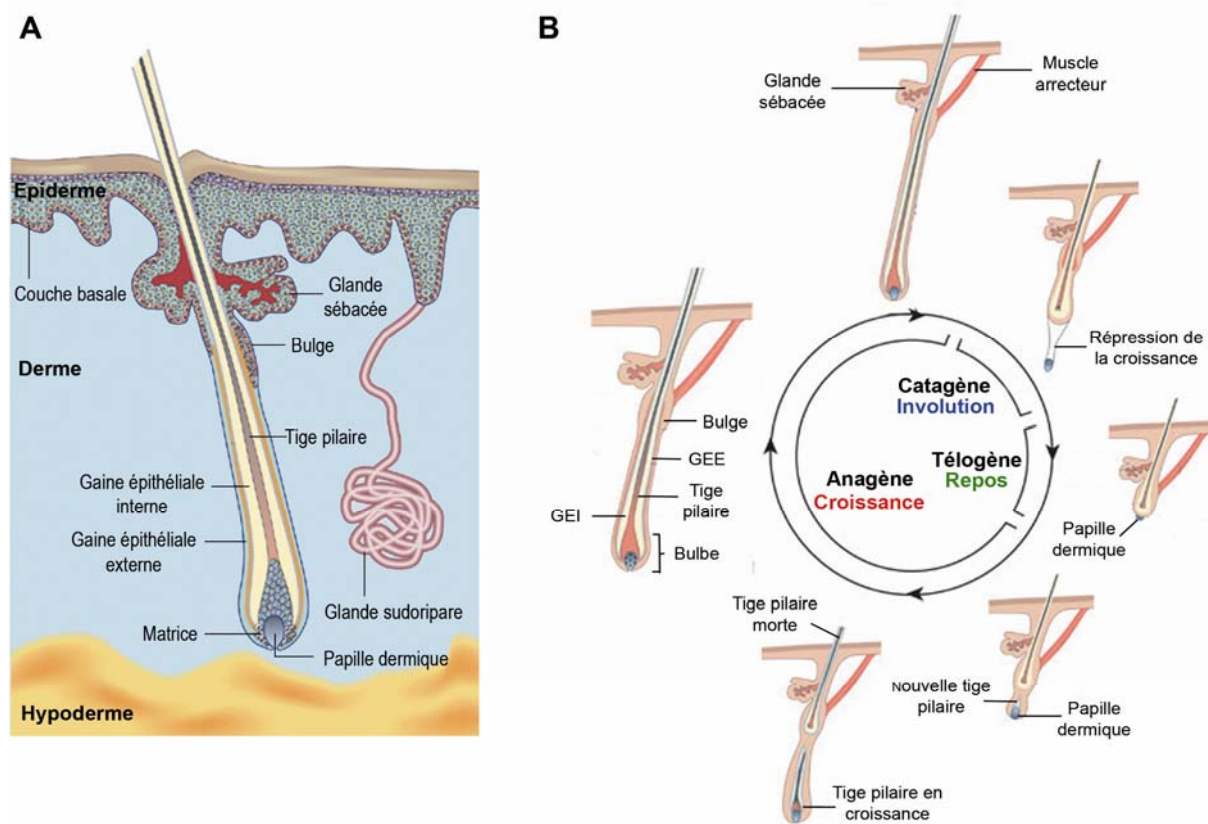


Figure 7 : Le follicule pilo-sébacé et le cycle pileire.

(A) Représentation schématique du follicule pilo-sébacé. Le follicule pileux est constitué de couches concentriques de cellules épithéliales. La gaine épithéliale externe est en continuité avec la couche basale de l'épiderme interfolliculaire. A la base du poil, les cellules de la matrice prolifèrent puis s'engagent dans un processus de différenciation générant les différentes couches de la gaine épithéliale interne et de la tige pileire. Le renflement, ou « bulge », situé sous la glande sébacée contient les cellules souches multipotentes du follicule pileux. Les glandes sébacées sécrètent un liquide riche en lipides, le sébum, qui lubrifie le poil et la peau. **(B) Le cycle pileire.** La phase anagène correspond à la phase de croissance du poil grâce au cycle de prolifération/différenciation des cellules de la matrice. Au cours de la phase catagène, les deux tiers inférieurs du poil régressent en raison de l'enclenchement d'un processus apoptotique au sein de la matrice. Après une phase de repos, ou phase télogène, les cellules souches du bulge initient l'entrée du follicule pileux dans une nouvelle phase de croissance (anagène). (D'après : Blanpain and Fuchs, 2009; Fuchs, 2007)

ganglions lymphatiques où elles stimulent les lymphocytes T. Ces cellules constituent la première ligne de défense immunitaire contre les pathogènes infectieux.

III.2.c. Les cellules de Merkel

Les cellules de Merkel sont des cellules neuroendocrines présentes principalement dans la couche basale de l'épiderme (pour revue voir (Boulais and Misery, 2007)). Les cellules de Merkel sont présentes en grand nombre dans les zones les plus sensibles au toucher, comme l'extrémité des doigts, où elles interagissent avec l'extrémité des fibres nerveuses qui traversent la JDE. Elles joueraient le rôle de mécanorécepteurs. Elles sécrètent également des hormones et des neuropeptides qui pourraient participer au maintien de l'homéostasie cutanée.

IV. Les annexes cutanées

IV.1. Le follicule pilo-sébacé

Le follicule pilo-sébacé comprend le follicule pileux, les glandes sébacées et dans certains endroits du corps, un muscle arrecteur dont la contraction provoque la verticalisation du poil (horripilation). Les follicules pilo-sébacés sont distribués sur toute la surface de la peau, à l'exception des paumes, des plantes de pied et des faces latérales des doigts et des orteils.

Le follicule pileux comprend le poil, ou tige pileuse, entouré par une gaine épithéliale interne et une gaine épithéliale externe (figure 7A). La gaine épithéliale externe, qui s'enfonce dans le derme, est en continuité avec la couche basale de l'épiderme inter-folliculaire. À son extrémité profonde, la gaine externe forme le bulbe pileux qui renferme une matrice germinative dont les cellules prolifèrent et se différencient pour former les différentes couches cellulaires de la gaine interne et de la tige pileuse. Le bulbe pileux est creusé d'une cavité, la papille dermique, une portion de derme peuplée par une population spécialisée de fibroblastes.

Contrairement au renouvellement de l'épiderme qui est continu, la croissance d'un follicule pileux est cyclique (figure 7B). La phase anagène est la phase de croissance de la tige pileuse. Elle est caractérisée par une intense prolifération des cellules matricielles du bulbe pileux. Au cours de la phase catagène, ou phase d'involution du follicule pileux, la partie inférieure du follicule est dégradée par un processus d'apoptose. Le follicule pileux entre alors en phase de repos, la phase télogène. La durée moyenne de chacune de ces phases est de 3 ans, 3 semaines et 3 mois, respectivement (Bernard, 2006). Sur une chevelure normale, environ 85 % des follicules sont en phase anagène et 15 % en phase télogène. À la fin de la phase télogène, le follicule se régénère à partir d'un réservoir de cellules multipotentes et entame une nouvelle phase anagène. Ces phases successives constituent le cycle pileux.

Les glandes sébacées sont des glandes exocrines qui produisent et sécrètent le sébum, un liquide riche en lipides. Le canal excréteur des glandes sébacées déverse le sébum dans l'*infundibulum* du follicule pileux, la cavité en contact avec l'extérieur où débouche la partie supérieure du poil.

IV.2. Les glandes sudoripares

Les glandes sudoripares sont les glandes exocrines qui sécrètent la sueur et jouent ainsi un rôle essentiel dans la thermorégulation. Les glandes eccrines sont localisées sur toute la surface de la peau mais elles sont particulièrement nombreuses au niveau des paumes des mains, de la plante des pieds et du front. La partie sécrétrice de ces glandes est enroulée dans le derme et leur canal excréteur débouche directement sur un pore à la surface de la peau (figure 7A). Les glandes apocrines sont présentes au niveau des aisselles, du périnée, du conduit auditif externe et des paupières. Leur canal excréteur débouche dans l'*infundibulum* d'un follicule pileux, sous la glande sébacée.

B. Les cellules souches kératinocytaires

I. Définition et caractéristiques des cellules souches tissulaires

L'épiderme doit être renouvelé en continu pour remplacer les cellules perdues quotidiennement par desquamation et il doit en outre posséder une capacité de régénération rapide et efficace en cas de blessure. Ces propriétés impliquent l'existence d'un ou plusieurs compartiments de cellules souches au sein de la peau. Les cellules souches sont définies d'une part par leur capacité d'auto-renouvellement à long terme et d'autre part par leur capacité à donner naissance à une descendance engagée dans un processus de différenciation spécifique (Lajtha, 1979). Les cellules souches embryonnaires (CSE) peuvent donner naissance à tous les types cellulaires constituant un individu ; on parle alors de pluripotence. Au contraire, le potentiel de différenciation des cellules souches tissulaires est restreint à leur tissu d'origine. Ces cellules souches donnent ainsi naissance à une (unipotence) ou plusieurs (multipotence) lignées cellulaires participant à l'organisation fonctionnelle d'un tissu donné. On distingue ainsi, par exemple, les cellules souches du système hématopoïétique, les cellules souches de l'intestin ou les cellules souches kératinocytaires.

L'hypothèse la plus communément admise pour expliquer le maintien d'une population de cellules souches « indifférenciées » au sein d'un tissu est la possibilité que ces cellules ne puissent exister que dans un micro-environnement très spécifique, appelé niche (Morrison et al., 1997). Au sein de la niche, les cellules souches seraient sous le contrôle de facteurs assurant leur maintien à long terme tout en empêchant leur différenciation. Il est également admis que les cellules souches seraient maintenues au sein de la niche dans un état de quiescence et ne se diviseraient donc que

très rarement afin de préserver l'intégrité de leur information génétique et épigénétique, renfermant le programme de la morphogénèse tissulaire.

II. Mise en évidence des cellules souches kératinocytaires *in vitro*

Une des grandes difficultés de l'étude des cellules souches réside dans l'obtention d'un modèle de culture performant permettant d'évaluer la présence et la fonctionnalité des cellules souches *in vitro*, en dehors de leur niche. Le système de culture doit permettre de préserver à la fois le potentiel de renouvellement à long terme et le potentiel de différenciation des cellules souches.

Dès 1975, Rheinwald et Green montrèrent que les kératinocytes épidermiques issus d'une biopsie cutanée pouvaient être cultivés à long terme en présence d'une couche nourricière de fibroblastes (feeders), irradiés aux rayons gamma pour arrêter leur croissance, mais continuant à produire les facteurs nécessaires à la croissance des kératinocytes (Rheinwald and Green, 1975). En présence d'EGF (epidermal growth factor), un facteur de croissance augmentant la capacité clonogénique des kératinocytes, ces derniers peuvent ainsi effectuer en culture plus de 100 doublements de population, soit un facteur d'expansion supérieur à 10^{30} (Rheinwald and Green, 1977). La descendance d'un seul kératinocyte cultivé dans les conditions adéquates pourrait donc régénérer la totalité de l'épiderme d'un individu ($\approx 10^{11}$ cellules), mais également celui de l'ensemble des individus de la planète ($\approx 10^{21}$ cellules).

Par la suite, l'analyse du potentiel de croissance des kératinocytes primaires humains cultivés dans ces conditions a permis de mettre en évidence trois types de colonies : les holoclones, les méroclones et les paraclones (Barrandon and Green, 1987) (figure 8). Les holoclones sont de larges colonies au contour régulier dont la majorité des cellules (> 95 %) sont clonogéniques et formeront elles aussi des colonies de grande taille. Les cellules générant un holoclone *in vitro* ont probablement pour origine une cellule souche épidermique. Les paraclones sont des colonies abortives de petite taille, initiées par une cellule présentant un potentiel de prolifération très limité (< 15 divisions). Moins de 5% des cellules issues d'un paraclone possèdent un potentiel clonogénique. Les méroclones sont des colonies de taille intermédiaire, au contour irrégulier. Elles sont initiées par des cellules fondatrices possédant un potentiel de croissance intermédiaire et dont la descendance, hétérogène, possède une capacité clonogénique comprise entre 5 et 95%. Au cours des passages, une transition de l'holoclone vers le méroclone, puis vers le paraclone est observée, traduisant un épuisement du réservoir des cellules à fort potentiel prolifératif. L'analyse clonale permet donc d'estimer la proportion de cellules souches épidermiques présentes au sein d'une culture de kératinocytes et cette proportion détermine la durée de vie de la culture.

Ces techniques de culture et les critères définis par ces travaux pionniers font encore autorité aujourd'hui pour la caractérisation du potentiel de prolifération des cellules souches

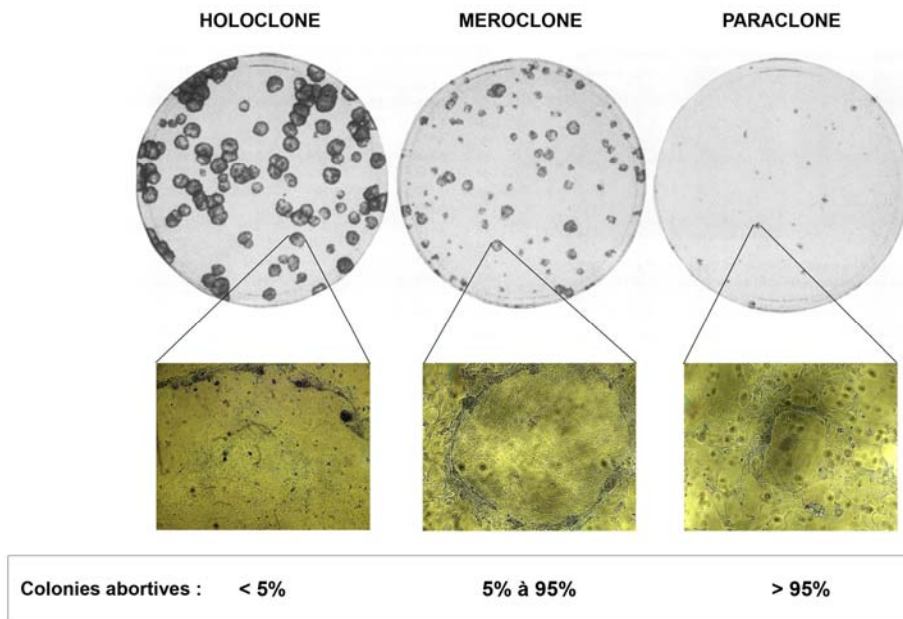


Figure 8 : Les 3 types de colonies formées par les kératinocytes en culture.

L'**holoclone** possède le plus fort potentiel prolifératif et correspondrait aux cellules souches épidermiques. Les colonies générées par un holoclone sont larges, rondes, avec un contour régulier et sont formées de petites cellules prolifératives. Le **paraclone** est constitué de cellules avec un potentiel de croissance très limité (< 15 divisions) et la plupart des colonies sont en différenciation terminale. Le **méroclone** présente des caractéristiques intermédiaires et constitue un état de transition entre l'holoclone et le paraclone. Les colonies du méroclone ont un contour irrégulier avec des petites cellules prolifératives en périphérie et de larges cellules différenciées au centre. (D'après : Barrandon and Green, 1987)

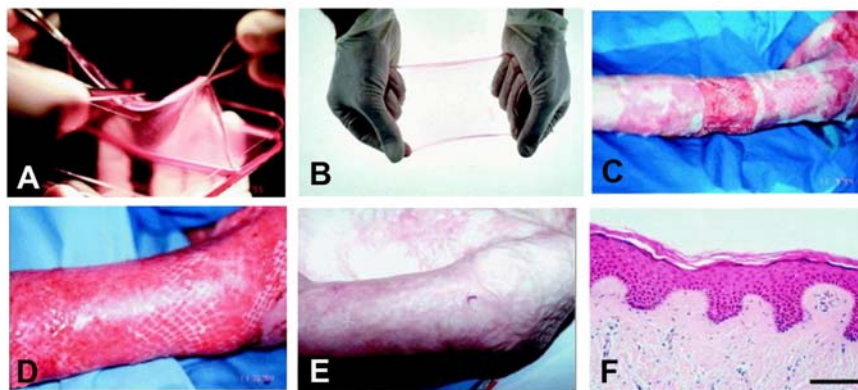


Figure 9 : Autogreffe d'épithélia de culture chez un patient sévèrement brûlé.

(A) Les kératinocytes du patient sont cultivés jusqu'à confluence directement sur le plastique des boîtes de culture ou bien sur une matrice de fibrine permettant d'améliorer la manipulation des feuillets épidermiques générés (B). (C) Les zones brûlées (ici le bras d'un patient brûlé sur 95% de sa surface corporelle) sont excisées et recouvertes de peau allogénique en attendant l'autogreffe pour limiter la déshydratation et les risques d'infection. Après excision de ces greffes allogéniques et/ou dermabrasion, les feuillets épidermiques générés à partir des cellules du patients sont déposés sur les lits de greffes, puis recouverts de gaze et de vaseline. (D) Apparence de la peau quelques semaines après la prise de greffe. (E) Apparence de la peau 3 ans après la greffe. La peau est élastique au toucher et présente une histologie normale (noter la reformation des crêtes épidermiques) malgré l'absence d'annexes cutanées (F). (D'après : Ronfard et al., 2000)

kératinocytaires *in vitro*. Parallèlement à ces études, des modèles de peau reconstruite *in vitro*, mimant le processus de stratification et de différenciation épidermique en culture, ont été développés (Asselineau et al., 1986; Bell et al., 1981). Ces épidermes reconstruits peuvent ensuite être greffés chez la souris immunodéficiente pour régénérer de la peau humaine *in vivo* (Demarchez et al., 1992) (Del Rio et al., 2002). Ces modèles permettent d'étudier à court terme ou à long terme, respectivement, le potentiel de régénération épidermique d'une population de kératinocytes, un potentiel directement lié à la présence de cellules souches fonctionnelles.

Toutefois, la preuve la plus importante de la présence et du maintien des cellules souches en culture vient du succès de l'autogreffe chez les grands brûlés de feuilletts épithéliaux générés en laboratoire à partir des kératinocytes épidermiques issus d'une biopsie de peau saine prélevée chez le patient (Gallico et al., 1984; Pellegrini et al., 1999; Ronfard et al., 2000). Le renouvellement à très long terme (plus de 20 ans) d'un épiderme aux caractéristiques normales, malgré l'absence d'annexes cutanées, prouve que les cellules souches ont été préservées en culture et ont conservé tous leurs potentiels de prolifération et de différenciation après la greffe chez l'homme (figure 9).

III. Localisation des cellules souches *in vivo*

III.1. Organisation fonctionnelle des kératinocytes de la couche basale

Bien que l'existence d'une population de cellules souches dans la couche basale de l'épiderme soit admise depuis de nombreuses années, leur nombre et la localisation précise de leur niche au sein de cette couche ne sont pas encore définis. Selon les estimations, les cellules souches représentaient entre 0,1% et 1 % des kératinocytes de la couche basale (Schneider et al., 2003).

D'après les premières observations décrites par Potten et ses coéquipiers à la fin des années 70 puis confirmées par Mackenzie et al. en 1997, l'épiderme serait organisé en colonnes, les unités de prolifération épidermiques (UPE), comprenant chacune une dizaine de kératinocytes basaux donnant naissance à plusieurs couches de cellules suprabasales (Mackenzie, 1997; Potten, 1974) (figure 10). Chacune de ces UPE dériverait d'une seule cellule souche. Les autres cellules basales des UPE possèderaient un potentiel prolifératif limité dans le temps, d'où leur nom de cellules en amplification transitoire ; issues directement des cellules souches, elles se diviseraient plusieurs fois avant de quitter la couche basale pour s'engager dans le processus de différenciation. L'existence d'un tel compartiment de cellules en amplification transitoire a deux avantages : 1) une importante « réserve » de cellules prolifératives permet une régénération rapide de l'épiderme en cas de lésion ; 2) le nombre de divisions des cellules souches nécessaire au remplacement des cellules de l'épiderme reste limité, préservant ainsi leur intégrité.

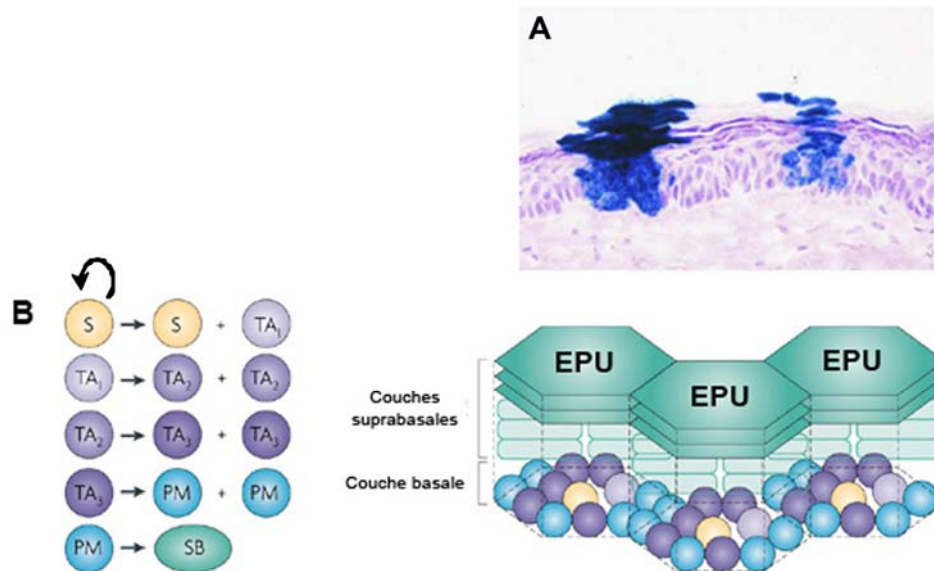


Figure 10 : Le modèle de l'unité épidermique de prolifération (EPU).

(A) Visualisation des EPU dans l'épiderme murin par marquage génétique. Après une dermabrasion (abrasion de l'épiderme et des couches supérieures du derme), les souris sont injectées localement avec un rétrovirus permettant l'expression du gène *LacZ* codant pour la β -galactosidase. La coloration de l'épiderme régénéré après quelques semaines révèle la présence de « colonnes » de différenciation, les EPU, qui persistent pendant environ 40 renouvellements épidermiques, suggérant la présence de cellules souches à leur base. **(B) Représentation schématique de l'organisation fonctionnelle des EPU.** Chaque EPU est initiée par une cellule souche épidermique (S) capable d'autorenouvellement et pouvant donner naissance à une population de cellules en amplification transitoire (transit amplifying cells, TA). Les cellules TA se divisent plusieurs fois avant de perdre leur potentiel prolifératif (post-mitotic cells, PM) et d'entrer dans le processus de différenciation en migrant vers les couches supérieures de l'épiderme (suprabasal cells, SB). (Photographie : Ghazizadeh and Taichman, 2001; Schéma d'après : Jones and Simons, 2008)

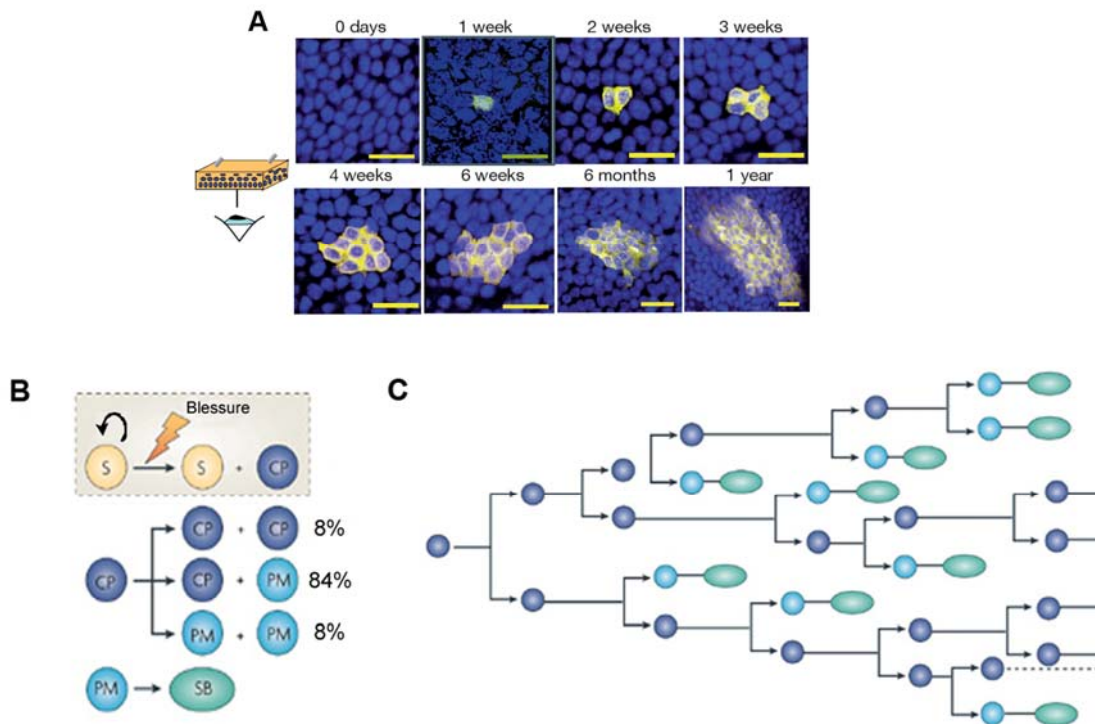


Figure 11 : Un nouveau modèle de renouvellement de l'épiderme ?

(A) Suivi de l'évolution clonale d'une cellule basale par marquage génétique (EYFP). Noter que le nombre de cellules issues d'un kératinocyte basal augmente progressivement au cours du temps, ce qui est en contradiction avec le modèle des EPU qui prédit que la taille du clone doit devenir constante au bout d'un certain temps. **(B) Le nouveau modèle proposé : une population de progéniteurs unique.** L'homéostasie de l'épiderme serait assurée par un compartiment de progéniteurs épidermiques « engagés » (committed progenitors, CP) capables (1) de s'autorenouveler ; (2) de donner naissance à des cellules engagées dans le processus de différenciation (PM) qui quitteront la couche basale vers les couches supérieures de l'épiderme (SB). Contrairement aux cellules TA dont le nombre de divisions est limité et dont l'engagement dans le processus de différenciation dépend de leur histoire, les progéniteurs CP ont la même probabilité de se différencier à chaque division. Un compartiment de cellules souches quiescentes pourrait être activé en cas de blessure pour régénérer le compartiment des progéniteurs CP. **(C) Evolution clonale à long terme d'un progéniteur CP.** (D'après : Clayton et al., 2007)

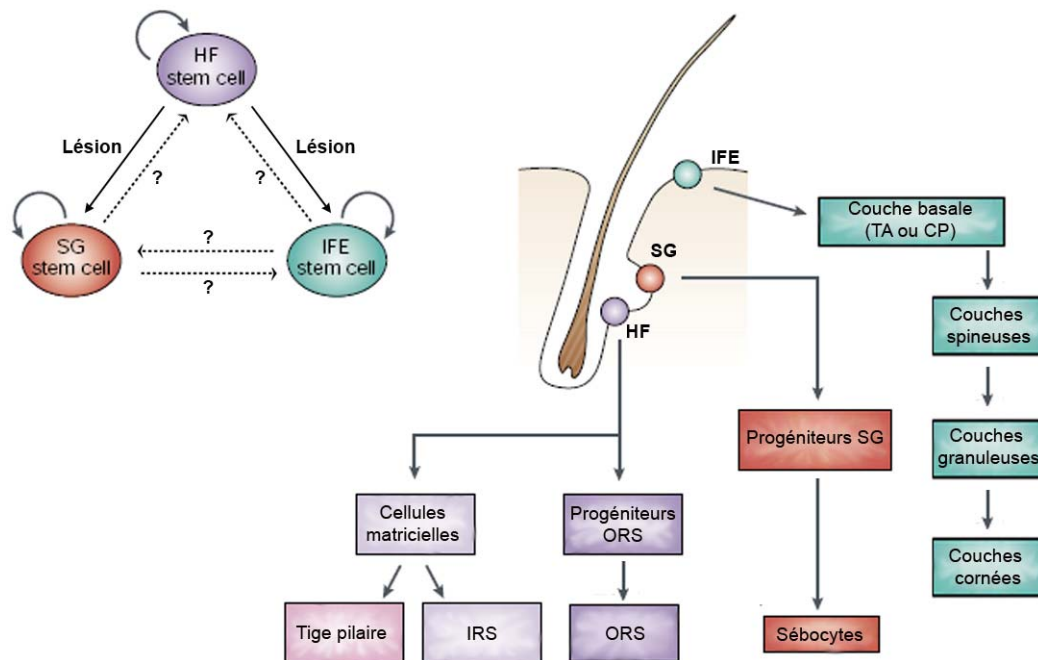


Figure 12 : Les différents compartiments de cellules souches dans la peau.

Les cellules souches de l'épiderme interfolliculaire (IFE) sont situées dans la couche basale et permettent le renouvellement permanent de l'épiderme. Les progéniteurs des glandes sébacées (SG) sont responsables du renouvellement physiologique des sébocytes. Les cellules souches du follicule pileux (HF) sont capables, en situation cicatricielle, de participer à la régénération de l'épiderme interfolliculaire (IFE) et des glandes sébacées (SG). Légende : HF, follicule pileux ; SG, glande sébacée ; IFE, épiderme inter-folliculaire ; ORS (outer root sheath), gaine épithéliale externe ; IRS (inner root sheath), gaine épithéliale interne. (D'après : Owens and Watt, 2003)

Un autre modèle a récemment été proposé par Clayton et ses co-équipiers (Clayton et al., 2007). Leurs résultats, basés sur le suivi de l'évolution clonale d'une cellule basale unique dans l'épiderme de queue de souris, suggèrent l'existence d'une population unique de progéniteurs au sein de la couche basale (figure 11). Ces progéniteurs seraient capables de se diviser de façon asymétrique, parallèlement ou perpendiculairement à la JDE, donnant ainsi directement naissance à une cellule engagée dans le processus de différenciation, sans passer par un compartiment de cellules en amplification transitoire. Toutefois, ce modèle n'a pu être démontré que dans l'épiderme de queue de souris, qui constitue un système très différent de l'épiderme interfolliculaire humain. Ainsi, chez l'homme, la notion d'une certaine hiérarchie au sein de la couche basale, en accord avec le modèle des EPU, semble être bien définie (Barrandon and Green, 1987; Fortunel et al., 2010).

III.2. Les cellules souches du follicule pileux

Une des premières méthodes utilisées pour l'identification des cellules souches *in vivo* repose sur l'utilisation d'analogues nucléotidiques comme la bromodéoxyuridine (BrdU) ou la [³H]thymidine. Au cours d'une mise en contact prolongée au sein d'un tissu, ces marqueurs sont incorporés, lors de la réplication, dans l'ADN de toutes les cellules en division. Après une période de chasse à la thymidine, le marqueur est rapidement dilué dans les cellules à forte activité mitotique, mais il persiste dans les cellules qui ne se divisent que rarement, mettant ainsi en évidence une population appelée « label retaining cells » (LRCs). Parmi ces LRCs se trouveraient les cellules souches tissulaires quiescentes.

En 1990, Cotsarelis *et al.* montrent que, chez la souris, la majorité des LRCs résidant dans la peau sont localisées au niveau d'une région particulière du follicule pileux appelée « bulge ». Le bulge est un renflement de la gaine épithéliale externe du follicule pileux, situé sous le canal excréteur de la glande sébacée (voir figure 7). Seules quelques LRCs sont observées dans la couche basale de l'épiderme interfolliculaire murin (Cotsarelis et al., 1990). Par la suite, deux études fonctionnelles permettent d'appuyer l'hypothèse selon laquelle les LRCs correspondraient aux cellules souches. En disséquant de façon méthodique les vibrisses d'un rat et en évaluant *in vitro* le potentiel clonogénique de chacune des régions de ces follicules, Koyabashi *et al.* montrent que 95% des cellules clonogéniques sont situées au niveau du bulge, les 5% restantes étant localisées dans la matrice du follicule (Kobayashi et al., 1993). Grâce à cette méthode, la même équipe montre que les cellules clonogéniques du follicule pileux humain sont concentrées dans une région située entre le site d'insertion du muscle arrecteur du poil et le bulbe pileux (Rochat et al., 1994).

Par la suite, des expériences de marquage génétique des cellules souches du bulge ont permis d'aboutir aux conclusions suivantes : (1) les cellules du bulge sont des cellules souches multipotentes possédant une forte capacité clonogénique (>140 générations) (Claudinot et al., 2005)

et capables de régénérer tous les compartiments épithéliaux du follicule pilo-sébacé (Taylor et al., 2000) (Blanpain et al., 2004; Claudinot et al., 2005; Morris et al., 2004) ; (2) en situation cicatricielle (blessure, greffe), elles colonisent l'épiderme interfolliculaire de façon transitoire pour assurer rapidement sa régénération ; (3) toutefois, elles ne participent pas en temps normal à l'homéostasie de l'épiderme interfolliculaire et ne sont donc ni les cellules souches de l'épiderme, ni la source des cellules souches de l'épiderme (Ito et al., 2005; Levy et al., 2005).

Il existe donc au moins deux populations distinctes de cellules souches capables de régénérer le compartiment des kératinocytes épidermiques : les cellules souches folliculaires, localisées dans le bulge chez la souris et dans un segment du tiers inférieur du follicule chez l'homme, et les cellules souches de l'épiderme interfolliculaire, localisées dans la couche basale (figure 12). Toutefois, si les cellules souches du follicule pileux ont été largement étudiées chez la souris, elles sont encore mal caractérisées chez l'homme. L'utilisation des cellules souches kératinocytaires pour des applications cliniques (greffes, thérapie génique) repose donc essentiellement sur le compartiment des cellules souches de l'épiderme interfolliculaire.

IV. Caractérisation des cellules souches : à la recherche de marqueurs spécifiques

De nombreux efforts ont été voués à la recherche de marqueurs spécifiques aux cellules souches kératinocytaires permettant (1) de les trier pour mieux les caractériser et pour sélectionner en culture les kératinocytes à fort potentiel de croissance ; (2) de les identifier au sein d'un tissu *in vitro* ou *in vivo*.

IV.1. Marqueurs des cellules souches folliculaires

En raison de son accessibilité et de sa morphologie distinctive, le bulge murin a pu être caractérisé par des approches de promoteurs reporteurs et de marquages immunohistochimiques qui ont permis la découverte de marqueurs spécifiques permettant le tri des cellules souches du bulge, comme CD34, ou leur identification *in vivo*, comme la kératine 15 (K15) (Liu et al., 2003; Trempus et al., 2003).

Au contraire, la définition anatomique de la localisation des cellules souches du follicule pileux humain est moins précise et rend plus difficile la définition de marqueurs caractéristiques. Toutefois, grâce à une approche de microdissection et d'analyse transcriptomique comparative de différentes régions du follicule, le profil d'expression génique des cellules souches folliculaires humaines a pu être établi (Ohyama et al., 2006; Ohyama et al., 2007). Ces cellules sur-expriment par exemple le marqueur de surface CD200 (×2) et K15 (×2) mais n'expriment pas CD34.

IV.2. Marqueurs des cellules souches interfolliculaires

IV.2.a. Marqueurs de surface

La recherche de marqueurs de surface permettant le tri des cellules souches interfolliculaires constitue un enjeu majeur pour enrichir une population de kératinocytes en cellules à fort potentiel prolifératif. L'attention s'est tout d'abord portée sur les marqueurs d'adhérence et notamment sur la famille des intégrines². Il est possible d'enrichir en cellules clonogéniques une population de kératinocytes humains en culture sur la base de leur niveau d'expression en surface de l'intégrine $\beta 1$ (Jones et al., 1995; Jones and Watt, 1993) ou de l'intégrine $\alpha 6$ (Kaur and Li, 2000). Cependant, la population sélectionnée sur ces critères reste très hétérogène en termes de capacité de prolifération à long terme (Fortunel et al., 2010). Pour affiner la sélection du compartiment des cellules souches par rapport aux progéniteurs épidermiques, les marqueurs d'adhérence ont été couplés à d'autres critères comme la faible expression de récepteurs membranaires régulant la prolifération (récepteur de l'EGF, récepteur de la transferrine) (Li et al., 1998a; Tani et al., 2000) (Fortunel et al., 2003). Par la suite, d'autres marqueurs de surface ont été proposés pour affiner l'enrichissement des cellules souches interfolliculaires humaines (tableau 2), bien qu'il n'existe à ce jour aucun marqueur complètement spécifique à ce compartiment. De plus, dans la plupart de ces études, la purification de potentielles cellules souches est rarement complétée par une étude exhaustive de leur capacité de prolifération à long terme et de leur potentiel de différenciation *in vitro* et/ou *in vivo*.

IV.2.b. Sélection de progéniteurs épidermiques par exclusion de colorant

L'utilisation de marqueurs de surface pour l'enrichissement des cellules souches *in vitro* est limitée par le fait que l'expression de ces protéines est modifiée dès la mise en culture des kératinocytes, rendant parfois difficile l'extrapolation des résultats obtenus *in vitro* aux applications *in vivo* et *vice versa*. Une alternative intéressante consiste à utiliser la capacité des cellules souches à excréter les drogues et les colorants, une caractéristique mise en évidence dans le système hématopoïétique (Goodell et al., 1996). Ainsi, une petite sous-population (appelée « side population », SP) peut être identifiée parmi les kératinocytes en culture par sa capacité à exclure le Hoescht 33342 (Larderet et al., 2006; Terunuma et al., 2003). Cette population, représentant 0,16% à 0,3% de la population totale, possède un fort potentiel prolifératif et permet la reconstruction d'un

² Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires hétérodimériques constitués d'une unité α et d'une unité β . Elles sont exprimées par tous les kératinocytes de la couche basale. Les plus abondantes dans l'épiderme sont les intégrines $\alpha 2\beta 1$ (récepteur du collagène IV), $\alpha 3\beta 1$ (récepteur de la laminine 332) et $\alpha 6\beta 4$ (intégrines des HD, récepteur de la laminine 332) (pour revue voir Watt, 2002). Les intégrines jouent un rôle dans l'adhérence des kératinocytes basaux à la JDE mais seraient également impliquées dans la régulation de leur engagement dans le processus de différenciation.

Marqueur	Références	Fonction	Modèle expérimental	Niveau d'expression dans les CSEp*	Méthodes d'analyse des CSEp
Intégrine β1	Jones et Watt, 1993	Adhérence des kératinocytes basaux	KHN (P2-P12)	fort (\times 2)	CFE, analyses morphologiques
Intégrine β1	Jones et al., 1995	Adhérence des kératinocytes basaux	Epiderme humain et KHN (P0-P1)	fort (\times 2)	CFE, analyses morphologiques, greffe chez la souris Nude (1 semaine)
Intégrine α6 CD71	Li et al., 1998a ; Kaur et Li, 2000	Adhérence des kératinocytes basaux Récepteur de la transferrine	KHN	fort faible	CFE, passages sériés (75-95 jours)
Delta1	Lowell et al., 2000	Ligand de Notch1	KHN surexprimant Delta1	fort (\times 2)	CFE, différenciation terminale <i>in vitro</i>
Desmogléine 3	Wan et al., 2003	Composant des desmosomes	KHN	faible (/4)	CFE, passages sériés (5-15 semaines)
EGF-R	Fortunel et al., 2003a	Récepteur de l'EGF	KHN	faible	Passages sériés (50-150 jours), peaux reconstruites <i>in vitro</i>
MCSP	Legg et al., 2003	Protéoglycane	KHN	fort (\times 7)	CFE, analyses morphologiques
Lrig 1	Jensen et Watt, 2006 Jensen et al., 2009	Antagoniste de l'EGF-R	KHN surexprimant Lrig1	fort (\times 7)	CFE, analyses morphologiques

Tableau 2 : Marqueurs proposés pour l'enrichissement des cellules souches de l'épiderme interfolliculaire.

*Niveau relatif par rapport aux autres kératinocytes de la couche basale. Le facteur de sur- (\times) ou de sous- (/) expression approximatif est indiqué entre parenthèses. CSEp, cellules souches épidermiques ; EGF, epidermal growth factor ; MCSP, melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan ; Lrig 1, leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1 ; CFE, colony forming efficiency.

épiderme stratifié après 45 doublings de population *in vitro* (Larderet et al., 2006). Les kératinocytes SP constituent un compartiment de progéniteurs différent du compartiment des cellules purifiées sur la base du niveau d'expression des intégrines $\beta 1$ et $\alpha 6$ (Terunuma et al., 2003).

IV.2.c. Marqueurs intracellulaires : l'exemple de p63

Le facteur de transcription p63, un membre de la famille de p53, a été proposé comme marqueur des cellules souches épithéliales (Pellegrini et al., 2001). Il apparaît toutefois aujourd'hui que p63 serait de façon plus générale un marqueur des progéniteurs épithéliaux. La protéine p63, et plus particulièrement son isoforme $\Delta Np63$, est en effet préférentiellement exprimée dans la couche basale de l'épiderme (Koster et al., 2004). Les souris déficientes en p63 présentent un grave défaut du développement épidermique (Mills et al., 1999; Yang et al., 1999). L'incapacité de ces souris à former un épiderme pluristratifié normal pourrait provenir d'un défaut de renouvellement des cellules souches – p63 étant un facteur essentiel à leur potentiel prolifératif (Senoo et al., 2007) – et/ou d'un blocage de l'engagement des progéniteurs épidermiques dans le processus de différenciation (Koster et al., 2007; Medawar et al., 2008). L'expression de $\Delta Np63$, et donc le maintien du caractère « souche », serait contrôlée notamment par le miRNA-203, un micro-ARN présent uniquement dans les couches suprabasales de l'épiderme (Lena et al., 2008; Yi et al., 2008).

La définition de marqueurs intracellulaires comme p63 reste un enjeu important car ce type de marqueurs peut être utilisé pour mieux caractériser la présence et le maintien des cellules souches au sein d'un tissu après des manipulations *in vitro* (peaux reconstruites) ou *in vivo* (greffes).

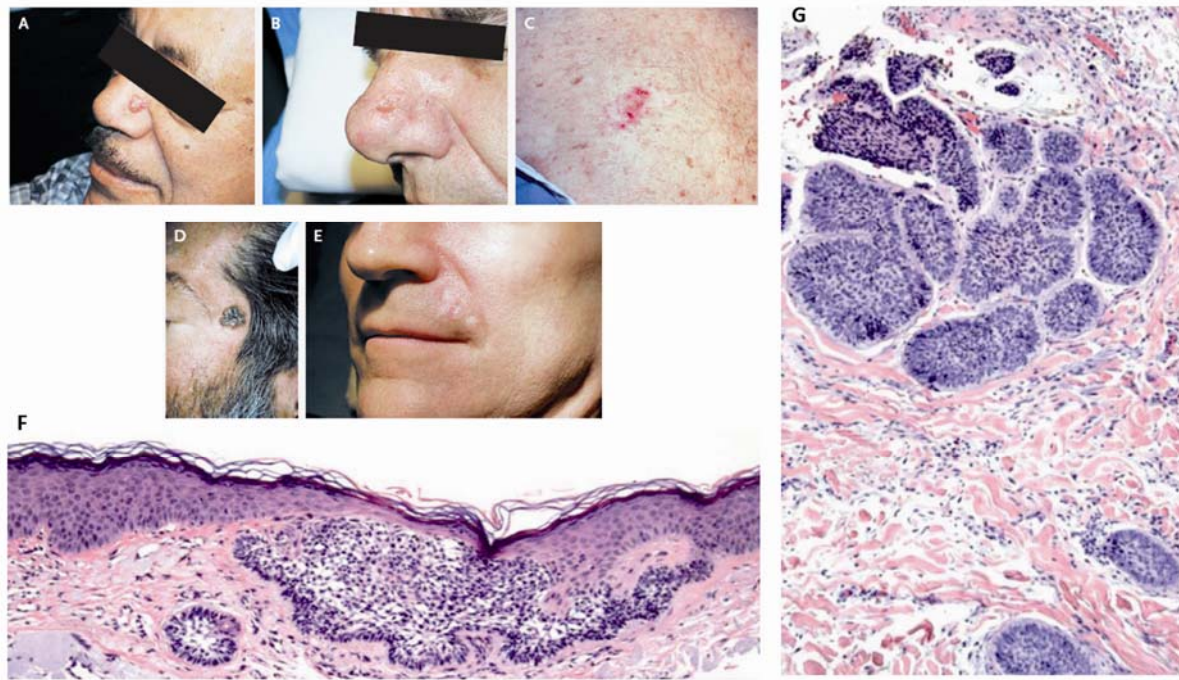


Figure 13 : Aspects macroscopiques et histologiques de différents types de carcinomes basocellulaires.

(A) et (B) CBC nodulaires. (C) CBC superficiel récurrent de l'abdomen. (D) CBC nodulaire pigmenté. (E) CBC morphéiforme de la lèvre. (F) Histologie d'un CBC superficiel montrant la prolifération des cellules tumorales basaloides le long de l'axe épidermique. (G) Histologie d'un CBC nodulaire se manifestant sous la forme de multiples amas sub-épidermiques de taille variable.

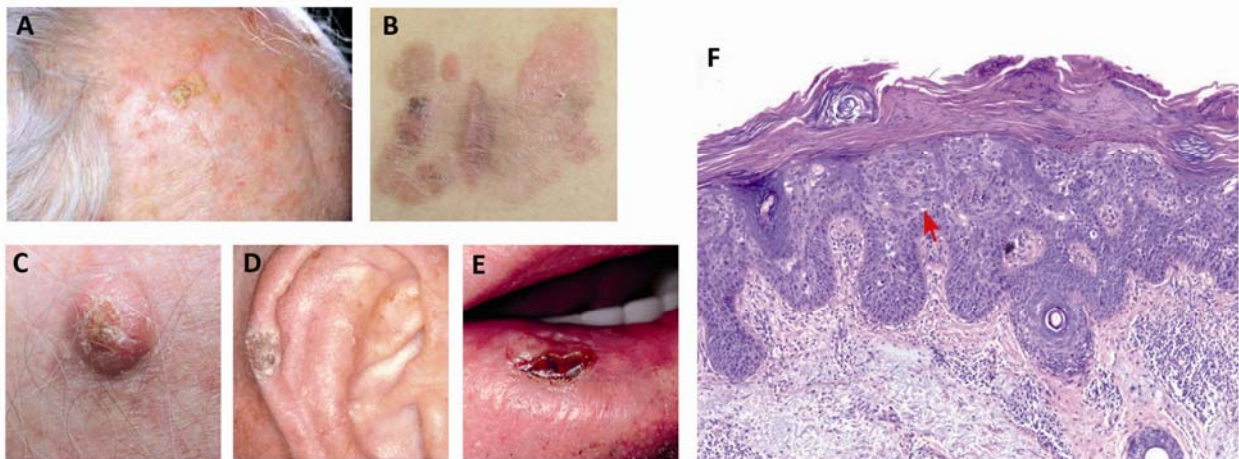


Figure 14 : Aspects macroscopiques et histologiques des carcinomes spinocellulaires et de leurs précurseurs.

(A) Kératose actinique. (B) Maladie de Bowen. (C), (D) et (E) Carcinomes spinocellulaires (CSC). (F) Histologie d'un CSC *in situ*. La flèche rouge signale les cellules atypiques intra-épidermiques.

C. Les cancers de la peau

En raison de sa situation anatomique, la peau est soumise quotidiennement à des agents toxiques mutagènes (ultraviolets, molécules chimiques). En outre, comme nous l'avons vu, l'épiderme est l'objet d'un renouvellement permanent grâce à un équilibre finement régulé entre cellules souches et progéniteurs épidermiques. Le maintien de l'intégrité du génome est primordial au sein des cellules souches et celles-ci sont donc maintenues dans un état de quiescence tout au long de la vie de l'individu. Au contraire, les cellules progénitrices (ou cellules en amplification transitoire) cyclent fréquemment mais ont une durée de vie limitée. L'exposition à des agents génotoxiques engendre donc un risque de croissance tumoral au sein de chacun de ces compartiments. Ainsi, même si chacun des types cellulaires de la peau peut être à l'origine de tumeurs cutanées de fréquence et de morbidité variables, les tumeurs qui se développent à partir des kératinocytes épidermiques sont les plus fréquentes. Les carcinomes baso-cellulaires (CBC) et les carcinomes spino-cellulaires (CSC) représentent à eux seuls environ 30% de toutes les tumeurs développées chez l'Homme chaque année (DePinho, 2000). Le mélanome malin, qui dérive des mélanocytes, occupe la troisième place des tumeurs cutanées les plus fréquentes. Les autres types de tumeurs cutanées – trichoépithéliomes (follicule pileux), fibrosarcomes (fibroblastes), tumeurs de Merkel, ... – sont beaucoup plus rares.

I. Cancers cutanés non-mélanomes : carcinomes baso- et spino-cellulaires

I.1. Epidémiologie et facteurs de risque

Les cancers cutanés non-mélanomes (CCNM) sont les cancers les plus fréquents chez l'homme et leur incidence ne cesse d'augmenter : + 3 à 8% par an depuis les années 60. (Diepgen and Mahler, 2002). Leur incidence est toutefois difficile à mesurer précisément car ils sont souvent exclus des registres des cancers. En 2002, 1,3 millions de cas de CCNM auraient été enregistrés aux Etats-Unis, soit environ 430 nouveaux cas pour 100 000 habitants (Alam and Ratner, 2001). Parmi les CCNM, environ 80% sont des CBC et 20% sont des CSC.

L'exposition au rayonnement ultraviolet (UV)³ contenu dans la lumière solaire constitue le principal facteur de risque pour le développement des CCNM. L'incidence des CSC est doublée tous les 10 degrés de latitude en descendant vers l'équateur (Diepgen and Mahler, 2002). Les sujets à peau claire sont les plus susceptibles de développer des CCNM, qui restent rares chez les populations d'origine africaine, asiatique ou hispanique. Le développement des CSC a été clairement associé à

³ Les UV et leurs effets font l'objet du chapitre suivant.

des expositions solaires chroniques et 90% de ces tumeurs se développent sur des zones régulièrement exposées au soleil (tête, visage, nuque, dos des mains) (Rass and Reichrath, 2008). Les CBC se développent également en majorité sur la tête, le visage et le tronc mais très rarement sur le dos des mains. Des expositions intenses et intermittentes durant l'enfance ou l'adolescence semblent favoriser les CBC (Rubin et al., 2005).

Les CCNM se développent principalement chez les sujets de plus de 50 ans et leur incidence augmente avec l'âge (Alam and Ratner, 2001; Diepgen and Mahler, 2002). L'immunosuppression, chez les patients transplantés notamment, favorise le développement des CCNM et, contrairement à la population générale, les personnes ayant reçu une greffe développent plus de CSC que de CBC (Carucci, 2004). Les risques de développer un CSC ou un CBC sont respectivement 65 fois et 10 fois plus élevés chez les patients transplantés. Les composés chimiques, tels que l'arsenic et les psoralènes, ainsi que les radiations ionisantes augmentent également le risque de CCNM.

I.2. Pathogénèse clinique et moléculaire

CBC. Les CBC se développent généralement *de novo*, sans lésion précurseur. Les kératinocytes tumoraux, qui ressemblent à des kératinocytes de la couche basale (rapport noyau/cytoplasme élevé), franchissent la membrane basale et envahissent le derme en formant des amas (nodules) ou des travées. Il existe plusieurs formes de CBC, selon leur histologie et leur état de différenciation (pour revue voir Crowson, 2006; Rubin et al., 2005) (figure 13). L'agressivité de la tumeur dépend du type histologique ; les CBC sont généralement des tumeurs à croissance lente, qui métastasent rarement (dans 0,0028 à 0,55% des cas) mais qui peuvent être localement très invasives (Robinson and Dahiya, 2003).

Une activation constitutive de la voie SHH/PATCHED, une voie de signalisation essentielle à la morphogénèse et à l'homéostasie du follicule pileux, est observée dans la majorité des CBC sporadiques (c'est-à-dire non liés à une prédisposition génétique) et serait un évènement précoce de la formation tumorale (Dahmane et al., 1997; Regl et al., 2002; Uden et al., 1996).

CSC. Les CSC se développent principalement à partir des kératoses actiniques, des lésions hyperkératosiques squameuses qui apparaissent sur les zones photo-exposées chez les individus de plus de 45 ans (figure 14). Toutes les kératoses actiniques n'évoluent pas vers un CSC invasif ; le risque de transformation d'une kératose actinique en CSC invasif est évalué à 0,1% par lésion et par an chez un individu non traité (Alam and Ratner, 2001). Les anomalies cytologiques visibles à un stade précoce dans les kératoses actiniques sont retrouvées dans les CSC dérivant de ces lésions. Ainsi des mutations dans le gène suppresseur de tumeurs P53 sont présentes dans 70% des kératoses actiniques et dans plus de 90% des CSC (Ziegler et al., 1994).

La maladie de Bowen constitue un autre précurseur du CSC. Elle se présente comme des plaques érythémato-squameuses qui peuvent se développer sur toutes les zones de la peau et sur les muqueuses, surtout génitales (figure 14). La maladie de Bowen peut progresser dans 3 à 20% des cas en carcinome invasif.

Le CSC est une tumeur qui peut être agressive et son potentiel métastatique, essentiellement vers les ganglions périphériques, est estimé autour de 2 à 10% (Veness et al., 2006). La survie à 10 ans des patients avec des métastases au niveau des ganglions n'est que de 20 à 30%, et elle chute à 10% en cas de métastases à distance (Alam and Ratner, 2001).

I.3. Traitement

Si les CCNM sont diagnostiqués de façon précoce, la chirurgie constitue le traitement le plus efficace car il offre les meilleurs résultats en termes de récurrence et d'esthétique (Avril et al., 1997). La radiothérapie est réservée aux tumeurs de grande taille chez les patients inopérables ou pour les formes métastatiques, éventuellement en association avec une chimiothérapie. Une bonne protection solaire dès l'enfance et une surveillance dermatologique régulière sont les meilleurs moyens de prévention des CCNM.

II. Mélanomes malins

II.1. Épidémiologie et facteurs de risque

D'après les données de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le MM ne représente que 4 à 6% des cancers cutanés diagnostiqués chaque année dans le monde (132 000 cas de MM sur 2 à 3 millions de cancers cutanés par an). Il est cependant responsable de la majorité des décès liés aux cancers cutanés en raison de son agressivité et de son potentiel métastatique élevé. Son incidence double tous les 10-20 ans parmi la population d'origine caucasienne. Contrairement aux CCNM qui touchent surtout les sujets âgés, les mélanomes sont très fréquents chez les sujets de 20 à 45 ans, bien que l'incidence augmente avec l'âge. Environ 50% des mélanomes se développent chez les personnes de moins de 55 ans et 30% chez les moins de 45 ans (Diepgen and Mahler, 2002).

Les facteurs de risque majeurs sont une combinaison de prédispositions constitutionnelles (couleur de la peau, présence de taches de rousseur, histoire familiale, nombre et taille des naevi ou « grains de beauté », âge) et de facteurs environnementaux (UV). Comme dans le cas des CBC, le MM ne semble pas lié à la chronicité des expositions solaires mais plutôt à des expositions intenses et intermittentes durant l'enfance (Miller and Mihm, 2006).

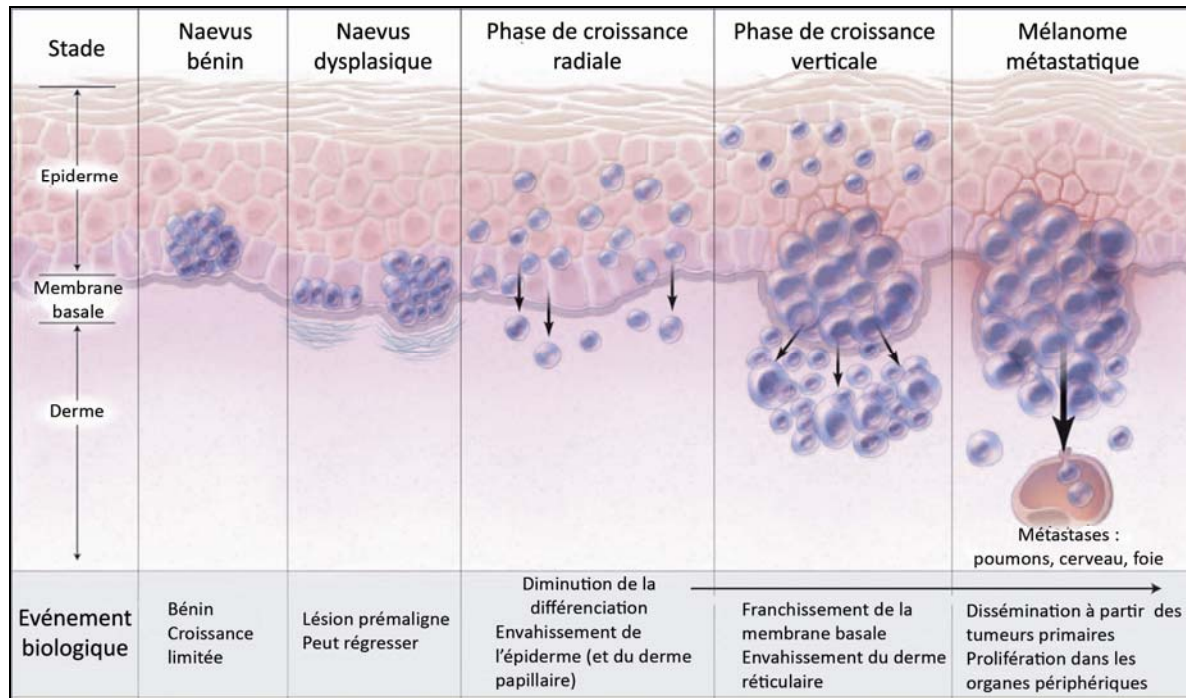


Figure 15 : Modèle de Clark.

Le modèle de Clark décrit les différents stades de la transformation du mélanocyte en mélanome malin. La première étape est une prolifération anormale mais contrôlée des mélanocytes menant à l'apparition d'un naevus bénin. La croissance des naevi étant limitée, ces derniers progressent rarement en cancers. Au stade suivant, une prolifération aberrante des mélanocytes mène à l'apparition d'un naevus dysplasique, qui peut survenir *de novo* ou au niveau d'un naevus bénin. Durant la phase de croissance radiale, les cellules dysplasiques envahissent l'épiderme et parfois le derme papillaire. Les lésions qui progressent au stade de croissance verticale peuvent envahir le derme dans sa profondeur, jusqu'à l'hypoderme. La dernière étape est la dissémination métastatique de cellules tumorales dans les organes périphériques. (D'après : Miller and Mihm, 2006)

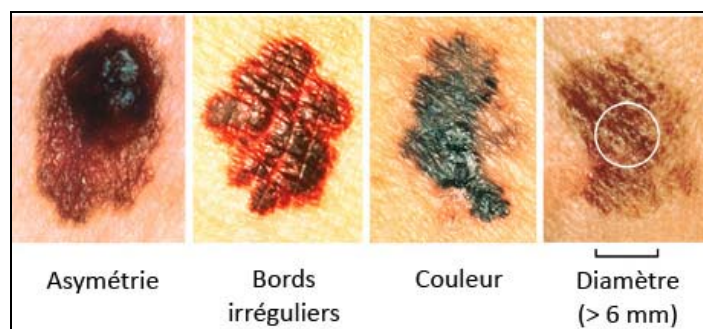


Figure 16 : Règle ABCDE.

La règle ABCDE permet de différencier un mélanome d'un naevus bénin selon des critères simples : Asymétrie, Bords irréguliers, Couleur inhomogène, Diamètre important, Evolution au cours du temps.

II.2. Pathogénèse clinique et moléculaire

Le modèle de Clark décrit les différents stades de transformation du mélanocyte en mélanome : formation d'un naevus bénin, dysplasie et hyperplasie de ce naevus, invasion locale de l'épiderme puis du derme, et dissémination métastatique (figure 15). Tous les mélanomes ne passent pas par l'ensemble des stades de ce modèle et seulement 20 à 30% sont issus de la transformation maligne d'un naevus pré-existant. Cliniquement, la profondeur de l'invasion locale, mesurée par l'index de Breslow, est un critère majeur pour la définition du stade et du pronostic du mélanome. La présence ou l'absence de cellules tumorales dans le « ganglion sentinelle », c'est-à-dire le premier ganglion de drainage de la tumeur primitive, apporte également une information pronostique importante.

Près de 10% des MM apparaissent dans un environnement familial prédisposant à ces tumeurs. Environ 40% des mélanomes familiaux sont liés à des mutations touchant le gène *CDKN2A* qui code pour les protéines suppresseur de tumeurs p16^{INK4A} et p14^{ARF} (Goldstein et al., 2006).

Les mélanomes sporadiques (non familiaux) sont principalement liés à des mutations activatrices touchant les gènes *NRAS* (15 à 30% des MM) et *BRAF* (50 à 70% des MM) et/ou à des mutations causant la perte de fonction de la protéine PTEN (20 à 45% des MM) (Gray-Schopfer et al., 2007; Russo et al., 2009).

II.3. Dépistage et traitement

La règle ABCDE permet de reconnaître les naevi atypiques susceptibles d'évoluer en mélanomes : A pour Asymétrie, B pour Bords irréguliers, C pour Couleurs (polychromie), D pour Diamètre supérieur à 6 mm, E pour Evolution au cours du temps (figure 16).

Si le MM est diagnostiqué suffisamment tôt, il peut être soigné par exérèse chirurgicale, et environ 80% des cas sont traités de cette façon. Par contre, les MM métastatiques, extrêmement agressifs, sont très résistants aux thérapies actuellement utilisées et ont donc un très mauvais pronostic, avec une survie moyenne de 6 mois et une survie à 10 ans estimée à moins de 10% (Gray-Schopfer et al., 2007). Il existe donc un énorme enjeu scientifique pour le développement de nouvelles stratégies de traitement du MM.

III. Syndromes de prédisposition

Plusieurs maladies génétiques cutanées héréditaires (ou génodermatoses) prédisposent au développement de cancers cutanés :

- La naevomatose basocellulaire (ou syndrome de Gorlin) est un syndrome autosomique dominant associé aux mutations du gène suppresseur de tumeurs *PTCH1* codant pour la protéine PATCHED, le récepteur membranaire du morphogène sonic hedgehog (SHH). Les patients atteints de ce syndrome présentent une forte prédisposition aux CBC mais pas au CSC.

- Le syndrome de Bazex-Dupré-Christol est une génodermatose rare qui prédispose à la survenue précoce de multiples CBC. Elle se transmet de façon dominante et le gène impliqué, qui n'est pas encore identifié avec certitude, est porté par le chromosome X.

- L'albinisme regroupe un ensemble de maladies héréditaires à transmission autosomique récessive, caractérisées par une hypo-pigmentation, voire une absence de pigmentation, de la peau, des phanères et des yeux. Les patients atteints d'albinisme sont prédisposés au développement de CBC, CSC et MM.

- Le *xeroderma pigmentosum* (XP) est un syndrome génétique rare, à transmission autosomique récessive, associé à des mutations touchant les gènes impliqués dans le principal mécanisme de réparation des lésions induites par les ultraviolets dans l'ADN. En l'absence de photo-protection, les patients XP développent de nombreux cancers cutanés (CBC, CSC, MM) dès leur plus jeune âge.

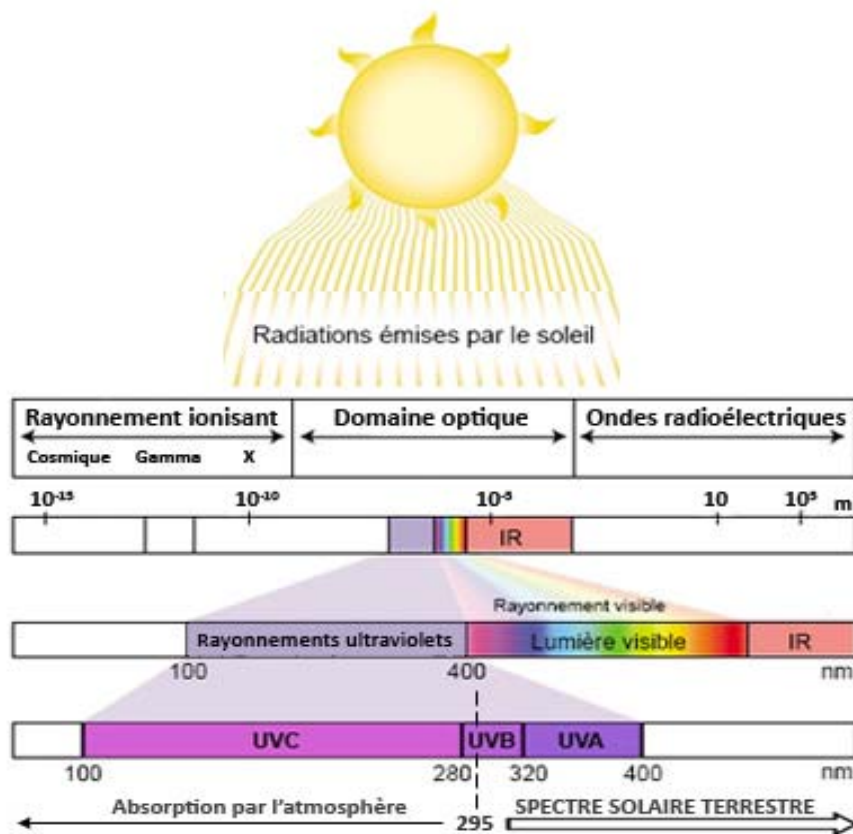


Figure 17 : Le spectre électromagnétique solaire.

Les chiffres indiquent les longueurs d'onde des différents rayonnements.

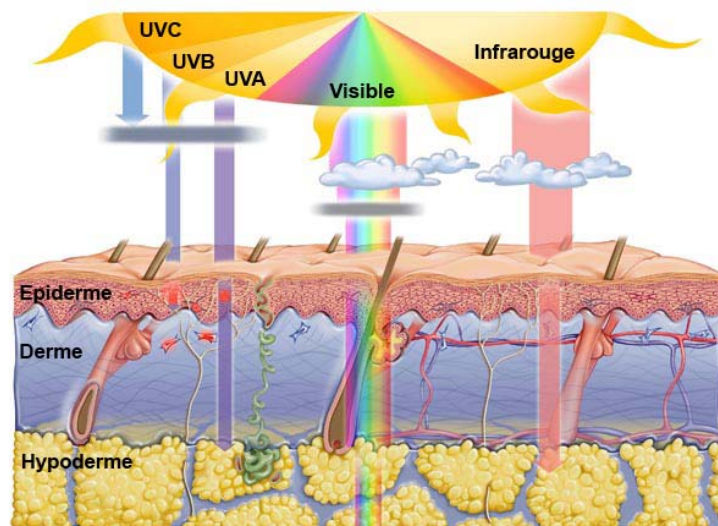


Figure 18 : Pénétration des rayonnements UV dans la peau.

Les UVB (295-320 nm) sont principalement absorbés dans l'épiderme et affectent donc particulièrement les kératinocytes, tandis que les UVA (320-400 nm) pénètrent jusqu'au derme.

LES ULTRAVIOLETS ET LEURS EFFETS SUR LA PEAU

Selon le principe de dualité onde-corpuscule, le rayonnement électromagnétique émis par le soleil peut être décrit de deux manières : c'est à la fois une onde électromagnétique caractérisée par une fréquence ν et une longueur d'onde λ , mais c'est également un flux de particules de masse nulle appelées photons se déplaçant dans le vide à une vitesse c ($c \approx 3.10^8 \text{ m.s}^{-1}$). Ces deux modélisations sont liées par les lois suivantes :

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda}$$

E : énergie du photon (J) ; ν : fréquence (Hz ou s^{-1}) ; λ : longueur d'onde (m) ; c : célérité de la lumière dans le vide (3.10^8 m.s^{-1}) ; h : constante de Planck ($h \approx 6,63.10^{-34} \text{ J.s}$)

Au sein du spectre électromagnétique solaire, l'œil de l'Homme ne perçoit qu'une petite portion du spectre, appelée « lumière » visible, qui couvre les longueurs d'ondes entre 380 nm (violet) et 780 nm (rouge) (figure 17).

Les rayonnements ultraviolets (UV) sont des rayonnements électromagnétiques dont la longueur d'onde est comprise entre 100 et 400 nm. Le spectre UV est sous-divisé en 3 régions : les UVA ($\lambda = 320\text{--}400 \text{ nm}$), les UVB ($\lambda = 280\text{--}320 \text{ nm}$) et les UVC ($\lambda = 100\text{--}280 \text{ nm}$). Les UVB (295–320 nm) et les UVA (320–400 nm) représentent respectivement 0,3 % et 5,1 % du rayonnement solaire parvenant à la surface de la Terre, la majorité de ce rayonnement étant composé de lumière visible (62,7%) et d'infrarouges (31,9%) (Sage, 1993). Les UVC (100–280 nm) et les UVB de courte longueur d'onde (280–295 nm) sont absorbés par la couche d'ozone de la stratosphère. Toutefois, en raison de la diminution de la couche d'ozone dans certaines régions du globe, la lumière solaire parvenant à la surface de la terre a tendance à s'enrichir en rayonnements UVB et UVC (Lloyd, 1993).

Les UV constituent, d'un point de vue énergétique, la partie la plus active du rayonnement solaire auquel sont soumis les organismes vivants. Ils sont donc responsables de la grande majorité des effets délétères liés à l'exposition solaire. La peau est bien entendu la première cible des rayonnements UV (figure 18). L'épiderme atténue la transmission des rayonnements de longueur d'onde $< 300 \text{ nm}$, mais laisse passer les rayonnements moins énergétiques (Young et al., 1998). Les UVB sont donc absorbés principalement au niveau de l'épiderme et du derme superficiel tandis que les UVA pénètrent beaucoup plus profondément dans la peau.

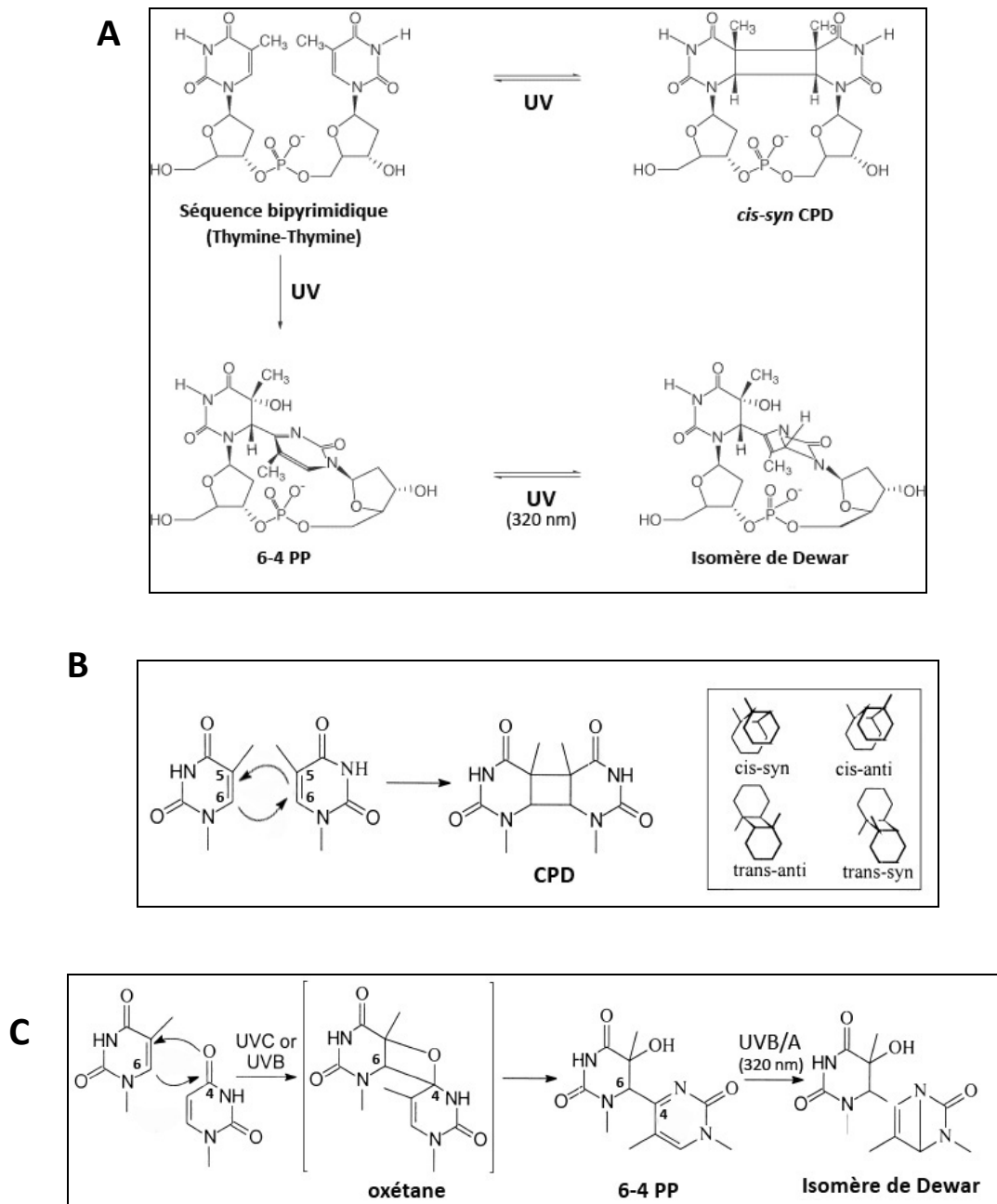


Figure 19 : Lésions induites par les UV dans l'ADN.

(A) Représentation des différentes lésions. **(B) Mécanisme de formation des CPD.** Les CPD sont formés par liaison covalente des atomes C5 et C6 de deux pyrimidines adjacentes. Seul l'isomère *cis-syn* est généré dans l'ADN double brin. **(C) Mécanisme de formation des 6-4 PP et photoisomérisation.** La première étape de la formation des 6-4 PP est une structure cyclique instable impliquant d'une part les carbones C5 et C6 de la base pyrimidique située en 5' sur le brin et d'autre part le carbone C4 et l'oxygène (pour une thymine) ou l'azote (pour un cytosine) porté par le carbone C4 de la pyrimidine située en 3'. Cet anneau se rompt spontanément, résultant en un transfert d'un groupement hydroxy (–OH) ou amino (–NH₂) au niveau du carbone C5 de la pyrimidine en 5' et aboutissant à la formation d'un pont stable entre les positions C6 et C4 des deux pyrimidines adjacentes. En présence de photons de longueur d'onde ≈ 320 nm, les 6-4 PP peuvent donner naissance à leur isomère de Dewar. Légende : CPD, dimère cyclobutéinique de pyrimidines ; 6-4 PP, pyrimidine (6-4)-pyrimidone.

A. Effets des UV sur l'ADN : lésions et mutations

I. Lésions induites par les UVC et les UVB sur l'ADN

Les cycles aromatiques des bases constituant la molécule d'ADN absorbent l'énergie des photons associés à une longueur d'onde comprise entre 230 et 290 nm, c'est-à-dire dans le domaine des UVC et, dans une moindre mesure, celui des UVB. L'énergie absorbée au niveau de deux pyrimidines (cytosine (C) ou thymine (T)) adjacentes fournit l'énergie nécessaire à la formation d'une liaison covalente entre ces deux bases, au détriment des liaisons hydrogène établies entre deux bases complémentaires et assurant la cohésion de la double hélice d'ADN. Les dimères de pyrimidine majoritairement induits par les UVC et les UVB sont les dimères cyclobutaniques de pyrimidines (cyclobutane pyrimidine dimer, CPD) et les pyrimidines (6-4)-pyrimidone (6-4 PP) (figure 19). Les UVC et les UVB induisent également d'autres types de lésions sur les bases de l'ADN, comme l'hydrate de cytosine, les dimères d'adénine ou les adduits thymine-adénine, mais la fréquence de formation de ces lésions est très faible.

I.1. Les CPD

Les CPD sont formés par liaison covalente de deux pyrimidines adjacentes en une structure « cyclique » engageant les atomes de carbone C5 et C6 de chaque pyrimidine (d'où le nom cyclobutane) (figure 19B). Les CPD sont les lésions photo-induites les plus fréquentes ; le taux de formation des CPD dans les cellules en culture après une irradiation UVB est estimé à $1-5 \cdot 10^{-4}$ lésions/kpb/J.m⁻² (Douki and Cadet, 2001; Perdiz et al., 2000), soit 300 à 1500 lésions/cellule/J.m⁻². Les CPD créent une distorsion de la double hélice d'ADN d'environ 7 à 10° par rapport à son conformation initiale (Kim et al., 1995; Miaskiewicz et al., 1996). Cette distorsion bloque la progression des ADN polymérase δ/ϵ lors de la réplication et de l'ARN polymérase II lors de la transcription.

La formation des CPD dépend de la longueur d'onde du rayonnement UV (UVB ou UVC), du matériel biologique étudié (ADN cellulaire, plasmide, etc.), du contexte de séquence autour du site bipyrimidique mais également du site bipyrimidique lui-même. Ainsi, dans la peau humaine ou les kératinocytes exposés aux UVB, les lésions les plus fréquentes sont les lésions T \rightarrow T⁴ et T \rightarrow C (Mouret et al., 2006).

Les îlots CpG contenus dans les régions promotrices des gènes humains sont fréquemment méthylés en position C5 de la cytosine (5-mC). Or la longueur d'onde d'absorption maximale des 5-

⁴ T \rightarrow T représente un CPD impliquant deux thymines adjacentes

mC est de 273 nm alors que celle des cytosines non-méthylées est de 267 nm. La présence d'une 5-mC au niveau d'une séquence bipyrimidique favorise donc la formation de lésions CPD sur ce site suite à une irradiation UVB (Drouin and Therrien, 1997; Mitchell, 2000; You et al., 1999).

I.2. Les 6-4 PP

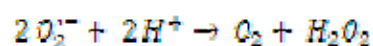
Les 6-4 PP résultent de la formation d'un pont stable entre les positions C6 et C4 de deux pyrimidines adjacentes (Figure 19C). Les 6-4 PP sont quantitativement les secondes lésions les plus fréquentes après une irradiation UVB ou UVC. Le ratio entre le nombre de CPD et le nombre de 6-4 PP formés pour une dose UVB donnée est estimé entre 8 : 1 (Perdiz et al., 2000) et 3 : 1 (Douki and Cadet, 2001). Les 6-4 PP sont des lésions beaucoup plus déformantes que les CPD : elles créent une distorsion de 44° de l'ADN par rapport à sa conformation initiale (Kim et al., 1995; Spector et al., 1997). Cette distorsion bloque la progression des ADN et des ARN polymérase.

Comme dans le cas des CPD, la formation des 6-4 PP est dépendante de la séquence bipyrimidique. Dans la peau et les kératinocytes primaires irradiés aux UVB, les seules lésions 6-4 PP observées sont les T(6-4)C et les T(6-4)T (Mouret et al., 2006). Contrairement au cas des CPD, les données concernant l'influence de la méthylation des cytosines sur la formation des 6-4 PP sont contradictoires (Mitchell, 2000; Pfeifer et al., 1991).

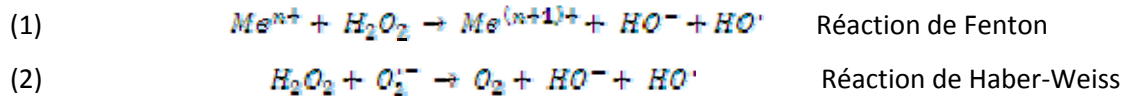
II. Lésions induites par les UVA

II.1. Photo-sensibilisateurs et espèces réactives de l'oxygène

Les UV peuvent également induire des dommages sur l'ADN de façon indirecte. En effet, les UVA ne sont que très faiblement absorbés par les bases de l'ADN mais ils peuvent exciter des chromophores cellulaires, appelés photo-sensibilisateurs, comme les mélanines, les porphyrines, la riboflavine, le tryptophane, etc. (pour revue voir : Ridley et al., 2009; Wondrak et al., 2006). Les photo-sensibilisateurs excités par l'absorption des photons UV peuvent revenir à leur état d'énergie fondamental par dissipation de chaleur ou émission de photons (c'est le phénomène de fluorescence) mais ils peuvent également subir une transition vers un état énergétique plus stable appelée état triplet. Cet intermédiaire joue un rôle clé dans l'induction des dommages liés aux UVA. Il peut réagir directement avec d'autres molécules, comme les bases de l'ADN, (photosensibilisation de type I) ou transférer son énergie aux molécules d'oxygène (photosensibilisation de type II), menant ainsi à la formation d'espèces réactives de l'oxygène (reactive oxygen species, ROS) comme l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ ou l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Foote, 1991). Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 est formé par dismutation de l'anion superoxyde :



Cette réaction peut se produire spontanément ou sous l'action de l'enzyme superoxyde dismutase (SOD). En présence de métaux de transition, H_2O_2 est capable de générer le radical hydroxyle HO^\bullet selon la réaction de Fenton (1) ou via sa réduction par l'anion superoxyde selon la réaction de Haber-Weiss (2):



L'accumulation de ROS dans la cellule peut provoquer des lésions directes sur tous les composants cellulaires : peroxydation des lipides, oxydation des protéines et altérations des acides nucléiques. Sur l'ADN, cinq principaux types de lésions peuvent être induits par les ROS : la modification de bases, la création de sites abasiques, la formation d'adduits lipidiques, les pontages ADN-protéines et les cassures de l'hélice d'ADN (simple ou double-brin) (Cadet et al., 1999). Nous ne décrivons ici que les altérations des bases de l'ADN.

II.2. Oxydation de la guanine

Les bases de l'ADN sont particulièrement sensibles aux réactions d'oxydation. Parmi elles, la guanine possède le potentiel d'ionisation le plus bas et constitue donc la principale cible devant l'adénine, puis la thymine et la cytosine (Ravanat et al., 2001). L'oxydation de la guanine par une réaction de photosensibilisation de type I (figure 20A) ou de type II (figure 20B) conduit à la formation de la 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoG)⁵ (Wondrak et al., 2006).

Contrairement aux dimères de pyrimidines qui induisent des distorsions de la structure de l'ADN, la 8-oxoG ne crée pas de déformation de l'ADN (Lipscomb et al., 1995). Par ailleurs, le carbone C8 oxydé se trouve complètement enchâssé au sein de la double hélice ce qui rend cette lésion pratiquement « invisible ». Il ne s'agit donc pas d'une lésion bloquante pour les polymérases répliquatives et transcriptionnelles (Bregeon et al., 2009).

II.3. Dimères de pyrimidine induits par les UVA

Les UVA n'étant pas absorbés directement par les bases pyrimidiques de l'ADN, la formation des CPD et des 6-4 PP a longtemps été considérée comme spécifique des rayonnements UVB et UVC. La 8-oxoG était alors considérée comme la lésion photo-induite majoritaire après une irradiation UVA. Cependant, l'accumulation des études visant à caractériser le spectre des dommages liés aux

⁵ Il est important de noter ici que les UVB sont également capables d'exciter des chromophores cellulaires et d'induire la production de ROS dans les cellules. Les UVB sont même 100 fois plus efficaces que les UVA pour la formation de la 8-oxoG, par un mécanisme de photosensibilisation de type II faisant sans doute intervenir l'oxygène singulet. Le taux de formation de la 8-oxoG étant toutefois 100 fois plus faible que celui des CPD, cette lésion apparaît comme une conséquence mineure de l'irradiation UVB (Douki et al., 1999).

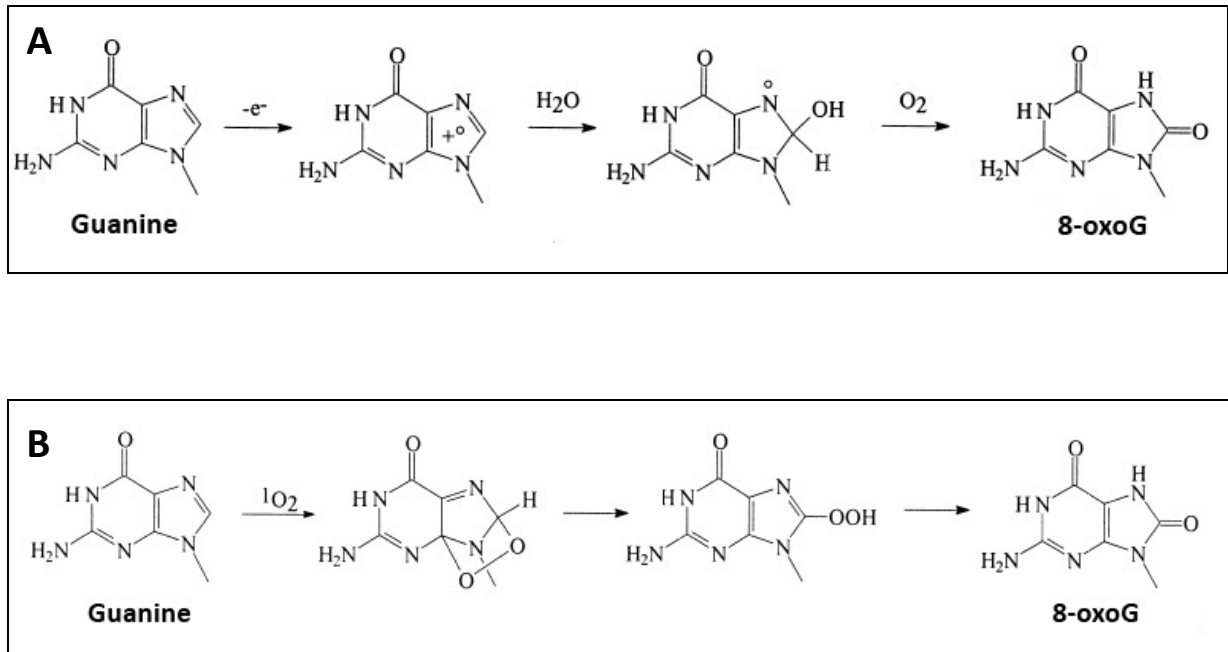


Figure 20 : Oxydation de la guanine.

(A) Photosensibilisation de type I. La présence d'un photo-sensibilisateur excité par des photons UV à proximité d'une guanine peut engendrer un transfert d'électron de la base vers le chromophore, donnant ainsi naissance à un radical guanine cationique ($+^\bullet$). L'addition d'une molécule d'eau sur ce radical puis son oxydation donnent naissance à la 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoG). **(B) Photosensibilisation de type II.** La guanine est la seule des quatre bases de l'ADN à réagir directement avec l'oxygène singulet 1O_2 . L'oxydation de la guanine en 8-oxoG par l'oxygène singulet 1O_2 passe par un intermédiaire endopéroxyde instable. Le radical hydroxyle HO^\bullet peut également être à l'origine de la formation de la 8-oxoG, mais ce radical est beaucoup moins sélectif que l'oxygène singulet 1O_2 puisqu'il peut causer des dommages sur toutes les bases de l'ADN, ainsi que sur les sucres constituant le squelette de la double hélice d'ADN. Légende : e^- , électron ; 1O_2 , oxygène singulet ; 8-oxoG, 8-oxo-7,8-dihydroguanine.

UVA permet aujourd'hui d'affirmer que la majorité des lésions induites sur l'ADN par les UVA sont des CPD de type T \rightarrow T (Courdavault et al., 2004; Douki et al., 2003; Mouret et al., 2006; Perdiz et al., 2000; Rochette et al., 2003). Les lésions 6-4 PP ne semblent pas être générées par les UVA. En fonction des types cellulaires et des méthodes d'analyse, les CPD sont 3 à 10 fois plus fréquents que la 8-oxoG dans l'ADN des cellules irradiées avec des UVA. Les lésions T \rightarrow T générées par les rayonnements UVA dériveraient d'un mécanisme de photosensibilisation de type I – par transfert d'énergie à partir de l'état triplet d'un chromophore cellulaire situé à proximité de l'ADN – plutôt que d'une excitation directe comme c'est le cas pour les CPD induits par les UVB (Douki et al., 2003; Wondrak et al., 2006).

Pour comparaison, il est toutefois intéressant de noter que, dans la peau, le taux global de lésions formées dans l'ADN suite à une irradiation UVB est d'environ 156 lésions/cellule/J.m⁻² tandis qu'il est de 0,024 lésion/cellule/J.m⁻² après une irradiation UVA (Mouret et al., 2006). La capacité des UVB à engendrer des CPD est donc plus de 6000 fois supérieure à celle des UVA.

III. Lésions induites par la lumière solaire

III.1. Comment simuler le spectre solaire ?

Le maximum du spectre d'absorption de l'ADN se situant autour de 260 nm, les lampes UVC « 254 nm » ont été largement employées pour étudier les effets intra-cellulaires des UV. Cependant, la pertinence de l'utilisation des UVC est remise en cause par le fait que ces derniers n'atteignent pas la surface de la Terre. Pour mieux comprendre l'impact physiologique des UV, de nombreuses études s'attachent désormais à « simuler » le rayonnement du soleil en recréant un spectre d'émission mimant le mieux possible le spectre solaire. Cette lumière solaire simulée (solar simulated light, SSL) est généralement produite par une lampe au xénon à large spectre couplée à un filtre passe-haut de type WG320, permettant de couper toutes les longueurs d'onde inférieures à 310 nm. Le rayonnement ainsi obtenu est composé de 0,8% d'UVB, de 6% d'UVA, de 44,5% de lumière visible et de 48,7% d'infrarouges (UVC < 10⁻⁵ %), soit des proportions très similaires à celles du spectre solaire (Perdiz et al., 2000). Toutefois certains n'hésitent pas à utiliser directement le soleil comme source lumineuse pour étudier l'effet du rayonnement UV sur leurs cellules (Tommasi et al., 1997) !

III.2. Les CPD, les 6-4 PP et leur isomère de Dewar

Les lésions 6-4 PP peuvent absorber les photons associés à des longueurs comprises entre 310 et 340 nm (frontière UVB/UVA) et l'énergie absorbée peut entraîner la conversion des 6-4 PP en leur isomère de Dewar (Taylor et al., 1990). Ce photo-isomère est caractérisé par une liaison entre l'atome d'azote N3 et l'atome de carbone C6 de la base située en 3' (figure 19C).

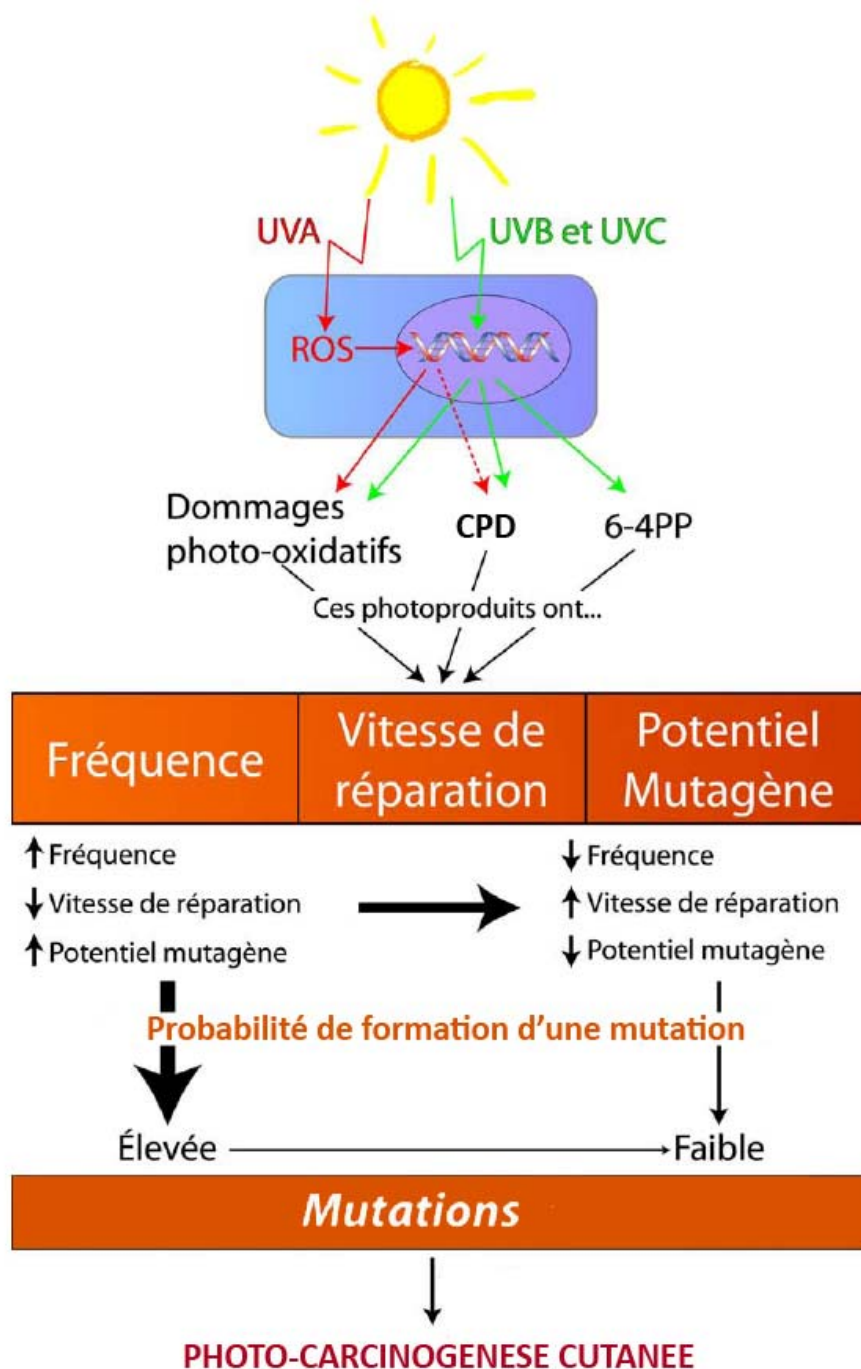


Figure 21 : Théorie de la mutagénèse somatique.

La théorie de la mutagenèse somatique tente de prédire la probabilité qu'un dommage généré par un agent mutagène entraîne la formation d'une mutation. Cette probabilité est dépendante : 1) de la fréquence de formation du dommage suite à l'exposition à l'agent mutagène ; 2) de la vitesse à laquelle le dommage est réparé ; 3) du potentiel mutagène intrinsèque du dommage. Le potentiel mutagène est notamment lié au type de dommage (i.e. CPD, 6-4 PP, 8-oxo) et à ses caractéristiques (i. e. séquence où il se forme, présence d'une base méthylée) qui vont déterminer l'efficacité de la réparation, la fidélité de la TLS, mais aussi le devenir de la lésion (probabilité de désamination par ex.).

Les CPD sont les lésions majoritaires après une irradiation SSL et 90% d'entre eux seraient liés aux rayonnements UVB de ce spectre (Douki et al., 1999). Par contre, la quantité totale de 6-4PP formés après une irradiation SSL est 20 fois plus faible qu'après une irradiation UVB (Douki et al., 2003). De plus, une forte augmentation de la photo-isomérisation des T(6-4)C et des T(6-4)T en isomères de Dewar est observée (Douki et al., 2003; Perdiz et al., 2000). Cette photo-isomérisation serait liée à l'absorption par les 6-4 PP des photons UVA émis par la SSL.

Selon l'étude menée par Tomassi *et al.* en irradiant des kératinocytes directement sous la lumière du soleil de Los Angeles à midi en plein été, certains sites CpG méthylés sont 15 fois plus susceptibles de générer un CPD après une irradiation solaire qu'après une irradiation UVB ou UVC (Tommasi et al., 1997). Ces résultats ont été confirmés *in vitro* par Mitchell et al. après une irradiation SSL un peu plus conventionnelle (Mitchell, 2000). La 5-mC jouerait donc un rôle important dans le spectre des lésions induites par la lumière solaire.

III.3. Induction de la 8-oxoG par la lumière solaire

Après une exposition SSL, le taux de formation de la 8-oxoG est extrêmement faible puisqu'il est estimé à environ 1.10^{-9} lésion/kpb/J.m⁻², soit 0,003 lésion/cellule/J/m⁻² (Douki et al., 1999). Dans les mêmes conditions, le taux de formation des CPD est environ 140 fois plus élevé que celui de la 8-oxoG.

IV. Mutagénèse photo-induite

Comme nous l'avons vu précédemment, les dimères de pyrimidines induits par les UV sur l'ADN entraînent une distorsion de la double hélice d'ADN qui bloque notamment la progression des polymérases répliquatives. Si la lésion n'est pas réparée, le passage de certaines polymérases distributives « à travers » cette lésion – synthèse translésionnelle (translesion synthesis, TLS) – peut être associé à l'insertion d'une base incorrecte en face des bases lésées. La TLS est alors qualifiée d'« infidèle » et une mutation apparaît au cycle de réplication suivant. La probabilité de mutagénèse au niveau d'un site particulier dépend de la fréquence des lésions, de leur cinétique de réparation mais également des caractéristiques intrinsèques des lésions qui détermine leur potentiel mutagène (figure 21).

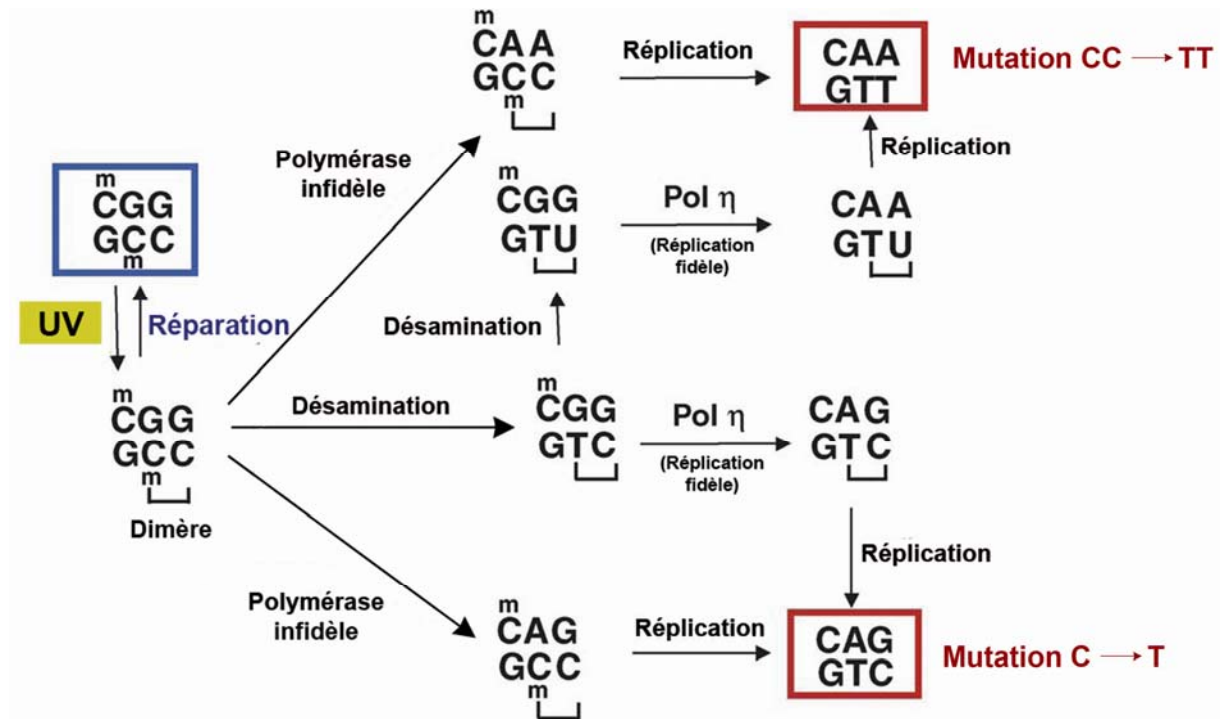


Figure 22 : Proposition de mécanisme pour la mutagenèse induite par les UV.

La formation d'un dimère de pyrimidines (représenté par un crochet) après une irradiation UV est particulièrement fréquente au niveau des séquences bipyrimidiques contenant une 5-méthylcytosine (mC). La synthèse translésionnelle par une polymérase infidèle peut conduire à l'incorporation d'une ou de deux bases adénine (A) en face du dimère (règle A). Au cycle de réplication suivant, une mutation C → T ou CC → TT apparaît. Une désamination spontanée ou photo-induite de la 5-méthylcytosine et/ou de la cytosine peut également avoir lieu au niveau du dimère, donnant naissance à une thymine (T) ou à un uracil (U), respectivement. Le passage de la polymérase translésionnelle η conduit alors à l'incorporation fidèle de bases A en face du dimère. Une mutation C → T ou CC → TT apparaît donc au cycle de réplication suivant. (D'après : Pfeifer et al., 2005)

IV.1. Mutations induites par les UVB et les UVC : nature et mécanisme de formation

L'étude du spectre des mutations induites par les UVC ou les UVB a permis de mettre en évidence que, de la levure aux cellules des mammifères, la majorité des mutations observées sont des transitions C → T formées au niveau de sites bipyrimidiques (Armstrong and Kunz, 1990; Drobetsky et al., 1987; Kappes et al., 2006; Pfeifer et al., 2005; Robert et al., 1996). La présence simultanée de transitions en tandem CC → TT constitue la véritable « signature » de la mutagénèse UVB/UVC car ce type de mutation est une caractéristique quasiment exclusive de l'effet de ces rayonnements (Hutchinson, 1994).

La présence de ces mutations au niveau des sites bipyrimidiques met clairement en évidence l'implication des dimères de pyrimidines dans le processus de mutagénèse (Brash et al., 1987). Toutefois, la contribution relative des CPD et des 6-4 PP reste encore controversée. Les CPD sont formés plus fréquemment que les 6-4 PP et ils sont aussi réparés plus lentement (Mitchell et al., 1990; Thomas et al., 1989). Cette différence de cinétique de réparation est liée à la plus forte distorsion de l'ADN induite par les 6-4 PP qui facilite leur reconnaissance et leur prise en charge par les protéines de réparation de l'ADN (Szymkowski et al., 1993). Les CPD persistent donc plus longtemps dans l'ADN et sont considérés par beaucoup comme les principales lésions mutagènes suite à une irradiation UV (You et al., 2001). Toutefois, la mutagénèse liée à la persistance de lésions 6-4 PP non réparées dans l'ADN ne peut pas être exclue (Gentil et al., 1996; LeClerc et al., 1991).

Plusieurs mécanismes de mutagénèse peuvent expliquer la prépondérance des transitions de type C → T au niveau des sites bipyrimidiques (Pfeifer et al., 2005). La première voie implique le passage à travers la lésion d'une ADN polymérase de la famille Y. Les polymérases de la famille Y, également appelées polymérases TLS, sont des ADN polymérases distributives, sans activité de relecture, capables de copier l'ADN en passant à travers des lésions ou des adduits bloquant les polymérases répliquatives δ/ϵ . Les polymérases TLS sont plus ou moins fidèles et leur taux d'erreur est 10 000 à 100 000 fois plus élevé que celui des polymérases δ/ϵ (Loeb and Monnat, 2008). Le passage d'une de ces polymérases à travers une lésion de type CPD peut aboutir à l'insertion non spécifique d'une ou deux adénines en face de la lésion qu'elle ne sait pas interpréter : c'est la « règle du A » (Tessman et al., 1992). Cette loi permettrait d'expliquer pourquoi, malgré leur fréquence de formation beaucoup plus importante, les dimères TT sont beaucoup moins mutagènes que les dimères faisant intervenir une cytosine. En effet, l'insertion d'une adénine en face d'une lésion TT ne modifie pas la séquence de l'ADN. Au contraire, l'incorporation d'une adénine en face d'une cytosine impliquée dans un dimère de pyrimidines peut conduire à l'apparition d'une mutation C → T (figure 22). La seconde voie de mutagénèse serait liée à la désamination photo-induite de la cytosine suivie d'un franchissement « fidèle » de la lésion par la polymérase η . La polymérase η est une polymérase

A	Gène	Modèle	Spectre UVA	Type de mutation (%)	Référence
	<i>aprt</i>	Cellules CHO (hamster)	> 350 nm	T → G (37) C → T (22) G → T (4)	(Drobetsky et al., 1995)
	<i>p53</i>	Tumeurs cutanées (CSC) chez la souris hairless	365 nm	C → T (100)	(van Kranen et al., 1997)
	<i>p53</i>	Peau humaine saine	340 - 400 nm	G → T (100)	(Persson et al., 2002)
	Transgène <i>LacZ</i>	Epiderme des souris "Muta TM "	> 310 nm	C → T (92) CC → TT (5) G → T (3)	(Ikehata et al., 2003)
	<i>hprt</i>	Fibroblastes primaires humains	340 - 400 nm	C → T (40) T → A (15) G → T (10) CC → TT (7)	(Kappes et al., 2006)
	Transgène <i>cll</i>	Fibroblastes embryonnaires murins Big Blue [®]	340 - 400 nm	C → T (31) G → T (26)	(Besaratina et al., 2008)
	<i>p53</i>	Kératinocytes basaux issues de peaux reconstruites	320 - 400 nm	T → G (50) G → C (40) C → T (10)	(Huang et al., 2009)

B	Gène	Modèle	Source UV	Type de Mutation (%)	Référence
	<i>aprt</i>	Cellules CHO (hamster)	Lampe au xénon + filtre passe-haut WG320 ($\lambda > 310$ nm)	C → T (36) CC → TT (25) T → G (25)	(Drobetsky et al., 1994)
	Transgène <i>cll</i>	Fibroblastes embryonnaires murins Big Blue TM	Simulateur solaire avec lampe au xénon	C → T (80) G → C (6) T → G (4,5)	(Besaratina et al., 2008)
	<i>p53</i>	Peaux reconstruites à partir de kératinocytes primaires humains	Simulateur solaire avec lampe au xénon + filtre UG5 ($250 < \lambda < 400$ nm) + filtre WG320 ($\lambda > 310$ nm)	T → G (50) G → T (15) C → T (15)	(Huang et al., 2009)

Tableau 3 : Mutations induites par les UVA et la lumière solaire simulée (SSL).

(A) Mutations induites par les UVA. (B) Mutations induites par la lumière solaire simulée. *aprt*, adénine phosphoribosyltransférase ; *hprt*, hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase.

translésionnelle capable de répliquer l'ADN de façon fidèle à travers un dommage de type CPD ou 8-oxoG, mais pas à travers une 6-4 PP (Masutani et al., 2000; Yu et al., 2001). La désamination de la cytosine conduit à la formation d'un uracile et si la cytosine est méthylée (5-mC), sa désamination conduit à la formation d'une thymine. Dans les deux cas, le passage de l'ADN polymérase η suite à cette désamination provoquera donc l'insertion spécifique d'une adénine en face de la cytosine désaminée (Peng and Shaw, 1996). Ainsi, la formation préférentielle des CPD sur les sites bipyrimidiques contenant une 5-mC et la désamination photo-induite de la 5-mC pourraient expliquer la fréquence élevée des mutations C \rightarrow T observées dans les séquences CpG des gènes humains (Lee and Pfeifer, 2003; Pfeifer et al., 2005; Tu et al., 1998).

IV.2. Mutations induites par les UVA

La 8-oxoG a longtemps été considérée comme le principal candidat permettant d'expliquer les effets génotoxiques des UVA. Lors de la réplication de l'ADN, la 8-oxoG peut être appariée avec une adénine et ce mésappariement peut provoquer, lors du deuxième cycle répliatif, l'apparition de transversions G \rightarrow T (Shibutani et al., 1991). Ce type de mutations a été décrit dans les fibroblastes murins et les kératinocytes humains irradiés aux UVA mais il n'est pas toujours majoritaire (tableau 3A). L'oxydation de la guanine peut également mener à la formation de résidus 8-oxoGTP dans le pool des nucléotides libres. L'appariement d'un 8-oxoGTP en face d'une adénine pourrait expliquer les mutations T \rightarrow G observées, par exemple, dans le gène p53 des kératinocytes basaux issus de peaux reconstruites irradiées avec des UVA (Huang et al., 2009).

Un nombre croissant de publications suggèrent également une forte implication des dimères de pyrimidines dans la mutagénèse UVA. En effet, de nombreuses études menées chez la souris ou sur des cellules humaines en culture montrent une prépondérance des transitions C \rightarrow T, parfois associées à la présence de la « signature UVB » CC \rightarrow TT, après une irradiation UVA (tableau 3A). La majorité de ces mutations sont formées au niveau des sites bipyrimidiques de l'ADN, mettant directement en cause les dimères de pyrimidine formés sur ces séquences.

IV.3. Mutations induites par la lumière solaire

Comme dans le cas des UVA, le profil des mutations induites la lumière solaire est largement dépendant du modèle étudié et des conditions expérimentales (tableau 3B). Les résultats obtenus par les différentes équipes soulignent la complexité des événements menant à la formation de mutations après une irradiation SSL.

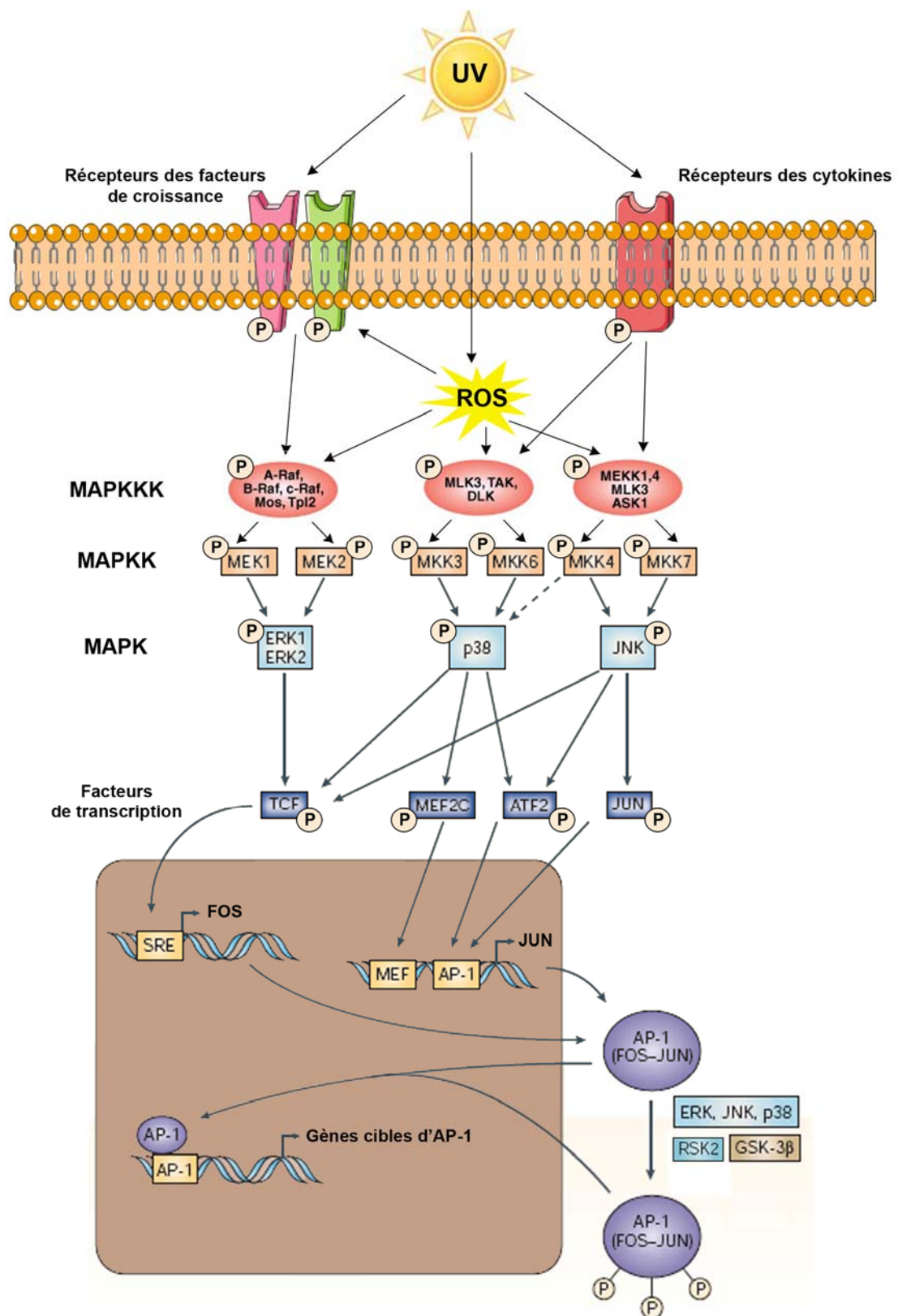


Figure 23 : Activation des MAP kinases et des facteurs de transcription AP-1 par les UV.
 Voir détails dans le texte. (D'après : Eferl and Wagner, 2003)

B. Effets cellulaires des UV

Les rayonnements UV déclenchent dans la cellule deux types de réponse : l'une est initiée directement au niveau de la membrane plasmique tandis que l'autre est liée à la détection des dommages induits par les UV sur l'ADN. Dans les deux voies, la réponse aux UV fait intervenir 3 types de protéines : (1) des senseurs qui font détecter les effets des UV (effets physiques ou thermodynamiques au niveau de la membrane plasmique ou modifications biochimiques dans l'ADN) ; (2) des transducteurs qui vont permettre la transmission du signal au sein de la cellule ; (3) des effecteurs qui vont permettre l'exécution des fonctions cellulaires adaptées (transcription, arrêt du cycle, réparation, apoptose). Ce chapitre n'a pas pour objectif de décrire de façon exhaustive la réponse cellulaire aux UV, mais essaie d'en donner une vue d'ensemble tout en y dégageant les éléments qui serviront à la compréhension des autres chapitres de ce manuscrit⁶.

I. Transduction du signal de réponse aux UV à partir de la membrane plasmique

Les rayonnements UV provoquent immédiatement dans la cellule l'activation de nombreuses voies de signalisation et, en quelques minutes, la transcription de gènes codant pour des facteurs de transcription et des protéines impliqués dans la régulation des grandes fonctions cellulaires (prolifération, métabolisme, réparation, apoptose, etc.). Cette réponse précoce repose sur des protéines et des facteurs préexistants dans la cellule et pouvant être activés par des modifications post-traductionnelles, et notamment par phosphorylation. Cette réponse, indépendante de la détection de dommages sur l'ADN (Devary et al., 1992; Devary et al., 1993), est initiée au niveau de la membrane plasmique puis est transmise par des cascades de signalisation jusqu'au noyau où sont transcrits les gènes cibles (figure 23).

I.1. Activation des récepteurs membranaires

L'un des premiers signaux détectables dans les kératinocytes après une irradiation UV est l'activation de nombreux récepteurs de facteurs de croissance et de cytokines, tels que le récepteur de l'EGF (epidermal growth factor), du KGF (keratinocyte growth factor), de l'IGF-1 (insulin-like growth factor 1), du TNF (tumor necrosis factor) et de l'interleukine 1 (IL-1) (Rittie and Fisher, 2002; Van Laethem et al., 2009). Le mécanisme menant à l'activation de ces récepteurs est mal connu. Il est probable que l'énergie du rayonnement UV provoque une perturbation de la structure de la

⁶ Les UVC et les UVB ont été largement utilisés pour déchiffrer les effets des UV sur la signalisation intracellulaire mais le rôle spécifique des UVA est encore mal connu. Dans ce chapitre, le terme « UV » fera donc référence aux UVB/UVC et les effets spécifiques des UVA seront mentionnés lorsqu'ils sont connus.

membrane plasmique et/ou un changement de conformation des protéines membranaires induisant l'activation des récepteurs et le déclenchement de plusieurs cascades de signalisation au sein de la cellule. La production de ROS sous l'action du rayonnement UV pourrait également jouer un rôle dans l'activation des récepteurs membranaires comme l'EGF-R et dans l'induction des voies de signalisation en aval (Peus et al., 1999; Peus et al., 1998).

I.2. Transduction du signal par les MAPK

Parmi les principales voies de signalisation induites par l'activation des récepteurs membranaires se trouve la superfamille des kinases MAP (mitogen-activated proteins, MAPK) (pour revue voir :Chang and Karin, 2001). Les MAPKs jouent un rôle dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires comme la prolifération, la différenciation, la tumorigénèse et l'apoptose. Le processus d'activation des MAPKs se déroule par phosphorylations séquentielles (figure 23). Tout d'abord, les kinases à spécificité sérine/thréonine MAPKKKs (MAP kinase kinase kinases ou MEKK) phosphorylent les sérines contenues dans la boucle d'activation des MAPKKs (MAP kinase kinases ou MEK), qui à leur tour vont phosphoryler les motifs thréonine-X-tyrosine (X= acide aminé quelconque) présents dans la boucle d'activation des MAPKs.

Les MAPKs sont divisées en trois familles : les kinases ERK (extra-cellular signal-regulated kinase ; ERK1 et ERK2), les kinases JNK (c-Jun N-terminal kinase ; JNK1, JNK2 et JNK3) et les kinases p38 MAPK (p38 α , β , γ et δ). Les kinases ERK sont activées par des signaux extracellulaires mitogènes comme les hormones et les facteurs de croissance et seraient globalement associées à la régulation de la prolifération et à la survie cellulaire. Les kinases JNK et p38 MAPK sont activées par des stress environnementaux (d'où leur regroupement sous le nom de *stress-activated protein kinases*, SAPK) comme les rayonnements UV, les cytokines pro-inflammatoires ou les modifications de température. Les SAPK seraient plutôt associées à l'inhibition de la prolifération et à l'apoptose. Cette dichotomie est toutefois une simplification extrême, car la régulation des MAPK est complexe et leurs effets respectifs dépendent fortement du type cellulaire étudié et du stimulus provoquant leur activation.

Les trois types de MAPK ont été impliqués dans la réponse précoce des kératinocytes primaires aux UVB et aux UVA, bien que le rôle spécifique de chacune de ces voies soit sujet à discussion (Adachi et al., 2003; Assefa et al., 1997; Chouinard et al., 2002; Englaro et al., 1998). Dans les fibroblastes, il semblerait que les voies JNK et/ou p38 MAPK, mais pas ERK, soient activées par les UVA (Klotz et al., 1999; Le Panse et al., 2003). Les ROS joueraient un rôle majeur dans l'induction de ces voies de signalisation après UVB (Peus et al., 1999) comme après UVA (Klotz et al., 1999; Le Panse et al., 2003).

I.3. Les effecteurs de la réponse cellulaire : exemple de la famille AP-1

I.3.a. Description des facteurs de transcription AP-1

Parmi les effecteurs principaux de la voie des MAPKs se trouve la famille des facteurs de transcription AP-1 (activator protein 1) (pour revue voir : Eferl and Wagner, 2003; Shaulian and Karin, 2002). Les facteurs de transcription AP-1 sont des complexes dimériques formés par des membres de la superfamille des protéines bZIP (basic leucine zipper domain). Le motif bZIP permet la dimérisation des facteurs AP-1 et leur liaison à l'ADN (figure 24).

Les premiers complexes AP-1 ayant été décrits, et les plus étudiés à ce jour, impliquent la famille des protéines JUN (c-JUN, JUNB et JUND) et la famille FOS (c-FOS, FOSB, FRA1 et FRA2). Les membres de la famille JUN peuvent s'associer entre eux pour former des homodimères tandis que les membres de la famille FOS ne peuvent former que des hétérodimères avec les membres de la famille JUN (figure 24). Les dimères AP-1 JUN/JUN et JUN/FOS reconnaissent une séquence particulière de l'ADN appelée « élément de réponse au TPA » (TPA-responsive element, TRE), dont le nom est issu de sa forte induction par l'agent chimique promoteur de tumeur 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA). La séquence palindromique TRE (5'-TGACGTCA-3') est présente dans le promoteur de nombreux gènes.

Les protéines JUN et FOS peuvent également interagir avec les protéines bZIP de la famille ATF (activating transcription factor), de la famille MAF (musculoaponeurotic fibrosarcoma) et avec les facteurs de transcriptions NRF1 et NRF2. Selon leur nature, les hétérodimères AP-1 se fixent préférentiellement sur les séquences apparentées TRE, CRE (c-AMP responsive element), MARE (MAF responsive element) ou ARE (antioxydant response element) (figure 24). La formation de chaque dimère dépend de l'affinité de dimérisation des protéines AP-1 et de l'abondance de chacune d'entre elles dans la cellule à un instant donné. La composition des dimères AP-1 régule leur activité et leurs effets sur la cellule.

I.3.b. Activation des facteurs de transcription AP-1

L'activité des facteurs AP-1 est induite par un grand nombre de stimuli physiologiques et de stress environnementaux. De nombreuses études soulignent également un rôle majeur des ROS dans la régulation de l'activité AP-1 (Sen and Packer, 1996). Ces stimuli provoquent l'activation des cascades de signalisation MAPK qui activent à leur tour les facteurs AP-1 par phosphorylation de divers substrats (figure 23). Le sérum et les facteurs de croissance induisent les facteurs AP-1 par activation des kinases ERK qui phosphorylent et activent les facteurs de transcription de la famille TCF (ternary complex factors). Les facteurs TCF se lient au promoteur des gènes de la famille FOS et favorisent leur transcription. L'induction des facteurs AP-1 par les cytokines et les stress

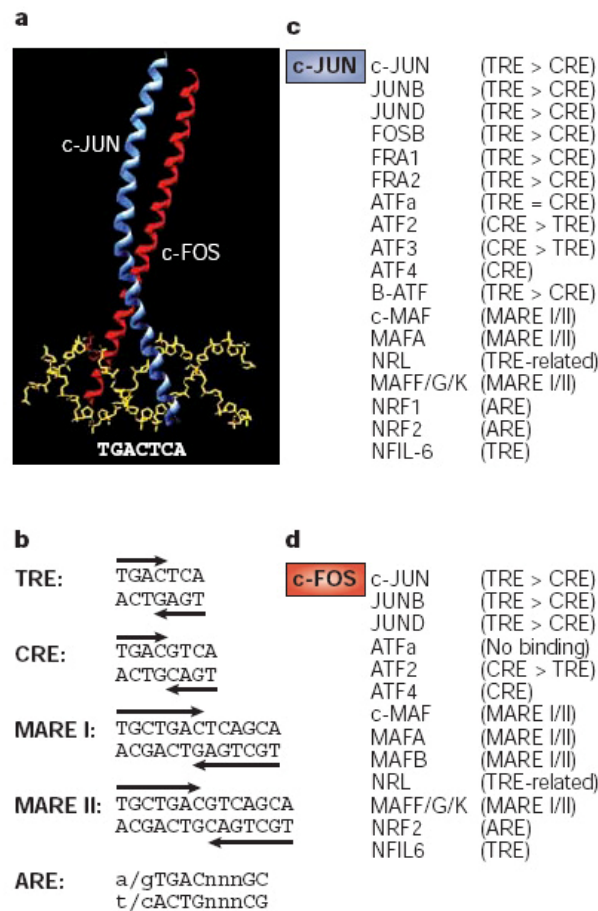


Figure 24 : Les facteurs de transcription AP-1 et leurs éléments de réponse.

Les facteurs AP-1 sont des homo- ou des hétéro-dimères de protéines appartenant aux familles JUN, FOS, ATF (activating transcription factor) et MAF (musculoaponeurotic fibrosarcoma). Ils reconnaissent de courtes séquences situées dans les régions promotrices et activatrices de leurs gènes cibles. **(a)** Le motif bZIP est présent sur de nombreuses protéines de liaison à l'ADN. Il contient une région basique riche en résidus arginine et lysine qui permet l'interaction avec la molécule d'ADN et un domaine de dimérisation protéique hydrophobe (« leucine-zipper ») caractérisé par la présence de résidus leucine espacés par intervalles de 7 résidus. L'interaction entre les régions hydrophobes de deux protéines bZIP fonctionne comme une fermeture éclair (zip) liant les protéines entre elles. **(b)** L'élément principal de fixation des facteurs AP-1 est la séquence TRE (TPA-responsive element), mais les différents dimères reconnaissent également les éléments CRE (c-AMP-response element), MARE (MAF-recognition element) et ARE (antioxydant-response element). **(c) (d)** Les partenaires de c-JUN et c-FOS et leurs éléments de réponse. (D'après : Eferl and Wagner, 2003)

génomiques comme les UV est liée principalement à l'activation des kinases JNK et p38 MAPK. Celles-ci phosphorylent et activent le facteur de transcription ATF2, qui interagit avec la protéine c-JUN pour induire la transcription des gènes *JUN*. Les kinases p38 MAPK et JNK activent également la transcription des gènes *FOS* par l'intermédiaire des TCF. D'autre part, l'activité de liaison à l'ADN et d'induction transcriptionnelle des complexes AP-1 est régulée au niveau post-traductionnel par la phosphorylation des protéines JUN et FOS par les MAPK et par les kinases GSK-3 β (glycogène synthase kinase 3 β) et RSK2 (ribosomal S6 kinase 2).

I.3.c. Les gènes cibles des complexes AP-1 et leur rôle dans la tumorigénèse

Les nombreux gènes cibles des facteurs de transcription AP-1 sont impliqués dans la régulation de processus biologiques tels que la prolifération, la différenciation, l'apoptose, le remodelage tissulaire et l'inflammation. Les facteurs AP-1 régulent l'expression des principaux marqueurs de la différenciation épidermique, tels que les kératines K5, K6, K8, K14, K18 and K19 ainsi que la filaggrine, l'involucrine et la loricrine (Angel et al., 2001). Les études réalisées *in vitro* sur des modèles de peaux reconstruites ont montré l'implication des facteurs AP-1 dans le dialogue paracrine entre le derme et l'épiderme (Szabowski et al., 2000). En raison de la pléiotropie de leur action, les complexes AP-1 ont également été impliqués dans le processus de tumorigénèse, bien que leur effet pro- ou anti-tumoral dépende de la composition des dimères mais aussi du type cellulaire impliqué, de l'état de différenciation de la tumeur ou du contexte génétique. Globalement, les protéines de la famille JUN régulent préférentiellement les gènes impliqués dans la prolifération et l'apoptose (*P53*, *P21/WAF1*, *FAS*, *BCL2*), tandis que les protéines de la famille FOS régulent des gènes impliqués dans la régulation de l'angiogénèse et l'invasion des tumeurs malignes. La famille AP-1 joue ainsi un rôle essentiel dans la régulation des métalloprotéinases matricielles (MMP), des enzymes impliquées dans la dégradation de la MEC et le remodelage tissulaire lors de la cicatrisation, la migration cellulaire et l'invasion tumorale (Brenneisen et al., 2002).

II. La réponse cellulaire liée à la détection des dommages sur l'ADN

Afin d'éviter la réplication d'un ADN endommagé et l'accumulation d'altérations génétiques au sein de sa progéniture, la cellule possède un mécanisme complexe de réponse aux dommages présents sur l'ADN qui permet : (1) l'activation de points de contrôle permettant le blocage transitoire de la progression du cycle cellulaire (en phase G1/S ou en phase G2/M) afin de donner à la cellule le temps de réparer son ADN ; (2) l'élimination des lésions présentes sur l'ADN grâce à la mise en place de mécanismes de réparation spécifiques ; (3) le déclenchement du processus de mort cellulaire par apoptose si les dégâts causés dans la cellule sont trop importants. Les mécanismes de réparation des lésions induites par les UV seront abordés dans le chapitre suivant. Nous nous

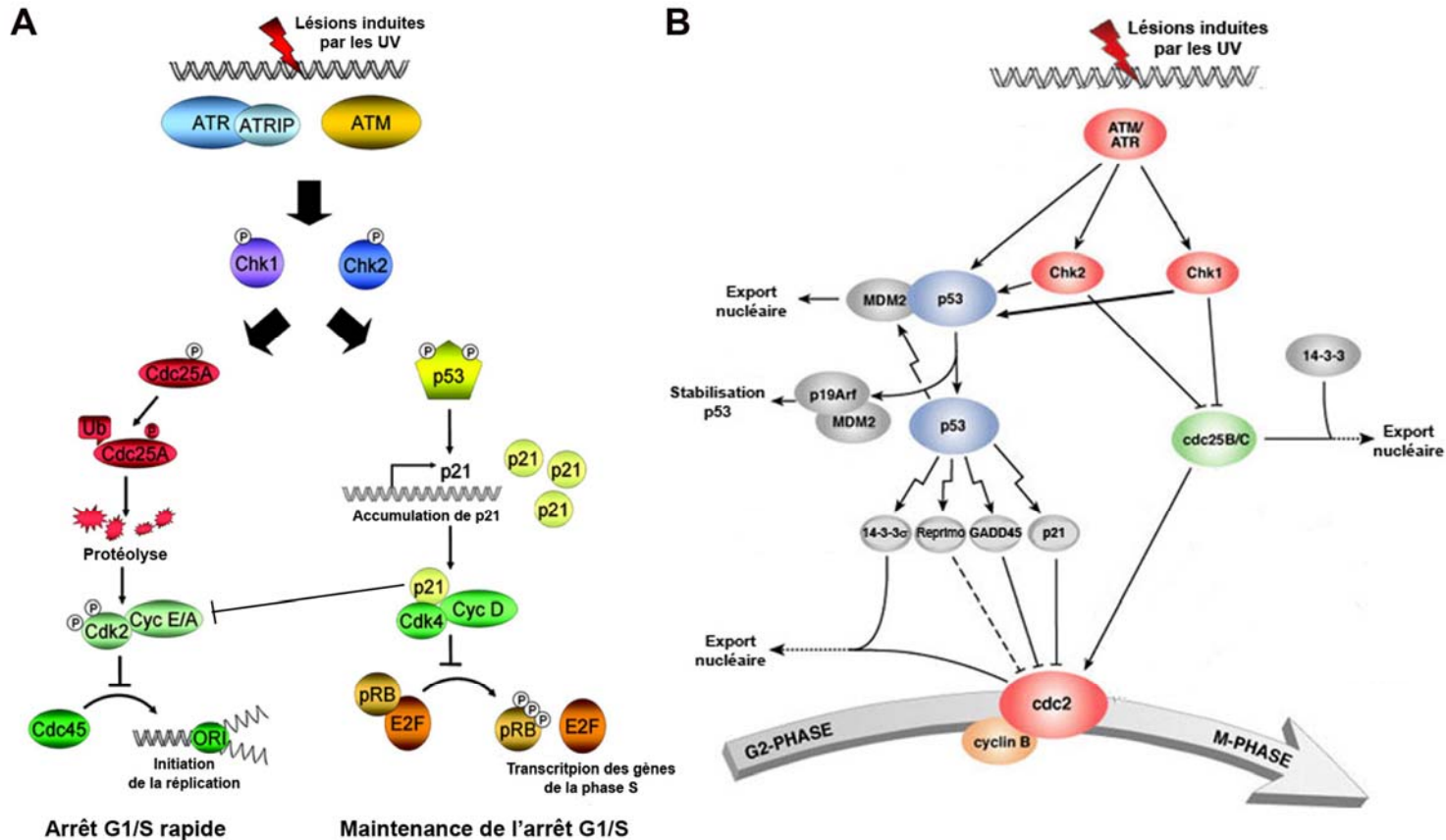


Figure 25 : Réponse cellulaire liée à la présence de dommages sur l'ADN : points de contrôle G1/S et G2/M.

La présence de dommages sur l'ADN est détectée rapidement par les kinases ATR et ATM qui phosphorylent les kinases de transduction du signal Chk1 et Chk2. Celles-ci enclenchent à leur tour une cascade de phosphorylation aboutissant à l'arrêt du cycle cellulaire. **(A) Point de contrôle G1/S.** La phosphorylation de la phosphatase Cdc25A par Chk1/Chk2 aboutit à son export vers le cytoplasme et à sa dégradation. Il en résulte une accumulation de la forme phosphorylée (inactive) de la kinase dépendante des cyclines Cdk2 qui est alors incapable d'initier la réplication. La protéine p53, phosphorylée et activée par les kinases Chk1 et Chk2, induit la transcription de *p21/WAF/CIP1*. p21 inhibe le complexe Cdk4/cycline D et le complexe Cdk2/cycline E. p21 inhibe également la transcription des gènes de la phase S en favorisant la séquestration du facteur de transcription E2F. **(B) Point de contrôle G2/M.** La protéine p53 induit la transcription du gène *14-3-3* qui code pour une protéine favorisant l'export des phosphatases Cdc2 et Cdc25 hors du noyau, inhibant ainsi la progression du cycle cellulaire vers la phase M. p53 induit aussi l'expression d'autres inhibiteurs de cdc2 comme Reprimo, p21 et GADD45.

limiterons dans ce paragraphe à décrire brièvement le fonctionnement des points de contrôle du cycle cellulaire et la mise en place du processus d'apoptose, des mécanismes dans lesquels la protéine suppresseur de tumeurs p53 joue un rôle clé.

II.1. Détection des lésions par les senseurs de l'ADN et transduction du signal

L'initiation des signaux nucléaires menant à la mise en place des points de contrôle du cycle cellulaire nécessite en premier lieu la reconnaissance des dommages présents sur l'ADN. Il est admis que les « senseurs » initiant la signalisation des points de contrôle sont distincts de ceux qui interviennent dans les mécanismes de réparation, mais il est probable que les événements à l'origine de l'activation de ces deux voies soient coordonnés dans l'espace et dans le temps.

Des études menées chez la levure et dans des cellules de mammifères ont montré que les kinases ATM (ataxia-telangiectasia mutated) et ATR (ATM and Rad3 related) font partie des premiers senseurs des dommages présents sur l'ADN (Cimprich and Cortez, 2008; Melo and Toczyski, 2002). ATM et ATR sont des protéines kinases à spécificité sérine/thréonine de la famille des *phosphoinositide 3-kinase related kinases* (PIKKs). ATM est principalement activée par la présence de cassures double-brin dans l'ADN (après une irradiation ionisante par exemple). ATR est activée en réponse aux différents types de dommages créés dans l'ADN après un stress génotoxique comme les UV mais elle est également activée en réponse à un stress répliatif (Cimprich and Cortez, 2008; Nakanishi et al., 2009). ATR forme avec la protéine ATRIP (ATR interacting protein) un hétérodimère qui possède une forte affinité pour l'ADN simple-brin recouvert par la protéine RPA (replication protein A) (Cortez et al., 2001; Zou and Elledge, 2003). ATR se lie en outre avec une plus forte affinité à un brin d'ADN contenant une lésion 6-4 PP qu'à un brin intact et cette liaison stimule son activité kinase (Unsal-Kacmaz et al., 2002). ATR est donc considérée comme la kinase spécifique en amont de la réponse aux dommages induits par les UV. La kinase ATM pourrait également jouer un rôle dans cette réponse car elle est phosphorylée spécifiquement par ATR après un stress UV, indépendamment de la présence de cassures double-brin (Stiff et al., 2006). De plus, il est intéressant de noter que l'activation de la kinase ATM est nécessaire à la signalisation cellulaire et à l'apoptose induites par les UVA (Zhang et al., 2002).

Les kinases ATR et ATM jouent à la fois le rôle de senseurs et de transducteurs du signal car leur activation en réponse aux dommages de l'ADN est à l'origine d'une cascade de signalisation impliquant plus de 700 protéines et plus de 900 événements de phosphorylation (Matsuoka et al., 2007). Les principales cibles directes d'ATR et ATM sont les kinases Chk1 et Chk2. Les kinases Chk1 et Chk2 phosphorylent à leur tour les effecteurs des points de contrôle permettant l'arrêt du cycle cellulaire (figure 25). La protéine suppresseur de tumeurs p53, qui est une cible directe des kinases ATR, ATM, Chk1 et Chk2, joue un rôle pivot dans ces mécanismes.

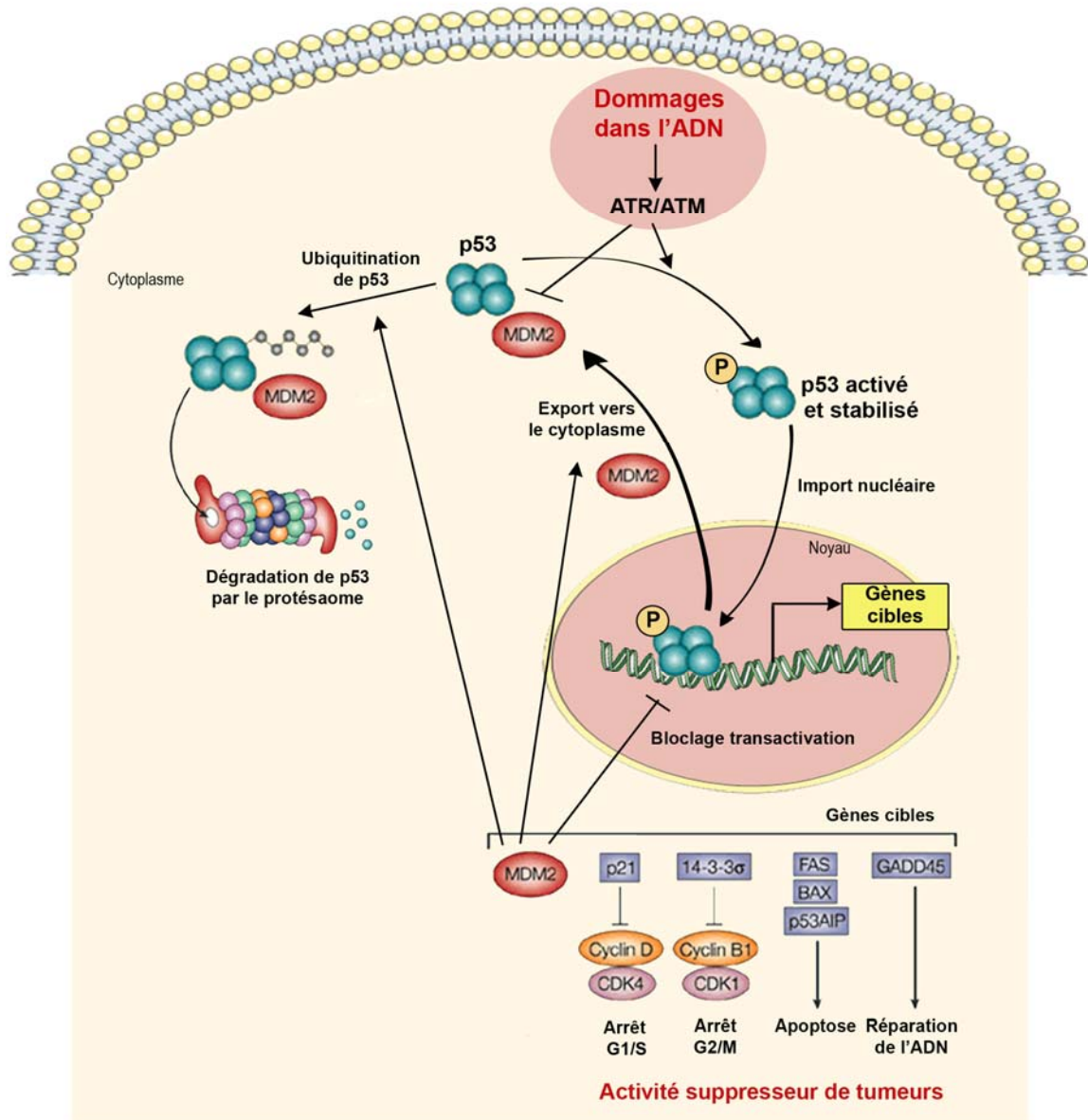


Figure 26 : Mécanismes de régulation et d'activation de p53.

En situation physiologique, la protéine p53 est maintenue à un faible niveau dans la cellule grâce à son interaction avec l'ubiquitine ligase MDM2. MDM2 favorise l'export de p53 vers le cytoplasme et y induit sa dégradation par le protéasome. P53 est un activateur transcriptionnel de MDM2 et intervient donc dans une boucle de rétrocontrôle négatif qui régule sa propre expression. En présence de dommages sur l'ADN, l'activation des kinases ATR/ATM aboutit à la phosphorylation de p53, inhibant ainsi son interaction avec MDM2. La protéine p53 s'accumule dans le noyau et active la transcription de ses gènes cibles. Par leur intermédiaire, p53 contrôle l'arrêt du cycle cellulaire en G1/S et G2/M, la réparation de l'ADN et l'apoptose en cas d'excès de lésions dans l'ADN. La protéine p53 est donc l'élément central de la réponse cellulaire liée à la présence de lésions photo-induites dans l'ADN.

II.2. p53 au cœur des points de contrôle du cycle cellulaire

Dans la cellule en condition d'homéostasie, la protéine p53 est maintenue en faible quantité dans un état latent grâce à son interaction avec l'ubiquitine ligase MDM2 (figure 26). MDM2 favorise la séquestration de p53 dans le cytoplasme et induit sa dégradation par le protéasome (Meek, 2009). Après un stress UV, les kinases ATR/ATM et Chk1/Chk2 phosphorylent MDM2 et p53, inhibant leur interaction (Stommel and Wahl, 2004). La protéine p53 activée et stabilisée s'accumule alors dans le noyau. Ainsi, les UV provoquent un allongement de la durée de vie de la protéine p53 et son accumulation rapide (<2h) dans la peau *in vivo* (Campbell et al., 1993; Hall et al., 1993). L'activation de p53 en réponse à la détection de dommages dans l'ADN est liée à de multiples modifications post-traductionnelles de la protéine qui dépendent de la nature et de l'intensité du stress (pour revue voir :Murray-Zmijewski et al., 2008). Elles régulent son niveau d'expression et son activité de facteur de transcription. Par exemple, la phosphorylation des sites Sérine 15 (par ATR) et Sérine 20 (par Chk1) régule la dégradation de p53 en inhibant son interaction avec MDM2 et module également l'interaction de p53 avec la machinerie de transcription (Meek, 2009; Sancar et al., 2004). L'accumulation de la protéine p53 dans les cellules après une irradiation UV permet la régulation du cycle cellulaire, de la réparation et de l'apoptose (figure 26).

II.3. « Better dead than wrong » : l'apoptose induite par les UV

En présence de dommages induits par les UV, la première réponse de la cellule est un signal de survie : la cellule essaie tout d'abord de préserver son matériel génétique en déclenchant les mécanismes de réparation de l'ADN et modifie son activité transcriptionnelle pour répondre au stress généré. Toutefois, si les lésions sont présentes en excès, la cellule peut s'engager dans la voie de l'apoptose, une mort cellulaire programmée permettant d'éviter l'expansion clonale de cellules dont le génome est gravement altéré. Le mécanisme exact déterminant la transition de la cellule vers l'apoptose reste à déterminer. Il est probable que le blocage et l'effondrement des fourches de réplication au niveau des lésions, favorisant la formation de cassures double-brin, le blocage de la transcription, l'arrêt prolongé du cycle cellulaire et l'énergie fournie par la cellule pour réparer les lésions concourent au déclenchement du processus apoptotique (Batista et al., 2009; Bernstein et al., 2002). La protéine p53 contribue principalement au déclenchement de l'apoptose par induction transcriptionnelle du récepteur de mort Fas et de la protéine pro-apoptotique Bax. Bax provoque la libération du cytochrome c de la mitochondrie vers le cytoplasme, l'induction des caspases et le clivage de protéines nécessaires à la survie cellulaire (Chipuk et al., 2004; Miyashita and Reed, 1995).

Phototype	Couleur de la peau, des cheveux et des yeux	Réaction au soleil
I	Peau très claire avec taches de rousseur Cheveux blonds ou roux Yeux clairs	Ne bronze pas Coups de soleil systématiques
II	Peau très claire Taches de rousseur au soleil Cheveux châains ou blonds Yeux clairs	Bronze difficilement Coups de soleil fréquents
III	Peau claire Cheveux châains ou blonds	Bronze progressivement Coups de soleil occasionnels
IV	Peau mate Cheveux châains ou bruns Yeux foncés	Bronze bien Coups de soleil peu fréquents
V	Peau foncée Cheveux foncés Yeux foncés	Bronze facilement Coups de soleil rares
VI	Peau noire Cheveux foncés Yeux foncés	Jamais de coups de soleil

Tableau 4 : Phototypes cutanés.

C. Effets tissulaires des UV

L'exposition aux UV induit la mise en place de nombreuses voies de communications au niveau cellulaire mais provoque également une réponse tissulaire régulée par des dialogues entre les différentes cellules cutanées (kératinocytes, mélanocytes, fibroblastes, cellules de Langerhans, etc.). Les réponses à court terme observées dans la peau favorisent la protection du tissu cutané mais l'exposition répétée et/ou prolongée aux UV peut venir à bout des réponses cellulaires mises en place pour réparer les altérations liées aux UV et éliminer les cellules endommagées. A long terme, ces effets délétères sont à l'origine du photo-vieillessement et de la photo-carcinogénèse cutanée.

I. Erythème et cellules « coup de soleil »

L'un des premiers effets tissulaires de l'exposition UV est l'érythème (« coup de soleil »), une réponse inflammatoire provoquant la vasodilatation des vaisseaux sanguins et le rougissement de la peau. Cette réaction est visible approximativement 6 à 8 heures après l'exposition UV et disparaît au bout de 36 à 48 heures. Les facteurs à l'origine de l'érythème sont encore mal connus, mais la présence de dimères de pyrimidines dans l'ADN pourrait déclencher cette réponse inflammatoire car il a été montré que le spectre d'activité de l'érythème est très proche de celui de la formation des CPD (Young et al., 1998). La dose minimale érythémateuse (MED, minimal erythemal dose) définit la dose à partir de laquelle l'érythème cutané est observé *in vivo*. La MED dépend du phototype cutané, défini par les caractéristiques physiques de l'individu (couleur de la peau, des yeux, des cheveux) et par la réaction de leur peau au soleil (tableau 4).

Parallèlement à la réaction érythémateuse, l'exposition de la peau aux UV provoque l'apparition de kératinocytes apoptotiques appelés « sunburn cells » (SBC, cellules « coup de soleil »). Ils sont caractérisés par un noyau pycnotique (rétraction du noyau sous l'effet de la condensation de la chromatine) et un cytoplasme éosinophile vacuolisé (Brash et al., 1996). La formation des SBC est dépendante de p53 (Ziegler et al., 1994) et constituerait un mécanisme de protection permettant l'élimination des cellules présentant un risque de transformation maligne (*e.g.* excès de lésions). La dose biologique efficace (BED, biologically efficient dose) définit la dose UV minimale capable d'induire la formation de SBC dans les couches suprabasales de l'épiderme 24h après l'exposition. La BED est utilisée pour les études *ex vivo* (peaux reconstruites, biopsies irradiées *ex vivo*) quand la MED ne peut être définie (absence d'érythème). Il existe une étroite corrélation entre la BED et la MED (Bernerd and Asselineau, 1997).

II. Pigmentation induite par les UV

La mélanine, répartie en bouclier au dessus du noyau des kératinocytes de l'épiderme, joue un rôle protecteur contre les rayonnements UV : elle agit à la fois comme une barrière physique qui disperse les rayons UV et comme un filtre qui absorbe une partie des rayonnements, limitant ainsi leur pénétration dans la peau (Brenner and Hearing, 2008). La pigmentation constitutive de la peau détermine la sensibilité de celle-ci à l'exposition UV. Ainsi les peaux noires, plus riches en eumélanine que les peaux claires, sont mieux protégées contre les dommages induits par les UV (Del Bino et al., 2006; Yamaguchi et al., 2006).

Le mécanisme d'induction de la pigmentation après une exposition UV dépend de la longueur d'onde du rayonnement. La coloration immédiate et persistante de la peau observée après une irradiation UVA serait liée à l'oxydation de la mélanine pré-existante, puis de ses précurseurs, et à leur redistribution vers les dendrites périphériques des mélanocytes, provoquant une accumulation de pigments bruns dans les différentes couches de l'épiderme (Maeda and Hatao, 2004; Routaboul et al., 1999). Les UVB stimulent la production de la mélanine en induisant l'activité de la tyrosinase, une enzyme localisée dans les mélanosomes. Cette activité s'accompagne d'une augmentation du nombre et de la dendricité des mélanocytes, favorisant le transfert d'un nombre croissant de mélanosomes vers les kératinocytes (Brenner and Hearing, 2008). Ce processus permet en quelques jours la mise en place d'une photo-protection durable (Gilchrest et al., 1996).

III. Immunosuppression induite par les UV

Le rayonnement UV perturbe le système immunitaire cutané et possède des propriétés immunosuppressives réduisant la capacité de surveillance vis-à-vis des tumeurs ou des antigènes viraux (pour revue voir : (Norval, 2006)). Les travaux pionniers de Kripke *et al.* ont montré que les tumeurs induites chez la souris par de fortes doses d'UVB étaient extrêmement immunogènes et ne pouvaient être transplantées que chez des hôtes immunodéprimés (Kripke, 1974). Par la suite, la même équipe montrait que la croissance des tumeurs induites par les UV n'était possible qu'en raison d'une altération systémique de la réponse immunitaire de leur hôte, et que ces tumeurs étaient rejetées si elles étaient transplantées chez des souris témoins (Kripke and Fisher, 1976; Kripke et al., 1977). Les travaux ultérieurs ont montré que les cellules de Langerhans subissaient de nombreuses modifications fonctionnelles et morphologiques après l'exposition UV, altérant leur nombre et leur fonction de présentation d'antigènes, avec des conséquences sur toute la réponse immunitaire en aval (Kripke, 1984).

IV. Photovieillissement

IV.1. Caractéristiques cliniques et biochimiques du photovieillissement

Le photovieillissement, ou vieillissement actinique, est un phénomène qui résulte des expositions chroniques de la peau au soleil. Il est à dissocier du vieillissement chronologique, ou intrinsèque, qui intervient naturellement au cours du temps. D'un point de vue clinique, la peau photoâgée se caractérise par un aspect papyracé reflétant sa fragilité, sa perte d'élasticité et sa sécheresse, et par la présence de rides profondes et de zones d'hyper- ou d'hypopigmentation. La présence de kératoses actiniques, les lésions précurseurs des SCC, est également fréquente (Berneburg et al., 2000) (Tableau 5).

Au niveau épidermique, les modifications liées au photovieillissement sont minimes et diffèrent peu de celles associées au vieillissement chronologique. L'épiderme est aminci et la jonction épidermique présente un aplatissement et une perte des crêtes épidermiques. Au contraire, des altérations majeures sont observées dans le derme, avec des modifications très importantes de la structure et de l'organisation de la MEC. La caractéristique majeure du photovieillissement est l'élastose solaire, une accumulation dans le derme réticulaire de fibres élastiques anormales, épaisses, associées à des protéines comme la fibronectine ou la fibrilline (Chen et al., 1986). Le réseau de fibres de collagène, la protéine majoritaire de la MEC, est également désorganisé et le contenu total du derme en collagène est diminué (Talwar et al., 1995), en raison notamment d'une inhibition de la synthèse des pro-collagènes I et III (Varani et al., 2001). Les métalloprotéinases matricielles (MMPs), des enzymes responsables de la dégradation des protéines de la MEC, jouent également un rôle majeur dans la désorganisation des collagènes observée dans la peau photoâgée (Quan et al., 2009).

IV.2. Les MMPs et leur rôle dans le photovieillissement

IV.2.a. Description des MMPs

Les MMPs sont des enzymes protéolytiques sécrétées ou membranaires qui régulent un grand nombre de processus biologiques par clivage de diverses protéines circulantes, membranaires ou extracellulaires. Elles interviennent notamment dans le remodelage tissulaire lors de la cicatrisation, la signalisation inter-cellulaire, l'inflammation et l'angiogénèse (pour revue voir : Egeblad and Werb, 2002; Kerkela and Saarialho-Kere, 2003; Sternlicht and Werb, 2001).

Les MMPs appartiennent à la superfamille des « metzincines » qui est caractérisée par la présence d'un motif très conservé de fixation du zinc au niveau du site catalytique. La famille des MMPs comprend 22 membres qui peuvent être divisés en 6 sous-groupes : (1) les collagénases ;

Structures cutanées	Modifications histologiques	Répercussions fonctionnelles et cliniques
<i>Stratum corneum</i>	Augmentation de l'épaisseur Présence d'amas de cornéocytes Couches superficielles déshydratées	Peau rugueuse, écaillée, avec formation de micro-fissures
Epiderme	Epaisseur irrégulière, parfois atrophique, parfois hyperplasique Aspect dysplasique des cellules basales par endroit	Dysplasies, néoplasies épithéliales
Cellules de Langerhans	Diminution du nombre	Diminution de l'immunité à médiation cellulaire
Mélanocytes	Augmentation du nombre, dysplasie Irrégularité de transfert de la mélanine dans l'épiderme	Lentigo actinique Irrégularités de la pigmentation (zones hyper- et hypo-pigmentées)
Matrice extracellulaire dermique	Remplacement de la MEC normale (collagène, élastine, glycosaminoglucanes) par des boules grossières de fibres élastiques et diminution du collagène	Rides profondes, aspect jaune et flasque de la peau
Vascularisation dermique	1) Perte des plexus vasculaires avec aplatissement des crêtes papillaires et diminution de la vascularisation au niveau du derme papillaire 2) Réponse inflammatoire liée aux UV avec dilatation et élargissement des vaisseaux dans le derme papillaire et le derme moyen. Fragilité vasculaire	Pâleur cireuse Télangiectasies Tendance aux ecchymoses
Glandes sébacées	Hypertrophie Rétention sébacée liée à une hyperkératose des canaux sébacés	Hyperplasies sébacées Formation de comédons

Tableau 5 : Modifications histologiques et manifestations cliniques du photovieillessement.
(D'après : Passeron and Ortonne, 2003)

(2) les gélatinases ; (3) les stromélysines ; (4) les matrilysines ; (5) les MMPs associées à la membrane (membrane-type, MT-MMP) et (6) les autres MMPs. A elles toutes, les MMPs peuvent dégrader tous les composants de la MEC (tableau 6).

Les membres de la famille des MMPs diffèrent d'un point de vue structurel, ce qui explique la capacité de chacune des enzymes à dégrader un certain type de substrats (figure 27). Toutes les MMPs possèdent un signal peptidique N-terminal (ou domaine « pré ») qui dirige la sécrétion de ces enzymes dans le réticulum endoplasmique (où le domaine « pré » est clivé) puis hors de la cellule. Ainsi, la plupart des MMPs sont constitutivement sécrétées après leur synthèse, sauf les MT-MMPs qui possèdent un domaine transmembranaire et sont exprimées à la surface de la cellule. Le domaine « pré » est suivi d'un domaine « pro » qui maintient l'enzyme dans un état latent jusqu'à son clivage et l'activation consécutive de l'enzyme. Après le domaine « pro » se trouve le site catalytique de l'enzyme qui contient le domaine de liaison au zinc. A l'exception des MMP7, 26 et 23, toutes les MMPs possèdent un domaine homologue à l'hémopexine connecté au site catalytique par une liaison peptidique. Ce domaine modifie l'affinité de l'enzyme pour certains substrats, influe sur son activité protéolytique et régule également la liaison des TIMPs (Tissue Inhibitors of MetalloProteinases), les inhibiteurs extracellulaires des MMPs.

IV.2.b. Régulation post-traductionnelle des MMPs

Comme d'autres enzymes protéolytiques, les MMPs sont tout d'abord synthétisées et sécrétées comme des proenzymes (ou zymogènes). Leur activation extracellulaire est initiée par des MMPs préalablement activées ou par des protéases à spécificité sérine qui clivent le lien peptidique retenant le domaine « pro » (Chakraborti et al., 2003; Nagase and Woessner, 1999).

Une dégradation contrôlée et coordonnée des composants de la MEC est nécessaire à la régulation de nombreux processus biologiques et l'activité des MMPs est donc contrôlée finement par leurs inhibiteurs, les TIMPs. Les TIMPs forment une famille de 4 protéines sécrétées (TIMP 1 – 4) qui inhibent de façon réversible les MMPs selon un processus stœchiométrique (1 :1). Les TIMPs exercent leur activité inhibitrice par leur domaine N-terminal qui se lie au site actif des MMPs et empêche la liaison de celles-ci sur leurs substrats (Willenbrock and Murphy, 1994). Un déséquilibre de la synthèse des MMPs et des TIMPs, résultant en un excès de MMPs, joue un rôle déterminant dans de nombreux processus pathologiques et notamment dans la promotion de l'invasion tumorale (Westermarck and Kahari, 1999).

Enzyme	Substrats	Activateur
Collagénases		
Collagenase-1 (MMP-1)	Col I, II, III, VII, VIII, X, aggrecan, entactin/nidogen, MBP, serpins, α 2M, perlecan, vitronectin, tenascin, fibrinogen, TNF precursor, IGFBP	MMP-3, -10, plasmin, kallikrein, chymase
Collagenase-2 (MMP-8)	Col I, II, III, aggrecan, serpins, α 2M, fibrinogen	MMP-3, -10, plasmin
Collagenase-3 (MMP-13)	Col I, II, III, IV, IX, X, XIV, aggrecan, fibrillin, fibronectin, gelatin, LN-1, large tenascin C, osteonectin, serpins, PAI, fibrinogen	MMP-2, -3, -10, -14, -15, plasmin
Gélatinases		
Gélatinase A (MMP-2)	Col I, IV, V, VII, X, gelatin, fibronectin, tenascin, fibrillin, osteonectin, entactin, aggrecan, vitronectin, decorin, MBP, decorin, plasminogen, α 2M, LN-5, IGFBP, TNF precursor, pro-TGF- β , α 1P1	MMP-1, -7, -13, -14, -15, -16, -24, 25, tryp-tase, thrombin, plasmin
Gélatinase B (MMP-9)	Col I, IV, V, VII, XI, XIV, gelatin, elastin, fibrillin, osteonectin, aggrecan, fibronectin, vitronectin, decorin, MBP, α 2M, TNF precursor, IGFBP, plasminogen, pro-TGF- β , α 1P1	MMP-2, -3, -13, plasmin
Stromélysines		
Stromélysine-1 (MMP-3)	Col III, IV, V, VII, IX, X, elastin, fibronectin, fibrillin, fibrinogen, gelatin, aggrecan, LN-1, nidogen, vitronectin, osteonectin, decorin, tenascin, α 1P1, TNF precursor, MBP, E-cadherin, IGFBP, asminogen, osteopontin	Plasmin, kallikrein, chymase, tryptase
Stromélysine-2 (MMP-10)	Col III; IV, V, IX, X, elastin, fibronectin, gelatin, aggrecan, LN-1, nidogen	Elastase, cathepsin G, plasmin
Stromélysine-3 (MMP-11)	α 1P1, IGFBP	Furin
Metalloelastase (MMP-12)	Elastin, col IV, fibronectin, LN-1, gelatin, vitronectin, entactin, proteoglycan, heparan and chondroitin sulfates, TNF precursor, plasminogen, fibrillin, fibrinogen, α 1P1	Plasmin
Matrilysines		
Matrilysine-1 (MMP-7)	Col IV, elastin, fibronectin, LN-1, entactin, tenascin, osteonectin, aggrecan, vitronectin, MBP, decorin, versican, α 1P1, osteopontin, E-cadherin, plasminogen, β 4 integrin, α -prodefensin, Fas ligand, pro-TNF- α	MMP-3, plasmin
Matrilysine-2 (MMP-26, endometase)	Col IV, gelatin, fibronectin, fibrin, α 1PI, β -casein, TACE substrate	ND
Membrane-type MMPs		
MT1-MMP (MMP-14)	Col I, II, III, gelatin, fibronectin, LN-1, vitronectin, aggrecan, tenascin, nidogen, perlecan, fibrinogen/fibrin, fibrillin, α 1PI, α 2M, LN-5, CD-44, tTG	Plasmin, furin
MT2-MMP (MMP-15)	Fibronectin, LN-1, gelatin, aggrecan, tenascin, nidogen, perlecan, vitronectin, tTG	ND
MT3-MMP (MMP-16)	Col III, fibronectin, gelatin, laminin, aggrecan, casein, vitronectin, α 2M, α 1PI, tTG	Furin
MT4-MMP (MMP-17)	Gelatin, TNF- α precursor, fibrillin, fibronectin	ND
MT5-MMP (MMP-24)	ND	ND
MT6-MMP (MMP-25)	Col IV, gelatin, fibronectin, fibrin, LN-1	ND
Autres		
MMP-19	Col IV, gelatin, LN-1, nidogen, tenascin, fibronectin, aggrecan, fibrinogen, COMP	Trypsin
Enamelysin (MMP-20)	Amelogenin, aggrecan, COMP	ND
MMP-23	ND	ND
Epilysin (MMP-28)	ND	ND

Col, collagen; COMP, cartilage oligomeric matrix protein; IGFBP, insulin-like growth factor binding protein; LN, laminin; MBP, myelin basic protein; α 2M, α 2-macroglobulin; PAI, plasminogen activator inhibitor; α 1PI, α 1-proteinase inhibitor; tTG, tissue transglutaminase; ND, not detected.

Tableau 6 : Les métalloprotéines matricielles et leurs substrats.

(D'après : Kerkela and Saarialho-Kere, 2003)

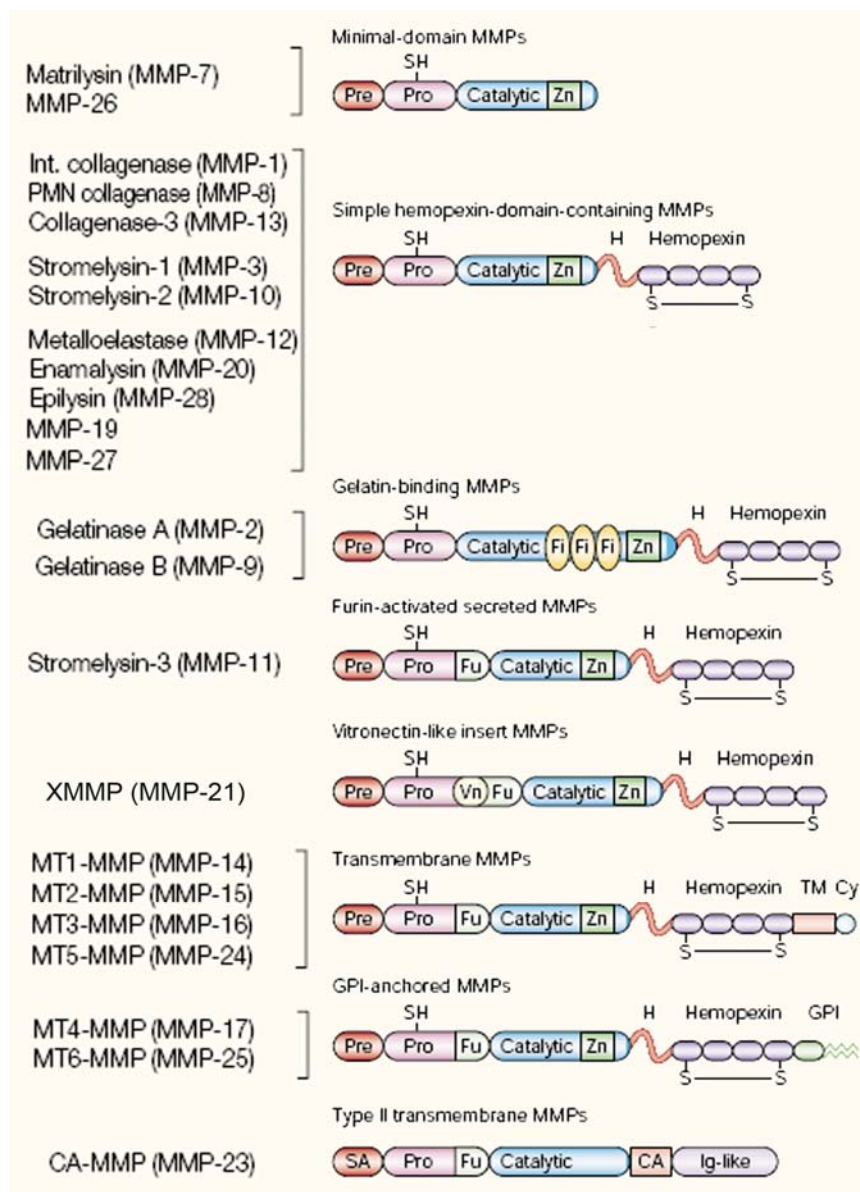


Figure 27 : Structure des MMPs.

D'un point de vue structurel, les MMPs peuvent être divisées en huit groupes : les cinq premiers groupes rassemblent les MMPs sécrétées, les trois derniers correspondent aux MMPs transmembranaires (MT-MMPs et CA-MMP). La séquence « Pré » dirige les MMPs vers le réticulum endoplasmique au cours de la traduction. Le propeptide (Pro), qui contient un groupement thiol (SH) capable d'interagir avec le zinc, maintient les MMPs sous une forme inactive (zymogène). Le domaine catalytique contient un site de liaison au zinc (Zn). Le domaine hémopexine est connecté au domaine catalytique par une charnière polypeptidique (H). Il joue un rôle dans les interactions de l'enzyme avec les inhibiteurs des MMPs (TIMPs), les molécules membranaires et les substrats protéiques. La première et la dernière répétition du domaine hémopexine sont reliées par un pont disulfure (S-S). Les MMPs de type gélatinase possèdent des domaines ressemblant aux répétitions liant le collagène décrites sur la fibronectine (Fi). Le motif Fu permet la reconnaissance et l'activation de certaines MMPs sécrétées par les protéases de type furine. Les MT-MMPs possèdent (1) un domaine transmembranaire (TM) et une courte région cytoplasmique (Cy) ou (2) un domaine d'ancrage au glycosylphosphatidylinositol (GPI). La MMP-23 possède un signal d'ancrage N-terminal (SA) qui la dirige vers la membrane cellulaire, ainsi qu'un domaine riche en cystéines (CA) et un domaine de type immunoglobuline (Ig). (D'après : Egeblad and Werb, 2002)

IV.2.c. MMPs, UV et photovieillissement

Les rayonnements UVB et SSL induisent l'expression de la MMP-1 (collagénase interstitielle), de la MMP-3 (stromélysine 1) et de la MMP-9 (gélatinase 92kDa) dans la peau humaine *in vivo* (Fisher et al., 1996; Fisher et al., 1997; Quan et al., 2009). Cette induction est liée à la rapide activation des MAPK puis des facteurs AP-1 qui régulent l'activité du promoteur des MMP-1, -3 et -9 (Brenneisen et al., 2002; Fisher and Voorhees, 1998). L'inhibiteur TIMP-1 est également induit par les UV parallèlement à l'induction des MMPs (Fisher et al., 1997). Les études menées *in vitro* sur des cultures de fibroblastes et des peaux reconstruites ont permis de montrer que les fibroblastes du derme étaient les producteurs majoritaires des MMPs en réponse à l'exposition UVB et SSL, suite à une activation paracrine par les kératinocytes (Fagot et al., 2002; Fagot et al., 2004). Toutefois, une étude récente montre que, dans la peau *in vivo*, les MMPs seraient induites majoritairement dans l'épiderme après une irradiation SSL (Quan et al., 2009), suggérant une régulation paracrine du derme vers l'épiderme. Les deux compartiments cutanés seraient donc impliqués dans la régulation de la production et de la sécrétion de MMPs.

Les UVA induisent également la sécrétion de MMP-1 dans les fibroblastes en culture, dans les peaux reconstruites et dans la peau *in vivo* (Bernerd and Asselineau, 1998; Scharffetter et al., 1991). Cette induction est liée à l'activation du facteur AP-1 par les ROS (Wenk et al., 1999). En raison de leurs propriétés de pénétration dans le derme, les UVA sont des acteurs majeurs dans les mécanismes menant aux altérations dermiques associées au photovieillissement (Bernerd and Asselineau, 1998).

Ensemble, les MMP-1, -3 et -9 possèdent la capacité de dégrader la plupart des composants du derme. La MMP-1 initie le clivage des collagènes fibrillaires de type I et III en coupant chaque fibre de la triple hélice constituant le collagène. Une fois clivé par la MMP-1, le collagène peut être fragmenté par les MMP-3 et -9. Les MMPs induites par les UV joueraient donc un rôle déterminant dans le processus de photovieillissement en participant à la dégradation et à la désorganisation de la MEC.

V. Photocarcinogénèse

Les altérations moléculaires, cellulaires et tissulaires induites par les UV, que nous avons évoquées tout au long de ce chapitre, contribuent, à long terme, au processus complexe menant au développement des carcinomes cutanés⁷ (figure 28).

Le gène suppresseur de tumeurs *p53* est souvent qualifié de « gardien du génome » en raison de son rôle dans le contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose pour répondre à la présence de dommages dans l'ADN. Il est l'un des acteurs majeurs du processus de carcinogénèse. Le développement rapide de carcinomes cutanés chez les souris déficientes pour *p53* (*p53* -/-) illustre l'importance de ce gène dans le contrôle de la promotion tumorale (Li et al., 1998b). Chez l'homme, de nombreuses études ont identifié la présence de mutations affectant le gène *p53* dans les carcinomes cutanés : des mutations de *p53* sont en effet présentes dans 41 à 90% des CSC (Bolshakov et al., 2003; Brash et al., 1991; Nelson et al., 1994; Ziegler et al., 1994) et dans 33 à 56% des CBC (Bolshakov et al., 2003; Kim et al., 2002; Rady et al., 1992; Soehnge et al., 1997; Zhang et al., 2001; Ziegler et al., 1993). La répartition de ces mutations n'est pas aléatoire : certains « points chauds » particulièrement susceptibles de porter une mutation provoquant l'inactivation fonctionnelle de *p53* ont été décrits (Brash et al., 1991; Ziegler et al., 1993). Plusieurs de ces sites sont des séquences CpG, fréquemment méthylées. La formation préférentielle des CPD au niveau des séquences contenant une 5-mC et le caractère hautement mutagène de ce type de séquence pourrait permettre d'expliquer la présence de ces points chauds (Drouin and Therrien, 1997; You et al., 2000). La majorité des mutations touchant le gène *p53* sont des transversions C→T et/ou CC→TT, qui constituent la signature spécifique des UV.

La formation de mutations dans le gène *p53* serait un évènement précoce du développement des cancers de la peau. En effet, des mutations spécifiques des UVB ont été identifiées sur le gène *p53* dans 75 à 80% des KA, les précurseurs des CSC (Agar et al., 2004; Ziegler et al., 1994). De plus, de nombreux clones de kératinocytes portant des mutations sur le gène *p53* sont présents dans la peau normale exposée au soleil (Jonason et al., 1996; Nakazawa et al., 1994). Ces clones se développent à partir de la JDE et/ou des follicules pileux et sont d'autant plus fréquents et larges que l'exposition solaire est chronique. Outre leur rôle dans l'initiation de la tumorigénèse, les UV pourraient donc également promouvoir le développement tumoral en induisant l'apoptose des cellules endommagées contenant une protéine *p53* fonctionnelle (contrôle cellulaire ou « cellular proofreading ») et en favorisant l'expansion clonale des cellules déficientes en *p53*.

⁷ Les kératinocytes constituant notre principal modèle d'étude, le processus menant au développement des mélanomes, extrêmement complexe et encore mal connu, ne sera pas abordé ici.

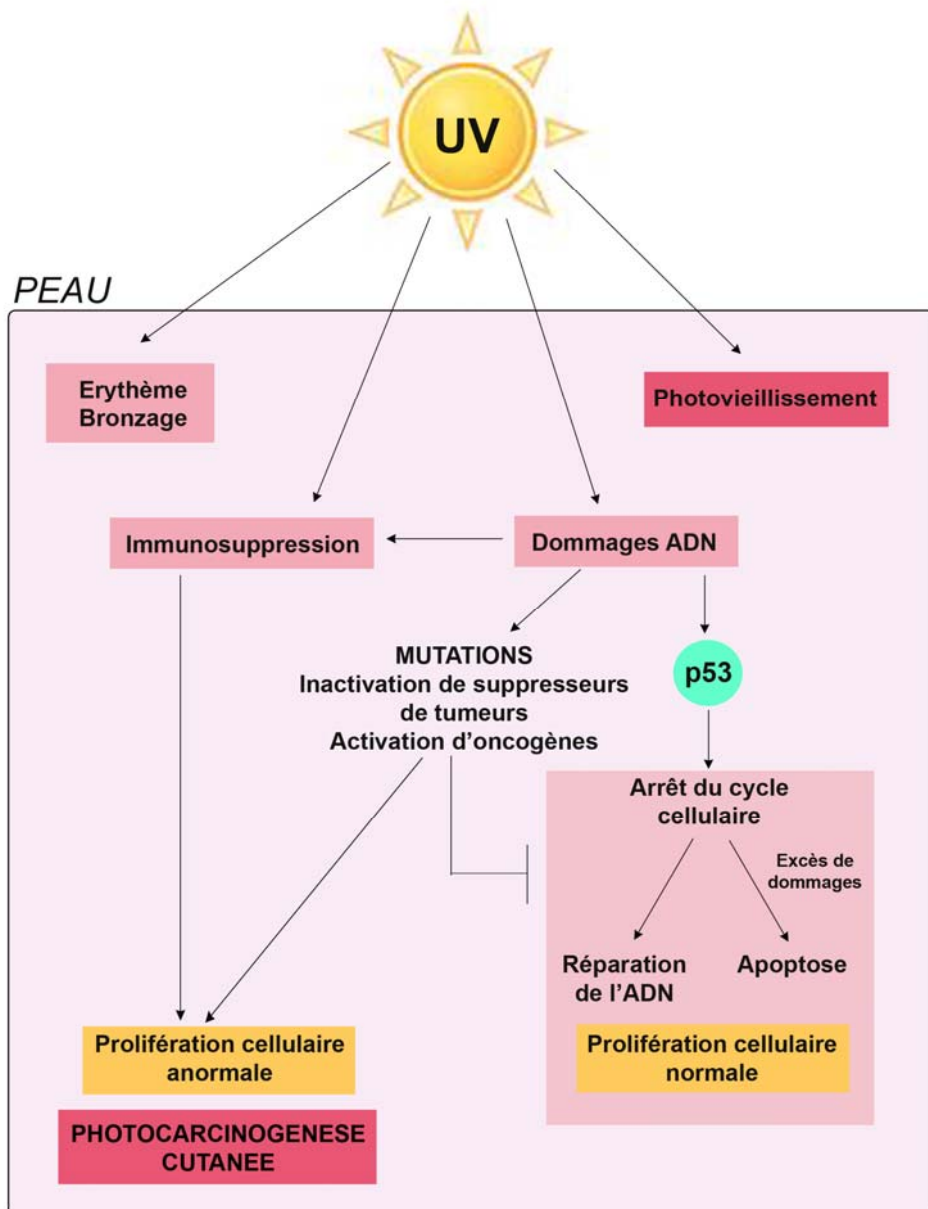


Figure 28 : Effets des UV sur la peau et implications pour la photo-carcinogénèse cutanée.

Selon les modèles hypothétiques décrivant le processus multi-étapes de la carcinogénèse, l'altération de deux gènes « gardiens » (« gatekeeper genes ») pourrait mener au cancer (Kinzler and Vogelstein, 1997). Dans les carcinomes cutanés, l'un de ces événements impliquerait probablement p53 et la mutation d'un autre gène (impliqué par exemple dans le contrôle du cycle cellulaire ou la prolifération) mènerait à la transformation maligne. Suite à l'expansion clonale des kératinocytes présentant des altérations génétiques, l'émergence de la tumeur est finalement favorisée par l'immunosuppression induite par les UV qui permet aux cellules transformées d'échapper à la surveillance immunitaire anti-tumorale. La forte incidence des CSC et de CBC dans les zones photo-exposées chez les patients greffés et traités par des immunosuppresseurs illustre l'impact de l'immunosuppression sur le développement des carcinomes cutanés (Glover et al., 1997). Le rayonnement solaire peut donc être considéré comme un « carcinogène total » puisqu'il est capable à lui seul d'initier et de promouvoir le développement des cancers cutanés.

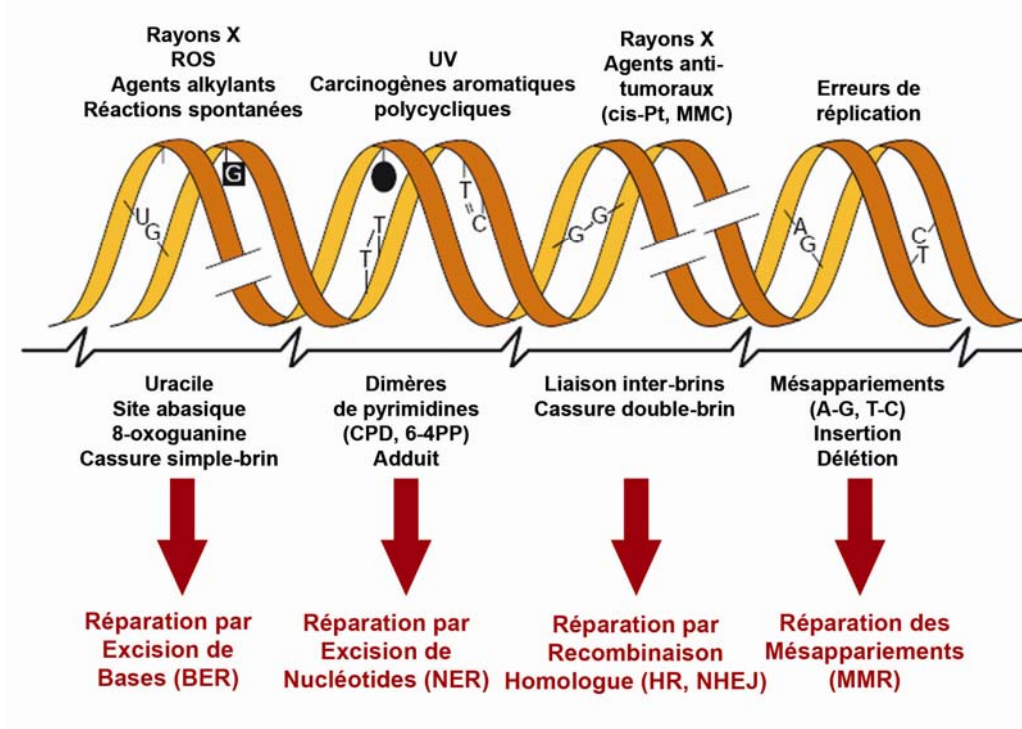


Figure 29 : Lésions de l'ADN et mécanismes de réparation.

ROS, espèces réactives de l'oxygène ; cis-Pt, cis-platine ; MMC, mitomycine C ; CPD, dimère cyclobuténique de pyrimidines ; 6-4 PP, pyrimidine (6-4)-pyrimidone ; HR, recombinaison homologue ; NHEJ, jonction non homologue des extrémités. (D'après : Hoeijmakers, 2001).

REPARATION DE L'ADN ET XERODERMA PIGMENTOSUM

Le nombre de dommages endogènes spontanés dans une cellule est estimé à près de 10^5 lésions par jour (Lindahl, 1993) et quelques heures au soleil peuvent induire plus de 10^6 photoproduits dans chaque kératinocyte exposé (Mouret et al., 2006). Pour faire face à ces menaces, les systèmes de réparation de l'ADN ont fait leur apparition très tôt au cours de l'évolution, ce qui explique leur grande conservation chez les eucaryotes. Il existe cinq grands mécanismes de réparation des dommages de l'ADN et chacun prend en charge un type de lésion particulier : la réparation par excision de nucléotides (Nucleotide Excision Repair, NER) élimine les lésions déformant la double hélice d'ADN ; la réparation par excision de bases (Base Excision Repair, BER) répare les modifications de bases (bases oxydées, sites abasiques) et les cassures simple-brin ; la réparation des mésappariements de bases (Mismatch Repair, MMR) enlève les mauvais nucléotides incorporés par les ADN polymérases ; la recombinaison homologue (Homologous Recombination, HR) et la jonction non homologue des extrémités (Non Homologous End Joining, NHEJ) prennent en charge les cassures double-brin (pour revue voir : Hoeijmakers, 2001)(figure 29).

L'altération de ces processus de réparation peut avoir de graves conséquences sur l'intégrité de l'ADN et l'homéostasie cellulaire. Les mutations germinales touchant les gènes impliqués dans l'un ou l'autre des systèmes de réparation de l'ADN sont donc généralement associées à des syndromes de prédisposition à différents types de cancers (pour revue voir : Hoeijmakers, 2001). C'est le cas notamment du xeroderma pigmentosum (XP), une maladie génétique rare de prédisposition aux cancers cutanés, liée à des mutations germinales dans les gènes codant pour les protéines de la NER.

A. La réparation par excision de nucléotides (NER)

La NER est un système de réparation polyvalent qui prend en charge une grande variété de lésions provoquant une distorsion de la structure de la double hélice d'ADN. La NER élimine notamment les adduits encombrants formés sur les bases de l'ADN par de nombreux produits chimiques, comme les adduits de cisplatine ou les adduits formés par le benzo(a)pyrène, un carcinogène environnemental contenu dans la fumée du tabac ou les gaz d'échappement des voitures. Dans la peau, les principaux substrats de la NER, et les plus importants d'un point de vue clinique, sont les dimères de pyrimidines induits par les UV, les CPD et les 6-4 PP.

Le mécanisme de la NER implique l'action coordonnée d'une trentaine de protéines (tableau 7) et se déroule en plusieurs étapes (figure 30) : (1) la reconnaissance de la lésion ; (2) la formation et la stabilisation d'un complexe multiprotéique comprenant le facteur de transcription TFIIH ; (3) le déroulement de la double hélice d'ADN autour de la lésion par des hélicases spécifiques ;

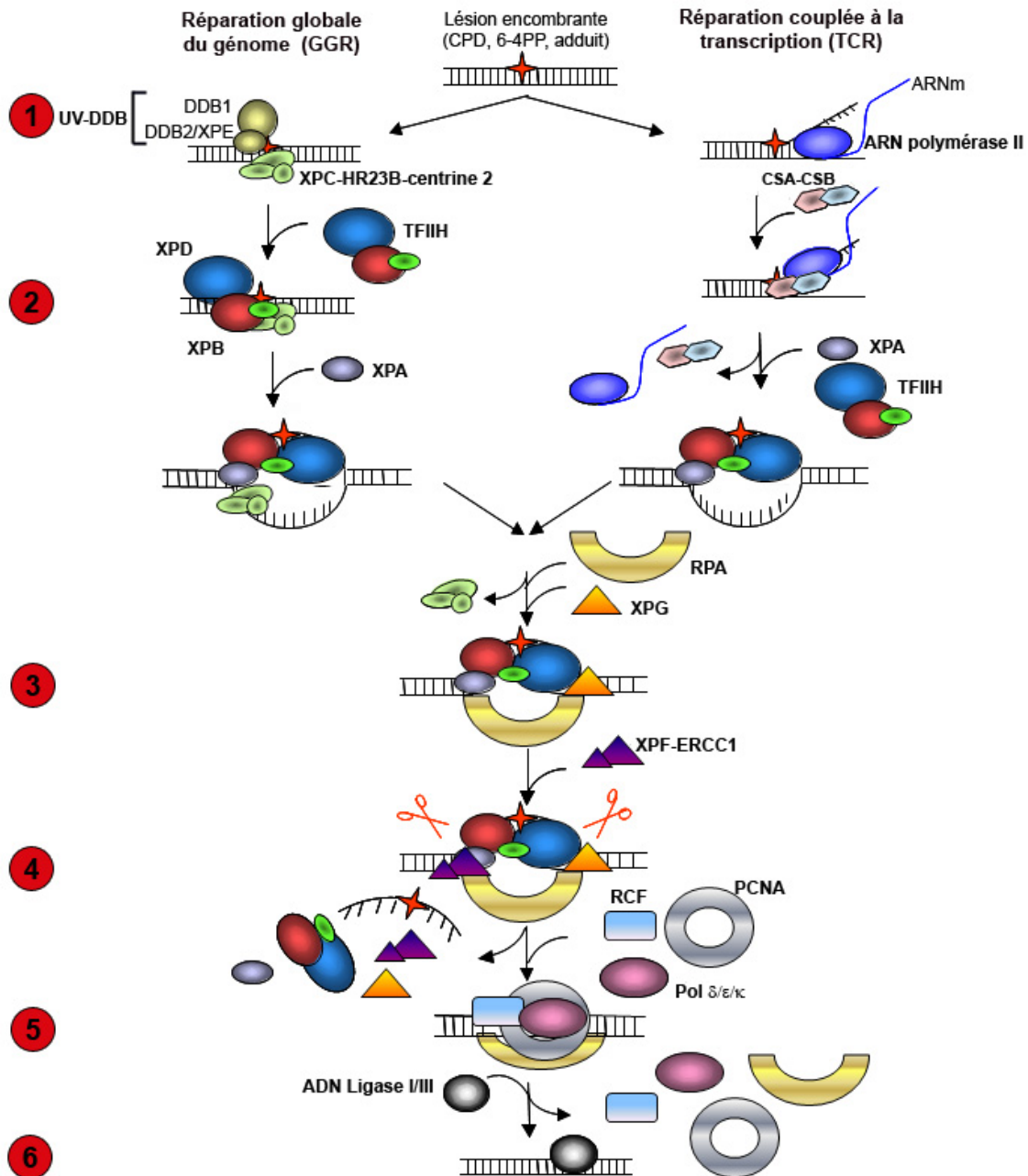


Figure 30 : Mécanisme de la réparation par excision de nucléotides (NER).

(1) Reconnaissance de la lésion par les complexes UV-DDB et XPC-RAD23B-centrine 2 (réparation globale du génome, GGR) ou par le blocage de l'ARN Polymérase II (réparation couplée à la transcription, TCR). (2) Recrutement du facteur de transcription TFIID au niveau de la lésion et ouverture de l'ADN par les hélicases XPB et XPD, éléments du facteur TFIID. La protéine XPA stimule l'activité hélicase/ATPase de TFIID. (3) Assemblage du complexe de pré-incision. La fixation de la protéine RPA stabilise le simple brin généré par l'ouverture locale de l'ADN et facilite la mise en place des endonucléases XPG et XPF-ERCC1. (4) Excision du fragment d'ADN endommagé grâce aux endonucléases XPG et XPF-ERCC1. XPF-ERCC1 et XPG incisent le brin d'ADN endommagé en position en 5' et 3' de la lésion, respectivement, ce qui permet l'excision du fragment contenant la lésion. (5) Synthèse d'un nouveau brin d'ADN par la machinerie de réplication. Le brin complémentaire intact sert de matrice. (6) Ligation du nouveau fragment.

(4) l'excision du brin d'ADN portant la lésion ; (5) la synthèse répliquative à partir du brin complémentaire non lésé ; (6) la ligature du nouveau brin synthétisé (de Laat et al., 1999). Dans les années 1980, l'équipe d'Hanawalt observa que les régions transcriptionnellement actives du génome étaient réparées plus vite par la NER que les régions silencieuses (Bohr et al., 1985; Mellon et al., 1987). A partir de cette observation, l'existence de deux voies de réparation a été mise en évidence : **la réparation couplée à la transcription (Transcription Coupled Repair, TCR)** élimine les lésions présentes sur le brin transcrit des gènes actifs tandis que **la réparation du génome global (Global Genome Repair, GGR)** enlève les lésions présentes sur l'ensemble du génome et notamment sur les brins non transcrits des gènes actifs.

I. Reconnaissance de la lésion

I.1. GGR : un rôle majeur de la protéine XPC dans la reconnaissance des lésions

I.1.a. Rôle du complexe XPC-RAD23B-Centrine 2 dans la GGR

Le principal acteur de la reconnaissance des lésions au cours de la GGR est la **protéine XPC**, un orthologue de la protéine Rad4 impliquée dans la NER chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. *In vivo*, la protéine XPC forme un complexe hétérotrimérique stable avec l'un des deux orthologues de la protéine Rad23 de *S. cerevisiae*, **RAD23A** et **RAD23B**, et la protéine centrosomique **centrine 2** (Masutani et al., 1994; Nishi et al., 2005; Sugawara et al., 1997).

La protéine XPC reconnaît l'ADN endommagé et initie la GGR

La **protéine XPC** possède une forte affinité pour l'ADN endommagé (Batty et al., 2000), alors que ni les orthologues de Rad23, ni la centrine 2 ne peuvent se lier eux-mêmes à l'ADN. Les études biochimiques réalisées *in vitro* sur divers substrats d'ADN ont montré que la protéine XPC pouvait reconnaître différents types de dommages, tels que les photoproduits 6-4PP, les adduits formés par les agents alkylants comme le N-acétoxy-2-acétylamino-fluorène (AAF) ou les adduits de cisplatine (Batty et al., 2000; Kusumoto et al., 2001). En revanche, son affinité pour les dimères de type CPD est beaucoup plus faible. La reconstitution *in vitro* des étapes successives de la NER a permis de déterminer que la protéine XPC était indispensable à l'initiation de la NER et au recrutement de la machinerie de réparation (Riedl et al., 2003; Sugawara et al., 1998). La protéine XPC initie la NER en se liant au niveau des sites endommagés et en provoquant une modification locale de la conformation de l'ADN (Janicijevic et al., 2003), facilitant ainsi le recrutement des autres facteurs de réparation.

Le complexe XPC est capable de reconnaître différents types de lésions qui ne partagent pas de structure chimique commune mais qui induisent tous une distorsion de la double hélice d'ADN.

Les lésions encombrantes reconnues par la NER provoquent généralement une rupture de l'appariement entre les bases lésées et leurs bases complémentaires. L'exposition à la surface de la double hélice de bases non appariées génère une configuration anormale ressemblant localement à de l'ADN simple-brin. L'étude cristallographique de la protéine Rad4 liée à un fragment d'ADN contenant un CPD a révélé que l'orthologue de la protéine XPC ne reconnaissait pas la lésion elle-même mais se fixait au niveau du brin non endommagé, en face de la lésion (Min and Pavletich, 2007). La liaison de Rad4 provoque un changement de conformation de l'ADN et l'expulsion du dimère et des bases complémentaires hors de la double hélice, stabilisant la fixation de Rad4 autour de ces dernières (figure 31). Comme son orthologue, la protéine XPC interagit préférentiellement avec le brin non endommagé situé en face d'une lésion grâce à un motif aromatique lui conférant une affinité particulière pour les bases non appariées (Camenisch et al., 2009; Maillard et al., 2007).

L'affinité relative de la protéine XPC pour les différents types de lésions est donc directement liée à leur propension à distordre la double hélice d'ADN. De telles considérations permettent d'expliquer pourquoi les dimères de type 6-4 PP sont reconnus beaucoup plus efficacement par XPC que les lésions CPD ; les CPD sont à l'origine d'une distorsion minime de l'ADN par rapport aux 6-4 PP (Kim et al., 1995) et les données RMN suggèrent que les deux résidus pyrimidiques engagés dans le dimère soient encore liés par liaison hydrogène aux purines du brin opposé (McAteer et al., 1998). Le mécanisme indirect de reconnaissance des lésions par la protéine XPC en fait un facteur extrêmement versatile qui permet l'identification et la réparation d'une très large variété de dommages par la GGR.

Les sous-unités RAD23A/B et centrine 2 régulent l'activité de la protéine XPC

La protéine de levure Rad23 et ses orthologues mammifères **RAD23A** et **RAD23B** partagent une séquence N-terminale « ubiquitin-like » (Ubl) et deux domaines associés à l'ubiquitine (UBA, Ubiquitin-Associated domains). Le site de liaison entre XPC/Rad4 et RAD23/Rad23 est situé entre ces deux domaines UBA (Masutani et al., 1997). Le domaine Ubl interagit avec le complexe régulateur 19S du protéasome 26S (Hiyama et al., 1999) et les sites UBA interagissent avec les chaînes de polyubiquitination (Wilkinson et al., 2001). Les membres de cette famille ont donc été impliqués dans la régulation de la dégradation des protéines par le système ubiquitine/protéasome.

In vivo, la majorité des protéines XPC forment un complexe avec la protéine RAD23B, tandis qu'une petite fraction seulement s'associe avec RAD23A (Araki et al., 2001). Ceci serait uniquement lié au fait que la protéine mRAD23A est 10 fois moins exprimée que la protéine mRAD23B et les deux protéines seraient fonctionnellement identiques dans le cadre de la GGR (Okuda et al., 2004). La délétion du gène *mRAD23B* chez la souris provoque de graves défauts du développement embryonnaire et une mort intra-utérine précoce (Ng et al., 2002). En outre, le niveau d'expression de

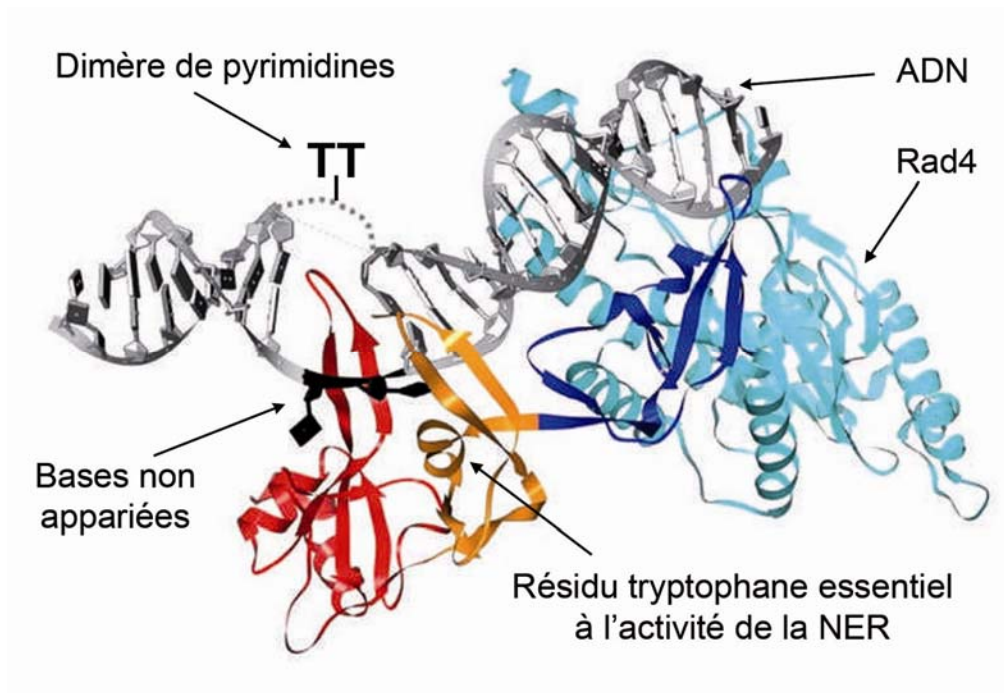


Figure 31 : Structure cristallographique de la liaison à l'ADN de Rad4, l'orthologue de XPC chez la levure.

La protéine Rad4 (en couleurs) se lie à l'ADN (en gris) en face de la lésion (TT), provoquant l'expulsion des résidus complémentaires mal appariés (en noir) hors de la double hélice. Le résidu tryptophane (W496 chez la levure, W690 chez l'homme) interagit avec les bases extrudées et donne à la protéine son affinité pour les régions d'ADN endommagées (D'après : Min and Pavletich, 2007).

Protéine	Gène	Locus	Maladie de la NER associée	Propriétés de la protéine	TCR/GGR
XPC	<i>XPC</i>	3p25.1	XP-C	Forme un complexe avec RAD23B et Centrine 2. Affinité pour les bases non appariées. Essentiel pour la reconnaissance des lésions au cours de la GGR.	GGR
RAD23B	<i>RAD23B</i>	9q31.2		Interagit avec le système ubiquitine/protéasome. Stabilise la protéine XPC.	GGR
Centrine 2	<i>CETN2</i>	Xq28		Augmente l'affinité du complexe XPC-RAD23B pour les lésions présentes sur l'ADN. Stimule l'activité de la NER. Rôle dans la duplication des centrioles en phase M.	
XPE	<i>DDB2</i>	11p11-12	XP-E	Forme un complexe avec DDB1. Possède une affinité pour l'ADN endommagé. Participe à la reconnaissance des lésions au cours de la GGR.	GGR
DDB1	<i>DDB1</i>	11q12-q13		Forme un complexe avec DDB2/XPE. Interagit avec un complexe à activité ubiquitine-ligase contenant les sous-unités Culline 4A et ROC1. Stabilise la liaison du complexe XPC-RAD23B-centrine 2 sur l'ADN endommagé.	GGR/(TCR)
CSA	<i>CSA/ERCC8</i>	5q12.1	CS-A	Interagit avec un complexe à activité ubiquitine ligase constitué entre autres par les protéines DDB1, Culline 4 et ROC1/RBX1. Interagit avec CSB et TFIIH.	TCR
CSB	<i>CSB/ERCC6</i>	10q11.23	CS-B	Protéine de la famille SWI/SNF. Facilite l'assemblage des protéines du complexe de réparation. Interagit avec CSA et TFIIH.	TCR
TFIIH				Activité hélicase/ATPase. Constitué d'un noyau de 7 sous-unités comprenant les hélicases XPB et XPD, les protéines régulatrices p62, p52, p44, p34 et p8/TTD-A et un module kinase CAK constitué par Cdk7, cycline H et MAT1. Ouverture de l'ADN lors de la transcription.	TCR/GGR
XPB	<i>XPB/ERCC3</i>	2q21	XP-B/CS TTD/XP-B	Appartient au complexe TFIIH. Activité ADN hélicase 3'→5'.	TCR/GGR
XPD	<i>XPD/ERCC2</i>	19q13.3	XP-D XP-D/CS TTD/XP-D	Appartient au complexe TFIIH. Activité ADN hélicase 5'→3'.	TCR/GGR
XPA	<i>XPA</i>	9q22.3	XP-A	Possède une affinité pour l'ADN endommagé. Stimule l'activité hélicase/ATPase de TFIIH. Interagit avec RPA pour stabiliser l'intermédiaire simple brin pendant la réparation de l'ADN.	TCR/GGR
RPA	<i>RPA1</i>	17p13.3		Protège l'ADN simple brin. Facilite la mise en place des endonucléases XPF-ERCC1 et XPG.	TCR/GGR
XPG	<i>XPG/ERCC5</i>	13q33	XP-G	Endonucléase. Liaison à l'ADN. Incise à environ 2-10 bases en 3'de la lésion. Stabilise la complexe de pré-incision.	TCR/GGR
XPF	<i>XPF/ERCC4</i>	16p13.12	XP-F	Forme avec ERCC1 un complexe à activité endonucléase. Liaison à l'ADN. Incise à environ 20 bases en 5'de la lésion	TCR/GGR
ERCC1	<i>ERCC1</i>	19q13.2-q13.3		Forme un complexe à activité endonucléase avec XPF.	TCR/GGR
PCNA	<i>PCNA</i>	20pter-p12		Stimule la processivité des ADN polymérase.	TCR/GGR
Pol δ, ε et κ				Synthèse d'ADN	TCR/GGR
Ligase I/III				Ligation	TCR/GGR

Tableau 7 : Composants de la NER.

la protéine XPC est fortement réduite en l'absence d'expression du gène *mRAD23B* et diminue encore de façon notable suite à la double délétion des gènes *mRAD23A* et *mRAD23B*. L'altération de la GGR et le taux de survie après UV dans les MEF doublement déficients en *mRAD23A/B* sont similaires à ceux observés dans les MEF déficients en *XPC* (Ng et al., 2003; Okuda et al., 2004). Il semblerait donc que les protéines RAD23 contribuent à la stabilisation de la protéine XPC en la protégeant contre la dégradation par le protéasome, régulant ainsi quantitativement l'activité de la GGR.

La troisième sous-unité du complexe XPC, la **centrine 2**, est une protéine de liaison au calcium de la famille des calmodulines. La centrine 2 a été initialement identifiée en tant que composant du centrosome où elle joue un rôle essentiel dans la duplication des centrioles avant la mitose (Salisbury et al., 2002). En dehors de son rôle au niveau du centrosome, la centrine 2 est capable d'interagir dans le noyau avec la protéine XPC (mais pas avec RAD23B), grâce à des interactions hydrophobes entre les régions C-terminales des deux protéines (Araki et al., 2001; Charbonnier et al., 2007; Nishi et al., 2005). Les études menées *in vitro* montrent que la centrine 2 n'est pas indispensable à la liaison de la protéine XPC sur l'ADN et à l'initiation de la NER (Araujo et al., 2000; Sugawara et al., 2001). Bien que la centrine 2 ne soit pas essentielle *per se* à la NER, son interaction avec la protéine XPC stimule la liaison du complexe XPC-RAD23B au niveau des 6-4PP et augmente l'activité de la NER *in vitro* (Nishi et al., 2005).

I.1.b. Rôle du complexe UV-DDB et des ubiquitine-ligases dans la régulation de la GGR

Le complexe UV-DDB facilite la reconnaissance de certaines lésions

Les lésions peu déformantes comme les CPD sont très mal reconnues par XPC lors des expériences menées *in vitro* sur des substrats d'ADN portant différents types de lésions (Kusumoto et al., 2001; Sugawara et al., 2001). Cependant, dans les cellules de mammifères, les CPD générés sur les brins non transcrits de l'ADN sont pris en charge efficacement par la GGR, dont l'initiation dépend de la protéine XPC. Ces données suggèrent donc la présence d'un autre facteur capable d'« assister » la protéine XPC pour la reconnaissance des CPD.

Le **complexe UV-DDB** (UV-Damaged DNA-Binding protein) fut initialement identifié comme un facteur capable de se fixer spécifiquement sur l'ADN endommagé (Chu and Chang, 1988). La purification de ce facteur a permis de révéler qu'il s'agissait en fait d'un hétérodimère composé de deux sous-unités : **DDB1** et **DDB2/XPE**. Le complexe UV-DDB est capable de se fixer *in vitro* sur divers types de lésions (*e.g.* CPD, 6-4 PP, sites abasiques) (Wittschieben et al., 2005). Contrairement à la protéine XPC, la sous-unité DDB2/XPE du complexe UV-DDB interagit directement avec la lésion présente sur l'ADN et possède une affinité particulière pour les 6-4 PP et les CPD (Scrima et al., 2008) (Sugawara et al., 2005). Le complexe UV-DDB est recruté rapidement au niveau des dommages

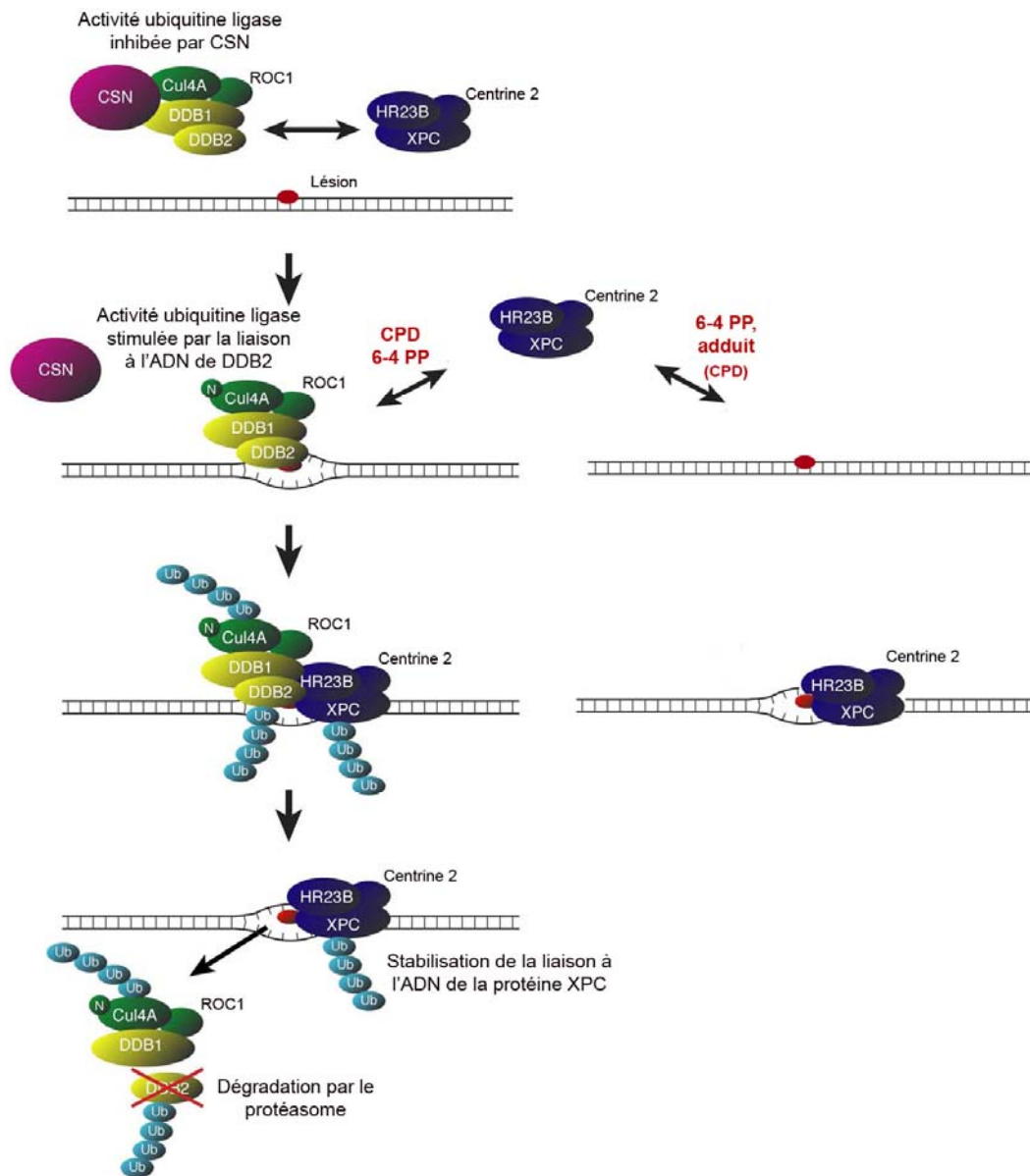


Figure 32 : Interaction entre le complexe UV-DDB et le complexe XPC-RAD23B-centrine 2.

En conditions normales, le complexe à activité ubiquitine ligase CUL4-ROC1-DDB1 associé à DDB2/XPE est inactivé par son interaction avec le signalosome COP9 (CSN). Suite à une irradiation UV, le complexe UV-DDB se fixe au niveau des lésions et se dissocie de CSN. La neddylation de CUL4 (N) induit alors l'activité ubiquitine ligase du complexe. Le complexe UV-DDB activé recrute le complexe XPC-HR23B-centrine 2 au niveau de la lésion et les protéines XPC, DDB2 et CUL4 sont ubiquitinées. La polyubiquitination du complexe UV-DDB provoque sa dissociation de l'ADN et la dégradation de DDB2 par le protéasome. Au contraire, la liaison de la protéine XPC à l'ADN est renforcée par sa polyubiquitination. L'interaction entre UV-DDB et XPC permet d'améliorer la reconnaissance des lésions peu déformantes et mal reconnues par XPC, comme les CPD. Cependant, la protéine XPC est capable de se fixer sur l'ADN et de reconnaître les lésions sans interagir au préalable avec UV-DDB. En outre, il semblerait que le complexe UV-DDB ait peu d'affinité pour les adduits chimiques dont la reconnaissance repose sur XPC. (D'après : Sugawara et al., 2005)

induits par les UV dans les cellules en culture (Wakasugi et al., 2002) et induit l'accumulation de la protéine XPC sur les lésions CPD et 6-4 PP (Fitch et al., 2003; Moser et al., 2005). Ce processus repose sur une interaction physique entre la protéine XPC et la sous-unité DDB2/XPE du complexe UV-DDB (Sugasawa et al., 2005). Il semble donc que le complexe UV-DDB contribue à l'initiation de la GGR en facilitant la reconnaissance des lésions. En effet, les 6-4 PP sont reconnues rapidement par la protéine XPC, mais l'identification des CPD serait facilitée par la liaison préalable du complexe UV-DDB. Toutefois, il est important de noter que le complexe UV-DDB ne peut pas se substituer fonctionnellement à la protéine XPC. En effet, la protéine XPC est absolument nécessaire à la reconstitution *in vitro* de la GGR, ce qui n'est pas le cas du complexe UV-DDB (Araujo et al., 2000). De plus, les cellules déficientes pour le gène *XPC* présentent une profonde altération de la GGR malgré la présence d'un complexe UV-DDB fonctionnel.

Régulation des complexes de reconnaissance de la NER par ubiquitination

Le complexe UV-DDB interagit *in vivo*, par l'intermédiaire de la protéine DDB1, avec un complexe à activité ubiquitine-ligase contenant les sous-unités Culline 4A et ROC1 (Groisman et al., 2003) (figure 32). Ce complexe est associé au signalosome COP9, un régulateur négatif de l'activité des ubiquitine-ligases de type culline. La liaison du complexe UV-DDB sur les lésions photo-induites provoque la dissociation du signalosome COP9 et l'activation du complexe ubiquitine-ligase associé à DDB1 (Sugasawa et al., 2005). Les sous-unités DDB2, Culline 4A et la protéine XPC, recrutée par le complexe UV-DDB, sont alors polyubiquitinées. La polyubiquitination de DDB2 abolit la capacité de liaison à l'ADN du complexe UV-DDB, provoquant sa dissociation et la dégradation de la sous-unité DDB2 par le protéasome (El-Mahdy et al., 2006). Au contraire, l'ubiquitination, apparemment réversible, de la protéine XPC renforce sa liaison sur l'ADN endommagé. Ce mécanisme facilite donc le « transfert » de la lésion du complexe UV-DDB à la protéine XPC, celle-ci étant probablement protégée de la dégradation par le protéasome grâce à son interaction avec la protéine RAD23B (Sugasawa, 2006; Sugasawa et al., 2005).

I.2. TCR : reconnaissance des dommages par le blocage de l'ARN polymérase

Un blocage prolongé de la transcription peut avoir des conséquences sévères sur les cellules et constitue un signal fort pour le déclenchement de l'apoptose par le biais de la protéine p53. En éliminant les lésions bloquant la progression de **l'ARN polymérase II**, la TCR assure une reprise rapide de l'activité transcriptionnelle et prévient le déclenchement de l'apoptose.

La reconnaissance des lésions est directement liée au blocage de la progression de l'ARN polymérase II (RNAPII) au cours du processus de transcription (Selby et al., 1997; Svejstrup, 2002). Aucune intervention des protéines XPC et UV-DDB n'est requise pour la TCR. Les caractéristiques

structurales de la lésion bloquante, et notamment l'amplitude de la déformation de la double hélice, jouent donc un rôle mineur dans le déclenchement de la TCR. Ainsi, les CPD et les 6-4 PP, deux lésions bloquantes pour RNAPII, sont reconnues et réparées avec la même efficacité par la TCR, contrairement à la GGR (Fousteri and Mullenders, 2008).

La signalisation et le recrutement de la machinerie de réparation dépendent des **protéines CSA et CSB** (Cockayne Syndrome A, B) dont le rôle exact n'est pas encore bien compris. La **protéine CSB** est une protéine de la famille SWI/SNF (SWitch/Sucrose NonFermentable) dont les membres sont impliqués dans le remodelage ATP-dépendant de la chromatine (Citterio et al., 1998; Newman et al., 2006). La protéine CSB est nécessaire à l'assemblage des protéines du complexe de réparation, dont l'accessibilité au site lésé serait facilitée par le recrutement de protéines de remodelage de la chromatine comme l'histone acétyltransférase p300. La **protéine CSA** contient un domaine WD40, impliqué dans les interactions protéine-protéine. La protéine CSA interagit avec un complexe à activité ubiquitine ligase constitué entre autres par les protéines DDB1, Culline 4 et ROC1/RBX1 (Groisman et al., 2003). L'irradiation UV provoque l'association de ce complexe avec le signalosome COP9 (CSN) et l'inhibition de l'activité ubiquitine ligase. Le rôle de ce processus dans la régulation de la TCR reste encore à déterminer.

II. Ouverture de l'ADN autour de la lésion

La reconnaissance des dommages, par XPC dans le cas de la GGR ou par le blocage de RNAPII dans le cas de la TCR, provoque le recrutement au niveau de la lésion du **facteur de transcription TFIIH**. TFIIH est un complexe multifonctionnel impliqué à la fois dans la transcription par les ARN polymérase I et II, dans la GGR et dans la TCR (Drapkin et al., 1994). Il est constitué d'un noyau de 7 sous-unités comprenant les **hélicases ATP-dépendantes XPB/ERCC3 et XPD/ERCC2** et les protéines p62, p52, p44, p34 et p8/TTD-A. Ce cœur est couplé à un module kinase CAK (cdk-activating kinase) composé de 3 sous-unités : Cdk7, cycline H et MAT1. Lors de la transcription, le complexe CAK régule par phosphorylation la grande sous-unité de RNAPII (Feaver et al., 1994; Roy et al., 1994). Au cours de la GGR, le facteur TFIIH serait recruté par interaction directe de ses sous-unités XPB et p62 avec la protéine XPC (Araujo et al., 2001; Riedl et al., 2003; Yokoi et al., 2000). La modification locale de la conformation de l'ADN induite par XPC pourrait également jouer un rôle majeur dans l'assemblage du facteur de transcription au niveau de la lésion (Janicijevic et al., 2003). Le recrutement de TFIIH au cours de la TCR intervient probablement grâce à l'interaction de RNAPII et des protéines CSA et CSB avec différentes sous-unités du facteur de transcription (Henning et al., 1995; Iyer et al., 1996).

L'élimination des lésions par la NER nécessite l'ouverture de la double hélice d'ADN autour du site endommagé. Les deux hélicases XPB et XPD jouent un rôle essentiel dans ce processus. Grâce à l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP, la **protéine XPB** peut ouvrir l'ADN dans la direction 3' → 5'

tandis que l'activité de la **protéine XPD** s'effectue dans le sens opposé (Schaeffer et al., 1993; Sung et al., 1993). L'activité ATPase des protéines XPB et XPD est stimulée par les sous-unités p52 et p44 de TFIIH, respectivement (Coin et al., 1998; Coin et al., 2007).

III. Assemblage du complexe de pré-incision

L'ouverture initiale de la double hélice d'ADN par les hélicases du facteur TFIIH (sur une distance de 10 à 20 nucléotides) provoque l'assemblage d'un complexe de « pré-incision » qui permet l'ouverture complète (~ 30 nucléotides) de l'ADN autour de la lésion et la stabilisation de cette structure. La **protéine XPA** est un élément essentiel de ce complexe. Elle contient un domaine « doigt de zinc » lui permettant de se lier à l'ADN et elle possède une affinité particulière pour l'ADN endommagé (Asahina et al., 1994). Elle a donc longtemps été considérée comme la protéine à l'origine de la reconnaissance des dommages (de Laat et al., 1999). Il semblerait que la protéine XPA reconnaisse un intermédiaire structurel spécifique formé lors de l'ouverture de l'ADN par TFIIH (Camenisch et al., 2006). La protéine XPA stimule l'activité hélicase/ATPase de TFIIH en catalysant le détachement du module CAK lors de la NER, accélérant ainsi l'élargissement et la stabilisation de l'ouverture effectuée dans l'ADN (Coin et al., 2008). Des analyses structurales ont également révélé que le domaine doigt de zinc de la protéine XPA est impliqué dans son interaction avec la **protéine de réplication A** (RPA, replication protein A) (Ikegami et al., 1998). RPA est un complexe hétérotrimérique extrêmement conservé qui se lie et stabilise les régions d'ADN simple-brin. L'interaction entre XPA et RPA stabilise la liaison de XPA sur l'ADN endommagé (Wang et al., 2000). RPA se lie probablement sur le brin non endommagé et permettrait non seulement la stabilisation, mais également la formation de l'ouverture complète de l'ADN autour de la lésion (He et al., 1995). En effet, l'assemblage du complexe de pré-incision de la NER provoque une ouverture de la double hélice d'ADN sur une distance d'environ 30 nucléotides, ce qui correspond à la taille optimale de la région sur laquelle un seul hétérotrimère RPA peut se lier.

L'endonucléase XPG semble également nécessaire à l'assemblage structurel du complexe de pré-incision, indépendamment de son activité de clivage qui intervient dans l'étape suivante de la NER. Une forte interaction entre XPG et TFIIH semble être à l'origine du recrutement précoce de l'endonucléase (Araujo et al., 2001; Ito et al., 2007). L'arrivée de la protéine XPG au niveau de la lésion provoque l'exclusion du complexe XPC-RAD23B-Centrine 2 (Riedl et al., 2003; Wakasugi and Sancar, 1998).

IV. Excision du fragment lésé

Après l'assemblage du complexe protéique stabilisant l'ouverture complète de l'ADN autour de la lésion, l'hétérodimère à activité **endonucléase ERCC1-XPF** est à son tour assemblé sur la plateforme de réparation. Les protéines ERCC1-XPF et XPG sont des endonucléases simple-brin capables de couper l'ADN en 5' et en 3', respectivement, d'une jonction entre une région simple-brin et une région double-brin. L'incision par ERCC1-XPF s'effectue à une distance de 16 à 25 nucléotides du côté 5' de la lésion et précède l'incision catalysée par XPG du côté 3', à environ 2-9 nucléotides de la lésion (Matsunaga et al., 1995; Moggs et al., 1996; Staresincic et al., 2009). La position exacte des sites d'incision peut varier en fonction du type de lésion, mais la taille de l'oligonucléotide excisé est pratiquement constante et se situe entre 24 et 32 nucléotides.

Théoriquement, les endonucléases ERCC1-XPF et XPG peuvent couper les deux brins d'ADN au niveau d'une structure ouverte. La discrimination du brin endommagé est donc essentielle pour éviter l'excision du brin complémentaire intact. La position initiale de la protéine XPC sur le brin non endommagé pourrait orienter l'assemblage et la translocation du complexe de réparation sur le bon brin et dans la bonne direction (Sugasawa, 2009). Le complexe XPA-RPA jouerait également un rôle dans le positionnement des endonucléases sur le bon brin de part et d'autre de la lésion (de Laat et al., 1999; Volker et al., 2001).

V. Synthèse réplivative

Après l'excision du fragment d'ADN contenant la lésion, le brin complémentaire sert de matrice pour la synthèse d'un nouveau brin. Le complexe PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), un anneau homotrimérique qui augmente la processivité des ADN polymérases lors de la réplication, est chargé sur l'ADN (Shivji et al., 1992). Alors que tous les autres facteurs de la NER se libèrent de l'ADN au cours ou après l'étape de double incision de l'ADN, la protéine RPA reste liée au brin non endommagé et participe au recrutement et à la mise en place des protéines nécessaires à l'étape de synthèse (Riedl et al., 2003).

Des données très récentes montrent que dans 50% des cas, l'étape de synthèse met en jeu la **polymérase κ** , recrutée par PCNA et XRCC1 (X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1), et la **polymérase δ** , recrutée par le facteur de réplication C (RFC, replication factor C) (Ogi et al.). Dans ce cas, la ligature du brin néo-synthétisé est effectuée par la **ligase III**, recrutée par XRCC1. Dans les autres cas, la **polymérase ϵ** , recrutée par le complexe RFC-CTF1, prend en charge la synthèse du nouveau brin qui est ligaturé par la **ligase I**. L'engagement dans l'une ou l'autre de ces deux voies dépendrait de la conformation du site de réparation et/ou de la structure de la chromatine.

VI. NER et contrôle du cycle cellulaire

A ce jour, il n'existe pas de preuves directes permettant d'affirmer que les lésions prises en charge par la NER puissent être reconnues directement par les kinases ATR/ATM, déclenchant ainsi l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire. Cependant, il est probable que la formation d'un intermédiaire présentant une région d'ADN simple-brin recouverte par RPA lors de la NER puisse induire la liaison et l'activation du complexe ATR/ATRIP et le déclenchement des points de contrôle (Hanasoge and Ljungman, 2007; Marini et al., 2006). La formation de cassures double-brin au niveau des CPD suite au blocage de la fourche de réplication jouerait également un rôle majeur dans l'arrêt des cellules en phase G1/S et dans la réponse transcriptionnelle de la cellule après un stress UV (Garinis et al., 2005). Le remodelage de la chromatine induit par la reconnaissance des lésions pourrait en outre participer à l'activation des kinases ATR/ATM (Gong et al., 2006; Ray et al., 2009).

Certaines protéines de la NER jouent probablement un rôle dans l'activation des points de contrôle grâce à leurs interactions directes avec les protéines de régulation du cycle cellulaire. C'est le cas notamment de l'ubiquitine-ligase culline 4 (Liu et al., 2009) et de la protéine DDB2/XPE (Stoyanova et al., 2009; Stoyanova et al., 2008) qui ont été impliquées dans le contrôle du niveau d'expression de p21/WAF1/CIP1, un régulateur majeur de la progression du cycle cellulaire en phase G1/S (Harper et al., 1993). L'intervention de la protéine PCNA dans la dernière étape de la NER lie également la réparation au contrôle du cycle cellulaire puisqu'il existe une interaction directe entre PCNA et p21 (Waga et al., 1994).

La protéine p53, un élément central dans le contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose, semble également jouer un rôle essentiel dans la régulation de la NER. Une interaction directe de p53 avec les protéines XPB, XPD et CSB a été observée (Wang et al., 1995). Cependant, le rôle de la protéine p53 dans la NER *in vivo* serait surtout lié à sa fonction de facteur de transcription puisque p53 n'est pas indispensable *per se* à l'activité de la NER *in vitro*. La protéine p53 a été impliquée dans la régulation de l'activité transcriptionnelle des gènes *DDB2/XPE* et *XPC* (Adimoolam and Ford, 2002; Hwang et al., 1999).

B. Le xeroderma pigmentosum et les autres maladies de la NER

Les mutations germinales touchant les gènes codant pour les protéines impliquées dans la NER sont principalement associées à trois syndromes : le xeroderma pigmentosum (XP), le syndrome de Cockayne (CS) et la trichothiodystrophie (TTD). Les symptômes cliniques de ces trois syndromes diffèrent considérablement et peuvent aller de la simple photosensibilité à une forte prédisposition aux cancers cutanés, associées parfois à des désordres développementaux et à une dégénérescence neuronale. Ainsi, parmi les trois syndromes de la NER, seuls les patients XP présentent une prédisposition dramatique aux cancers cutanés. Cette hétérogénéité clinique a pour origine une forte hétérogénéité génétique : sept gènes différents ont été associés au syndrome XP (*XPA*, *B*, *C*, *D*, *E*, *F*, *G*), deux au CS (*CSA* et *CSB*) et trois à la TTD (*XPB*, *XPD*, *TTDA*). Des mutations sur le même gène peuvent parfois engendrer deux syndromes très différents ; c'est le cas des gènes *XPB*, *XPD* et *XPG* qui, en fonction des mutations, peuvent être associés au XP, à un syndrome intermédiaire XP/CS ou à la TTD (dans le cas de *XPB* et *XPD* seulement). Dans le cas du CS et de la TTD, les liens entre la réparation par la NER et les symptômes cliniques ne sont pas toujours évidents et suggèrent un rôle des gènes impliqués au-delà de la réparation.

Le XP constituant notre sujet d'étude, nous mettrons l'accent dans ce chapitre sur la description de ce syndrome et nous n'évoquerons que brièvement les deux autres maladies de la NER, le CS et la TTD.

I. Descriptions génétique et clinique du xeroderma pigmentosum

I.1. Historique

Le xeroderma pigmentosum (XP) fut décrit pour la première fois par le dermatologue hongrois Moriz Kaposi en 1870 (Kraemer et al., 1987b). La maladie fut initialement appelée « xeroderma » (du grec *xero* : sec et *derma* : peau) en référence à l'aspect parcheminé (fin et sec) de la peau des patients. Le terme « pigmentosum » fut ajouté en 1882 pour mettre en avant les anomalies pigmentaires caractéristiques des patients. Par la suite, des cas de patients XP présentant des anomalies neurologiques furent rapportés par le médecin allemand Neisser, puis par les italiens DeSanctis et Cacchione.

L'hypersensibilité aux ultraviolets (UV) des cellules XP a été décrite dès 1964 mais la preuve qu'un défaut de réparation de l'ADN par la NER était à l'origine de cette hypersensibilité a été apportée par James Cleaver en 1968 (Cleaver, 1968). Cleaver montra également que les cellules de patients ne présentant pas de troubles neurologiques possédaient une capacité résiduelle de réparation plus élevée que celle des patients avec des complications neurologiques. Ceci l'amena à

émettre pour la première fois l'hypothèse d'une hétérogénéité génétique à l'origine des diverses formes cliniques observées. Par la suite, la découverte d'une forme de pathologie « xerodermoïde » avec une capacité de réparation par excision normale mais une altération de la synthèse répllicative « translésionnelle » permit la définition d'un groupe appelé « XP variant » (XP-V)(Lehmann et al., 1975).

Aujourd'hui, sept groupes de complémentation « classiques », c'est-à-dire déficients en NER, ont été identifiés : ce sont les groupes XP-A, -B, -C, -D, -E, -F et -G. Les gènes correspondants, *XPA* à *XPG*, ont été clonés et codent tous pour des protéines intervenant dans la NER. Le groupe XP variant (XP-V) présente certains symptômes cliniques en rapport avec les groupes XP classiques mais ne constitue pas en soi une maladie de la NER puisqu'il est associé à des mutations dans le gène *XPV* codant pour la polymérase translésionnelle η (Masutani et al., 1999).

I.2. Les groupes « classiques » : XP-A à XP-G

I.2.a. Caractéristiques communes

(i) Incidence et mode de transmission

Le XP est une maladie très rare. Son incidence globale en Europe Occidentale est estimée à 2,3 personnes par million de naissances (Kleijer et al., 2008) mais elle peut atteindre 1 personne sur 20.000–100.000 au Japon et 1 personne sur 10.000–30.000 en Afrique du Nord, notamment en raison de la présence de mutations à effet fondateur dans ces régions. Ainsi, le groupe XP-A, qui représente environ 16% de l'ensemble des patients XP en Europe Occidentale rassemble au Japon plus de 60% des patients XP en raison d'une mutation fondatrice portée par environ 1% de la population japonaise (Hirai et al., 2006). En Europe Occidentale, 60% des patients XP appartiennent au groupe XP-C (Kleijer et al., 2008). Les autres groupes sont plus rares (voir tableau 8).

La maladie est transmise sur un mode autosomique et récessif. Elle touche donc les deux sexes en égales proportions et les parents, hétérozygotes, ne présentent pas de symptômes cliniques. Une relation de consanguinité entre les parents des patients XP est observée dans 31% des cas (Kraemer et al., 1987b)⁸.

(ii) Espérance de vie

Sur les 830 patients décrits dans l'étude de Kraemer, seulement 5% étaient âgés de plus de 45 ans (et seraient probablement des patients XP-V). Globalement, l'espérance de vie des patients XP

⁸ La plupart des données cliniques disponibles, et qui seront décrites ici sauf indication contraire, reposent sur une étude de Kraemer datant de 1987 et rassemblant 830 cas de xeroderma pigmentosum précédemment décrits dans la littérature.

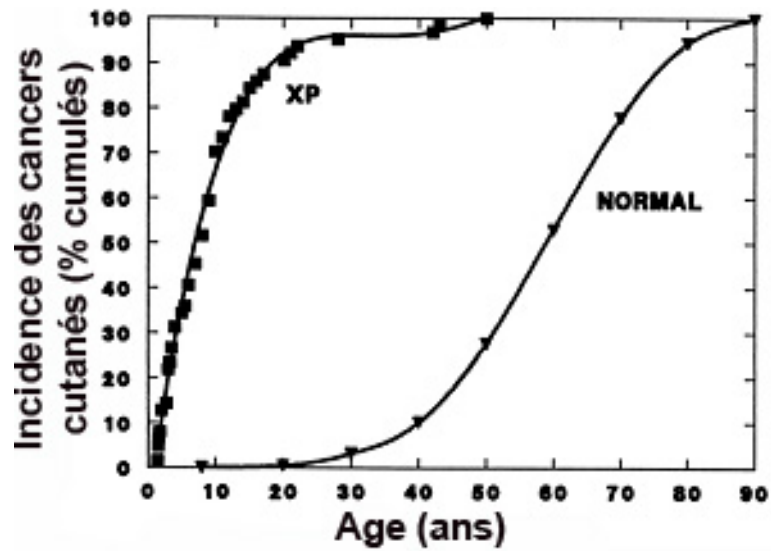


Figure 33 : Incidence des cancers cutanés en fonction de l'âge chez les individus XP.

L'âge médian d'apparition du premier cancer cutané est de 8 ans dans la population XP contre 58 ans dans la population générale. (D'après : Kraemer et al., 1987a)

est réduite d'environ 20 à 30 ans par rapport à la population normale. La cause de la mort n'est pas toujours déterminée mais serait liée dans au moins un tiers des cas aux cancers développés par les patients XP. Il est toutefois important de noter que l'espérance de vie dépend de la sévérité des symptômes, et donc du groupe de complémentation, mais également du mode de vie des patients XP. Une protection extrêmement stricte contre les ultraviolets pourrait ainsi allonger de façon significative la durée de vie de certains patients (voir §B.II de ce chapitre).

(iii) Lésions cutanées

L'apparition de symptômes cutanés sévères est la principale caractéristique des patients XP et le premier élément permettant le diagnostic de cette pathologie. L'âge médian d'apparition des premières anomalies cutanées se situe entre 1 et 2 ans. Les lésions cutanées sont presque exclusivement limitées aux zones exposées à la lumière du soleil, la tête et le visage étant principalement touchés. Les patients XP sont photosensibles et présentent dès les premiers mois de leur vie une réaction anormale à l'exposition solaire. Le premier symptôme observé est généralement un érythème intense et persistant après une exposition solaire parfois minime. La dose minimale érythémateuse (MED) est significativement plus faible que la normale chez les patients de certains groupes de complémentation dont le groupe XP-A (Kondo et al., 1992). Chez la majorité des patients, de nombreuses taches pigmentaires apparaissent progressivement, et souvent avant l'âge de 2 ans, sur les zones exposées au soleil. La peau des patients XP présente également des télangiectasies cutanées (vasodilatations anormales) et une atrophie lui donnant l'aspect rugueux caractéristique du photovieillissement cutané. Les expositions répétées au soleil peuvent engendrer chez les jeunes enfants XP l'apparition de kératoses actiniques, les lésions précurseurs des carcinomes spinocellulaires (CSC), siégeant principalement sur le visage ou le cuir chevelu. Dans la population générale, ces lésions apparaissent habituellement chez les personnes relativement âgées ayant été fréquemment exposées au soleil par le passé.

Près de 80% des patients XP développent des cancers cutanés et l'âge médian d'apparition de la première tumeur est de 8 ans, soit 50 ans plus tôt que dans la population générale (figure 33). La majorité des cancers développés sont des CSC et des CBC qui représentent à eux seuls plus de 70% de l'ensemble des tumeurs cutanées développées par les patients XP. 97% des carcinomes cutanés apparaissent sur le visage, la tête ou le cou. Globalement, en considérant la population des individus de moins de 20 ans, l'incidence des CSC et des CBC est 4800 fois plus élevée chez les patients XP que dans la population générale. De plus, alors que dans la population générale la fréquence des CBC est environ 4 fois plus élevée que celle des CSC (Alam and Ratner, 2001), les patients XP développent 1,5 à 2 fois plus de CSC (potentiellement métastatiques) que de CBC (très rarement métastatiques).

Les mélanomes malins (MM) représentent 10% des néoplasmes décrits chez les patients XP. Les MM se développent en moyenne 10 ans plus tard que les CSC et les CBC. La fréquence des MM chez les individus de moins de 20 ans est 2000 fois plus élevée chez les patients XP que dans la population générale. 65% des MM se développent sur la tête, le visage et le cou contre 20% dans la population générale, ce qui met en évidence le rôle majeur des rayonnements ultraviolets dans l'étiologie du mélanome chez les patients XP.

Des néoplasmes cutanés plus rares comme des kératoacanthomes, des fibrosarcomes et des angiomes sont également observés chez les patients XP.

(iv) Anomalies oculaires

La plupart des patients XP présentent également des affections oculaires, principalement au niveau des paupières, de la cornée et de la conjonctive, qui sont les premières cibles du rayonnement UV. La photophobie fait partie des premiers symptômes observés chez 20% des enfants XP. Les yeux des patients XP sont souvent irrités, rouges et larmoyants. Comme la peau présente sur le reste du corps, la paupière subit également des altérations liées à l'exposition solaire. L'atrophie des paupières peut mener à la perte des cils ou à un ectropion (éversion de la paupière), exposant la conjonctive et la cornée. Une inflammation de la cornée, pouvant mener à son opacification, provoque des défauts de vision chez 15% des patients XP. Enfin, des néoplasmes oculaires, principalement des CSC et des CBC, peuvent apparaître au niveau des paupières, de la cornée et de la conjonctive. Quelques cas de mélanomes oculaires ont également été rapportés. Plus de la moitié de ces tumeurs se développent avant l'âge de 11 ans et leur fréquence est 2000 fois plus élevée que dans la population générale.

(v) Désordres neurologiques

Environ 20% des patients XP souffrent d'une dégénérescence neurologique progressive, qui n'est observée que chez les patients des groupes XP-A, XP-B, XP-D et XP-G. Les autres symptômes de ces patients sont identiques à ceux des individus XP ne présentant pas d'anomalies neurologiques. Ainsi, la fréquence des cancers cutanés et des affections oculaires est la même chez les patients atteints de troubles neurologiques que chez les autres patients. Les cancers cutanés apparaissent au même âge (âge médian 8 ans) dans les deux groupes, mais les premiers symptômes apparaissent plus tôt chez les patients présentant des troubles neurologiques (âge médian de 6 mois contre 18 mois pour l'ensemble des XP). Les réactions anormales à l'exposition solaire sont en effet plus fréquentes et plus intenses. Les anomalies neurologiques apparaissent progressivement avec l'âge, en raison de la dégénérescence des neurones (Robbins et al., 1991). Elles se manifestent par une baisse des capacités intellectuelles, une activité motrice anormale, une baisse des réflexes, une

diminution de l'ouïe et une mauvaise diction. Chez certains patients, des malformations corporelles viennent s'ajouter aux désordres neurologiques. Un ralentissement de la croissance, une microcéphalie et un développement sexuel retardé peuvent alors être observés.

(vi) Autres anomalies

Des expositions répétées au soleil peuvent entraîner une atrophie des lèvres et de la peau autour de la bouche, pouvant provoquer chez certains patients des difficultés à ouvrir complètement la bouche. Des lésions de la cavité buccale sont observées chez certains patients XP et le risque de développer un CSC sur le bout de la langue est 20000 fois plus élevé que dans la population générale.

Environ 1,5 à 4% des patients XP développent également des tumeurs internes (Kondo et al., 1992; Kraemer et al., 1987b). Les patients XP de moins de 20 ans ont un risque 10 à 20 fois plus élevé de développer des tumeurs internes par rapport au reste de la population. Les tumeurs développées sont souvent localisées au niveau du cerveau (gliomes) mais peuvent également toucher les poumons, la thyroïde ou le système digestif (Giglia et al., 1998).

Le statut immunologique des patients XP est généralement normal mais des anomalies immunitaires ont été rapportées dans environ 4% des cas. Ces anomalies seraient probablement liées à des expositions solaires répétées mais pourraient également être directement associées au défaut de réparation par la NER dans les cellules de l'immunité cellulaire.

I.2.b. Hétérogénéité du tableau clinique en fonction des groupes de complémentation : lien avec les caractéristiques génétiques et cellulaires

Bien que les gènes associés aux différents groupes de complémentation codent tous pour des protéines impliquées dans la NER, il existe une nette hétérogénéité clinique entre les différents groupes (Kondo et al., 1992)(tableau 8). La contribution relative et ordonnée des différentes protéines XP au mécanisme de la NER et les études menées sur les cellules des patients ont permis d'expliquer en partie les différences observées entre les différents groupes. La mesure de la survie cellulaire après UV et l'UDS (Unscheduled DNA Synthesis ou « synthèse non programmée de l'ADN ») sont les principales techniques permettant d'analyser les caractéristiques des cellules XP. L'UDS permet de mesurer l'efficacité de la NER dans les cellules en culture. Pour cela, les cellules sont irradiées avec des UV en présence de ³H-thymidine puis, après une étape de chasse à l'aide de thymidine « froide », elles sont fixées et mises au contact d'une émulsion pour autoradiographie. L'étape de synthèse répliquative intervenant au cours de la NER provoque l'incorporation de la thymidine radioactive dans l'ADN et, après révélation, le nombre de « grains » visibles dans les noyaux des cellules (i.e. foci de réparation) est directement lié à l'efficacité de la NER.

Groupe de complémentation	Transmission	Fréquence (%) en Europe [§]	Tumeurs	Sensibilité aux UV	Manifestations			GGR	TCR
					cutanées	oculaires	neurologiques		
XP-A [#]	AR	14	++	++++	+++	+++	+++	< 15 %	< 15 %
XP-B*	AR	rare*	+	++	+	nd	+	5-15 %	5-15 %
XP- C	AR	54	+++	++	+++	+	-	10%	100%
XP-D	AR	10	++	+++	++	+	+	30%	30%
XP- E	AR	2	+	+	+	+	-	40-60 %	100%
XP- F	AR	4	++	++	+	+/-	+/-	10%	10%
XP-G	AR	5	+++	+++	+	-	+/-	5%	5%
XP variant, XP-V	AR	10	+	+	++	+	-	100%	100%

AR, Autosomique Récessif ; # Fréquent au Japon, rare en Europe ; *syndrome XP-B/CS uniquement ; § Kleijer et al., 2008

Tableau 8 : Caractéristiques cliniques et cellulaires des différents groupes de complémentation XP.

(D'après : Kraemer et al., 1987; Kondo et al., 1992; Kleijer et al., 2008)

(i) Les groupes XP « purs »

Globalement, les patients portant des mutations touchant les gènes uniquement impliqués dans la GGR (comme *XPC* et *DDB2/XPE*) présentent principalement une prédisposition aux cancers cutanés, sans atteinte neurologique. Ainsi, le **groupe XP-E**, associé uniquement aux désordres cutanés, est la forme la moins sévère du XP. Les mutations dans le gène *DDB2/XPE* provoquent une diminution partielle (environ 50%) de la réparation par la NER. Comme nous l'avons vu précédemment, la protéine *DDB2/XPE* est impliquée dans la reconnaissance des lésions au cours de la GGR, mais n'est pas indispensable à ce mécanisme. L'altération de la NER dans les cellules XP-E reflète donc uniquement le ralentissement de l'activité de la GGR, la TCR étant totalement fonctionnelle dans ces cellules. Au contraire, les patients du **groupe XP-A** présentent l'une des formes les plus graves de la maladie, associant une extrême prédisposition aux carcinomes cutanés, un retard mental sévère et une neurodégénérescence progressive. La perte de fonction de la protéine XPA abolit aussi bien l'activité de la GGR que de la TCR. Les cellules XP-A possèdent donc une extrême sensibilité aux UV et de très faibles taux résiduels de réparation par la NER. La neurodégénérescence observée chez les patients XP-A reflète l'importance de la TCR dans les cellules neuronales.

De façon étonnante, bien que la protéine XPF soit essentielle à la GGR comme à la TCR, les patients du **groupe XP-F** présentent des symptômes atténués, avec une photosensibilité moyenne, un développement plus tardif des cancers cutanés et des désordres neurologiques extrêmement rares. Les fibroblastes XP-F conservent de faibles niveaux de TCR et de GGR (10%), ce qui suggère que les mutations touchant le gène *XPF* n'abolissent pas totalement la fonction du complexe à activité endonucléase XPF-ERCC1 mais perturbent sa formation (Matsumura et al., 1998). La protéine XPF est impliquée dans de nombreux autres processus cellulaires (réparation des liaisons interbrins sur l'ADN, recombinaison homologue, maintenance des télomères, etc.) et les souris déficientes en *XPF* présentent des anomalies sévères du développement et de la croissance (Tian et al., 2004). Il est donc probable que les mutations abolissant complètement la fonction de la protéine XPF soient létales, comme c'est le cas pour les mutations touchant le gène *ERCC1*.

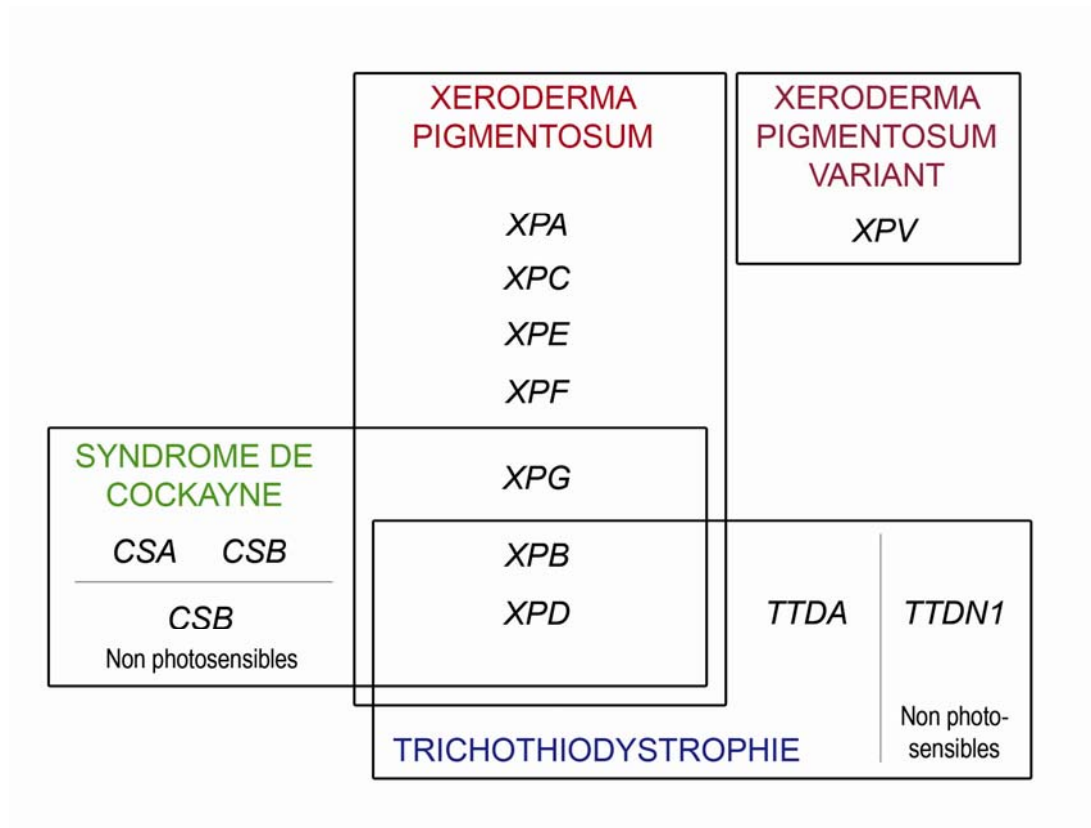


Figure 34 : Recouvrement génétique du xeroderma pigmentosum, du syndrome de Cockayne et de la trichothiodystrophie.

(ii) Recouvrement du XP avec les autres maladies de la NER : CS et TTD

Le cas des gènes *XPB*, *XPD* et *XPG* est complexe car, en fonction du type de mutation porté par le patient, ces gènes peuvent être associés au XP, au syndrome combiné XP/CS ou à la TTD.

Le syndrome de Cockayne

Le syndrome de Cockayne est principalement un désordre développemental et neurologique. La fréquence du CS est identique à celle du XP, soit environ 2,7 naissances sur un million (Kleijer et al., 2008). Les formes « pures » du CS sont liées à des mutations dans les gènes *CSA* (CS de type I ou CS-A ; 35%) et *CSB* (CS de type II ou CS-B ; 65%). La plupart des patients CS sont photosensibles et leur exposition au soleil provoque un érythème et une inflammation cutanés sévères, mais des cas de patients CS non photosensibles ont également été rapportés (Colella et al., 1999). En outre, contrairement aux patients XP, les patients CS ne sont pas prédisposés au développement de cancers cutanés.

D'un point de vue clinique, le CS peut prendre plusieurs formes. La forme la plus légère est le syndrome de sensibilité aux UV (UVSS, UV-sensitive syndrome) dont les symptômes se limitent à la photosensibilité. La forme la plus extrême du CS est le syndrome cérébro-oculo-facio-squelettique (COFS), qui entraîne généralement le décès des patients dans les premières années de vie. Elle est principalement liée à des mutations dans le gène *CSB*. Les patients CS sont caractérisés par un retard de croissance et de développement, un nanisme cachectique (amaigrissement pathologique), un visage en « tête d'oiseau » (nez croché, yeux creusés), une rétinopathie et une surdité progressives, une microcéphalie, un vieillissement prématuré et des anomalies neurologiques (retard mental, altération de la psychomotricité).

Le CS est une maladie de la TCR puisque les cellules des patients CS-A et CS-B possèdent une réparation normale du génome global (GGR) mais une altération de la réparation des brins transcrits (TCR). Cependant la plupart des symptômes des patients CS sont difficiles à mettre en relation avec le défaut de réparation puisque les cellules XP-A, qui présentent également une altération profonde de la TCR, ne développent pas les symptômes caractéristiques du CS. Une implication des protéines *CSA* et *CSB* dans le processus de transcription en dehors de la NER (Tantin et al., 1997) et dans la prise en charge des dommages oxydatifs (Stevnsner et al., 2002) pourraient contribuer à expliquer les symptômes des patients CS.

La trichothiodystrophie

La trichothiodystrophie (TTD) désigne un groupe de maladies caractérisées par des cheveux courts, épars et fragiles, pauvres en soufre (en raison d'une synthèse anormale de la cystéine contenue dans la kératine). Son incidence en Europe Occidentale est de 1,2 naissance par million (Kleijer et al., 2008). Le groupe des TTD inclut de nombreux syndromes dont les manifestations cliniques sont variables. Le syndrome BIDS est un type de TTD caractérisé par des cheveux épars et cassants (Brittle Hair), un retard mental (Intellectual impairment), une hypofertilité (Decrease fertility) et un nanisme (Short stature). Le syndrome IBIDS (ou syndrome de Tay) est un syndrome BIDS auquel s'ajoute une ichtyose cutanée (Ichthyosis). Environ 50% des patients TTD présentent également une photosensibilité cutanée et oculaire et sont regroupés sous le syndrome PIBIDS. Comme dans le cas du CS, les patients TTD ne présentent pas de prédisposition au développement de cancers cutanés.

Des mutations dans les gènes *XPB*, *XPD* (Itin et al., 2001) et *TTDA/GTF2H5* (general transcription factor IIH, polypeptide 5) (Giglia-Mari et al., 2004) sont responsables des formes de TTD associées à une sévère photosensibilité et une déficience de la NER (GGR et TCR). Le gène *TTDN1*, dont la fonction n'est pas connue, est associé à un groupe de patients non photosensibles dont les cellules présentent une activité normale de NER (Nakabayashi et al., 2005). Les mutations dans le gène *XPD* sont les plus fréquentes mais les relations complexes entre le génotype et le phénotype chez les patients porteurs de mutations sur le gène *XPD* ne sont pas encore bien comprises. Le phénotype des patients TTD est probablement lié à la perte de fonction du facteur TFIIH qui, au-delà de la NER, joue un rôle essentiel au cours de la transcription.

Recouvrement des syndromes

Parmi les patients CS, environ 10% présentent des symptômes spécifiques au syndrome XP et sont notamment prédisposés aux cancers cutanés (Greenhaw et al., 1992). Ce syndrome combiné XP/CS est lié à des mutations dans les gènes *XPG*, *XPB* ou *XPD* (figure 34). L'analyse des mutations présentes dans le **gène *XPG*** a permis de révéler quelques corrélations entre le génotype et le phénotype. Les mutations faux-sens compatibles avec la production d'une protéine entière seraient à l'origine du syndrome XP-G « pur » (50% des patients XP-G), tandis que les mutations aboutissant à la production d'une protéine tronquée ou instable expliqueraient le syndrome XP/CS (Clarkson, 2003). Les mutations dans le **gène *XPB*** sont rares. Aucun patient XP-B « pur » n'a été décrit à ce jour et seules quelques familles sont atteintes du syndrome TTD/XP-B ou XP-B/CS. La rareté des mutations touchant le gène *XPB* est liée au rôle essentiel de cette hélicase dans le développement embryonnaire et la viabilité (Andressoo et al., 2009). De même, la perte de fonction totale de la protéine *XPD* est létale à un stade précoce du développement embryonnaire (de Boer et al., 1998). Les nombreuses

mutations décrites dans le **gène XPD** sont exclusivement des mutations faux-sens. Elles sont associées, selon leur localisation et leurs conséquences, aux groupes XP-D, XP-D/CS ou TTD/XP-D.

Il est tentant de penser que les mutations affectant l'activité du facteur TFIIH dans la NER seraient liées au syndrome XP de prédisposition au cancer, tandis que les mutations altérant la transcription basale expliqueraient les phénotypes associés aux « syndromes transcriptionnels » CS et TTD. Toutefois les relations génotype/phénotype de ces maladies sont encore loin d'être bien comprises.

I.2.c. Le groupe XP-C

(i) Caractéristiques cliniques et cellulaires

Le groupe XP-C est le plus fréquent en Europe Occidentale où il rassemble 60,7 % des patients XP (Kleijer et al., 2008). Les patients XP-C sont photosensibles et fortement prédisposés au développement de cancers cutanés, mais ne présentent que très rarement des troubles neurologiques. Ces derniers n'ont été décrits que chez 3 patients XP-C (Khan et al., 2009a) et dans les 3 cas, les anomalies neurologiques observées n'étaient typiques ni des symptômes généralement associés au XP, ni de ceux associés au syndrome XP/CS. Pour deux de ces patients XP-C, une relation de consanguinité a été établie entre les parents. Il est donc possible que la transmission d'autres mutations et/ou polymorphismes récessifs puissent être à l'origine des troubles neurologiques observés.

La variabilité clinique du groupe XP-C est essentiellement associée à l'histoire de l'exposition solaire des patients. L'espérance de vie des patients XP-C, directement liée à l'incidence et la sévérité des tumeurs cutanées, peut ainsi être allongée grâce à la qualité de la protection solaire et de la surveillance dermatologique (Slor et al., 2000). Le cas unique d'une patiente XP-C ayant atteint l'âge de 83 ans a même été décrit récemment (Jacobelli et al., 2008).

Les cellules XP-C présentent une forte altération de l'activité de la NER (environ 10-15% d'activité résiduelle globale) mais cette diminution reflète essentiellement le défaut d'activité de la GGR puisque la TCR est totalement fonctionnelle dans les cellules XP-C (Venema et al., 1990). Dans les fibroblastes XP-C, la TCR permet ainsi une réparation efficace et séquentielle des lésions de type CPD et 6-4PP présentes sur le brin transcrit de l'ADN (van Hoffen et al., 1995). La fonctionnalité de la TCR pourrait expliquer l'absence de troubles neurologiques chez les patients XP-C.

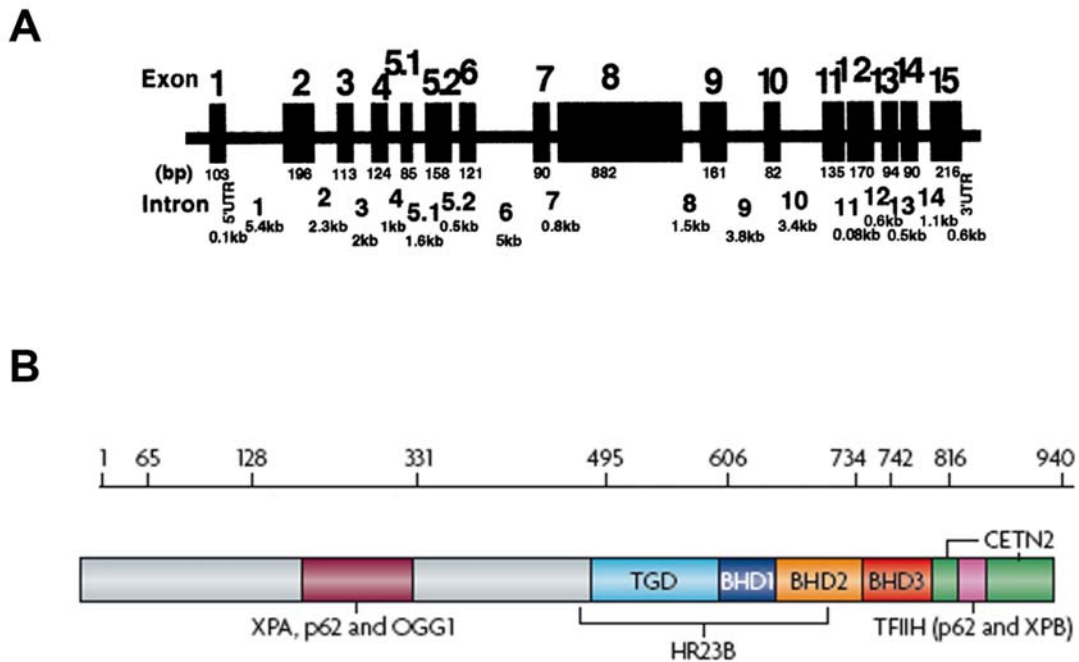


Figure 35 : Le gène et la protéine XPC. (A) Organisation du gène XPC. (B) Domaines fonctionnels de la protéine XPC.

En couleur sont indiqués les principaux domaines d'interaction de la protéine XPC avec ses partenaires de la NER – XPA, HR23B (ou RAD23B), centrine 2 (CETN2) et TFIIH (sous-unités p62 et XPB) – et avec l'enzyme de la BER OGG1. La protéine XPC contient en outre quatre domaines de liaison à l'ADN : le domaine transglutaminase (TGD) et les trois domaines « β -hairpin » BHD1, BHD2 et BHD3 (D'après : Cleaver et al., 2009).

(ii) Le gène XPC et sa régulation transcriptionnelle

Structure du gène XPC, polymorphismes et variants d'épissage

Le gène *XPC* est situé sur le bras court du chromosome 3 (3p25). Il s'étend sur 33 kb et possède 16 exons (de 82 à 882 pb) et 15 introns (de 0,08 à 5,4 kb) (figure 35)(Khan et al., 2002). Quelques polymorphismes du gène *XPC* contribuent de manière significative au risque de développer certains cancers du poumon, du sein, de la tête et du cou et de la vessie (Francisco et al., 2008; Khan et al., 2002; Zhang et al., 2008).

Régulation transcriptionnelle

Environ 10 copies du transcrit *XPC* (3558 pb) seraient présentes dans la cellule à un instant donné, ce qui est en accord avec le niveau d'expression de la plupart des gènes (Lockhart and Winzeler, 2000). Le promoteur du gène *XPC* n'a jamais été complètement caractérisé et les données concernant sa régulation sont rares.

Des études menées dans la lignée de fibroblastes normaux WI38 (fibroblastes pulmonaires fœtaux) et dans la lignée tumorale HCT116 (cancer colorectal) ont montré que la transcription du gène *XPC* était induite par les UV et que cette induction dépendait de la protéine p53 (Adimoolam and Ford, 2002). Un élément de réponse à p53 situé en amont (-1700 à -1650 pb) de la boîte TATA du gène *XPC* permet la liaison de p53 sur le promoteur *XPC* et la régulation de son expression. Ces résultats contribueraient à expliquer la diminution d'activité de la GGR observée dans les cellules doublement mutées pour *p53* (Ford and Hanawalt, 1995). Cependant, aucune étude n'a permis à ce jour de documenter la régulation du gène *XPC* par la protéine p53 dans les cellules primaires. La réduction du niveau d'expression et de l'activité de la protéine p53 dans des kératinocytes exprimant les oncoprotéines virales E6/E7 ne provoque pas de diminution du niveau d'expression de la protéine *XPC* et n'altère pas l'efficacité de la GGR (Ferguson and Oh, 2005; Oh and Yeh, 2005). Il est donc probable que d'autres éléments contribuent à l'induction transcriptionnelle du gène *XPC* observée dans les kératinocytes primaires humains 8 à 24h après une irradiation UVB (Rezvani et al.; Sesto et al., 2002). Deux études récentes montrent que l'expression du gène *XPC* après un stress UVB est régulée par le facteur de transcription HIF-1 α (Hypoxia-Inducible factor 1 α) dans les kératinocytes primaires humains (Rezvani et al.) et par la protéine ARF (dont l'homologue est p14^{ARF} chez l'homme) dans les fibroblastes murins (Dominguez-Brauer et al., 2009), indépendamment de p53.

(iii) La protéine XPC : structure, interactions et régulation

Structure de la protéine XPC

Le gène *XPC* code pour une protéine basique (pI théorique : 9,03) de 940 acides aminés (M = 125 kDa) (Masutani et al., 1994). L'analyse structurale de la protéine de levure Rad4, qui possède environ 40% d'homologie avec son orthologue XPC, a permis de mettre en évidence quatre domaines de liaison à l'ADN : un domaine d'homologie avec la transglutaminase (TGD, transglutaminase-homology domain) et trois domaines en épingle à cheveux β (BHD, β -hairpin domain ; BHD1, BHD2 et BHD3) (Min and Pavletich, 2007)(figure 35). Les régions N- et C-terminale autour des domaines de liaison à l'ADN sont encore mal caractérisées en raison de leur désorganisation structurale (Miron et al., 2008). Cependant, l'analyse des mutations présentes chez les patients XP-C et la production de protéines artificiellement tronquées ont permis de définir dans ces régions les domaines d'interaction de la protéine XPC avec les autres composants de la NER : TFIIH, RAD23B, Centrine 2 et XPA (Bernardes de Jesus et al., 2008; Bunick et al., 2006; Uchida et al., 2002) (figure 35).

Régulation post-traductionnelle de la protéine XPC

La quantité et l'activité de liaison à l'ADN de la protéine XPC sont finement régulées dans la cellule. Dans des conditions physiologiques, la protéine XPC endogène est stable dans les fibroblastes murins et humains (demi-vie estimée entre 6 et 9h) (Okuda et al., 2004; Yasuda et al., 2007). La synthèse *de novo* de la protéine XPC est maintenue à un faible niveau pour limiter le niveau d'expression de la protéine, dont la surexpression semble néfaste à la cellule (Ng et al., 2003). Les protéines RAD23A/B participent à la stabilisation de la protéine en la protégeant partiellement de la dégradation par la protéasome (Okuda et al., 2004).

La protéine Rad4 est également stable chez *S. Cerevisiae* dans des conditions physiologiques mais elle est rapidement dégradée après une irradiation UV (Gillette et al., 2006). De façon similaire, la protéine XPC est rapidement dégradée par le protéasome dans la lignée de fibroblastes humains OSU-2 suite à une irradiation UV (Wang et al., 2007a). Cette dégradation provoque une diminution d'expression de la protéine XPC visible pendant 2 à 4h, puis l'induction transcriptionnelle du gène XPC et/ou la stabilisation de la protéine XPC en réponse à la présence de dommages sur l'ADN permettent un retour à la normal, voire une induction, du niveau d'expression de la protéine XPC. Ce phénomène est accompagné de modifications post-traductionnelles de la protéine, qui est à la fois ubiquitinée et sumoylée (Sugasawa et al., 2005; Wang et al., 2005). La poly-ubiquitination réversible de la protéine XPC par le complexe à activité ubiquitine ligase UV-DDB-Culline 4A augmente son affinité pour l'ADN endommagé et empêche sa dégradation par la protéasome tant que la plateforme de réparation n'est pas mise en place (Sugasawa et al., 2005). De même, il semblerait que la sumoylation de la protéine XPC joue un rôle protecteur contre sa dégradation (Wang et al.,

2007a; Wang et al., 2005). Après la reconnaissance de dommages sur l'ADN, la dégradation de la protéine XPC, finement régulée par des modifications post-traductionnelles, serait donc indispensable pour « laisser la place » aux autres protéines de la NER et permettre notamment la liaison de l'endonucléase XPG sur l'ADN endommagé (Wang et al., 2007a).

Il semblerait également qu'en conditions physiologiques, une petite partie des protéines XPC fasse la navette entre le cytoplasme et le noyau grâce aux signaux d'export nucléaire (NES, nuclear export signal) et de localisation nucléaire (NLS, nuclear localisation signal) présents sur la protéine (Hoogstraten et al., 2008). En présence de dommages sur l'ADN, la protéine XPC s'accumule rapidement dans le noyau au niveau de la chromatine et y persiste pendant plusieurs heures pour assurer la reconnaissance et la réparation des lésions « discrètes » comme les CPD. Les modifications post-traductionnelles de la protéine XPC pourraient participer à sa rétention nucléaire.

(iv) Les mutations dans le gène XPC et leurs conséquences

Profil des mutations chez les patients XP-C

Une quarantaine de mutations germinales touchant le gène *XPC* ont été décrites à ce jour (figure 36) (Chavanne et al., 2000; Khan et al., 2009a; Khan et al., 2006; Khan et al.; Li et al., 1993; Soufir et al., 2010). Les mutations sont réparties sur toute la longueur du gène *XPC*, sans point chaud apparent. La plupart aboutissent à (1) des décalages du cadre de lecture résultant de l'insertion ou de la délétion de quelques nucléotides dans les exons ; (2) la production d'un codon stop prématuré (mutations non-sens) ; (3) des anomalies d'épissage résultant de mutations ponctuelles ou d'insertions/délétions altérant les sites accepteurs ou donneurs d'épissage. Trois mutations faux-sens (Pro334His, Trp690Ser et Pro703Leu) et une insertion en phase (V696_V697insVal) ont également été décrites (Chavanne et al., 2000; Jacobelli et al., 2008; Li et al., 1993).

Une mutation située dans le neuvième exon du gène *XPC* (Val548AlafsX25) est présente chez 87% des patients XP-C originaires d'Europe et d'Afrique du Nord (Soufir et al., 2010). L'incidence de cette mutation atteint 96% chez les patients originaires du Maghreb. En outre, en raison du fort taux de consanguinité dans cette région, la mutation est présente à l'état homozygote chez les 50 patients décrits dans cette étude. L'haplotypage des microsatellites a permis de révéler un effet fondateur lié à cette mutation dans le bassin méditerranéen, la mutation fondatrice étant apparue il y a environ 1250 ans, à l'époque de l'invasion de l'Europe par les musulmans du Maghreb.

Localisation	Modification nucléotides	Modification acides aminés	Type de mutation	Référence
Exon 2	c.128delC	p.Pro43GlnfsX36	Décalage cadre de lecture	Chavanne et al., 2000
Exon 3	c.321_322insAA	p.Ala109ArgfsX5	Décalage cadre de lecture	Chavanne et al., 2000
	c.362delA	p.Asp121AlafsX17	Décalage cadre de lecture	Cleaver et al., 2007
IVS 3	c.413-24T>C	p.Glu138ValfsX4	Défaut épissage	Khan et al., 2004
	c.413-9T>A			
Exon 4	c.420_423delTGAG	p.Glu141LeufsX6	Décalage cadre de lecture	Khan et al., 2006
	c.445G>T	p.Glu149X	Non sens	Lam et al., 2005
	c.445_446delGA	p.Glu149LysfsX19	Décalage cadre de lecture	Cleaver et al., 2007
Exon 5	c.463C>T	p.Arg155X	Non sens	Khan et al., 2006
	c.564_565delAT	p.Tyr189SerfsX10	Décalage cadre de lecture	Khan et al., 2006; Slor et al., 2000
	c.622-3C>G			Khan et al., 2006; Li et al., 1993
IVS 5	c.622-2A>C	p.Val208HisfsX35	Défaut épissage	Khan et al., 2006
	c.622-2A>G			
Exon 6	c.652delT	p.Phe218SerfsX41	Décalage cadre de lecture	Soufir et al., 2010
	c.658C>T	p.Arg220X	Non sens	Chavanne et al., 2000
	c.670_671insT	p.Cys224LeufsX45	Décalage cadre de lecture	Chavanne et al., 2000
IVS6	c.779+1_14del12		Défaut épissage	Soufir et al., 2010
Exon 8	c.940delC	p.Arg314GlyfsX11	Décalage cadre de lecture	Cleaver et al., 2007
	c.1001C>A	p.Pro334His	Faux sens	Li et al., 1993
	c.1103_1104delAA	p.Gln368ArgfsX6	Décalage cadre de lecture	Chavanne et al., 2000; Khan et al., 2006; Li et al., 1993
	c.1211delG	p.Gly404AlafsX122	Décalage cadre de lecture	Chavanne et al., 2000; Khan et al., 2006; Lam et al., 2005
	c.1243C>T	p.Arg415X	Non sens	Khan et al., 2006
	c.1290_1295delTAAAGA	p.Tyr430X	Non sens	Khan et al., 2006
	c.1291_1292delAA	p.Lys431ArgfsX6	Décalage cadre de lecture	Khan et al., 2006
	c.1399C>T	p.Gln467X	Non sens	Soufir et al., 2010
Exon 9	c.1564A>T	p.Lys522X	Non sens	Khan et al., 2006
	c.1627_1872del	p.Val543PhefsX317	Décalage cadre de lecture	Chavanne et al., 2000
	c.1643_1644delTG	p.Val548AlafsX25	Décalage cadre de lecture	Chavanne et al., 2000; Khan et al., 2006; Li et al., 1993
	c.1660C>T	p.Glu554X	Non sens	Lam et al., 2005
	c.1704T>A	p.Tyr568X	Non sens	Soufir et al., 2010
	c.1735C>T	p.Arg579X	Non sens	Chavanne et al., 2000; Gozukara et al., 2001; Khan et al., 2006
Exon 10	c.1923_1934delins25	p.Lys642Ile fsX20	Décalage cadre de lecture	Emmert et al., 2006
IVS 10	c.2033+2A>C	p.Phe625GlyfsX34	Décalage cadre de lecture / défaut épissage	Khan et al., 1998
Exon 11	c.2069G>C	p.Trp690Ser	Faux sens	Chavanne et al., 2000; Li et al., 1993
	c.2074A>T	p.Lys692X	Non sens	Khan et al., 2006
	c.2092_2093insGTG	p.Val696_Val697insVal	Insertion	Li et al., 1993
	c.2108C>T	p.Pro703Leu	Faux sens	Jacobelli et al., 2008
Exon 12	c.2152C>T	p.Arg718X	Non sens	Chavanne et al., 2000
IVS12	c.2251-1_-2delTAG	p.Val751AspfsX2	Défaut épissage	Khan et al., 2002; Khan et al., 2006
	c.2251_2420del	p.Val751AspfsX2	Décalage cadre de lecture	Chavanne et al., 2000
Exon 13	c.2257delC	p.Arg753GlyfsX14	Décalage cadre de lecture	Chavanne et al., 2000
	c.2287delC	p.Leu763CysfsX4	Décalage cadre de lecture	Soufir et al., 2010
Exon 14	c.2421_2604del	p.Thr808ValfsX48	Décalage cadre de lecture	Chavanne et al., 2000
	c.2429_2441del	p.Gly810AlafsX9	Décalage cadre de lecture	Rivera-Begeman et al., 2007
Exon 15	c.2544delG	p.Trp848X	Non sens	Jacobelli et al., 2008

Figure 36 : Ensemble des mutations décrites chez les patients XP-C. (D'après : Soufir et al., 2010)

Relation génotype-phénotype

Toutes les mutations touchant le gène *XPC* (hormis les 3 mutations faux-sens et l'insertion en phase 697insVal) aboutissent à la formation d'un codon stop prématuré, prédisant la production de protéines tronquées au niveau de leur partie C-terminale. Cette région est essentielle à l'activité de *XPC* puisqu'elle contient le domaine de liaison à l'ADN et les principaux sites d'interaction avec les autres protéines de la NER (Uchida et al., 2002) (figure 35). Quelque soit la mutation, la protéine tronquée ne sera donc pas fonctionnelle (si elle existe effectivement dans la cellule), ce qui explique la relative homogénéité clinique observée dans le groupe XP-C, ainsi que la similarité des caractéristiques cellulaires (survie et taux d'UDS après UV) chez les différents patients XP-C.

Le niveau d'ARNm *XPC* est fortement réduit chez les patients XP-C : il représente moins de 25% du taux moyen observé chez les individus de la population générale (Khan et al., 2006). Cette observation suggère une dégradation rapide des ARNm mutés par le mécanisme de NMD (Nonsense-Mediated mRNA Decay ou dégradation des ARNm non-sens), qui vise à éliminer les ARNm porteurs d'un codon stop prématuré pour éviter l'expression de protéines tronquées potentiellement délétères pour la cellule (Maquat, 2005).

Les mutations provoquant des anomalies d'épissage peuvent autoriser la production de niveaux plus ou moins élevés d'ARNm normal et donc de protéine *XPC* fonctionnelle (Khan et al., 2009b). Le taux de réparation par la GGR et la survie après UV étant corrélés à l'activité de la protéine *XPC*, les patients porteurs de ces mutations présentent des symptômes d'autant plus graves (cinétique d'apparition et fréquence des anomalies cutanées et oculaires) que le taux d'ARNm normal est faible.

Cas des mutations faux-sens

Seulement trois mutations faux-sens ont été décrites chez les patients XP-C. Il est donc probable que les mutations ponctuelles ne provoquant pas d'altération structurale et/ou fonctionnelle majeure de la protéine *XPC* résultent en un phénotype clinique léger voire asymptomatique. Au contraire, les rares mutations faux-sens constatées chez les patients XP-C ont permis de définir des domaines fonctionnels essentiels à l'activité de la protéine au sein de la GGR.

Chez le patient porteur de la mutation faux-sens Trp690Ser, le taux d'ARNm *XPC* est quasiment normal et la protéine *XPC* est détectée en faible quantité (Chavanne et al., 2000). Pourtant, ce patient présente des symptômes cliniques aussi graves que les patients présentant des mutations « tronquantes ». Le résidu Trp690, conservé chez 5 homologues de la protéine *XPC* (homme, souris, *Drosophila melanogaster*, *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*), est essentiel à la reconnaissance des dommages par *XPC* puisqu'il confère à la protéine son affinité particulière pour les résidus non appariés à leurs bases complémentaires (Maillard et al., 2007) (figure 31). La protéine

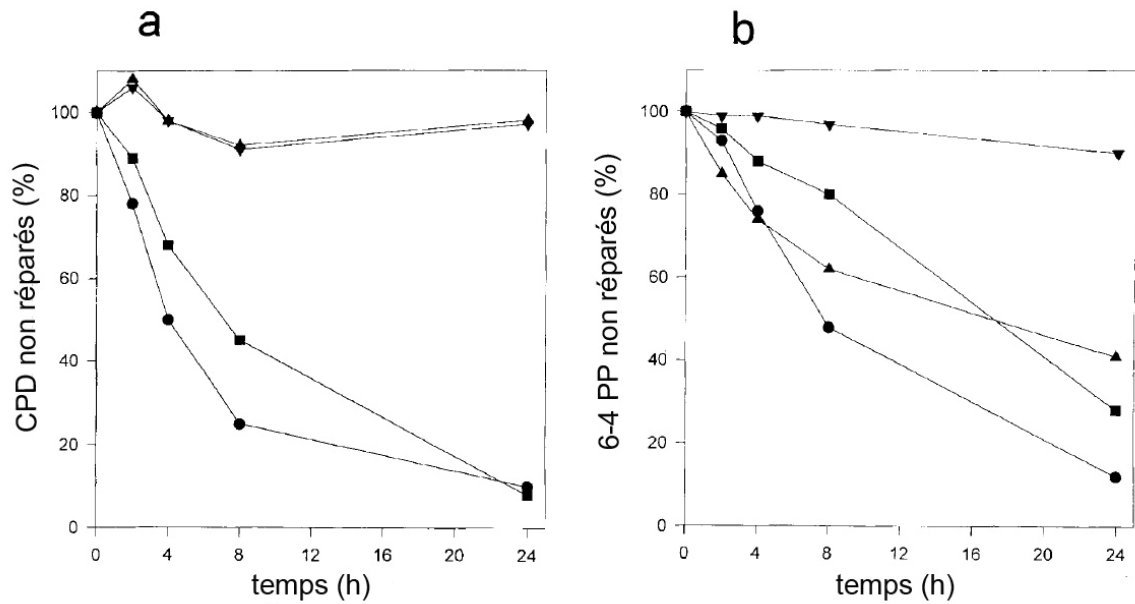


Figure 37 : Réparation des dimères de pyrimidine chez les souris XPC +/+ et XPC -/-.

(a) Réparation des CPD. (b) Réparation des 6-4 PP. Légende : ▼ XPC -/- brin non transcrit (GGR) ; ▲ XPC +/+ brin non transcrit (GGR) ■ XPC -/- brin transcrit (TCR) ● XPC +/+ brin transcrit (TCR). Les souris XPC -/- réparent efficacement les lésions présentes sur les brins transcriptionnellement actifs de l'ADN (TCR), mais présentent une forte altération de la réparation des lésions présentes sur les brins non transcrits (GGR). Noter que les souris XPC +/+ ne réparent pas les CPD présents sur les brins non transcrits de l'ADN. (D'après : Berg et al., 1998)

mutée Trp690Ser est recrutée au niveau de l'ADN endommagé par UV-DDB mais n'est pas stabilisée sur l'ADN, ce qui empêche l'assemblage des autres facteurs de la NER (Yasuda et al., 2007).

La mutation Pro334His a permis, quant à elle, de mettre en évidence un site d'interaction avec la sous-unité p62 de TFIIH dans la partie N-terminale de la protéine XPC (Bernardes de Jesus et al., 2008) et de confirmer l'implication de cette région dans le recrutement de la protéine XPA (Bernardes de Jesus et al., 2008; Bunick et al., 2006) (figure 35).

(v) Les modèles murins *Xpc* -/-

Peu après le clonage de l'ADNc *XPC* humain (Legerski and Peterson, 1992), la génération de souris déficientes en *Xpc* (*Xpc* -/-) par RH a permis l'étude *in vivo* de la physiopathologie des symptômes observés chez les patients XP-C. Le gène *Xpc* murin possède 80% d'identité avec le gène *XPC* humain. Contrairement au cas des gènes *Xpb* et *Xpd*, la délétion du gène *Xpc* reste compatible avec le développement embryonnaire et la viabilité des souris (Cheo et al., 1997; Sands et al., 1995). Les souris *Xpc* -/-, comme la majorité des patients XP-C, ne présentent aucune anomalie neurologique notable et sont fortement prédisposées au développement d'anomalies oculaires et de carcinomes cutanés photo-induits (Cheo et al., 1997; Friedberg et al., 2000; Sands et al., 1995). L'exposition quotidienne des souris *Xpc* -/- aux UVB provoque la formation de cancers de la peau (principalement des CSC) chez 100% des souris en moins de 25 semaines. Aucune lésion néoplasique n'est observée chez les souris WT ou *Xpc* +/- pendant la même période.

Les souris *Xpc* -/- sont également prédisposées au développement de tumeurs internes induites par les carcinogènes chimiques (Cheo et al., 1999). L'injection intrapéritonéale d'une seule dose d'acétylaminofluorène (AAF), ou de son dérivé actif le N-hydroxy-AAF, induit la formation de tumeurs bénignes ou malignes à la fois dans le foie et le poumon chez ~50% des souris *Xpc* -/- au bout de 15 mois, contre 0% chez les souris WT et 3% chez les souris *Xpc* +/- . En outre, en l'absence de tout traitement pro-tumoral, les souris *Xpc* -/- développent significativement plus de tumeurs spontanées du poumon (Hollander et al., 2005) et du foie (Melis et al., 2008) que les souris WT.

Les souris déficientes en *Xpc* résumant donc de façon satisfaisante les caractéristiques du syndrome XP-C humain. Toutefois, il est important de noter que, chez la souris, l'élimination des CPD sur le brin non transcrit de l'ADN est très peu efficace (Berg et al., 1998; Ruven et al., 1993) (figure 37). L'absence de réparation des CPD par la GGR fait donc des souris WT un « semi-mutant *Xpc* » par rapport à la situation observée chez l'homme. Le mécanisme de photocarcinogénèse chez la souris ne peut donc pas refléter totalement les événements menant au développement de tumeurs cutanées chez l'homme.

(vi) Un rôle pour la protéine XPC dans la BER ?

Des expériences de criblage double-hybride ont montré que la protéine XPC était capable d'interagir physiquement avec la thymine-ADN glycosylase (Thymine DNA glycosylase, TDG) (Shimizu et al., 2003). La TDG est une enzyme de la réparation par excision de bases (BER) qui excise les résidus uracile et thymine au niveau des mésappariements G:U et G:T résultant de la désamination spontanée des cytosines et des 5-mC, respectivement (Hardeland et al., 2001). La TDG contribue donc à la diminution de la mutagenèse spontanée. Outre son interaction physique avec la TDG, la protéine XPC stimule son activité *in vitro*. Il semblerait que la protéine XPC facilite le recyclage de la TDG en favorisant sa dissociation des sites abasiques. L'absence de protéine XPC pourrait donc compromettre l'activité de la TDG et favoriser l'accumulation de mésappariements G:U et G:T, contribuant ainsi à l'augmentation du taux de mutations spontanées C → T. Cependant, aucune étude n'a permis de confirmer cette hypothèse chez l'homme et aucune augmentation du taux de mutations spontanées C → T n'a été mise en évidence dans les souris *Xpc*^{-/-} par rapport aux souris WT (Uehara et al., 2009).

Une étude récente suggère en outre une implication de la protéine XPC dans la réparation des dommages oxydatifs dans les cellules humaines (D'Errico et al., 2006). En effet, la protéine XPC stimule l'activité de l'ADN glycosylase OGG1, une enzyme de la BER essentielle à l'excision de la 8-oxoguanine (8-oxoG). La protéine XPC favorise la liaison de l'enzyme OGG1 au niveau des lésions d'oxydation présentes sur l'ADN puis facilite son détachement et son recyclage. Par conséquent, une diminution de la vitesse de réparation des résidus 8-oxoguanine est observée dans les kératinocytes et les fibroblastes XP-C. D'autre part, les cellules XP-C sont plus sensibles aux agents oxydants (D'Errico et al., 2006), à l'oxygène (Melis et al., 2008) et aux rayonnements UVA, producteurs de ROS, que les cellules WT (Otto et al., 1999b). La mutation faux-sens Pro334His décrite chez un patient XP-C fragilise l'interaction entre les protéines XPC et OGG1 et provoque une diminution de l'activité enzymatique d'OGG1 sur un oligonucléotide portant une lésion 8-oxoG (Bernardes de Jesus et al., 2008).

I.3. Le cas particulier du groupe variant XP-V

Le groupe XP-V regroupe 10 à 20% de l'ensemble des patients XP. Comme dans le cas des groupes XP classiques, les patients XP-V sont prédisposés aux cancers cutanés mais ceux-ci apparaissent plus tardivement (entre 15 et 40 ans). L'espérance de vie des patients XP-V est donc beaucoup plus élevée que celle des autres patients XP.

Contrairement aux autres cellules XP, les cellules XP-V ne sont pas déficientes en NER et sont peu sensibles aux UV, mais elles possèdent un défaut de réplication de l'ADN après l'irradiation UV

(Lehmann et al., 1975). Elles sont en outre plus sensibles que les cellules normales aux effets mutagènes des UV (Wang et al., 2007b). Le syndrome XP-V est lié à une mutation dans le gène *XPV* qui code pour la polymérase translésionnelle η (Masutani et al., 1999). Les polymérases translésionnelles (TLS) interviennent pour « remplacer » les polymérases répliquatives bloquées au niveau d'une lésion sur l'ADN. L'efficacité et la fidélité du contournement de la lésion dépend de la polymérase TLS mais aussi du type de lésion. Comme nous l'avons déjà mentionné, la polymérase η est capable de répliquer de façon fidèle l'ADN en face d'une lésion de type CPD mais pas 6-4PP (Masutani et al., 2000). D'autres polymérases TLS sont incapables de franchir les CPD ou bien sont extrêmement enclines à insérer de mauvaises bases en face des lésions (Lehmann et al., 2007). En l'absence d'une polymérase η fonctionnelle dans les cellules XP-V, les CPD seraient donc franchies par des polymérases TLS moins fidèles (dont l'identité exacte n'est pas encore connue), augmentant ainsi la fréquence des mésappariements et le risque de mutagénèse (revue : Kannouche and Stry, 2003).

Le syndrome XP-V n'est donc pas une maladie de la NER mais la prédisposition des patients XP-V au développement de cancers cutanés souligne l'importance de la polymérase η dans la protection contre la carcinogénèse cutanée.

I.4. Mutagénèse dans les tumeurs cutanées chez les patients XP

Dans les cancers cutanés sporadiques (patients non-XP), la majorité des mutations sont des transitions $C \rightarrow T$, parfois associées à des transitions en tandem $CC \rightarrow TT$ (environ 5 à 10%). Dans les tumeurs issues de patients XP, une forte augmentation de la fréquence des transitions en tandem $CC \rightarrow TT$ est observée (40 à 60% dans le gène *p53*, figure 38) (Daya-Grosjean and Sarasin, 2005; Giglia-Mari and Sarasin, 2003; Giglia et al., 1998; Spatz et al., 2001). La présence préférentielle des mutations en tandem $CC \rightarrow TT$ sur les séquences CpG suggère un rôle de la désamination des cytosines méthylées (5-mC) dans le mécanisme de mutagénèse. En effet, comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, la désamination (spontanée ou photoinduite) d'une cytosine donne un uracile tandis que la désamination d'une 5-mC donne une thymine. Dans le cas des cellules non-XP, la désamination des 5-mC, plus instables que les cytosines, serait à l'origine des mutations $C \rightarrow T$ au niveau des séquences CpG (figure 39). Dans les cellules XP, le défaut d'activité de la NER provoque la persistance de lésions au niveau des sites C.5-mC.pG et augmente la probabilité de désamination de la 5-mC, puis de la deuxième cytosine, provoquant ainsi l'apparition des mutations en tandem $CC \rightarrow TT$ au deuxième cycle de réplication.

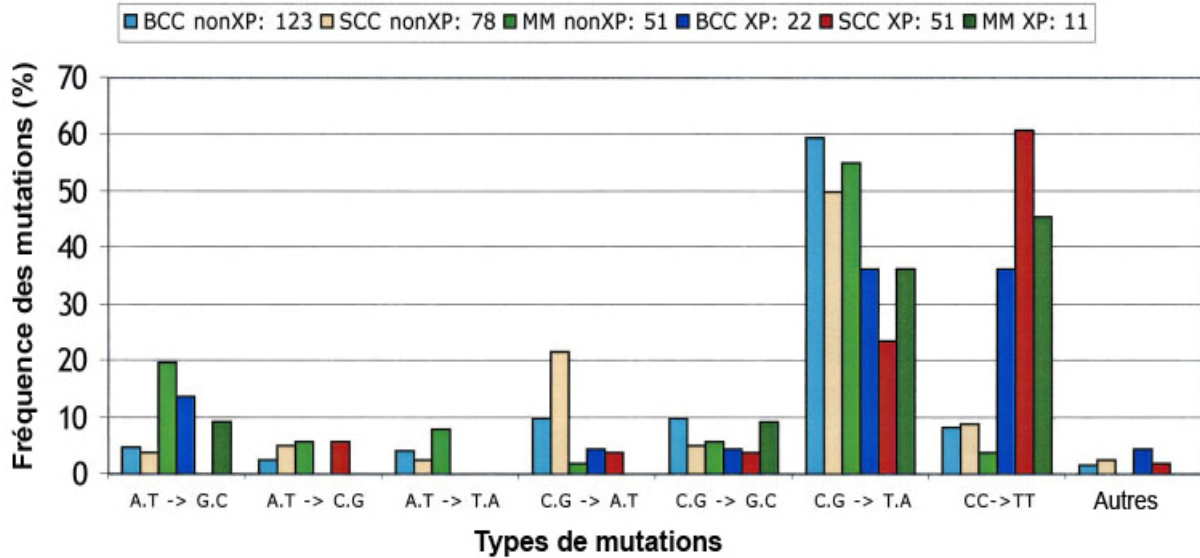


Figure 38 : Profil des mutations observées dans le gène p53 des tumeurs XP et non-XP. BCC, carcinome basocellulaire ; SCC, carcinome spinocellulaire ; MM, mélanome malin. (D'après : Giglia-Mari and Sarasin, 2003)

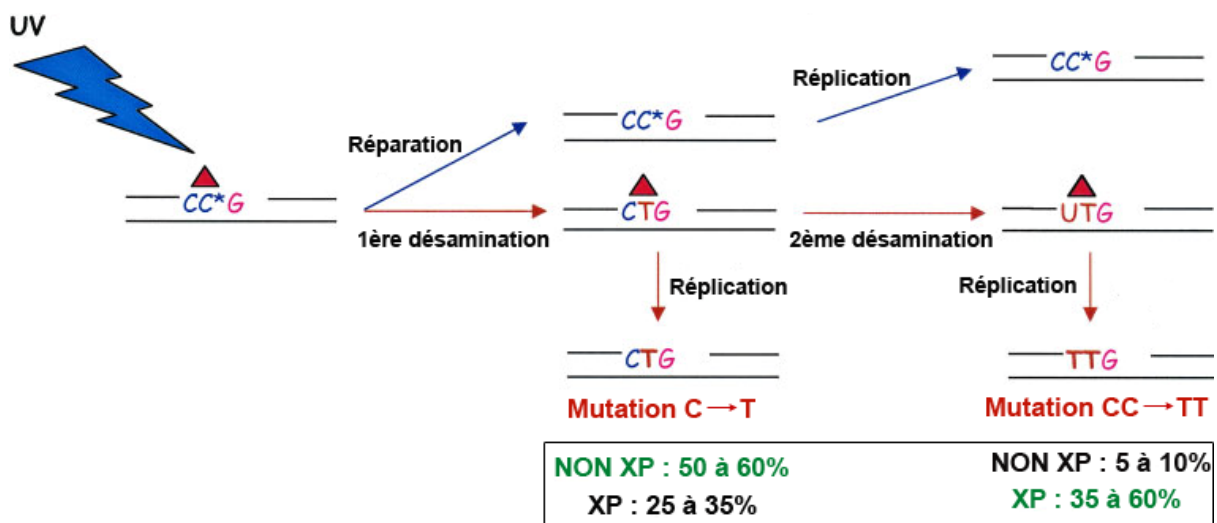


Figure 39 : Mécanisme de mutagenèse chez les patients XP. Les lésions formées au niveau des séquences CpG (C* indique une 5-méthylcytosine) peuvent subir une désamination spontanée ou photo-induite des cytosines. La première désamination se produit probablement au niveau des C*, plus instables. Plus la lésion persiste longtemps sur l'ADN, plus le risque de désamination de la cytosine adjacente à la C* augmente. Dans les cellules XP, déficientes en NER, la probabilité d'une double désamination est donc significativement plus élevée que dans les cellules possédant une NER efficace. Ceci expliquerait la forte fréquence des mutations en tandem CC → TT chez les patients XP. (D'après : Giglia-Mari and Sarasin, 2003)

II. Traitement du XP

Protection solaire

Il n'existe actuellement aucun traitement permettant de guérir les patients XP. Afin de prévenir l'apparition des lésions cutanées, les patients doivent éviter en permanence l'exposition à la lumière du jour en limitant au maximum leurs activités et leurs déplacements à l'extérieur pendant la journée, ce qui leur doit le nom d'«enfants de la lune». A l'extérieur, une protection totale est recommandée : chapeaux à large bord, gants, vêtements longs et « imperméables » aux UV, lunettes ou masque équipés d'un filtre contre les UV. Cette protection doit en outre être associée à l'application, toutes les 2 heures, de crème solaire à indice de protection maximum (« écran total », SPF > 50) sur chaque partie de peau découverte. Les fenêtres de la maison, de la voiture, et si possible de l'école des enfants XP doivent être équipées de filtres anti-UV. Certaines lampes (halogènes, néons), qui peuvent émettre des rayonnements UV, doivent être bannies.

Si cette protection solaire drastique est mise en place dès le diagnostic des enfants, elle permet de ralentir, voire de supprimer, l'apparition d'anomalies cutanées chez les patients XP et d'allonger parfois considérablement leur espérance de vie (Davis et al., 1994; Emmert et al., 2009; Lynch et al., 1977). Cependant, un risque de carence en vitamine D liée à la photoprotection permanente des patients XP a été évoqué (Kondo et al., 1992). En effet, la synthèse de la vitamine D dans l'épiderme est stimulée en grande partie par les UV. Toutefois, une étude menée pendant 6 ans sur des patients XP se pliant à une photoprotection stricte n'a pas révélé de chute significative du taux de vitamine D chez ces patients (Sollitto et al., 1997). Une alimentation normale et équilibrée suffirait donc à maintenir le taux de vitamine D chez les patients XP, même si des compléments alimentaires peuvent parfois être prescrits en prévention.

Surveillance dermatologique et traitements prophylactiques

Une surveillance dermatologique régulière permet le dépistage précoce des cancers cutanés. Les patients sont suivis par un dermatologue tous les deux mois environ et une biopsie est systématiquement réalisée sur les lésions suspectes. Le traitement de choix des cancers cutanés est le retrait de la lésion par exérèse chirurgicale, après anesthésie locale. Si la lésion recouvre une surface trop importante, une greffe de peau saine (prélevée sur le malade, à un endroit du corps non exposé comme la cuisse, l'abdomen ou la fesse) peut être nécessaire pour la reconstruction esthétique (Ashall et al., 1987; Atabay et al., 1991; Ergun et al., 2002). Les dermabrasions mécaniques et les peelings chimiques peuvent également être proposés aux patients. Ces techniques consistent à réaliser l'ablation des différentes couches de l'épiderme (et parfois même une partie du derme superficiel) dans le but (1) d'éliminer les cellules tumorales ou pré-tumorales et (2) d'induire


la ré-épithélisation de la peau à partir de cellules souches situées plus profondément dans la peau (comme celles du follicule pileux) et donc moins exposées aux altérations des UV. Ces techniques ont parfois un effet esthétique très favorable et pourraient également avoir un rôle préventif contre les kératoses et les carcinomes superficiels (Agrawal et al., 1992; König et al., 1998).

La radiothérapie et la chimiothérapie systémique sont parfois prescrites dans un but palliatif pour les tumeurs inopérables. Cependant, des cas de cytotoxicité exacerbée ont été rapportés et il est préconisé d'utiliser chez les patients XP des doses plus faibles que celles normalement recommandées (source : <http://www.therapeutique-dermatologique.org>). Les nombreuses kératoses actiniques sont traitées par cryothérapie ou par application d'une crème à base de 5-fluoro-uracil, un anti-métabolite capable de stopper la croissance des cellules tumorales.

Traitements pharmacologiques

Les rétinoïdes par voie orale sont efficaces pour ralentir l'apparition des tumeurs cutanées chez les patients XP. Une étude clinique menée par K. Kraemer pendant 3 ans sur 5 patients XP a permis de montrer que l'administration orale d'isotrétinoïne (un dérivé synthétique de la vitamine A ; dosage : 2 mg/kg) permettait de réduire l'incidence des tumeurs cutanées de 63% (Kraemer et al., 1988). Toutefois, la posologie élevée utilisée dans cette étude (2 mg/kg) est souvent mal tolérée (sécheresse et fragilité de la peau et des muqueuses, altération de la fonction hépatique, céphalées). Les doses plus faibles sont moins efficaces, mais il existe une variation inter-individuelle puisque des doses de 0,5 mg/kg d'isotrétinoïne peuvent diminuer l'incidence des tumeurs chez certains patients (Kraemer et al., 1992). Cependant, les rétinoïdes doivent être pris de façon continue car les tumeurs réapparaissent rapidement après l'arrêt du traitement. Un phénomène de rebond avec une forte augmentation du nombre de tumeurs est observé dans les 6 mois consécutifs à l'arrêt du traitement, ce qui suggère un rôle des rétinoïdes dans le blocage d'une étape tardive de la carcinogenèse cutanée (Kraemer et al., 1988).

Une autre étude clinique intéressante, menée par D. Yarosh, concerne l'utilisation de la T4 endonucléase V (T4N5), une enzyme d'origine bactérienne capable d'éliminer les lésions de type CPD (Yarosh et al., 2001). L'application topique pendant un an d'une lotion liposomique contenant 1 mg/L de T4N5 permet une réduction de 30% de l'incidence des CBC et de près de 70% de l'incidence des kératoses actiniques chez les patients XP. Aucun effet toxique et aucune réaction allergique n'ont été observés chez les patients traités. De plus, contrairement au cas des rétinoïdes, aucune augmentation du nombre de tumeurs n'est observée dans les 6 mois après l'arrêt du traitement, soulignant l'action de la T4N5 dans l'étape la plus précoce du développement tumoral (formation des CPD). Il est toutefois important de noter que l'effet de l'endonucléase T4N5 n'est significatif que chez les patients de moins de 18 ans, qui représentent tout de même la majorité des patients XP.



	Maladie	Gène	Protéine	Site d'expressio	Fonction de la protéine	Altérations
Couches cornées (CC)	Syndrome de Netherton	<i>SPINK5</i>	LEKTI	CC	Inhibiteur de protéase à sérine	Desquamation/Barrière
	Ichtyose vulgaire	<i>FLG</i>	Filaggrine	CG/CC	Protéine de structure de l'EC	Différenciation terminale/Barrière
Couches granuleuses (CG)	Ichtyose lamellaire	<i>TGM1</i>	Transglutaminase 1	CG	Enzyme impliquée dans la formation de l'EC	Différenciation terminale/Barrière
	Ichtyose liée à l'X	<i>STS</i>	Stéroïde sulfatase	CG	Enzyme du métabolisme lipidique	Différenciation terminale/Barrière
Couches spineuses (CS)	Epidermolyse hyperkératotique	<i>KRT1/KRT10</i>	Keratines K1/K10	CS	Filaments intermédiaires du cytosquelette	Cohésion de l'épiderme
	Epidermolyse bulleuse "simplex"	<i>KRT5/KRT14</i>	Keratines K5/K14	CB	Filaments intermédiaires du cytosquelette	Cohésion de l'épiderme
	Epidermolyse bulleuse jonctionnelle	<i>ITGA6, ITGB4</i>	Intégrine α6, Intégrine β4	JDE	Récepteurs transmembranaires des HD	Cohésion entre l'épiderme et le derme
Couche basale (CB)		<i>COL17A1</i>	Collagen 17/BP180	JDE	Fibrilles d'ancrage des HD	Cohésion entre l'épiderme et le derme
		<i>LAMA3, LAMB2, LAMC2</i>	Laminine 5 (sous-unités α3, β3, γ)	JDE	Fibres d'ancrage des HD	Cohésion entre l'épiderme et le derme
Jonction dermo-épidermique (JDE)	Epidermolyse bulleuse dystrophique	<i>COL7A1</i>	Collagène VII chaîne α1	JDE	Fibres d'ancrage des HD	Cohésion entre l'épiderme et le derme

Tableau 9 : Désordres génétiques liés à une désorganisation structurale ou fonctionnelle de la peau.
(D'après : Magnaldo and Sarasin, 2002)

THERAPIE GENIQUE ET APPLICATION AUX GENODERMATOSES

Plus de 200 gènes sont associés à des désordres cutanés héréditaires affectant la peau (Leech and Moss, 2007). Ces maladies – appelées génodermatoses – peuvent résulter de la mutation d'un gène exprimé exclusivement dans la peau, ou dont le rôle y est particulièrement essentiel, comme les gènes codant pour des protéines impliquées dans la structure même de l'épiderme (tableau 9). Elles peuvent également être liées à des mutations dans un gène exprimé de façon ubiquitaire mais dont l'altération affecte une fonction particulièrement importante dans la peau ou ses annexes, comme les mutations touchant les gènes impliqués dans la NER. Parmi les génodermatoses, certaines sont particulièrement sévères et peuvent parfois compromettre le pronostic vital du patient, comme c'est le cas pour le XP. Pour la plupart de ces maladies, il n'existe actuellement aucun traitement efficace. Cependant, grâce à son accessibilité, la peau apparaît comme une cible privilégiée pour les approches thérapeutiques par transfert de gène – ou thérapie génique – qui constituent aujourd'hui un espoir réaliste de traitement de certains désordres héréditaires cutanés, comme le XP.

A. Présentation générale de la thérapie génique

I. Les différentes stratégies de thérapie génique

Quatre types de stratégies de thérapie génique ont été développés pour corriger les défauts à l'origine du large panel des maladies génétiques.

La première approche, qui est celle que nous développerons particulièrement dans ce chapitre, consiste à introduire dans les cellules des patients une version normale du gène muté. Cette approche concerne principalement les maladies récessives résultant de mutations qui provoquent une perte de fonction de la protéine associée au gène muté. Elle est historiquement la première approche à avoir été adoptée et la plupart des essais cliniques de thérapie génique reposent sur cette stratégie.

La seconde approche consiste à modifier l'ARNm issu de la transcription du gène muté pour éviter les conséquences de la mutation sur la protéine. Lorsque la mutation se situe dans un exon qui peut être éliminé sans que la structure et la fonction de la protéine n'en soient significativement altérées, l'utilisation d'oligonucléotides antisens spécifiques permet de forcer le saut de l'exon portant la mutation lors de l'épissage du pré-ARNm (« exon skipping ») (revue : van Ommen et al., 2008) (figure 40). Cette technique s'applique particulièrement bien aux gènes codant pour des protéines comportant des domaines structuraux répétés telles que la dystrophine, une protéine du cytosquelette essentielle à l'intégrité des fibres musculaires et dont la perte de fonction est associée à la dystrophie musculaire de Duchenne (Hoffman et al., 1987). Après des essais extrêmement

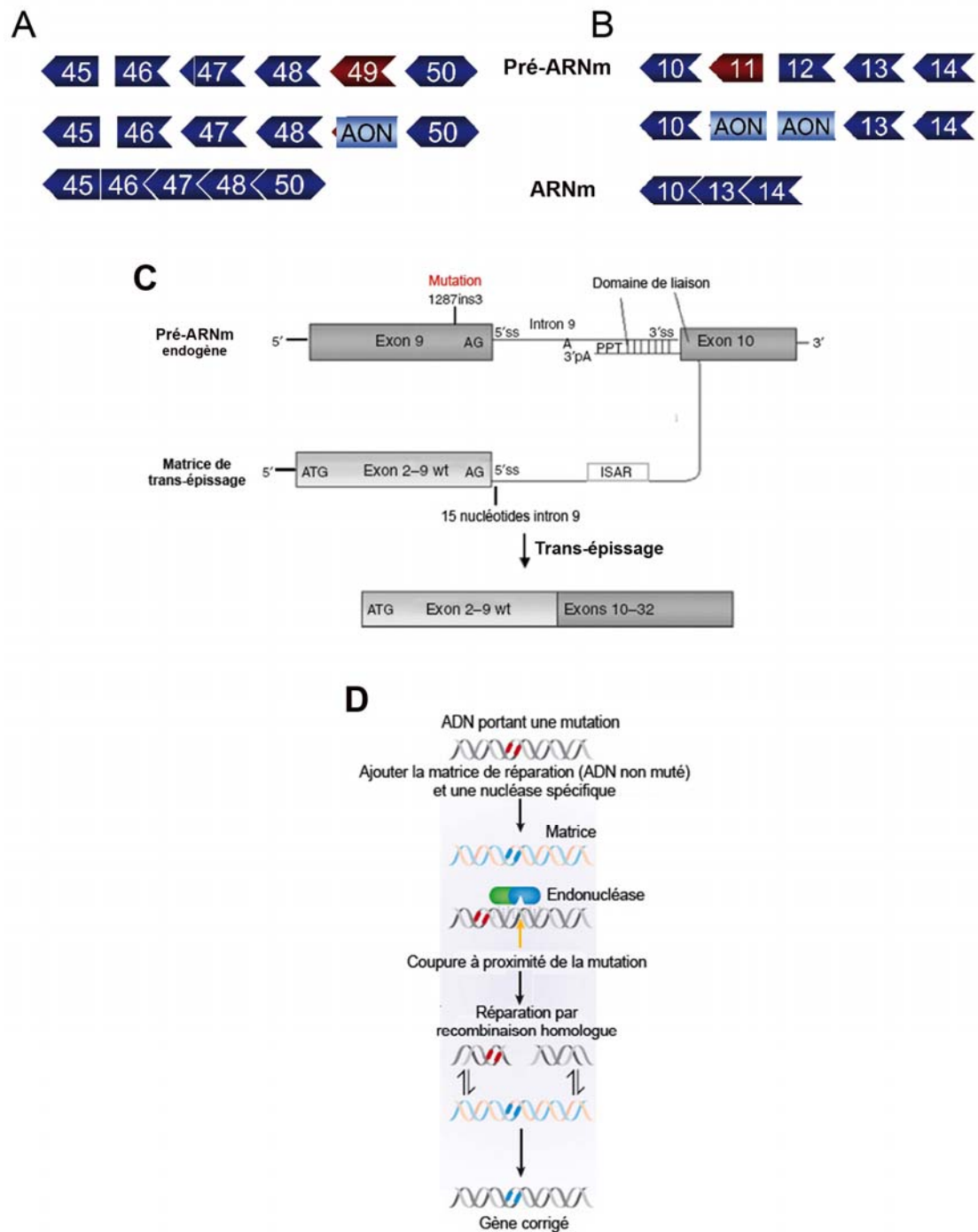


Figure 40 : Différentes stratégies de thérapie génique.

(A) (B) Thérapie génique par saut d'exon. L'exon portant la mutation (en rouge) peut être éliminé dans l'ARNm grâce à l'utilisation d'oligonucléotides antisens (AON) favorisant le saut de cet exon lors de l'épissage du pré-ARNm. Un ou plusieurs exons peuvent être ciblés pour maintenir le cadre de lecture. **(C) Stratégie SMaRT.** La matrice de trans-épissage porte une version normale de l'exon muté et des exons en amont, ainsi qu'un domaine de liaison au pré-ARNm endogène. La machinerie d'épissage de la cellule permet le trans-épissage entre la matrice et le pré-ARNm endogène, aboutissant à la formation d'un ARNm normal. **(D) Chirurgie génomique grâce aux endonucléases.** Des endonucléases naturelles sont modifiées par ingénierie pour reconnaître des séquences bien spécifiques de l'ADN. La coupure double-brin induite par ces nucléases est réparée par recombinaison homologue en utilisant un fragment d'ADN exogène intact comme matrice.

concluants chez la souris *mdx* mimant la maladie (Goyenvalle et al., 2004; Lu et al., 2003), deux essais cliniques sont actuellement en cours en Europe pour tester cette approche de thérapie génique par saut d'exon chez les patients atteints de dystrophie musculaire de Duchenne (<http://clinicaltrials.gov>). La modification des ARNm peut également être effectuée en exploitant un phénomène naturel découvert chez les eucaryotes inférieurs : le *trans*-épissage des ARN par la machinerie d'épissage (SMaRT, Spliceosome-Mediated RNA Trans-splicing). Dans les cellules humaines, le mécanisme d'épissage est essentiellement intra-moléculaire (c'est-à-dire qu'il se déroule sur un seul pré-ARNm) mais un épissage entre deux molécules de pré-ARNm différentes (ou *trans*-épissage) peut parfois être observé (Puttaraju et al., 1999). La technique SMaRT utilise la machinerie d'épissage de la cellule pour aboutir à la recombinaison du pré-ARNm endogène portant la mutation avec un pré-ARNm exogène contenant une version normale de l'exon muté (figure 40). Ce *trans*-épissage forcé aboutit à la transformation de l'ARNm muté en ARNm normal et à la production de protéines fonctionnelles. Cette stratégie a été utilisée avec succès sur des modèles murins de maladies génétiques récessives comme la mucoviscidose (Liu et al., 2002), l'immunodéficience liée à l'X (Tahara et al., 2004) et l'hémophilie de type A (Chao et al., 2003).

La troisième approche de thérapie génique consiste à inhiber l'expression du gène muté pour éviter la production de protéines anormales ayant un effet dominant négatif sur la protéine normale. La correction génétique des maladies à transmission dominante est plus complexe que celle des maladies récessives puisqu'elle nécessite une extinction de l'allèle muté sans altérer l'expression de l'allèle normal. Différentes stratégies visant à détruire l'ARNm muté ont été proposées (oligonucléotides antisens, ribozymes, ARN interférence) mais la stratégie SMaRT, qui permet de « réparer » l'ARNm muté, peut également être envisagée pour les maladies héréditaires dominantes (pour revue voir : Pelletier et al., 2006).

Enfin la quatrième stratégie vise à corriger très spécifiquement la mutation dans l'ADN cellulaire par recombinaison homologue. Cette « chirurgie génomique » repose sur l'utilisation d'endonucléases chimériques dont le domaine de liaison à l'ADN est modifié par ingénierie pour reconnaître des séquences bien particulières de l'ADN (par exemple les séquences à proximité d'une mutation connue). Une portion d'ADN normale (i.e. ne portant pas la mutation) est introduite de façon simultanée dans la cellule et sert de substrat pour la réparation du locus par recombinaison homologue (figure 40). Idéalement, cette technique émergente pourrait permettre la réparation du gène déficient dans son propre contexte, sans modifier le reste du génome. Des essais expérimentaux ont permis d'apporter la preuve de concept de cette technique pour la correction de gènes humains associés à des syndromes d'immunodéficience sévère comme *IL2RG* (Urnov et al., 2005) et *RAG1* (Grizot et al., 2009).

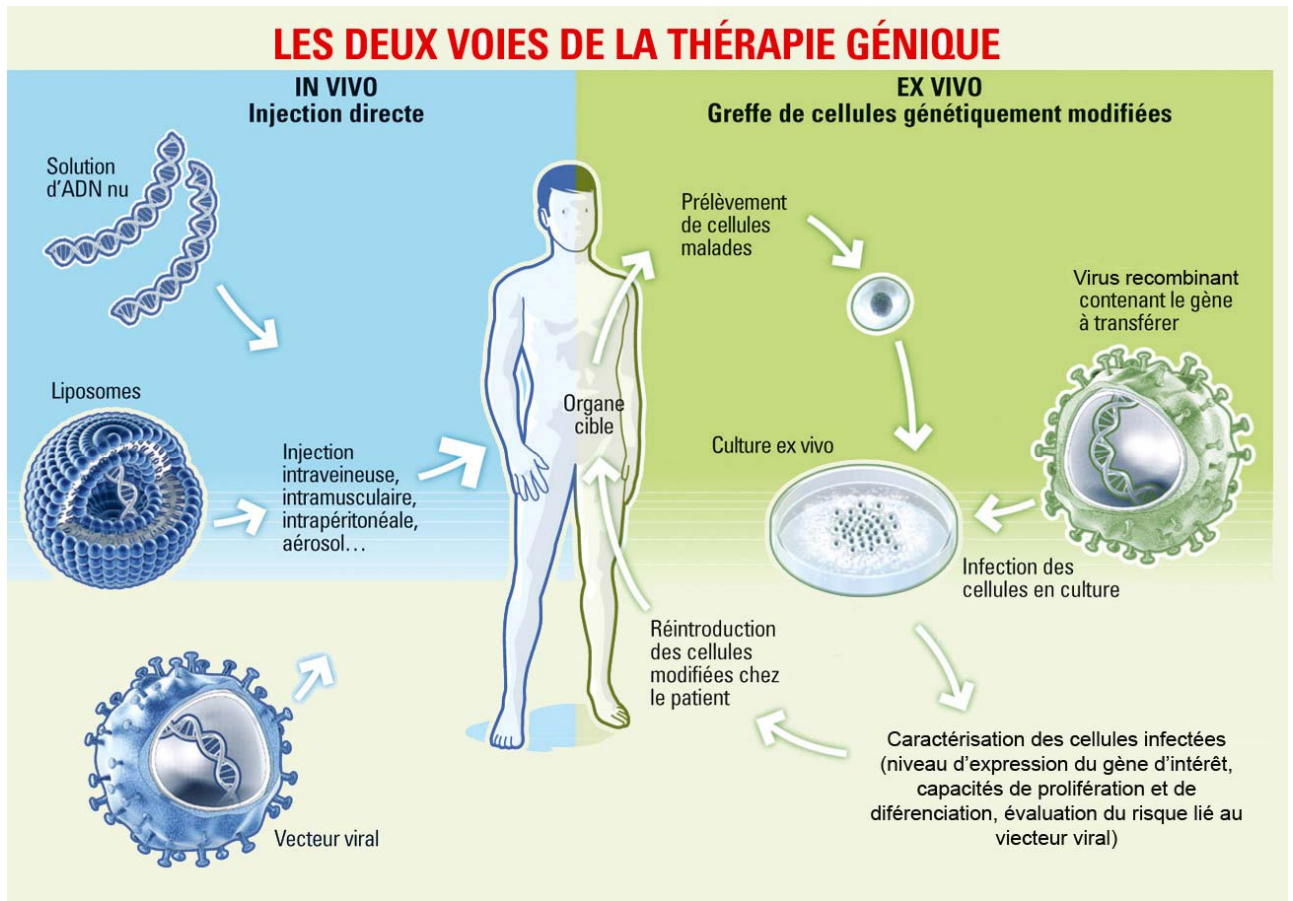


Figure 41 : Thérapie génique *in vivo* et *ex vivo*.

II. Les différentes techniques de transfert de gènes

Le transfert d'un gène thérapeutique⁹ (ou transgène) s'effectue généralement à l'aide d'un vecteur, viral ou non-viral, qui facilite le transport et la pénétration du transgène au sein de l'organe ou des cellules cibles. Le choix d'un vecteur dépend principalement (1) de la cible à atteindre (faut-il cibler spécifiquement certaines cellules ou traiter un organe entier ?); (2) du mode d'administration (le gène thérapeutique peut-il être administré *in vivo* ou *ex vivo* ?); (3) de la taille du transgène; (4) du mode d'expression désiré pour le transgène (son expression doit-elle être permanente, transitoire, constitutive, inductible ?). En outre, la bio-sécurité ne doit pas être négligée : les effets secondaires des vecteurs sur l'organisme (toxicité, potentiels allergène et antigénique) doivent être négligeables par rapport au bénéfice apporté par la correction génétique.

Les vecteurs viraux, issus de la modification par génie génétique des virus naturels, sont généralement des outils de choix pour assurer le transfert de gènes, mais des systèmes non viraux ont également été développés pour répondre à des exigences de sécurité et de facilité d'utilisation.

II.1. Thérapie génique *in vivo* ou *ex vivo* ?

Le **transfert de gène *in vivo*** consiste à introduire directement dans l'organisme le vecteur contenant le gène thérapeutique. Cette approche, peu contraignante d'un point de vue technique, simplifie la mise en place clinique du traitement. Cependant, elle est limitée par le manque de spécificité du ciblage de l'organe à traiter (risque de diffusion systémique) et par le problème de pénétration du vecteur au sein du tissu.

La **thérapie génique *ex vivo*** consiste à prélever les cellules cibles chez le patient, à les propager *in vitro*, puis à introduire le matériel génétique thérapeutique dans ces cellules avant de les réimplanter chez le patient (figure 41). Cette technique est plus laborieuse et plus onéreuse que le transfert de gènes *in vivo* puisqu'elle nécessite deux interventions chirurgicales : l'une pour prélever les biospies et l'autre pour réimplanter les cellules génétiquement corrigées. En outre, cette stratégie implique la possibilité de pouvoir maintenir en culture les cellules à traiter, ce qui n'est pas forcément possible pour tous les organes. En revanche, le transfert de gène *ex vivo* offre de nombreux avantages en termes d'évaluation pré-clinique de la sécurité de la correction génétique. En effet, la fonctionnalité et l'innocuité à long terme du gène thérapeutique peuvent être vérifiées *ex vivo* dans les cellules génétiquement corrigées avant leur réimplantation chez le patient. Cette

⁹ En raison de notre choix de stratégie de thérapie génique par transfert de gène, le reste de ce chapitre sera centré autour de cette approche. Les considérations concernant les différentes méthodes de transfert de gènes s'appliquent néanmoins également au transfert des éléments nécessaires aux autres approches (oligonucléotides antisens, shRNA, etc.).

Vecteur	Matériel génétique	Capacité cargo	Tropisme	Transduction	Immunogénicité	Maintien du génome	Avantages	Limitations
<i>enveloppé</i>								
Gammarétrovirus	ARN	8-9 kb	cellules en division uniquement	<i>Ex vivo</i>	faible	Intégration dans le génome hôte	Transduction efficace dans les cellules en division. Expression permanente du transgène.	Transduit uniquement les cellules en division. Mutagénèse insertionnelle.
Lentivirus	ARN	8 kb	large	<i>Ex vivo/In vivo</i>	faible	Intégration dans le génome hôte	Transduit les cellules non prolifératives. Expression permanente du transgène.	Mutagénèse insertionnelle.
HSV-1	ADNdb	30-40 kb 150 kb (amplicons)	fort pour les neurones	<i>Ex vivo/In vivo</i>	fort	Episomal	Capacité cargo importante. Tropisme sélectif pour les neurones.	Immunogène. Expression du transgène transitoire dans les cellules autres que les neurones.
<i>non-enveloppé</i>								
Adénovirus	ADNdb	8 à 30 kb	large	<i>Ex vivo/In vivo</i>	fort	Episomal	Transduction efficace dans beaucoup de tissus. Capacité cargo importante.	Très immunogène. Expression transitoire du transgène.
AAV	ADNsb	<5kb	large	<i>Ex vivo/In vivo</i>	faible	Episomal (90%) Intégré (10%)	Non immunogène. Non pathogène. Expression stable du transgène.	Capacité cargo limitée

Tableau 10 : Les différents vecteurs viraux utilisés pour le transfert de gènes.

technique offre également la possibilité de sélectionner *ex vivo* les cellules génétiquement modifiées pour réintroduire chez le patient une population enrichie en cellules efficacement corrigées.

II.2. Vecteurs non viraux

L'avantage des vecteurs non viraux réside avant tout dans leur facilité de production et d'utilisation. Le gène thérapeutique est généralement inséré dans un plasmide, sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire ou spécifique à un tissu particulier. L'injection directe de cet ADN « nu » dans le muscle *in vivo* peut conduire à une expression stable du transgène pendant 2 mois (Wolff et al., 1990). Toutefois, ce type d'administration ne fonctionne pas dans tous les organes et le taux de transfection est souvent faible. De nombreuses techniques visant à améliorer le transfert de gènes dans les cellules *in vitro* ou *in vivo* ont été développées : complexation de l'ADN dans des polymères ou des liposomes cationiques facilitant l'interaction avec la membrane plasmique et l'endocytose de l'ADN (Felgner et al., 1989) ; utilisation d'impulsions électriques pour induire la formation de pores dans les membranes plasmique et nucléaire (électroporation) (Neumann et al., 1999) ; bombardement de micro-particules recouvertes d'ADN (« gene gun ») (Yang et al., 1990) ; développement de nanoparticules biodégradables (Ditto et al., 2009), etc. Cependant, les plasmides ne s'insèrent que très rarement dans le génome hôte et ne permettent donc qu'une expression transitoire du transgène, ce qui rend ce genre d'approche incompatible avec les applications nécessitant une expression à long terme du gène thérapeutique.

Des techniques alternatives ont été mises au point plus récemment pour permettre l'intégration du transgène dans le génome hôte par des méthodes non-virales. La co-transfection d'un vecteur codant pour l'intégrase de bactériophage ϕ C31 et d'un vecteur portant le gène thérapeutique permet l'intégration de celui-ci dans le génome des cellules hôte au niveau de séquences relativement spécifiques (Ortiz-Urda et al., 2002). Le système transposon *sleeping beauty* (SB) peut également être utilisé pour favoriser l'intégration aléatoire du transgène dans le génome grâce à un mécanisme de « couper-coller » utilisant l'activité de la transposase SB (Ortiz-Urda et al., 2003b; Yant et al., 2000). Ces deux techniques souffrent néanmoins d'un taux d'efficacité assez faible (<15% de cellules corrigées) qui ne leur permet pas encore de présenter un intérêt majeur par rapport aux vecteurs viraux.

II.3. Vecteurs viraux

L'utilisation des virus pour le transfert de gènes repose sur leur capacité naturelle à introduire leur matériel génétique dans une cellule et à exploiter la machinerie de leur hôte pour leur propre multiplication. Pour utiliser les virus en thérapie génique, l'objectif est d'obtenir des particules virales infectieuses capables d'induire l'expression du transgène au sein de la cellule hôte,

mais ne possédant pas la capacité de se répliquer chez leur hôte. En séparant les éléments nécessaires à la réplication et à l'assemblage des particules virales d'une part et les séquences de régulation du génome viral d'autre part, des particules virales recombinantes, infectieuses mais incompetentes pour la réplication, peuvent être produites et utilisées pour la transduction¹⁰ des cellules à corriger.

Les vecteurs viraux les plus couramment utilisés pour le transfert de gènes sont dérivés des gamma-rétrovirus (RV), des lentivirus (LV), des adénovirus (AV), des virus associés aux adénovirus (AAV) ou des herpès virus (HSV)¹¹ (tableau 10).

II.3.a. Les rétrovirus

(i) Caractéristiques générales des rétrovirus

Les rétrovirus constituent une large famille de virus à ARN qui infectent naturellement la plupart des vertébrés (pour revue voir : Coffin, 1996; Kay et al., 2001; Verma and Weitzman, 2005). Ils sont associés, chez leurs différents hôtes, à de nombreuses maladies : sarcomes, lymphomes, syndromes d'immunodéficience, désordres neurologiques. Malgré la diversité des espèces qu'ils infectent et de leurs effets sur ces hôtes, la plupart des rétrovirus partagent tout de même une relative similarité au niveau de la structure des particules virales (ou virions), de l'organisation de leur génome et de leur mode de réplication.

Structure des virions et organisation du génome

La particule virale (~ 100 nm de diamètre) est entourée d'une enveloppe lipidique décorée de glycoprotéines dimériques qui se fixent sur des récepteurs spécifiques à la surface de la cellule hôte (figure 42). A l'intérieur, une capsid de forme conique renferme le génome viral constitué de deux copies identiques d'ARN positif simple-brin de 7 à 11 kb. Le génome viral contient trois gènes essentiels, *gag*, *pro-pol* et *env*, entourés par les séquences régulatrices R et U5 du côté 5' et U3 et R du côté 3' (figure 42). Le gène *gag* code pour une polyprotéine dont le clivage protéolytique génère les différentes protéines de la capsid. Le gène *pro-pol* code pour la protéase, la rétro-transcriptase (reverse transcriptase, RT) et l'intégrase virales, qui sont encapsidées avec le génome viral au sein du virion. En réalité, ces protéines sont générées à partir du clivage d'une polyprotéine issue de la traduction d'un précurseur *gag/pro-pol*. Le gène *pro-pol* n'est donc pas un gène au sens strict du terme puisqu'il n'est transcrit que dans la continuité du gène *gag*. Le gène *env* quant à lui code pour

¹⁰ La transduction définit l'infection abortive (i.e. n'aboutissant pas à la réplication du génome viral) permettant l'introduction dans la cellule hôte du transgène porté par les particules virales recombinantes.

¹¹ Les herpès virus n'étant pas utilisés pour les approches de transfert de gènes dans la peau, leurs caractéristiques ne seront pas développées dans ce paragraphe mais elles sont résumées dans le tableau 12.

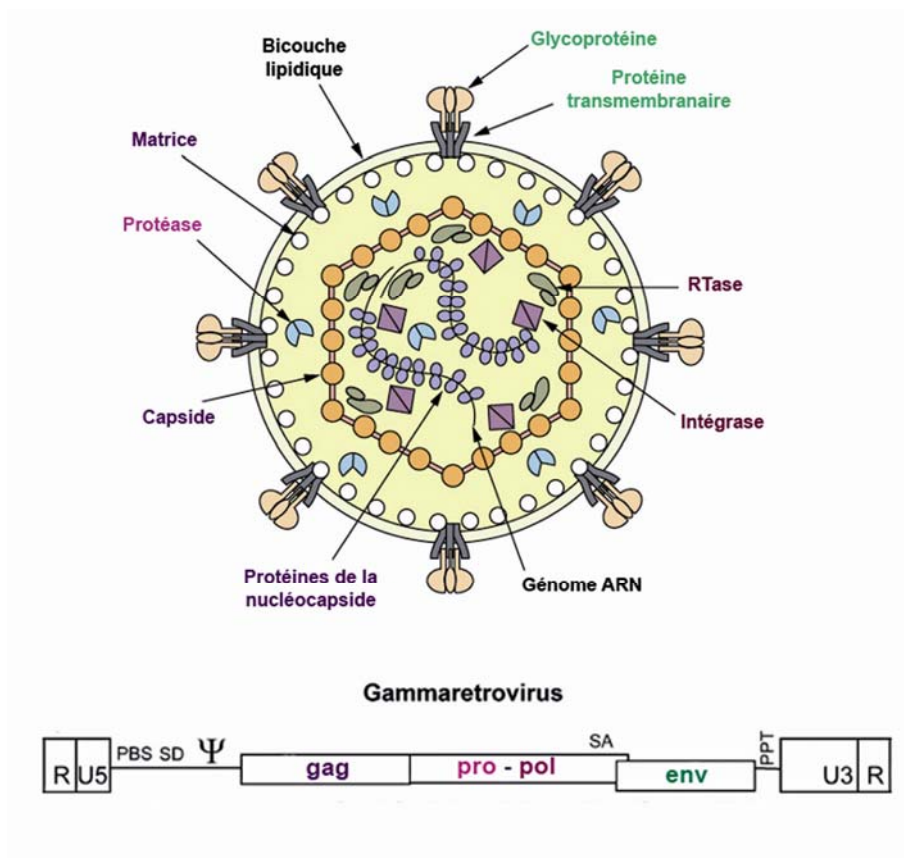


Figure 42 : Structure et génome d'un gammarétrovirus.

Les séquences R, U5 et U3 fournissent les signaux nécessaires à la rétro-transcription du génome ARN puis les éléments nécessaires à l'intégration et à la transcription (promoteur, activateurs, site de polyadénylation) du génome lorsqu'il est sous forme ADN (provirus). La séquence ψ permet l'encapsidation du génome ARN lors de la production des virions. La région PBS (primer binding site) est le site de fixation d'un ARN de transfert (ARNt) servant d'amorce pour la synthèse du premier brin d'ADN au cours de la rétro-transcription du génome viral. La séquence PPT (polypurine tract) sert d'amorce pour la synthèse du second brin d'ADN lors de la rétro-transcription. Les sites SD (splice donor) et SA (splice acceptor) permettent l'épissage du génome pour la production des protéines d'enveloppe.

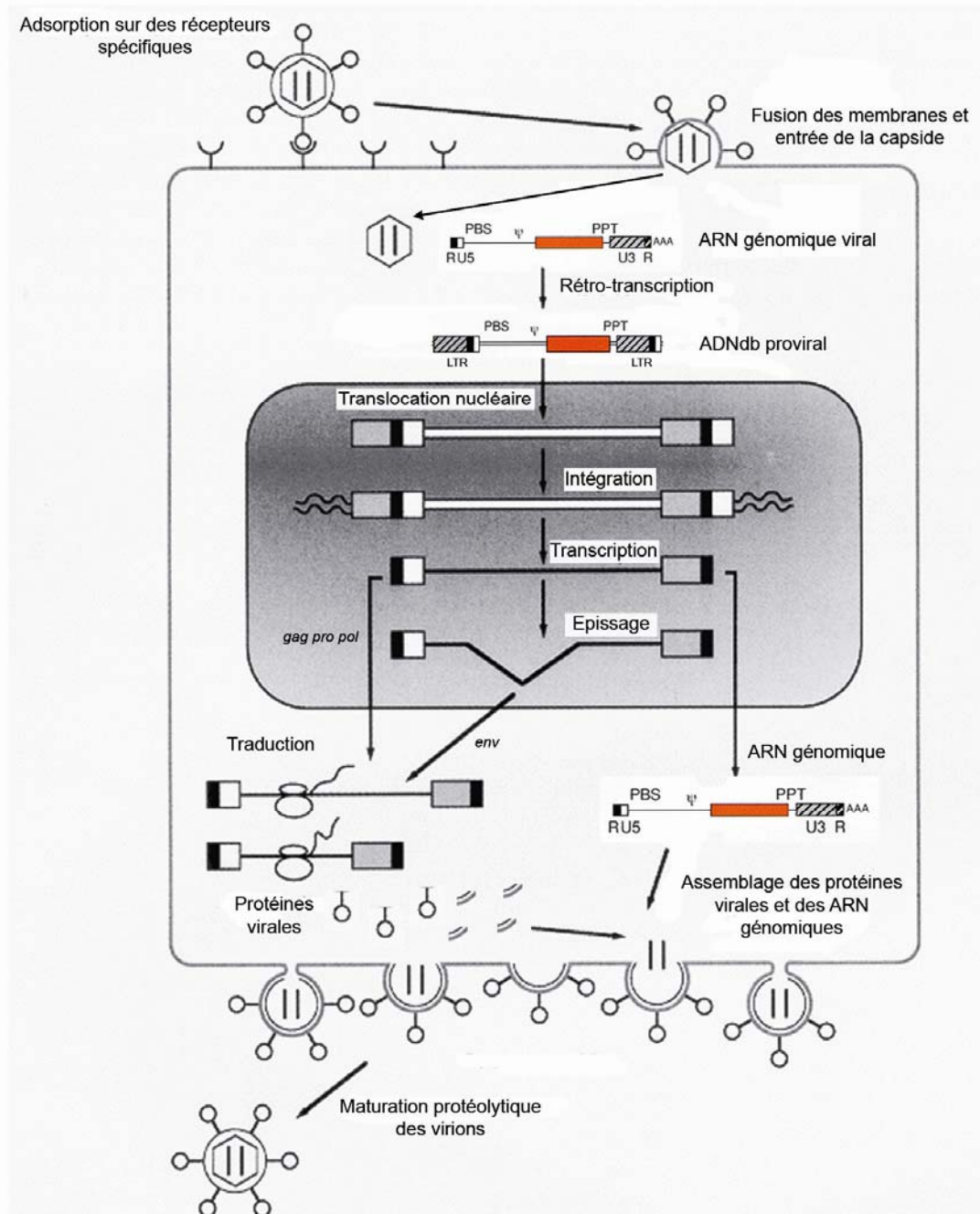


Figure 43 : Cycle de réplication des rétrovirus.

les glycoprotéines de l'enveloppe virale, qui assurent l'entrée du virus dans la cellule. Le génome des gammavirus ne contient que les gènes *gag*, *pro-pol* et *env* tandis que le génome des lentivirus présente une organisation plus complexe et code pour des protéines virales supplémentaires.

Cycle de réplication du rétrovirus

Les particules virales sont adsorbées à la surface de la cellule hôte grâce à l'interaction entre les glycoprotéines de l'enveloppe avec des récepteurs spécifiques situés sur la membrane cellulaire (figure 43). Après la liaison du virus sur son récepteur, la capsid est introduite dans la cellule par fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique. Au sein de la capsid, l'ARN génomique viral est alors converti en ADN double-brin grâce à la rétro-transcriptase virale. Cette étape (dont le mécanisme est détaillé sur l'annexe 1), aboutit à la formation des répétitions terminales longues (LTR, Long Terminal Repeat) de part et d'autre de la région codante. Les LTR contiennent tous les éléments de régulation nécessaires à l'intégration, puis à l'expression du provirus. La région U3 du LTR 5' contient les séquences d'initiation et de régulation de la transcription tandis qu'une séquence de polyadénylation située entre les régions R et U5 du LTR 3' assure le signal de fin de transcription. L'ADN proviral, associé à un complexe de pré-intégration, est transporté vers le noyau où l'intégrase virale permet son insertion dans le génome de la cellule hôte. La machinerie de transcription de la cellule initie ensuite normalement la transcription du provirus à partir des LTR. Une partie des transcrits fournit de nouvelles copies d'ARN génomique viral tandis que l'autre fraction est utilisée pour la synthèse des protéines virales. La traduction des transcrits entiers permet la production des polyprotéines *gag* ou *gag/pol* tandis que les glycoprotéines d'enveloppe sont traduites à partir d'un transcrit épissé. L'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe dans la membrane plasmique et l'assemblage des polyprotéines *gag* et *gag/pol* avec deux copies d'ARN viral provoquent le bourgeonnement de particules virales hors de la cellule. Le clivage des polyprotéines par la protéase virale et l'assemblage de la capsid autour du génome viral prennent place au moment où le virion est libéré de la cellule, emportant avec lui une partie de la membrane plasmique cellulaire pour former son enveloppe.

(ii) Les gamma-rétrovirus

En raison de la simplicité de leur génome, dont la majorité des séquences régulatrices sont regroupées au sein des LTR, les gamma-rétrovirus ont été parmi les premiers virus à être utilisés comme vecteurs pour la thérapie génique. Parmi eux, le virus de la leucémie murine de Moloney (MMLV, Moloney Murine Leukemia Virus) a été particulièrement étudié.

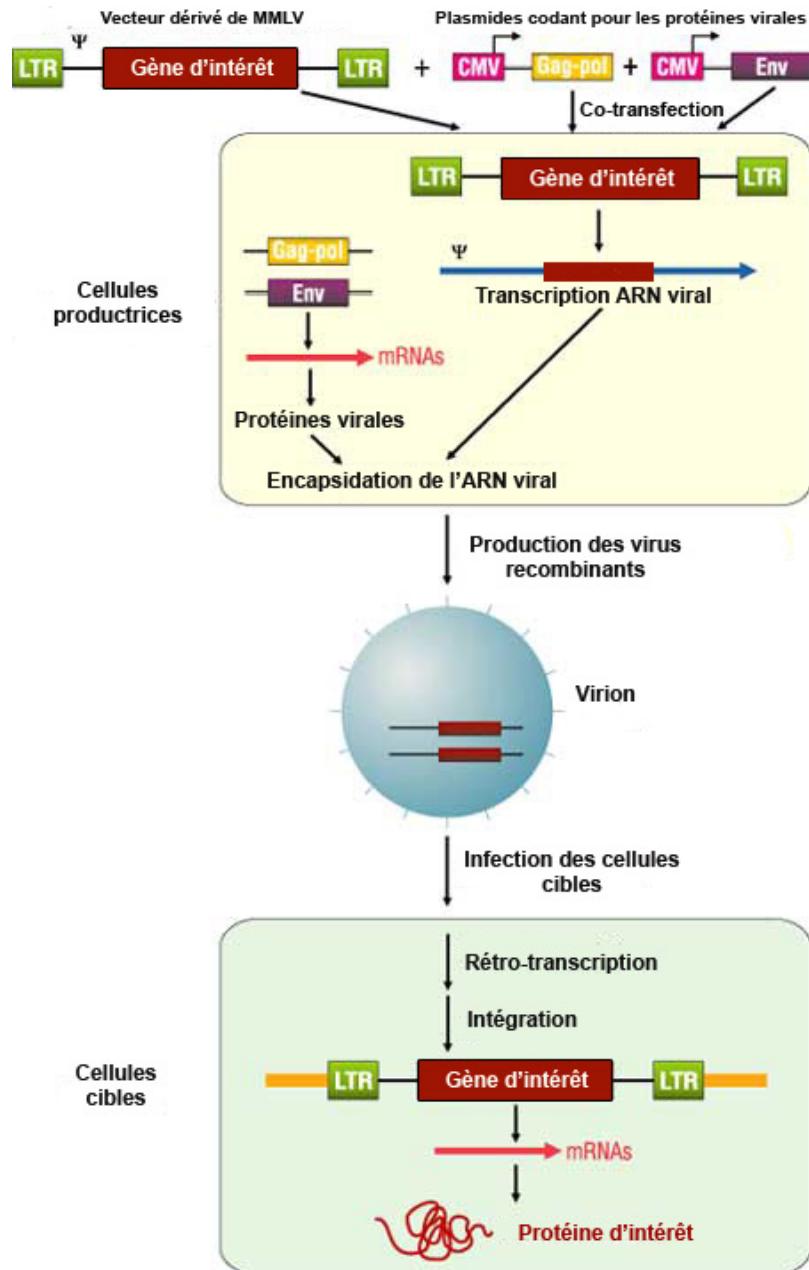


Figure 44 : Production de vecteurs rétroviraux pour le transfert de gènes.

Construction des vecteurs rétroviraux

Des vecteurs incompetents pour la répllication dérivés de MLV sont générés en remplaçant les séquences codant pour les protéines virales par l'ADNc du gène d'intérêt. Entre 8 et 9 kb d'ADN exogène peuvent ainsi être insérés à la place des gènes viraux. L'expression du gène d'intérêt peut être placée sous le contrôle des LTR viraux mais des promoteurs internes peuvent également être introduits dans le vecteur rétroviral. L'insertion d'un site d'entrée des ribosomes (IRES, Internal Ribosome Entry Site) dans le vecteur viral permet l'expression de plusieurs régions codantes à partir d'un seul promoteur (Chen et al., 1993). La traduction de deux protéines à partir d'un seul ARNm grâce à l'IRES assure leur production simultanée ; si l'une de ces protéines est un marqueur de sélection, l'expression du gène d'intérêt dans les cellules sélectionnées est théoriquement garantie.

Production des rétrovirus recombinants

Pour la production des particules rétrovirales recombinantes, les enzymes et les protéines de structure virales sont fournies en *trans* par des lignées cellulaires exprimant les gènes viraux de façon stable ou transitoire (figure 44). Pour limiter les risques de recombinaison, les gènes *gag/pol* et *env* sont exprimés à partir de deux vecteurs différents, ne portant pas la séquence d'encapsidation ψ et dans lesquels le LTR 3' peut être remplacé par un signal de polyadénylation provenant d'un autre virus, comme SV40 (Simian Virus 40) (Danos and Mulligan, 1988; Markowitz et al., 1988). Dans ce cas, trois événements de recombinaison (acquisition d'une séquence ψ , acquisition d'un LTR 3', recombinaison des séquences *gag/pol* et *env* sur un même vecteur) sont nécessaires à la production d'un génome viral complet. La séparation des gènes *gag/pol* et *env* permet en outre de remplacer facilement le gène *env* de MMLV par un gène d'enveloppe issu d'un autre virus. Cette substitution des protéines d'enveloppe, appelée pseudo-typage, permet d'étendre la capacité d'infection du virus à d'autres cibles cellulaires puisque ce sont les glycoprotéines d'enveloppe qui définissent le tropisme du virus. Dans certains cas, les glycoprotéines exogènes augmentent aussi la stabilité des particules virales recombinantes. Ainsi, la protéine d'enveloppe du virus de la stomatite vésiculaire (VSV-G, Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein) est très utilisée pour le pseudo-typage des rétrovirus puisqu'elle permet la production de particules virales particulièrement stables, capables d'infecter une large variété de types cellulaires (Burns et al., 1993; Yee et al., 1994).

L'utilisation de lignées cellulaires hautement permissives à la transfection, telles que les cellules HEK 293T, permet de produire des vecteurs rétroviraux par triple transfection transitoire avec une efficacité comparable aux lignées d'empaquetage exprimant les gènes viraux de façon stable (Pear et al., 1993; Soneoka et al., 1995). Cette technique, plus flexible et plus rapide que la création d'une lignée productrice stable, permet en outre de générer des particules virales même si les protéines produites par le vecteur viral ou les composants même du virion sont toxiques pour la

cellule. Ainsi, la protéine VSV-G est toxique à forte dose pour les cellules, mais l'utilisation de la triple transfection permet d'obtenir des surnageants rétroviraux pseudo-typés VSV-G avec de très bons titres (10^7 - 10^8 particules infectieuses/ml) (Burns et al., 1993; Yee et al., 1994). La concentration de ces surnageants par ultracentrifugation permet d'obtenir des titres supérieurs à 10^9 particules infectieuses/ml.

Avantages et limites des gamma-rétrovirus pour le transfert de gènes

L'intérêt majeur des rétrovirus réside dans leur capacité d'intégration au sein du génome de la cellule hôte. Bien que l'intégration ne garantisse pas forcément la pérennité de l'expression du transgène, elle demeure le moyen le plus efficace pour maintenir l'information génétique dans des cellules fortement prolifératives ou dans un tissu se renouvelant fréquemment. Cependant, les gamma-rétrovirus ne peuvent intégrer leur matériel génétique que dans le génome des cellules en division. En effet, la rupture de la membrane nucléaire au cours de la mitose est requise pour que le complexe de pré-intégration puisse accéder à la chromatine (Miller et al., 1990; Roe et al., 1993). Cette propriété limite l'utilisation des gamma-rétrovirus *in vivo* puisque, dans les tissus, une fraction mineure des cellules passe par la phase de mitose à un instant donné. D'autre part, si l'intégration des gamma-rétrovirus dans le génome a longtemps été considérée comme aléatoire, ce dogme est aujourd'hui réfuté. L'analyse à grande échelle du profil des intégrations de MMLV dans les cellules humaines a révélé récemment que ce virus s'intégrait préférentiellement dans les régions transcriptionnellement actives du génome, avec un biais particulier pour les sites d'initiation de la transcription (Mitchell et al., 2004; Wu et al., 2003). Il existe donc un risque de mutagenèse insertionnelle et notamment d'activation de proto-oncogènes sous l'effet des séquences activatrices (enhancers) des LTR viraux (Anson, 2004).

Ce risque a malheureusement été mis en évidence lors de la première application clinique de thérapie génique ayant permis de traiter avec succès une maladie génétique, le déficit immunitaire combiné sévère (SCID, Severe Combined ImmunoDeficiency). Depuis 1999, 28/31 patients atteints de SCID lié à l'X (SCID-X1) et 11/11 patients atteints de SCID lié à une déficience en adénosine-désaminase (ADA-SCID, Adenosine-Deaminase Deficient SCID) ont été traités avec succès au cours de trois essais cliniques de thérapie génique *ex vivo* (Aiuti et al., 2002; Cavazzana-Calvo et al., 2000; Fischer and Cavazzana-Calvo, 2008; Gaspar et al., 2004). Les cellules progénitrices hématopoïétiques (CD34+) des patients ont été transduites *ex vivo* avec un rétrovirus dérivé de MMLV permettant l'expression du gène thérapeutique (*IL2RG* ou *ADA*) avant d'être réimplantées chez les patients. La correction de l'immunodéficience est quasiment complète et les patients traités conservent à ce jour (après plus de 10 ans pour certains) un système immunitaire fonctionnel leur permettant de mener une vie normale. Cependant, ce succès a été mitigé par les effets adverses de la thérapie génique

observés au cours de deux essais cliniques (Cavazzana-Calvo et al., 2005; Fischer and Cavazzana-Calvo, 2008; Hacein-Bey-Abina et al., 2003). Plusieurs mois après leur traitement, 5 patients SCID-X1 ont en effet développé un syndrome lymphoprolifératif lié à l'intégration du provirus au niveau du locus du proto-oncogène *LMO2*, menant à la surexpression de ce dernier sous l'effet des LTR viraux et à l'expansion clonale de lymphocytes T anormaux (Hacein-Bey-Abina et al., 2003). Cette complication a été fatale pour un patient, mais les quatre autres ont été traités avec succès par chimiothérapie, tout en conservant les bénéfices de la thérapie génique (Cavazzana-Calvo et al., 2007; Fischer and Cavazzana-Calvo, 2008).

Ces observations ont relancé le débat sur la sécurité des vecteurs intégratifs, bien que les mécanismes liés au développement du syndrome lymphoprolifératif chez les patients SCID-X1 ne soient pas encore bien compris puisqu'ils n'ont, par exemple, jamais été observés chez les patients ADA-SCID traités de la même façon. Il est donc probable que leur apparition chez les patients SCID-X1 soit la conséquence de l'effet combiné de plusieurs facteurs, parmi lesquels l'avantage prolifératif des cellules exprimant le gène *IL2RG* jouerait probablement un rôle clé (Dave et al., 2004; Thrasher et al., 2006; Woods et al., 2006). Ces résultats ne doivent toutefois pas masquer le succès de cette thérapie chez des enfants dont l'espérance de vie, en l'absence de greffe de moelle allogénique, ne dépasse pas 20 à 30 mois (Cavazzana-Calvo et al., 2007).

(iii) Les lentivirus

L'utilisation des vecteurs lentiviraux, dérivés notamment du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (HIV-1, Human Immunodeficiency Virus type 1), s'est largement développée au cours des dernières années. L'organisation du génome viral de HIV-1 est plus complexe que celle de MMLV : HIV-1 code pour six protéines accessoires supplémentaires (Tat, Rev, Vif, Vpr, Nef et Vpu) en plus des protéines associées aux gènes *gag*, *pol* et *env* (Kay et al., 2001; Verma and Weitzman, 2005) (figure 45). Les vecteurs dérivés de HIV-1 sont dépourvus de la plupart des séquences codantes mais conservent les séquences régulatrices communes aux rétrovirus (LTR, ψ , PBS, PPT). L'utilisation de promoteurs hybrides CMV/LTR ou de promoteurs inducibles permet d'améliorer la production des vecteurs lentiviraux tout en la rendant indépendante de l'expression de la protéine Tat, augmentant ainsi la biosécurité des vecteurs (Dull et al., 1998; Kim et al., 1998). Des vecteurs HIV-1 pseudo-typés VSV-G de grade clinique peuvent aujourd'hui être produits par transfection transitoire avec de très bons titres (10^8 à 10^{10} particules infectieuses/ml après concentration) (Ansorge et al., 2009; Kutner et al., 2009).

Contrairement au cas des gamma-rétrovirus, le passage du génome lentiviral au sein du noyau de la cellule hôte repose sur un transport actif du complexe de pré-intégration à travers les pores nucléaires (Bukrinsky et al., 1992; Suzuki and Craigie, 2007). Les lentivirus sont donc capables

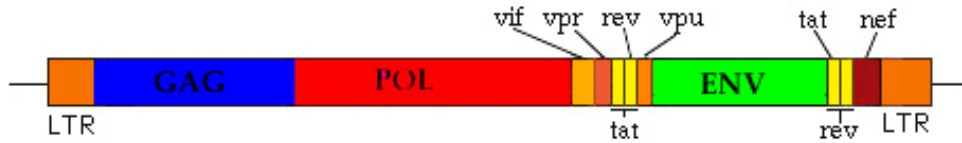


Figure 45 : Génome du lentivirus HIV-1.

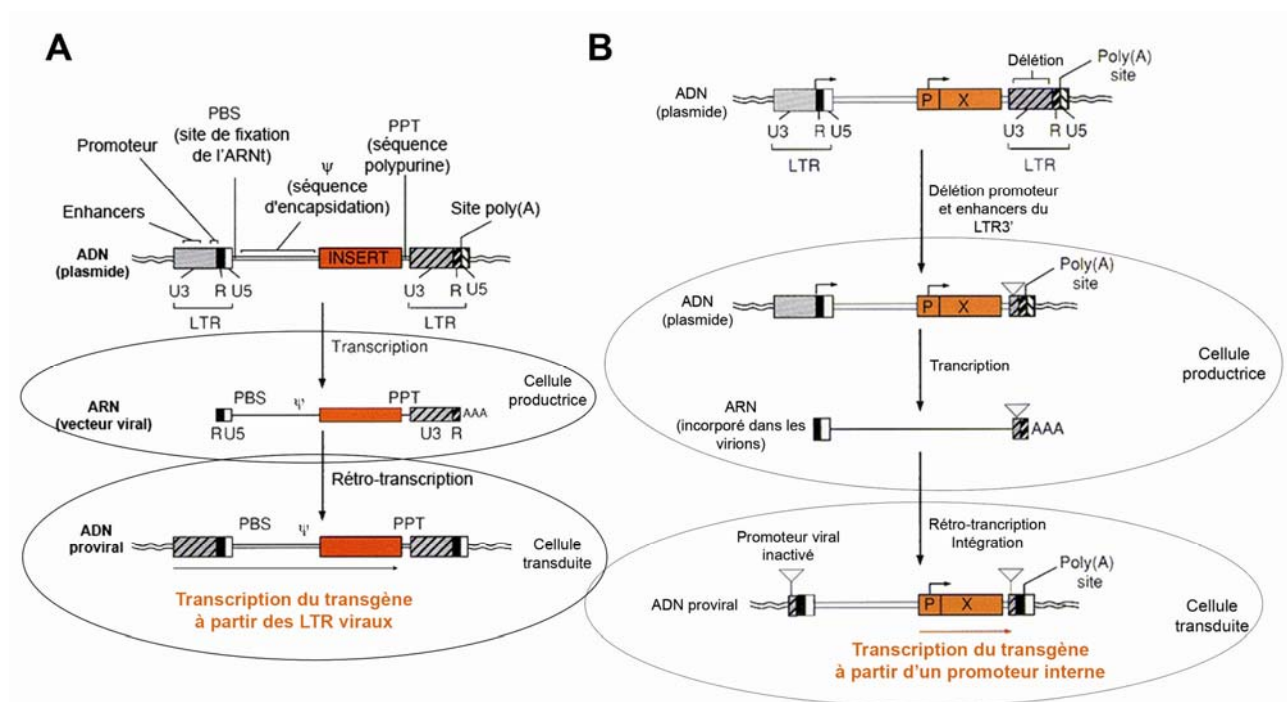


Figure 46 : Principe des vecteurs SIN.

(A) Transcription et rétro-transcription d'un vecteur dérivé de MMLV. Le plasmide utilisé pour la production des virus recombinants contient le gène d'intérêt (insert) encadré par les séquences régulatrices de MMLV (LTR 5' et 3', PBS, PPT, ψ). La transcription de ce plasmide dans la cellule productrice permet de générer les ARN qui seront encapsidés dans les particules virales recombinantes. Suite à la transduction des cellules cibles, le vecteur viral est rétro-transcrit : au cours de ce processus, la région U3 du LTR 3' (zone hachurée) est copiée au niveau du LTR 5'. Cette région contient les séquences régulatrices de la transcription de l'ADN proviral et permet donc l'expression du gène d'intérêt. **(B) Construction d'un vecteur SIN.** Pour construire un vecteur SIN, les séquences régulatrices de la région U3 du LTR 3' sont éliminées (∇). La rétro-transcription du vecteur viral dans les cellules transduites donne donc naissance à un ADN proviral possédant 2 LTR inactivés. L'expression du gène d'intérêt n'est donc plus sous le contrôle des LTR viraux mais sous le contrôle d'un promoteur interne.

de se répliquer aussi efficacement dans des cellules non prolifératives que dans des cellules en division (Weinberg et al., 1991). Cette propriété rend l'utilisation des lentivirus particulièrement intéressante pour le transfert de gènes *in vivo* dans des tissus où une forte proportion des cellules sont différenciées ; l'efficacité des lentivirus a notamment été démontrée dans le cerveau, le muscle, le foie, la rétine et la peau (Baek et al., 2001; Ghazizadeh et al., 2004). Cependant, les lentivirus s'insèrent préférentiellement dans les gènes transcriptionnellement actifs ce qui pourrait induire, comme dans le cas des gamma-rétrovirus, un risque de mutagénèse insertionnelle (Mitchell et al., 2004; Schroder et al., 2002).

(iv) Les vecteurs SIN

Pour réduire les risques d'activation de proto-oncogènes, des vecteurs « auto-inactivant » (SIN, Self-Inactivating) ont été développés (Yee et al., 1987; Yu et al., 1986). Au cours du mécanisme de rétro-transcription des rétrovirus, la région U3 de l'extrémité 3' de l'ARN génomique viral sert de matrice pour la synthèse des régions U3 contenues dans les deux LTR du provirus (figure 46A). Les régions U3 étant redondantes au sein d'un vecteur rétroviral servant à la production de particules virales recombinantes, celle du LTR 3' peut être modifiée sans que la production virale n'en soit altérée. Cependant, lors de la rétro-transcription du vecteur dans les cellules transduites, les modifications affectant la région U3 du LTR 3' sont copiées sur les deux LTR du provirus. Ainsi, en éliminant les séquences de régulation de la transcription contenues dans la région U3 du LTR 3', une inactivation transcriptionnelle des deux LTR est obtenue dans la cellule hôte (figure 46B). Le transgène doit donc être placé sous le contrôle d'un promoteur interne qui assurera sa transcription au sein des cellules transduites. Cette stratégie peut être utilisée pour éviter les effets activateurs des LTR sur les gènes situés en aval du provirus. Les vecteurs SIN ont été particulièrement développés dans le domaine des lentivirus (Miyoshi et al., 1998; Zufferey et al., 1998) et, en termes d'expression du transgène, leur efficacité semble équivalente à celle des vecteurs classiques (Schambach et al., 2006).

II.3.b. Les adénovirus

Les adénovirus sont des virus à ADN non enveloppés qui infectent de nombreuses espèces et de nombreux types cellulaires (Kay et al., 2001; Verma and Weitzman, 2005). Leur génome est constitué d'une molécule d'ADN double-brin linéaire (~ 36 kb) et code pour une cinquantaine de protéines. Les adénovirus infectent aussi bien les cellules prolifératives que les cellules quiescentes. Dans la cellule hôte, le génome des adénovirus, maintenu sous forme épisomale, est transcrit et répliqué dans le noyau grâce à son association avec la matrice nucléaire. L'infection par les adénovirus provoque une forte réponse immunitaire de l'hôte contre les protéines virales,

aboutissant à la destruction des cellules transduites et à la perte d'expression du transgène (Yang et al., 1994a; Yang et al., 1994b). Les propriétés cytotoxiques et immunogènes des adénovirus ont été exploitées pour développer de nouvelles approches de vaccination (Lasaro and Ertl, 2009) et de thérapies anti-tumorales (Alemany et al., 2000). Des vecteurs adénoviraux de troisième génération, totalement dépourvus des gènes viraux (« gutless ») et pouvant véhiculer plus de 30 kb de matériel génétique exogène, permettent de réduire la réponse immunitaire de l'hôte et d'allonger la durée d'expression du transgène (Segura et al., 2008). Ces vecteurs ont été utilisés avec succès dans des modèles murins ou canins de maladies monogéniques par injection directe du vecteur dans le tissu cible *in vivo* (muscle, foie, cerveau) (Jager and Ehrhardt, 2007). Toutefois, la production des vecteurs adénoviraux « gutless » demeure encore trop laborieuse pour être utilisée à l'échelle clinique.

II.3.c. Les virus associés aux adénovirus

Les virus associés aux adénovirus (AAV, Adeno-Associated Virus) sont des virus à ADN simple-brin non pathogènes chez l'homme (pour revue voir : Coura Rdos and Nardi, 2007). Le cycle répliatif complet des AAV nécessite la présence d'un virus « helper » de type adénovirus ou herpès virus. En l'absence de virus helper, les AAV établissent une infection latente en persistant sous forme épisomale ou en s'intégrant dans le génome de la cellule hôte (Miao et al., 1998). La transduction par les vecteurs AAV est facilitée dans les cellules en phase S (Russell et al., 1994) mais ils sont également capables d'infecter les cellules non prolifératives et peuvent donc être délivrés *in vivo* dans de nombreux tissus (système nerveux central, foie, poumon, muscle, rétine). Les vecteurs AAV ne contenant aucune séquence codante d'origine virale, leur toxicité et leur effet immunogène sont très limités par rapport aux adénovirus. Cependant, les AAV infectent naturellement l'homme et des anticorps neutralisants circulants dirigés contre ces virus sont observés dans la majorité de la population, ce qui peut inhiber la transduction (Peden et al., 2004). La découverte de nouveaux sérotypes permet maintenant de disposer de sérotypes privilégiés pour chaque tissu ou organe cible, ce qui permet d'échapper aux anticorps dirigés contre l'AAV de sérotype 2, le plus commun chez l'homme. Au cours des 10 dernières années, les AAV ont été largement utilisés pour des essais cliniques de thérapie génique visant à traiter l'hémophilie de type B (Kay et al., 2000), la mucoviscidose, la maladie de Parkinson (pour revue voir : Aiuti et al., 2007; Alexander et al., 2007; Coura Rdos and Nardi, 2007) et plus récemment l'amaurose congénitale de Leber, une maladie de la rétine menant vers la cécité (Maguire et al., 2008). La petite taille du génome des AAV (< 5kb) reste toutefois la principale limite de l'utilisation des AAV pour le transfert de gènes.

B. Thérapie génique cutanée

I. La peau : une cible privilégiée pour la thérapie génique

Les caractéristiques de la peau, et particulièrement de l'épiderme, en font un tissu privilégié pour les approches de thérapie génique¹². L'épiderme est renouvelé tout au long de notre vie grâce à l'existence d'un compartiment de cellules souches ; en corrigeant génétiquement ces cellules souches, il devrait donc être possible d'assurer l'expression à très long terme du gène thérapeutique dans l'ensemble de l'épiderme. D'autre part, depuis les travaux de Rheinwald et Green, (Rheinwald and Green, 1975; Rheinwald and Green, 1977), il est possible de cultiver les kératinocytes épidermiques *in vitro* en préservant les caractéristiques des cellules souches. Des kératinocytes primaires, issus de biopsies de patients sains ou atteints d'une génodermatose, peuvent donc être mis en culture et amplifiés avant d'être génétiquement manipulés, autorisant ainsi les approches par transfert de gènes *ex vivo* (Carreau et al., 1995; Choate et al., 1996b; Gerrard et al., 1993; Morgan et al., 1987). En outre, la formation de feuilletts épidermiques à partir de cultures de kératinocytes primaires et leur utilisation pour l'autogreffe chez les grands brûlés sont des techniques maîtrisées depuis plus de 30 ans, qui ont permis de montrer le maintien des cellules souches en culture et leur capacité à régénérer un épiderme pendant plusieurs années après la greffe (Compton et al., 1998; Gallico et al., 1984; Pellegrini et al., 1999). A partir des kératinocytes et des fibroblastes, il est également possible de « reconstruire » de la peau *in vitro* possédant la plupart des caractéristiques de la peau humaine *in vivo* (Asselineau et al., 1986), ce qui permet l'évaluation de la correction génétique dans un contexte tridimensionnel proche de l'architecture cutanée. Les feuilletts épithéliaux reconstruits *ex vivo* à partir de cellules humaines génétiquement modifiés peuvent ensuite être greffés chez la souris pour permettre une étude pré-clinique *in vivo* de la correction génétique (Del Rio et al., 2002; Morgan et al., 1987; White et al., 1998). Enfin, l'épiderme étant l'un des tissus les plus accessibles de l'organisme, le suivi des traitements cliniques, comme les greffes, y est particulièrement aisé.

¹² Cette thématique a donné lieu à la rédaction de deux revues au cours de ma thèse. Voir l'annexe 2 à la fin de ce manuscrit.

II. Choix de la stratégie en fonction de l'application

Trois grands types d'applications sont susceptibles de bénéficier d'une approche thérapeutique par transfert de gènes dans la peau : (1) le traitement (thérapie anti-tumorale) ou l'amélioration (induction de la cicatrisation) transitoire d'une situation locale (pour revue voir : Carretero et al., 2006) ; (2) la traitement d'un désordre systémique caractérisé par une déficience dans la production de certains facteurs circulants (hormone de croissance, facteur de coagulation) ; (3) la correction permanente d'une maladie génétique affectant la peau (épidermolyse bulleuse, xeroderma pigmentosum).

II.1. Thérapie génique non permanente

Dans le cas d'une thérapie transitoire, l'intégration du gène d'intérêt dans le génome hôte n'est pas recherchée et il n'est pas non plus nécessaire de cibler le compartiment des cellules souches. L'injection *in vivo* de vecteurs adénoviraux apparaît donc comme la meilleure option, bien que le caractère immunogène de ces vecteurs puisse limiter leur application thérapeutique (Sylvester et al., 2000). La localisation de l'épiderme à la surface du corps humain rend également attractives les approches topiques non-virales pour le transfert de gènes *in vivo*, mais la vectorisation à travers la barrière cutanée reste encore difficile malgré le développement de nombreuses technologies au cours des dernières années pour augmenter la perméabilité de la peau : application d'un champ électrique (électroporation), utilisation des ultrasons (sonophorèse) ou de produits chimiques (surfactants), injection à travers le *stratum corneum* à l'aide de micro-aiguilles (pour revue voir : Kikuchi et al., 2008).

II.2. Thérapie génique des désordres systémiques

Le traitement des désordres systémiques repose sur l'utilisation de la peau en tant que « bio-réacteur » pour la production de protéines thérapeutiques pouvant être délivrées, via la circulation sanguine, à l'ensemble de l'organisme. Ce type d'approche fut l'objet du premier essai de transfert de gènes *ex vivo* dans les kératinocytes primaires humains (Morgan et al., 1987; Teumer et al., 1990). La transduction des kératinocytes à l'aide de vecteurs rétroviraux codant pour une hormone de croissance puis la greffe de ces cellules génétiquement modifiées chez la souris athymique permirent d'observer une production de l'hormone de croissance humaine pendant plusieurs semaines dans le plasma des souris (Teumer et al., 1990). Cette approche a ensuite été appliquée à la production du facteur de coagulation IX, dont la déficience est responsable de l'hémophilie de type B (Gerrard et al., 1993; White et al., 1998), et plus récemment à la sécrétion d'érythropoïétine (Scheidemann et al.,

2008). La maîtrise du taux de la protéine thérapeutique dans le sang reste toutefois la principale limite de ce type d'approche.

II.3. Correction génétique des génodermatoses

II.3.a. Cahier des charges

La correction génétique des affections héréditaires touchant la peau nécessite une expression à très long terme du gène thérapeutique. Dans ce but, il faut : (i) cibler le compartiment des cellules souches épidermiques ; (ii) permettre l'intégration du matériel génétique dans le génome de la cellule hôte afin d'assurer la persistance du transgène lors du renouvellement de l'épiderme, tout en évitant l'interruption de gènes vitaux ou l'activation d'oncogènes ; (iii) préserver l'intégrité des potentiels de prolifération et de différenciation des cellules génétiquement manipulées ; (iv) limiter les réponses immunitaires de l'organisme hôte envers les cellules génétiquement manipulées. En outre, dans le cas des génodermatoses associées à une prédisposition au cancer de la peau, en particulier le xeroderma pigmentosum ou les épidermolyses bulleuses dystrophiques, la sélection des cellules génétiquement corrigées est une exigence supplémentaire à prendre à compte. Il est en effet nécessaire, pour ces pathologies, de limiter la possibilité de réimplanter chez le patient des cellules susceptibles d'initier une tumeur dans le greffon.

II.3.b. Quel vecteur et quelle approche pour la correction génétique des génodermatoses ?

Pour assurer une expression permanente du gène thérapeutique, les vecteurs viraux intégratifs (lentivirus, gamma-rétrovirus, AAV) sont actuellement les meilleurs candidats. Encore peu d'études documentent l'utilisation des AAV dans la peau et leur efficacité pour la transduction des kératinocytes est encore controversée (Braun-Falco et al., 1999; Gagnoux-Palacios et al., 2005). De plus, la faible capacité cargo de ces vecteurs (< 5 kb) limite leur utilisation pour la correction des génodermatoses. Le développement des vecteurs lentiviraux offre de nouvelles perspectives pour la thérapie génique cutanée en raison de la capacité de ces derniers à infecter les cellules non prolifératives. Comme il est admis que les cellules souches sont maintenues dans un état de quiescence au sein du tissu cutané, seul un vecteur capable de transduire efficacement les cellules non prolifératives peut être utilisé pour cibler le compartiment souche *in vivo*. Ainsi, les lentivirus constituent un outil plus performant que les gamma-rétrovirus pour le transfert de gènes *in vivo*, par injection directe dans la peau (Baek et al., 2001; Ghazizadeh et al., 2004; Hachiya et al., 2007). La thérapie génique *in vivo* permettrait d'alléger la prise en charge clinique des patients et d'éviter le lourd processus de greffe, souvent associé à des problèmes d'ordre esthétique. Cependant, en termes d'évaluation de la bio-sécurité, la thérapie génique *ex vivo* présente de nombreux avantages

par rapport au transfert de gènes *in vivo*. Les kératinocytes transduits *ex vivo* peuvent en effet être complètement caractérisés avant leur réimplantation chez le patient. En outre, seule l'approche *ex vivo* permet l'enrichissement de la population réintroduite chez le patient en cellules efficacement corrigées. Les vecteurs rétroviraux dérivés de MMLV ont permis les premières approches de thérapie génique cutanée *ex vivo* (Morgan et al., 1987) et restent à ce jour les plus couramment utilisés. Toutefois, les dernières générations de vecteurs lentiviraux sont autant, voire plus, efficaces que les vecteurs MMLV pour la transduction des kératinocytes primaires *ex vivo* (Gagnoux-Palacios et al., 2005; Serrano et al., 2003) et leur utilisation pour la thérapie génique des affections cutanées pourrait bientôt détrôner celle des gamma-rétrovirus.

III. Avancées dans la thérapie génique des génodermatoses

III.1. Thérapie génique des ichthyoses et des épidermolyses bulleuses

Beaucoup d'approches de thérapie génique cutanée se sont dirigées vers les affections résultant de mutations sur les gènes codant pour des protéines impliquées dans la structure de l'épiderme (voir tableau 9). Parmi elles, les **ichthyoses** ont fait l'objet des premiers essais de correction génétique *ex vivo* des kératinocytes primaires à l'aide de rétrovirus. **L'ichthyose lamellaire** est un désordre cutané caractérisé par un défaut sévère de la différenciation terminale résultant d'une mutation dans le gène codant pour la transglutaminase 1 (*TSG1*), une enzyme essentielle à la formation de l'enveloppe cornée. La transduction *ex vivo* des kératinocytes d'un patient atteint d'ichthyose lamellaire à l'aide de vecteurs rétroviraux permettant l'expression de l'ADNc *TSG1*, puis la greffe chez la souris athymique de peaux reconstruites à partir de ces cellules permettent d'observer, en quelques semaines, une normalisation et une restauration de la fonction barrière de l'épiderme (Choate et al., 1996a; Choate et al., 1996b). Le même type de protocole a ensuite été adapté à la correction génétique *ex vivo* de kératinocytes issus de patients atteints d'**ichthyose liée à l'X**. Cette maladie qui affecte également la différenciation terminale des kératinocytes en raison d'une mutation dans le gène codant pour la stéroïde sulfatase, dont la déficience conduit à une accumulation de cholestérol dans la couche cornée (Freiberg et al., 1997).

Les **épidermolyses bulleuses** sont des maladies « mécano-bulleuses » résultant de mutations dans les gènes dont les produits sont impliqués dans l'assemblage du cytosquelette et/ou la cohésion dermo-épidermique. Elles se caractérisent par une extrême fragilité de la peau et la formation de « bulles » ou vésicules au moindre traumatisme physique ou aux endroits soumis régulièrement aux frottements (coudes, genoux).

L'épidermolyse bulleuse simplex (EBS) est un désordre autosomique à transmission dominante résultant de mutations dans les gènes codant pour les kératines K5 ou K14 (Bonifas et al., 1991; Coulombe et al., 1991) ou, dans le cas de l'EBS liée à une dystrophie musculaire, dans le gène codant pour la plectine (*PLEC1*) (Smith et al., 1996). Ces protéines sont essentielles à l'assemblage et à l'ancrage du cytosquelette dans les kératinocytes de la couche basale. La thérapie génique de l'EBS est complexe car les approches thérapeutiques doivent permettre de supprimer l'expression des protéines à effet dominant négatif. La technologie SMaRT pourrait constituer une approche intéressante pour le traitement de l'EBS, la preuve de concept ayant été rapportée récemment pour la réparation du gène *PLEC1* dans un modèle *in vitro* d'EBS (Wally et al., 2008).

L'épidermolyse bulleuse jonctionnelle (EBJ) est une maladie autosomique et récessive liée à une mutation dans l'un des six gènes codant pour les trois composants essentiels des hémidesmosomes : les trois chaînes qui constituent la laminine 332 (*LAMA3*, *LAMB3*, *LAMC2*), le collagène XVII (*COL17A1*) ou les intégrines $\alpha 6/\beta 4$ (*ITGA6*, *ITGB4*) peuvent être affectés dans l'EBJ (McGrath et al., 1995; Vidal et al., 1995). La restauration de l'expression d'une laminine 332 fonctionnelle dans les kératinocytes de patients atteints d'EBJ a été réalisée à l'aide de vecteurs rétroviraux (Dellambra et al., 1998; Robbins et al., 2001; Vailly et al., 1998), à l'aide de vecteurs lentiviraux permettant une expression ciblée du transgène dans la couche basale (promoteur du gène *K14*) (Di Nunzio et al., 2008) ou grâce à des approches non virales par le biais de l'intégrase $\phi C31$ (Ortiz-Urda et al., 2002) ou du système transposon *Sleeping Beauty* (Ortiz-Urda et al., 2003b). Le collagène XVII et l'intégrine $\beta 4$ ont également été ré-introduits à l'aide de vecteurs rétroviraux dans des kératinocytes primaires de patients EBJ porteurs de mutations dans les gènes *COL17A1* (Seitz et al., 1999) et *ITGB4* (Dellambra et al., 2001), respectivement. Dans tous les cas, la ré-expression des composants des hémidesmosomes permet de restaurer l'adhésion cellulaire et la capacité clonogénique des kératinocytes EBJ. En outre, les kératinocytes génétiquement corrigés permettent de régénérer *in vivo*, chez la souris immunodéficiente, de la peau présentant toutes les caractéristiques d'une peau normale, avec un assemblage correct des hémidesmosomes.

Le succès de ces études précliniques a donné lieu récemment au premier essai clinique de thérapie génique cutanée *ex vivo* ciblant une génodermatose (Mavilio et al., 2006). Les kératinocytes d'un patient atteint d'une EBJ liée à une mutation dans le gène *LAMB3* ont été transduits *ex vivo* à l'aide d'un vecteur rétroviral dérivé de MMLV permettant l'expression de l'ADNc *LAMB3* sous le contrôle des LTR viraux (figure 47). Des feuilletts épidermiques réalisés à partir de ces kératinocytes génétiquement corrigés ont ensuite été greffés sur les jambes du patient. Une restauration de la synthèse et de l'assemblage d'une laminine 332 fonctionnelle est observée dans les greffes, permettant la formation d'un épiderme adhérent stablement au derme. Aucune infection, inflammation ou réponse immunitaire dirigée contre les cellules transduites n'a été

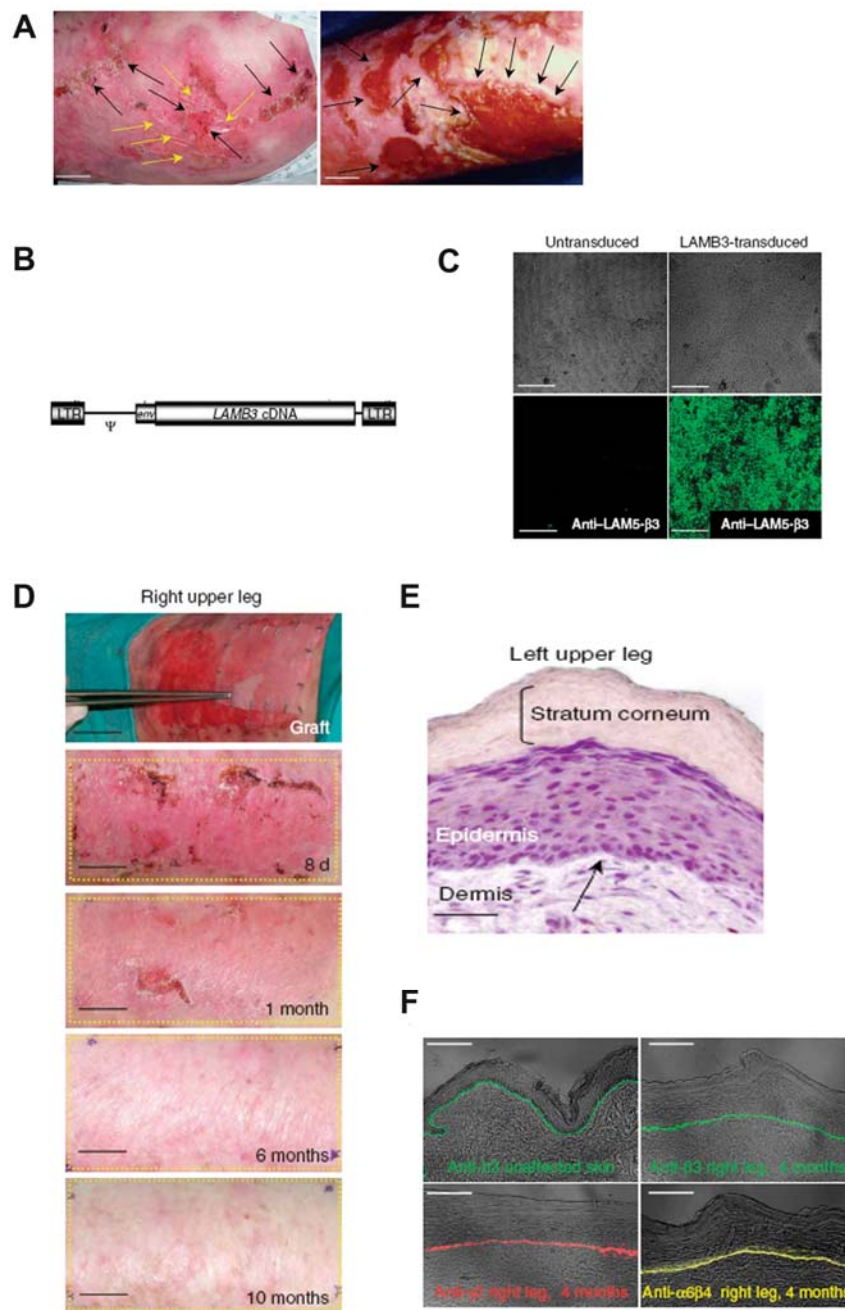


Figure 47 : Premier essai clinique de correction génétique *ex vivo* de l'épidermolyse bulleuse jonctionnelle (Mavilio et al., 2006).

(A) La déficience en LAM5-β3 (chaîne β3 de la laminine 332) provoque la formation de cloques (flèches jaunes) qui dérivent en croûtes (à gauche, flèches noires) ou en lésions non cicatrisées infectées (à droite, flèches noires). (B) Vecteur dérivé de MMLV utilisé pour le transfert de l'ADNc complet de *LAMB3*. (C) Ré-expression de la protéine LAM5-β3 dans les kératinocytes transduits en culture (en vert). (D) Aspect des feuilletts épidermiques génétiquement corrigés au moment de la greffe, puis aspect de la peau régénérée au cours du temps. Noter l'absence de cloques et de lésions cicatricielles. (E) Histologie de la peau génétiquement corrigée 4 mois après la greffe. L'épiderme est correctement stratifié et différencié (l'épaisseur de la couche cornée est caractéristique de l'épiderme de la paume, où ont été prélevés les kératinocytes transduits). Noter la cohésion de l'épiderme et du derme (flèche noire) qui fait habituellement défaut chez les patients EBJ. (F) Expression des marqueurs de la JDE dans la peau régénérée : LAM5-β3 (en vert : à gauche, individu non EBJ ; à droite, patient EBJ traité), LAM5-γ2 (en rouge), intégrine α6β4 (en jaune).

rapportée au cours des trois années de suivi du patient. Le succès de cet essai suscite un immense espoir pour le traitement des nombreuses génodermatoses candidates à ce type d'approche.

L'épidermolyse bulleuse dystrophique (EBD) est une maladie autosomique dominante (EBDD) ou récessive (EBDR) lié à des mutations dans le gène codant pour le collagène VII (*COL7A1*), une fibre d'ancrage essentielle à l'adhérence entre le derme et l'épiderme (Hovnanian et al., 1992). Dans la forme la plus sévère de cette maladie, l'EBD récessive d'Hallopeau-Siemens, les lésions peuvent progresser en carcinomes spinocellulaires agressifs. La thérapie génique de l'EBD est rendue difficile par la taille élevée de l'ADNc *COL7A1* (~9 kb) qui approche la capacité cargo limite des rétrovirus de type MMLV. La correction par transfert de gène des kératinocytes de patients atteints d'EBDR a été réalisée *in vitro* à l'aide de vecteurs lentiviraux SIN (Chen et al., 2002) ou grâce à l'intégrase ϕ C31 (Ortiz-Urda et al., 2002). Les kératinocytes primaires humains transduits à l'aide de vecteurs rétroviraux de type MMLV portant l'ADNc *COL7A1* complet permettent la régénération *in vitro* et *in vivo* chez la souris athymique d'une peau présentant toutes les caractéristiques d'une peau normale (Gache et al., 2004). Dans le cadre de l'EBDR, la sécrétion du collagène VII par des fibroblastes normaux (Wong et al., 2008; Woodley et al., 2003) ou par des fibroblastes EBDR génétiquement corrigés *ex vivo* (Ortiz-Urda et al., 2003a; Woodley et al., 2003) est suffisante pour restaurer la formation de fibres d'ancrage au niveau de la jonction dermo-épidermique (JDE). Des approches de thérapie *in vivo* ont été également testées : ainsi l'injection directe de collagène VII recombinant (Woodley et al., 2004a) ou de lentivirus codant pour *COL7A1* (Woodley et al., 2004b) dans une peau humaine régénérée chez la souris immunodéficiente à partir de kératinocytes EBDR permettent d'observer une amélioration de la JDE grâce à la formation de fibres d'ancrage fonctionnelles.

III.2. Thérapie génique du xeroderma pigmentosum

Comme dans le cas des épidermolyses bulleuses, l'absence de traitement efficace pour les patients XP encourage les approches de correction génétique *ex vivo* des kératinocytes épidermiques. Dans un premier temps, l'efficacité de l'utilisation des vecteurs rétroviraux pour corriger les défauts génétiques des cellules XP a été démontrée dans des fibroblastes primaires issus de patients appartenant aux groupes XP-A, XP-B, XP-C et XP-D (Carreau et al., 1995; Quilliet et al., 1996; Quilliet et al., 1997; Zeng et al., 1997). Les fibroblastes transduits retrouvent une capacité de réparation de l'ADN par la NER et une survie après UV normales. En outre, certains défauts secondaires observés dans les cellules XP, comme une déficience en catalase (Quilliet et al., 1997) ou une stabilisation prolongée de p53 (Dumaz et al., 1998), sont également corrigés dans les fibroblastes transduits. Ces études ont permis de poser les jalons de la correction génétique des kératinocytes XP.

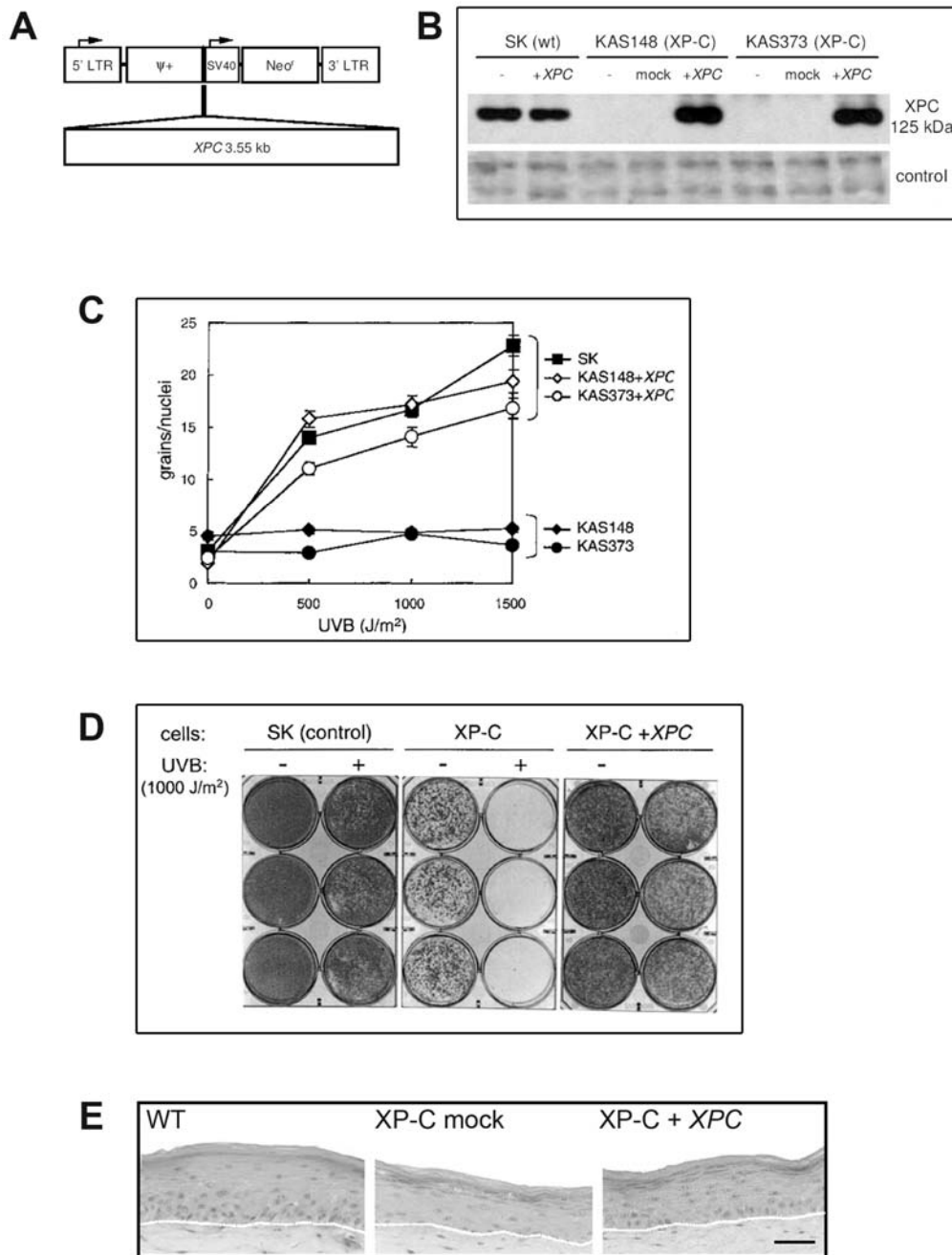


Figure 48 : Correction génétique *ex vivo* des kératinocytes XP-C.

(A) Vecteur rétroviral LXPCSN dérivé de MMLV. Le gène *neo*, dont le produit confère la résistance à la néomycine, est utilisé pour sélectionner les kératinocytes efficacement transduits. **(B)** Ré-expression de la protéine XPC après transduction *ex vivo* de kératinocytes primaires de patients XP-C. L'anticorps utilisé est dirigé contre la partie C-terminale de la protéine XPC. La majorité des mutations touchant le gène *XPC* provoquent l'apparition d'un codon stop prématuré et prédisent la production de protéines tronquées au niveau de leur partie C-terminale. Celles-ci (si elles existent) ne sont donc pas détectées dans les cellules XP-C. **(C)** Restauration de la réparation par excision de nucléotides mesurée par UDS (unscheduled DNA synthesis). Le nombre de grains est corrélé au nombre de foyers de réparation. **(D)** Restauration de la survie cellulaire après UV. Noter que la prolifération cellulaire en l'absence d'UV est altérée dans les cellules XP-C et que la correction génétique rétablit une prolifération normale. **(E)** Cultures organotypiques *in vitro*. Les étapes de transduction et de sélection n'altèrent pas la capacité des kératinocytes XP-C transduits à former un épiderme stratifié et différencié (Arnaudeau et al., 2003).

Parmi tous les groupes de complémentation, le groupe XP-C apparaît comme le meilleur candidat pour les approches de thérapie génique cutanée. Le groupe XP-C regroupe en effet plus de 50% des patients XP en Europe Occidentale, en Afrique du Nord et aux Etats-Unis, et les patients XP-C ne présentent pas les symptômes neurologiques observés dans d'autres groupes. La réintroduction *ex vivo* du gène *XPC* dans des kératinocytes primaires issus de patients XP-C a été réalisée au sein de notre laboratoire à l'aide de vecteurs rétroviraux dérivés de MMLV (Arnaudeau et al., 2003). Dans cette construction, l'expression du gène *XPC* est placée sous le contrôle des LTR viraux et l'expression simultanée du gène de résistance à la néomycine (*neo*) permet la sélection des cellules transduites (figure 48). Les kératinocytes XP-C corrigés ré-expriment une protéine *XPC* fonctionnelle qui restaure la capacité de réparation de l'ADN et la survie cellulaire après UV. Les kératinocytes corrigés permettent en outre la reconstruction *in vitro* d'un épiderme normalement stratifié et différencié. Cependant, le passage sérié des kératinocytes transduits (1 passage/semaine) a montré que l'expression de la protéine *XPC* était perdue en moins de 8 semaines (données non publiées). Un mauvais ciblage des cellules souches et/ou une altération de leur potentiel de prolifération en raison de l'utilisation de l'antibiotique G418/généticine pourraient expliquer cette perte précoce de l'expression de la protéine *XPC* dans les kératinocytes transduits. Ces éléments ont constitué un encouragement fort au développement d'une stratégie de sélection alternative autorisant l'évaluation à long terme de la correction génétique des kératinocytes XP-C *in vitro* et *in vivo* (voir Chapitre Objectifs de la thèse).

Récemment, des vecteurs lentiviraux dérivés de HIV-1 permettant l'expression des gènes *XPA*, *XPC* ou *XPB* ont été développés (Marchetto et al., 2006). La transduction *in vitro* de fibroblastes transformés XP-A, XP-C et XP-D à l'aide de ces vecteurs permet de restaurer la capacité de réparation par la NER et la survie cellulaire après UV. En outre, la résistance aux UV des cellules corrigées persiste trois mois après la transduction, démontrant l'expression à long terme du transgène dans ces cellules. L'utilisation des vecteurs lentiviraux n'a pas encore été validée *in vivo* sur des modèles murins XP. Les auteurs suggèrent toutefois un intérêt majeur de ces virus pour mieux comprendre les désordres neurologiques affectant certains patients XP, en raison de leur capacité à infecter les neurones post-mitotiques (Menck et al., 2007).

Des adénovirus recombinants portant l'ADNc des gènes *XPA*, *XPC* ou *XPB* ont également été développés par le même groupe. Ces vecteurs permettent de corriger le phénotype XP de fibroblastes transformés dérivés des groupes XP-A, XP-C ou XP-D (Armellini et al., 2005; Muotri et al., 2002). De plus, bien que la transduction par des adénovirus mène généralement à une expression transitoire du transgène, une expression stable du gène *XPA* a pu être observée pendant deux mois dans les fibroblastes XP-A corrigés (Muotri et al., 2002). Ce résultat a permis la validation des adénovirus portant l'ADNc du gène *XPA* humain (*AdXPA*) *in vivo* chez la souris *XPA* ^{-/-} (Marchetto et

al., 2004). Les souris déficientes en XPA développent de nombreuses tumeurs cutanées suite à une irradiation UV (Tanaka et al., 2001). L'injection des vecteurs AdXPA dans la peau des souris XPA $-/-$ permet l'expression de la protéine XPA humaine dans les kératinocytes épidermiques murins, mais également dans les fibroblastes. L'irradiation des souris avec un rayonnement UVB (3.4 kJ/m²/jour pendant 4 jours) provoque chez les souris XPA $-/-$ la formation de tumeurs cutanées de type CSC au bout de 5 à 6 mois. En revanche, les souris wild-type et les souris XPA $-/-$ injectées avec les vecteurs AdXPA ne développent aucune tumeur cutanée. Ces résultats ont permis de montrer pour la première fois l'effet protecteur de la thérapie génique contre le développement de tumeurs cutanées dans un modèle XP. Cependant, l'utilisation des adénovirus chez les patients XP est compromise par la forte réponse immunitaire induite par ces virus, notamment en cas d'administrations répétées qui s'avèreraient sans doute nécessaires pour le traitement à long terme des patients XP. Des vecteurs de type AAV permettant le transfert de gènes dans les cellules XP sont en cours de développement dans ce même laboratoire (Menck et al., 2007).

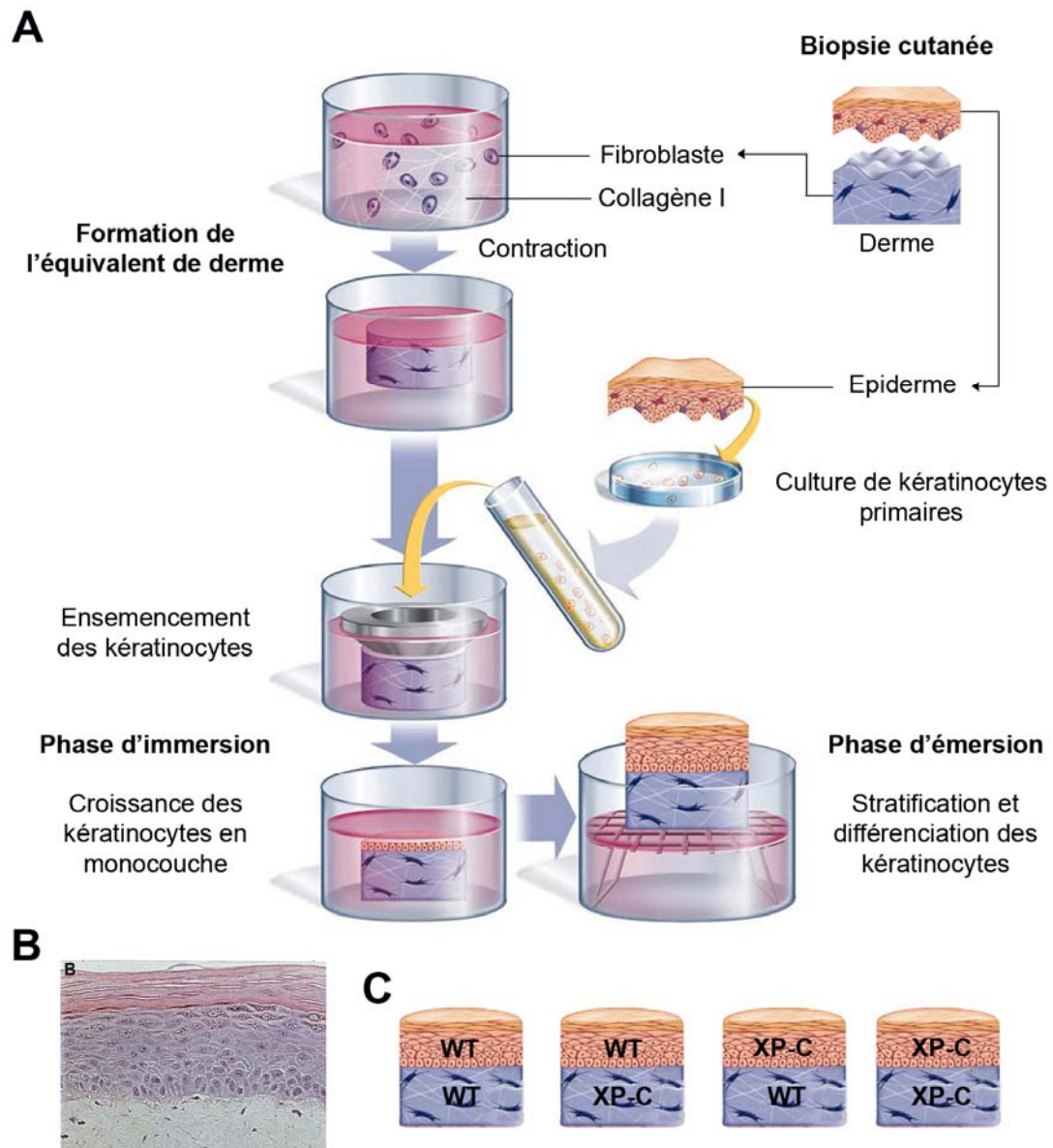


Figure 49 : Peaux reconstruites *in vitro*.

(A) Les fibroblastes et les kératinocytes sont isolés à partir de petites biopsies de peau humaine saine non photo-exposée. Les fibroblastes sont mélangés à une solution de collagène de type I pour former, après contraction, l'équivalent de derme (« lattice »). Les kératinocytes sont ensuite ensemencés sur l'équivalent de derme et placés en immersion pendant 7 jours. Au cours de cette phase, ils prolifèrent et recouvrent la surface du derme. Les lattices sont alors placées à l'interface air/liquide pour favoriser la stratification et la différenciation des kératinocytes. Au bout de 7 à 8 jours, un épithélium stratifié squameux avec une architecture proche de l'épiderme humain est obtenu **(B)**. **(C)** Ce protocole autorise la formation de peaux « composites » reconstruites à partir de kératinocytes et de fibroblastes de différents donneurs (WT, XP-C, etc.).

OBJECTIFS DE LA THESE

A. Caractérisation des cellules cutanées issues de patients XP-C : un rôle pour la protéine XPC au-delà de la NER ?

Les cultures organotypiques de peau (ou « peaux reconstruites *in vitro*») permettent d'étudier le phénotype des kératinocytes et des fibroblastes dans un contexte tridimensionnel proche de l'architecture d'une peau humaine normale (Bernerd et al., 2005) (figure 49). La technique autorise en outre la fabrication de peaux « composites » réalisées à partir de fibroblastes et de kératinocytes de génotypes différents (ex. un épiderme contrôle (wild-type, WT) sur un derme XP-C, ou inversement). Cette flexibilité facilite l'étude des interactions entre le derme et l'épiderme en permettant de visualiser directement l'influence d'un compartiment sur l'autre. De plus, les peaux reconstruites peuvent être facilement irradiées et/ou traitées par des substances pharmacologiques, ce qui autorise des études souvent proscrites chez les patients. Enfin, elles peuvent être réalisées à partir de cellules génétiquement manipulées et peuvent donc être utilisées pour l'évaluation des approches de thérapie génique cutanée *ex vivo*.

La première reconstruction de peaux XP-C *in vitro* a permis de révéler certaines anomalies intrinsèques jusqu'alors insoupçonnées (Bernerd et al., 2001) (figure 50). Les peaux ont été réalisées à partir de kératinocytes et de fibroblastes XP-C issus de zones non-exposées au soleil (fesse). Pourtant, en l'absence d'exposition aux UV, des altérations de la différenciation et de la prolifération kératinocytaires peuvent être observées dans les peaux XP-C : (1) un retard marqué de la différenciation caractérisé par une expression anormale de l'intégrine $\beta 1$ dans les couches suprabasales de l'épiderme, accompagnée par une expression tardive des marqueurs précoces de la différenciation (kératine K10) et une quasi-absence des marqueurs tardifs (loricrine) (figure 50A) ; (2) une augmentation du nombre de cellules exprimant le marqueur Ki67, c'est-à-dire des cellules engagées dans le cycle cellulaire (hors G0), dans la couche basale de l'épiderme (figure 50B). Certaines altérations de la différenciation ont été retrouvées *in vivo* sur les coupes de peau XP-C (collaboration A. Spatz (IGR), données non publiées), ce qui atteste la validité de notre modèle d'étude.

D'autre part, la réalisation de cultures organotypiques « composites » a permis de révéler un rôle majeur des fibroblastes XP-C sur le comportement des kératinocytes sus-jacents. En effet, la présence de fibroblastes XP-C dans l'équivalent de derme provoque la formation d'invasions kératinocytaires dans le derme, qu'il s'agisse de kératinocytes WT ou XP-C (figure 50C). Cette observation rappelle les étapes précoces du développement tumoral et met l'accent sur le rôle essentiel des interactions mésenchyme/épithélium dans le processus de carcinogénèse cutanée.

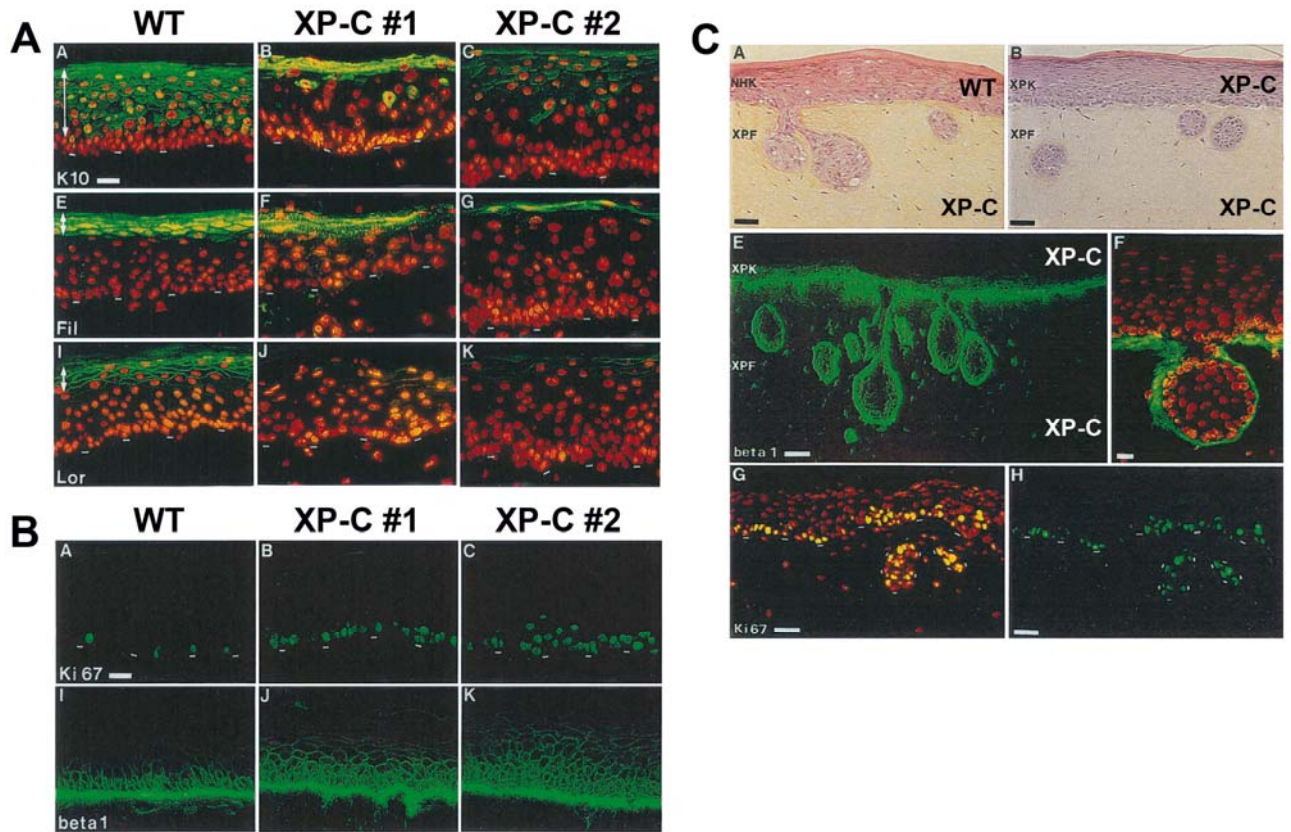


Figure 50 : Peaux reconstruites *in vitro* à partir de kératinocytes et de fibroblastes XP-C.

(A) En l'absence d'exposition UV, les peaux reconstruites XP-C présentent des anomalies spontanées de la différenciation kératinocytaire. Toutes les souches de kératinocytes (WT, XP-C #1 et XP-C #2) sont ensemencées sur des équivalents de derme contenant des fibroblastes WT. Noter le retard et la diminution d'expression de la kératine K10 (A, B, C), de la filaggrine (E, F, G) et de la lorricrine (I, J, K) dans les épidermes XP-C par rapport à l'épiderme WT. **(B)** Une augmentation du nombre de cellules exprimant Ki67 (marqueur des phases du cycle cellulaire hors G0) est observée dans la couche basale des épidermes XP-C (A, B, C). L'intégrine $\beta 1$, qui est normalement déposée au niveau de la couche basale de l'épiderme, est exprimée de manière anormale dans les couches suprabasales des épidermes XP-C (I, J, K). **(C)** Les fibroblastes XP-C induisent la formation d'invasions kératinocytaires dans le derme, aussi bien en présence de kératinocytes WT (A) que de kératinocytes XP-C (B). Le marquage de l'intégrine $\beta 1$ (F, G) montre la continuité entre la couche basale de l'épiderme et les invaginations. La présence de cellules exprimant Ki67 dans les invaginations (G, H) suggère une prolifération des kératinocytes au sein du derme (D'après : Bernerd et al., 2001).

Ces observations nous ont conduits à explorer les questions suivantes :

1) Comment les fibroblastes XP-C favorisent-ils l'invasion des kératinocytes dans le derme ?

Le rôle des fibroblastes XP-C dans le phénotype cutané et la prédisposition des patients XP-C aux cancers cutanés a longtemps été négligé. Nos recherches se sont donc concentrées sur les facteurs sécrétés par les fibroblastes pouvant contribuer à promouvoir l'invasion du derme par les kératinocytes. Outre leur potentiel pro-invasif, les fibroblastes XP-C favorisent également une plus forte contraction des dermes équivalents que les fibroblastes WT (diamètre final inférieur de 25% environ). Or, l'utilisation d'un inhibiteur des métalloprotéinases matricielles (MMPs) (Marimastat) inhibe la contraction des lattices de collagène par les fibroblastes (Scott et al., 1998). En raison de leur implication dans la progression et l'invasion tumorales (Curran and Murray, 1999; Egeblad and Werb, 2002) et dans les phénomènes de vieillissement chronologique (West, 1994) et de photo-vieillesse cutanés (Fisher et al., 1996), les MMPs apparaissent donc comme des candidates particulièrement intéressantes dans le cadre de notre étude. Nous avons ainsi émis l'hypothèse d'une dérégulation de la production et/ou de l'activation des MMPs dans les fibroblastes XP-C. Le profil d'expression des MMPs a donc été étudié dans six souches indépendantes de fibroblastes XP-C cultivés en monocouche ou insérés dans des équivalents de derme. Les résultats de cette étude ont été publiés dans un article présenté dans la **partie A.I du chapitre Résultats**.

2) Quel est l'impact à long terme de l'absence d'une protéine XPC fonctionnelle dans les kératinocytes XP-C ?

Outre les altérations de différenciation et de prolifération observées dans les peaux reconstruites *in vitro*, d'autres anomalies intrinsèques ont été décrites dans les cellules XP-C. Les travaux réalisés au laboratoire ont permis de montrer qu'à l'état basal, en l'absence de stress UV, les kératinocytes issus de patients XP-C présentent une diminution importante du taux de phases S par rapport aux kératinocytes WT (- 40 %) (Arnaudeau et al., 2003). Un défaut d'activité de la catalase (une enzyme antioxydante) a été mis en évidence dans la peau de patients XP et dans des fibroblastes issus de patients appartenant à différents groupes de complémentation, dont le groupe XP-C (Vuillaume et al., 1986; Vuillaume et al., 1992). Les fibroblastes et les kératinocytes XP-C présentent également un ralentissement de la réparation de la 8-oxoG par la BER (D'Errico et al., 2006).

D'autre part, les souris *Xpc* *-/-* accumulent, au cours de leur vie, des mutations spontanées dans le cœur, le foie, les poumons et la rate, avec une fréquence beaucoup plus élevée que les souris *wild-type* (Uehara et al., 2009), ce qui semble indiquer un rôle pour la protéine Xpc dans le maintien de la stabilité du génome à l'état stable.

L'ensemble de ces observations suggère que le défaut d'expression d'une protéine XPC fonctionnelle pourrait jouer, directement ou indirectement, un rôle dans l'émergence d'anomalies spontanées. Pour explorer cette hypothèse, nous avons comparé le profil d'expression génique à l'état stable (sans UV) de trois souches indépendantes de kératinocytes primaires XP-C à celui de trois souches de kératinocytes contrôles (WT). Les résultats de cette analyse transcriptomique sont présentés dans la **partie A.II du chapitre Résultats**.

B. Correction génétique *ex vivo* des kératinocytes XP-C

I. Quelles sont les exigences à respecter pour envisager un protocole de thérapie génique cutanée *ex vivo* pour les patients XP-C ?

Un protocole clinique de thérapie génique *ex vivo* des kératinocytes XP-C consisterait à : (1) prélever une biopsie de peau saine, non photo-exposée chez le patient ; (2) mettre en culture les kératinocytes dans des conditions favorisant le maintien des cellules souches ; (3) transduire les cellules *ex vivo* à l'aide d'un vecteur viral permettant l'expression à long terme d'une version normale de l'ADNc *XPC* ; (4) sélectionner une population pure de kératinocytes génétiquement corrigés en s'assurant de la présence de cellules souches ; (5) greffer chez le patient des feuilletts épidermiques générés à partir des kératinocytes génétiquement corrigés. Dans le cadre d'une perspective de greffe chez les patients XP-C, la sélection des cellules génétiquement corrigées est nécessaire pour limiter la possibilité de réimplanter chez le patient des cellules déficientes en NER susceptibles d'initier une tumeur dans le greffon. Pour des raisons immunitaires, l'utilisation de tout gène de sélection non humain est exclue et l'immunosuppression n'est pas envisageable puisqu'elle favorise le développement des cancers cutanés (Lutz and Heemann, 2003). En outre, la stratégie de sélection utilisée doit préserver le maintien à long terme des cellules souches épidermiques, ce qui ne semble pas être le cas en présence d'antibiotiques comme la généticine (G418) (données non publiées ; Mathor et al., 1996). La méthode classique de sélection grâce à l'expression d'un gène bactérien de résistance à un antibiotique n'est donc pas compatible avec les exigences de la thérapie génique *ex vivo* des kératinocytes XP-C.

II. Développement d'une stratégie de sélection compatible avec ces exigences

En fonction des critères évoqués ci-dessus, une nouvelle stratégie de sélection des kératinocytes génétiquement manipulé a été élaborée au laboratoire (Bergoglio et al., 2007)¹³. Elle repose sur l'utilisation du marqueur de surface CD24, une petite protéine (80 acides aminés) ancrée à la membrane cellulaire via un groupement glycoposphatidyl inositol (GPI) pouvant subir de nombreuses glycosylations. Dans l'épiderme, l'expression de CD24 est restreinte aux cellules suprabasales de l'épiderme. Les cellules de la couche basale, dont certaines sont des cellules souches, n'expriment pas ce marqueur (Magnaldo and Barrandon, 1996) (figure 51).

La stratégie mise en œuvre et illustrée par la figure 51¹⁴. Une culture de masse de kératinocytes primaires est transduite à l'aide de vecteurs rétroviraux permettant l'expression concomitante de CD24 et du gène d'intérêt (gène thérapeutique ou gène traceur comme la GFP). La sélection des cellules transduites se déroule en deux étapes. La première étape consiste à isoler toutes les cellules qui expriment CD24 à leur surface après la transduction grâce à un anticorps spécifique couplé à des billes magnétiques. Seuls les kératinocytes prolifératifs efficacement transduits, qui expriment donc CD24 de façon ectopique, et les kératinocytes différenciés qui expriment CD24 de façon naturelle (et éventuellement ectopique s'ils ont été infectés) seront ainsi isolés. La population kératinocytaire sélectionnée est ensuite remise en culture en conditions standards. A ce stade, une étape de « sélection naturelle » va permettre d'éliminer en un ou deux passages les cellules différenciées car leur potentiel de prolifération est très limité. Grâce à cette stratégie, il est possible d'obtenir, en quelques passages, une population homogène de cellules efficacement transduites et possédant un potentiel prolifératif élevé.

Cette stratégie a été validée dans des kératinocytes primaires normaux transduits à l'aide de vecteurs rétroviraux dérivés de MMLV exprimant la cassette bicistronique *CD24-IRES-GFP*¹⁵ sous le contrôle d'un promoteur hybride LTR/CMV (vecteurs pCMMP *CD24-IRES-GFP*) (Bergoglio et al., 2007). Les résultats de cette étude ont montré que la stratégie CD24 permettait d'obtenir rapidement une population pure (>99%) de kératinocytes efficacement transduits sans altérer leurs capacités de prolifération et de différenciation. Les kératinocytes sélectionnés peuvent être passés pendant 65 semaines sans qu'une diminution d'expression du transgène ne soit observée. En outre, les cellules transduites conservent leur capacité à régénérer de la peau génétiquement modifiée *in vitro* et *in vivo* après greffe sur la souris immunodéficiente (22 semaines, souris Nude).

¹³ Brevet international (Magnaldo and Sarasin, 2001)

¹⁴ Voir aussi l'annexe 2.

¹⁵ Le site interne d'entrée des ribosomes (IRES) assure la traduction des protéines CD24 et GFP à partir du même ARNm.

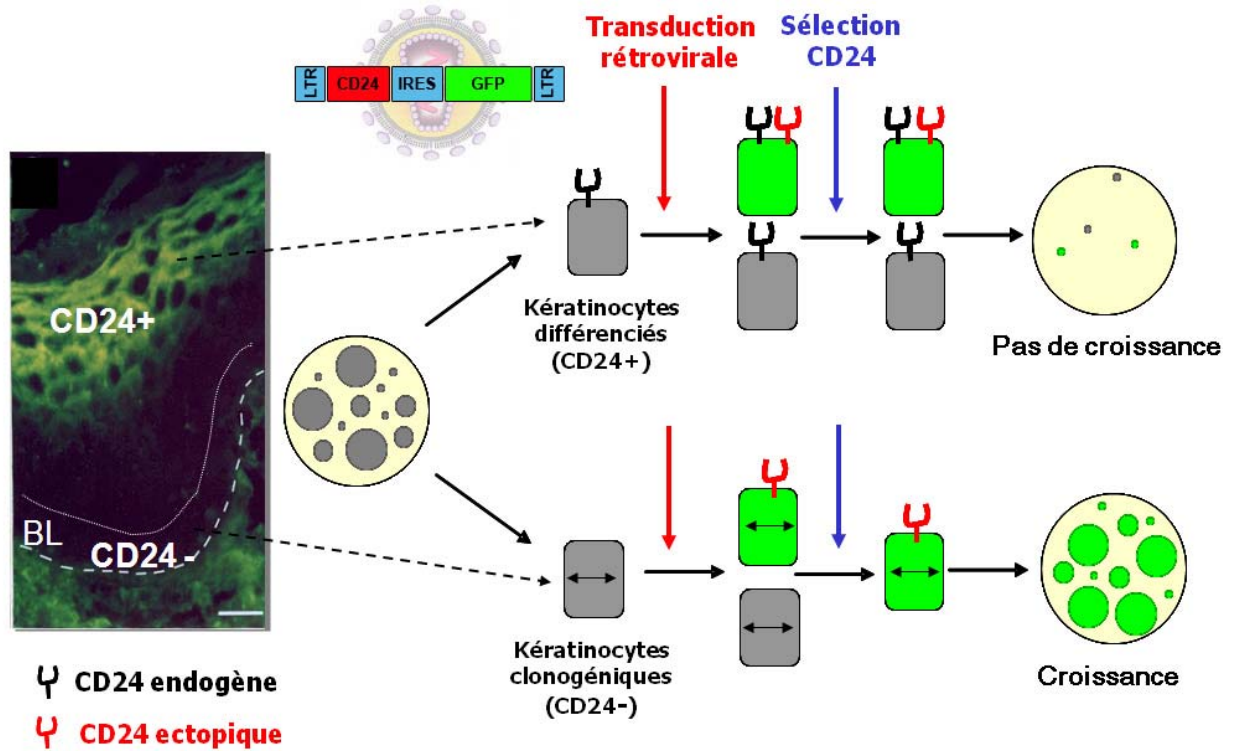


Figure 51 : Stratégie de sélection CD24.

Dans une culture de masse de kératinocytes, seuls les cellules différenciées expriment CD24 de façon endogène. Les kératinocytes sont transduits à l'aide d'un vecteur rétroviral permettant l'expression de CD24 et du gène d'intérêt (ici la GFP). Après transduction, tous les kératinocytes exprimant CD24 sont sélectionnés grâce à un anticorps dirigé contre CD24 et un anticorps secondaire couplé à des billes magnétiques. Après remise en culture des cellules, seuls les kératinocytes clonogéniques efficacement transduits (qui expriment CD24 de façon ectopique) persistent en culture car ce sont les seuls à posséder un fort potentiel prolifératif. IRES, internal ribosome entry site. (D'après : Bergoglio et al., 2007)

III. Application à la correction génétique des kératinocytes XP-C

A l'issue des étapes de validation du système de sélection décrites ci-dessus, l'objectif prioritaire était de développer l'utilisation de cette stratégie pour la correction génétique des kératinocytes primaires XP-C. Des vecteurs rétroviraux dérivés de MMLV exprimant la cassette bicistronique *CD24-IRES-XPC* ont donc été développés au laboratoire et produits par le Généthon (vecteurs pCMMP *CD24-IRES-XPC*).

Notre objectif était alors de répondre aux questions suivantes :

1) Après transduction des kératinocytes XP-C avec les vecteurs rétroviraux pCMMP *CD24-IRES-XPC*, la stratégie CD24 permet-elle d'obtenir une population de kératinocytes contenant des cellules souches efficacement corrigées capables de maintenir l'expression à long terme d'une protéine XPC fonctionnelle *in vitro* ?

2) Les kératinocytes XP-C transduits et sélectionnés sont-ils capables de régénérer un épiderme possédant une capacité normale de réparation des lésions induites par les UV (a) *in vitro* et (b) *in vivo* après greffe sur la souris immunodéficiente ?

L'ensemble des résultats concernant la correction génétique des kératinocytes XP-C sont regroupées dans un article (en préparation) qui est présenté dans la **partie B.I du chapitre Résultats**.

D'autre part, si les kératinocytes XP-C accumulent des anomalies intrinsèques en l'absence d'une protéine XPC fonctionnelle, il nous paraissait important de répondre à la question :

3) Quel est l'effet global de la réexpression stable de la protéine XPC dans les kératinocytes XP-C ?
ou en d'autres termes : **La correction génétique peut-elle vraiment tout corriger ?**

Nous avons donc entrepris de caractériser le profil d'expression génique à l'état stable de trois souches indépendantes de kératinocytes primaires XP-C transduits à l'aide des vecteurs *CD24-IRES-XPC* par comparaison aux souches parentales XP-C. Les résultats de cette analyse transcriptomique sont présentés dans la **partie B.II du chapitre Résultats**.

RESULTATS

A. Caractérisation des cellules cutanées issues de patients XP-C : un rôle pour la protéine XPC au-delà de la NER ?

I. Article n°1 : Les fibroblastes issus de patients atteints de xeroderma pigmentosum de groupe C surexpriment la métalloprotéinase matricielle 1.

La reconstruction de peaux XP-C *in vitro* a permis de mettre en évidence un rôle probable des fibroblastes dans la progression et l'invasion tumorales chez les patients XP-C. En effet, les fibroblastes XP-C induisent l'apparition d'invaginations kératinocytaires dans les équivalents de derme, aussi bien en présence de kératinocytes contrôles (WT) que de kératinocytes XP-C. De plus, en l'absence de toute exposition aux UV, les fibroblastes XP-C présentent une forme allongée et dendritique généralement caractéristique des fibroblastes issus de peaux photo-âgées.

Les métalloprotéinases matricielles (MMP) ont été impliquées dans l'invasion tumorale, le vieillissement chronologique et le photo-vieillessement cutané. Une dérégulation de la production et/ou de l'activation de ces enzymes pourrait permettre d'expliquer le phénotype des fibroblastes XP-C et leur propension à induire l'invasion des kératinocytes dans le derme. Le profil d'expression et de sécrétion des MMPs a donc été analysé par western blot et ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) dans six souches de fibroblastes XP-C cultivés en monocouche ou au sein d'équivalents de derme. En l'absence d'UV, tous les fibroblastes XP-C sur-expriment constitutivement et spécifiquement la MMP1. Une surexpression de la MMP1 est également observée dans le derme de biopsies cutanées non photo-exposées prélevées sur des patients XP-C. Ces données suggèrent donc une implication de la MMP1 dans le vieillissement cutané précoce et la prédisposition des patients XP-C aux carcinomes cutanés. La surexpression de la MMP1 est liée à une augmentation de l'activité transcriptionnelle de son promoteur. L'activation des facteurs AP-1, et notamment de la protéine FOSB2, jouerait un rôle essentiel dans l'accumulation de transcrits *MMP1* dans les fibroblastes XP-C. En parallèle, une augmentation de la quantité d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) est observée dans les fibroblastes XP-C. Au-delà de son implication dans la NER, la protéine XPC pourrait donc avoir un rôle dans le maintien de l'équilibre cellulaire puisque son absence à long terme favorise l'apparition d'anomalies cellulaires en l'absence de toute exposition UV.

ORIGINAL ARTICLE

Overexpression of matrix metalloproteinase 1 in dermal fibroblasts from DNA repair-deficient/cancer-prone xeroderma pigmentosum group C patients

M Fréchet^{1,3}, E Warrick^{1,2,3}, C Vioux², O Chevallier¹, A Spatz¹, S Benhamou¹, A Sarasin¹, F Bernerd² and T Magnaldo¹

¹Genomes and Cancers, CNRS FRE 2939, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France and ²L'Oreal, Life Sciences Advanced Research, Centre C Zviak, Clichy, France

Xeroderma pigmentosum (XP) is a rare, recessively inherited genetic disease characterized by skin cancer proneness and premature aging in photoexposed area. The disease results from defective nucleotide excision repair of ultraviolet (UV)-induced DNA lesions. Reconstruction of group C (XP-C) skin *in vitro* previously suggested that patients' dermal fibroblasts might be involved in promoting skin cancer development, as they elicited microinvasions of both control and XP-C keratinocytes within dermal equivalents. Here we show that in the absence of UV exposure XP-C fibroblasts exhibit aged-like features such as an elongated and dendritic shape. We analysed the repertoire of expression of matrix metalloproteinases (MMPs) involved in skin aging and cancer. All XP-C fibroblasts tested in this study overexpressed specifically and significantly MMP1. MMP1 expression was also found increased in the dermis of XP-C skin sections suggesting the active contribution of XP-C mesenchymal cells to skin aging and exacerbated carcinogenesis. Increased MMP1 expression in cultured XP-C fibroblasts resulted from *MMP1* mRNA accumulation and enhanced transcriptional activity of the *MMP1* gene promoter. Deletion analysis revealed the essential role of AP-1 activation in constitutive MMP1 overexpression in XP-C primary fibroblasts. In parallel, levels of reactive oxygen species and FOSB DNA-binding activity were found increased in XP-C fibroblasts. Altogether, these observations suggest that beyond its role in nucleotide excision repair the XPC protein may be important in cell metabolism and fate in the absence of UV. *Oncogene* (2008) 27, 5223–5232; doi:10.1038/onc.2008.153; published online 12 May 2008

Keywords: xeroderma pigmentosum; skin; cancer; MMP1; AP-1; ROS

Introduction

Exposure to solar light is important in skin photoaging and in the development of basal and squamous cell carcinomas (BCC and SCC), the prevailing types of human cancers (Kraemer, 1997; DePinho, 2000). Solar radiation contains UVB wavelengths (280–315 nm) that induce DNA lesions called cyclobutane pyrimidine dimers (CPD) and pyrimidine 6-4 pyrimidone photo-products (6-4 PP), at bipyrimidine DNA sequences. Both lesions are mutagenic and may provoke tumoral onset. Xeroderma pigmentosum (XP) is a rare (about 1 out of 500 000 newborns) genetic disease inherited as autosomal and recessive traits. XP patients present a high photosensitivity, premature skin aging and a proneness (2000 ×) to BCC and SCC in photoexposed skin areas. Most XP patients fall within one of the seven genetic groups of complementation (XP-A–XP-G) connected to a mutation in one of the 'XP genes' (*XPA–XPG*) involved in nucleotide excision repair (NER). NER is the most versatile repair mechanism dedicated to the removal of bulky DNA adducts including CPD and 6-4 PP (Bootsma *et al.*, 1995). In XP patients, the steady-state behavior as well as the responses of XP cells to ultraviolet (UV) light within the natural, three-dimensional architecture of the skin have received little investigations. Previously, our organotypic skin reconstructions (Bernerd *et al.*, 2001, 2005) revealed that in the absence of exogenous stress XP-C fibroblasts induce epidermal invasions of control and XP-C keratinocytes within the dermal compartment of skin. These observations suggested that dermal fibroblasts could also contribute to the dramatic predisposition of XP-C patients to invasive skin carcinoma (SCC).

Matrix metalloproteinases (MMPs) form a family of metalloendopeptidases responsible for the proteolysis of extracellular matrix (ECM) components upon various biological processes including development, wound healing, aging and carcinogenesis (Egeblad and Werb, 2002; Kerkela *et al.*, 2002; Kerkela and Saarialho-Kere, 2003; Comoglio and Trusolino, 2005). Interestingly, high levels of MMP1 and MMP3 expression have been found at the invasive front of SCC, as well as in surrounding stromal cells (Tsukifuji *et al.*, 1999; Egeblad

Correspondence: Dr T Magnaldo, Instabilité Génétique et Cancer, Institut Gustave-Roussy, rue Camille Desmoulins, Villejuif 94805, France. E-mail: magnaldo@igr.fr and

Dr F Bernerd, L'Oreal, Life Sciences Advanced Research, Centre C Zviak, 90, Rue du Général Roguet, 92583 Clichy, France. E-mail: fbernerd@rd.loreal.com

³These authors contributed equally to this work.

Received 1 September 2006; revised 25 March 2008; accepted 8 April 2008; published online 12 May 2008

and Werb, 2002). Activity of MMPs has also been shown to be involved in the release of a range of regulatory proteins associated with ECM components such as growth factors and their receptors, cytokines and chemokines (Vu and Werb, 2000; Sternlicht and Werb, 2001; Stamenkovic, 2003).

Here, we investigated expression of MMPs in XP-C fibroblasts and report that levels of MMP1 protein and mRNA are significantly increased in XP-C compared to control fibroblasts resulting from enhanced activity of the *MMP1* gene promoter. These differences were observed along with significant accumulation of reactive oxygen species (ROS), in the absence of external genotoxic stress, suggesting that the function of the XPC protein extends beyond NER. Thus, the absence of XPC could also indirectly contribute to tumoral invasion in XP patients.

Results

XP-C primary fibroblasts exhibit an aged-like phenotype

The phenotype of XP-C fibroblasts was studied in the three-dimensional environment of a collagen I dermal equivalent (three and six independent strains of either control (non-XP) or XP-C primary dermal fibroblasts, respectively). At 24 h after the beginning of the contraction, dermal equivalents containing XP-C fibroblasts were systematically smaller (about 11%) than those containing control fibroblasts (data not shown). To assess the morphology of XP-C fibroblasts, sections

of control and XP-C dermal equivalents were immunolabelled for vimentin, a marker for adult mesenchymal cells, and for $\beta 1$ -integrin, a subunit of the membrane receptor participating to the anchorage of fibroblasts to collagen I fibers. XP-C fibroblasts were about twice as long as control fibroblasts (control: 54 μm ; XP-C: 102 μm) and also exhibited a higher dendricity (Figure 1).

Increased MMP1 expression in XP-C fibroblasts

The secretion of MMP1, 2, 3, 7, 9 and 13 was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in culture supernatants of control and XP-C fibroblasts cultured either as monolayers (Figure 2a, left panel) or in dermal equivalents (Figure 2a, right panel). In both culture conditions, only MMP1, 2 and 3 could reliably be detected. Levels of MMP2 and MMP3 secreted by XP-C fibroblasts monolayers were similar to those of control fibroblasts, whereas MMP1 secretion was significantly increased (7.3-fold, $P < 0.025$) in culture supernatants of XP-C fibroblasts (Figure 2a, left panel). Importantly, MMP1 increase was not related to the age of donors ($P > 0.05$, Pearson's correlation test). Secretion of MMP1 (2.6-fold) and, in a lesser extent, of MMP3 (2.1-fold) but not of MMP2, was also found substantially increased in culture supernatants of XP-C dermal equivalents compared to controls (Figure 2a, right panel). Western blot analysis of proteins present in culture supernatants (Figure 2b, upper panel) confirmed increased MMP1 secretion by XP-C compared to control fibroblasts (monolayers and dermal

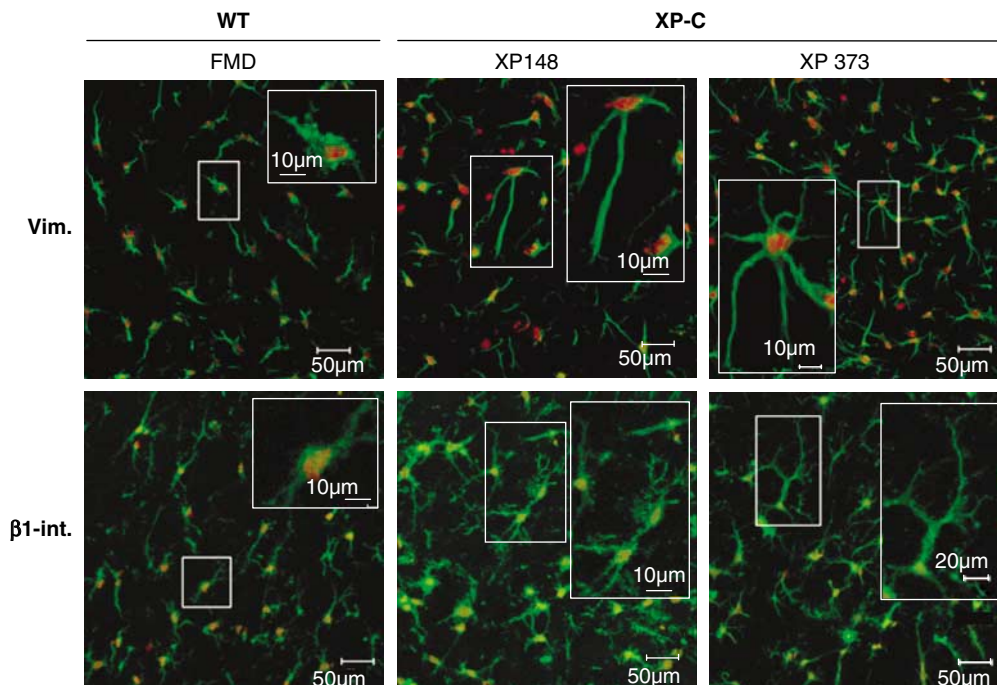


Figure 1 Phenotype of xeroderma pigmentosum group C (XP-C) fibroblasts embedded in a dermal equivalent. Confocal analysis of 30 μm cryosections of control and XP-C dermal equivalents immunolabelled for vimentin or $\beta 1$ -integrin. Note that XP-C fibroblasts are much larger and more dendritic than control fibroblasts. Vim, vimentin; $\beta 1$ -int, $\beta 1$ -integrin.

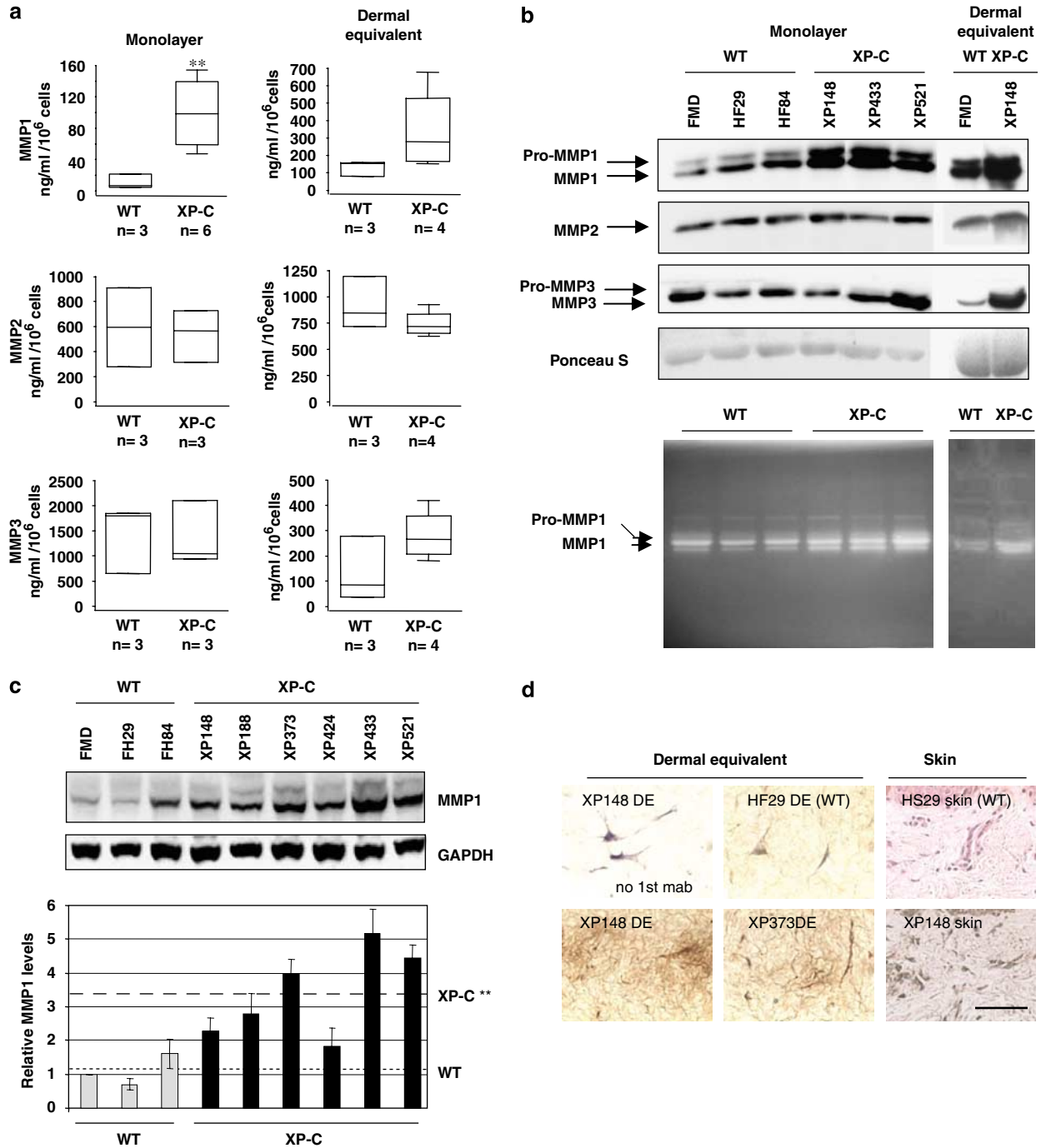


Figure 2 Increased production of matrix metalloproteinase 1 (MMP1) in xeroderma pigmentosum group C (XP-C) fibroblasts. (a) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) analysis of secreted MMPs in supernatants of control (wild-type (WT): FMD, HF29 and HF84) and xeroderma pigmentosum group C (XP-C) fibroblasts cultured as monolayers ($n=3$: XP148, XP433, XP521; $n=6$: XP148, XP188, XP373, XP424, XP433, XP521) or in dermal equivalents ($n=4$: XP148, XP188, XP373 and XP521). In both culture conditions, XP-C fibroblasts secrete more MMP1 than control fibroblasts (** $P<0.025$). (b) Upper panel: western blot analysis of secreted MMPs in supernatants of control (WT) and XP-C fibroblasts cultured as indicated. Lower panel: casein gel zymography of secreted MMPs in supernatants of control and XP-C fibroblasts. Note increased digestion of the substrate by culture supernatants of XP-C fibroblasts. (c) Upper panel: immunoblotting of intracellular protein extracts from control and XP-C fibroblasts. Lower panel: blot quantification of intracellular MMP1. For each strain, MMP1 level was normalized to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) level. Data are represented as mean \pm s.e.m. of three independent blots and are plotted as fold induction over FMD (control fibroblast strain used as a reference). The mean amounts of MMP1 in WT and XP-C fibroblasts strains are illustrated as a thin and a large dotted line, respectively. The threefold increase of MMP1 in XP-C fibroblasts is significant, ** $P<0.025$. (d) Immunolabeling of MMP1 on 5 μ m paraffin sections of control (HF29) and XP-C (XP148 and XP373) dermal equivalents (DE), and of control human skin (HS29) and XP-C skin (XP148) *ex vivo*, as indicated. The negative control performed by omitting the anti-MMP1 antibody (no 1st mab) illustrates specificity of the labeling. Bar: 150 μ m.

equivalents). Accordingly, zymography analyses indicated higher MMP1 activity in XP-C supernatants (Figure 2b, lower panel). Western blot analysis using total protein extracts from monolayer cultures showed that the level of intracellular MMP1 was also significantly increased (about 3.1-fold, $P < 0.025$) in XP-C compared to controls (Figure 2c). Importantly, immunolabeling of dermal equivalents and skin sections of XP-C patients (when available, $n = 2$) also indicated higher MMP1 staining in XP-C than in controls (Figure 2d).

Amount of *MMP1*, *MMP2* and *MMP3* mRNAs was measured by real-time quantitative PCR on RNA from control and XP-C fibroblasts. Only *MMP1* mRNA was significantly increased (11.5-fold, $P < 0.05$) in XP-C fibroblasts (Figure 3a) compared to controls. As the MMP1 inhibitor TIMP1 can neutralize MMP1 activity, amount of *TIMP1* mRNA was also assessed but no difference was observed between control and XP-C fibroblasts (Figure 3a).

Role of activator protein-1 pathway in increased MMP1 transcription in XP-C fibroblasts

Whether increased amount of *MMP1* mRNA in XP-C fibroblasts resulted from enhanced transcriptional activity was assessed by transient transfection reporter assay using a plasmid construct harboring 4400 bp of the 5'-regulatory region of the human *MMP1* gene (PColl-LUC-4400; Angel *et al.*, 1987; Rutter *et al.*, 1997). Transcriptional activity of the MMP1 reporter construct was found about five times higher ($P < 0.05$) in XP-C compared to control fibroblasts (Figure 3b).

The proximal AP-1 responsive element (position -73 to -67) has been shown to be essential for both basal and AP-1-activated transcription of the *MMP1* gene (Angel *et al.*, 1987; White and Brinckerhoff, 1995). To assess the specific contribution of this AP-1 sequence, the activity of a shorter reporter construct, spanning from nucleotide -73 bp to +63 of the 5'-regulatory sequence of the *MMP1* gene (Angel *et al.*, 1987; Stein *et al.*, 1989) was measured, indicating a 2.2-fold significant ($P < 0.05$) increase in the transcriptional activity in XP-C compared to control fibroblasts (Figure 3c).

AP-1 is a complex transcription factor composed of heterodimer combinations of members of the JUN and FOS families (Karin *et al.*, 1997) that bind to the AP-1 cognate sequence TGA(G/C)TCA to activate or repress transcription. Qualitative and quantitative AP-1 DNA-binding activity was measured in nuclear extracts prepared from primary control and XP-C fibroblasts. Among members of the AP-1 family tested (c-JUN, JUNB, JUND, c-FOS, FOSB, FRA-1 and FRA-2), only FOSB isoforms exhibited a substantially higher functional binding activity (1.4-fold) to the AP-1 DNA sequence in nuclear extracts from XP-C compared to control fibroblasts (Figure 4a). The amount of FOSB2 protein, measured by western blot, was increased in XP-C fibroblasts nuclear extracts (Figure 4b). Surprisingly, functional binding and nuclear expression of phos-

phorylated c-JUN (P-c-JUN) were slightly decreased in XP-C fibroblasts.

Accumulation of ROS in XP-C primary fibroblasts

As the increase of *MMP1* gene transcription in XP-C fibroblasts was observed in the absence of UV exposure, we hypothesized that it could result from deregulated cellular metabolism. Accumulation of ROS was measured by flow cytometry using the CM-H₂DCFDA probe. Figure 5 indicates a 1.5-fold significant ($P < 0.05$) increase in ROS accumulation in XP-C compared to control fibroblasts. Interestingly, treatment of XP148 cells using the antioxidant substance epigallocatechin-*O*-gallate (EGCG) resulted in the decrease of both ROS and secreted MMP1 (Supplementary data 1).

Discussion

We present here one of the very few studies relying on the use of several independent human primary XP-C cells.

Our previous observations suggested that XP-C fibroblasts promote development of carcinoma-like structures *ex vivo* (Bernerd *et al.*, 2001, 2005). Present data further indicate that XP-C primary fibroblasts exhibit increased length and dendricity, some features highly reminiscent of chronically and photoaged skin in individuals from the general population (Fligiel *et al.*, 2003; Varani *et al.*, 2004; Shin *et al.*, 2005), though none of the XP-C cells studied here have a history of exposure to UV light.

In addition, MMP1 expression and secretion were significantly higher in XP-C than in control primary fibroblasts suggesting its contribution in collagen I remodeling and microinvasive propensity of keratinocytes (Bernerd *et al.*, 2001, 2005). Our study had to be limited to six primary strains of XP-C fibroblasts due to the extreme rarity of the disease. Whether MMP1 overexpression is a common, general and specific phenotypic trait of the XP-C complementation group remains to determine, although MMP1 overexpression was observed in all the XP-C strains studied here. In contrast, as suggested in other studies (Khorramizadeh *et al.*, 1999), MMP1 level was not different in one fetal XP-C fibroblast strain (8-month fetus) compared to control postnatal fibroblasts (data not shown). In the general population, MMP1 expression increases with skin aging (Fisher *et al.*, 1996). In XP-C patients, MMP1 overexpression could thus be a worsening actor toward exacerbated premature skin aging and tumor susceptibility.

MMP1 overexpression in XP-C fibroblasts results from higher rates of *MMP1* gene transcription and accumulation of *MMP1* mRNA. In contrast, *TIMP1* mRNA amount was not increased in XP-C fibroblasts compared to controls. Transcription of the *MMP1* gene was shown to be enhanced in response to the UV challenge (Stein *et al.*, 1989), most notably through the activation of AP-1 transcriptional factors (Angel *et al.*,

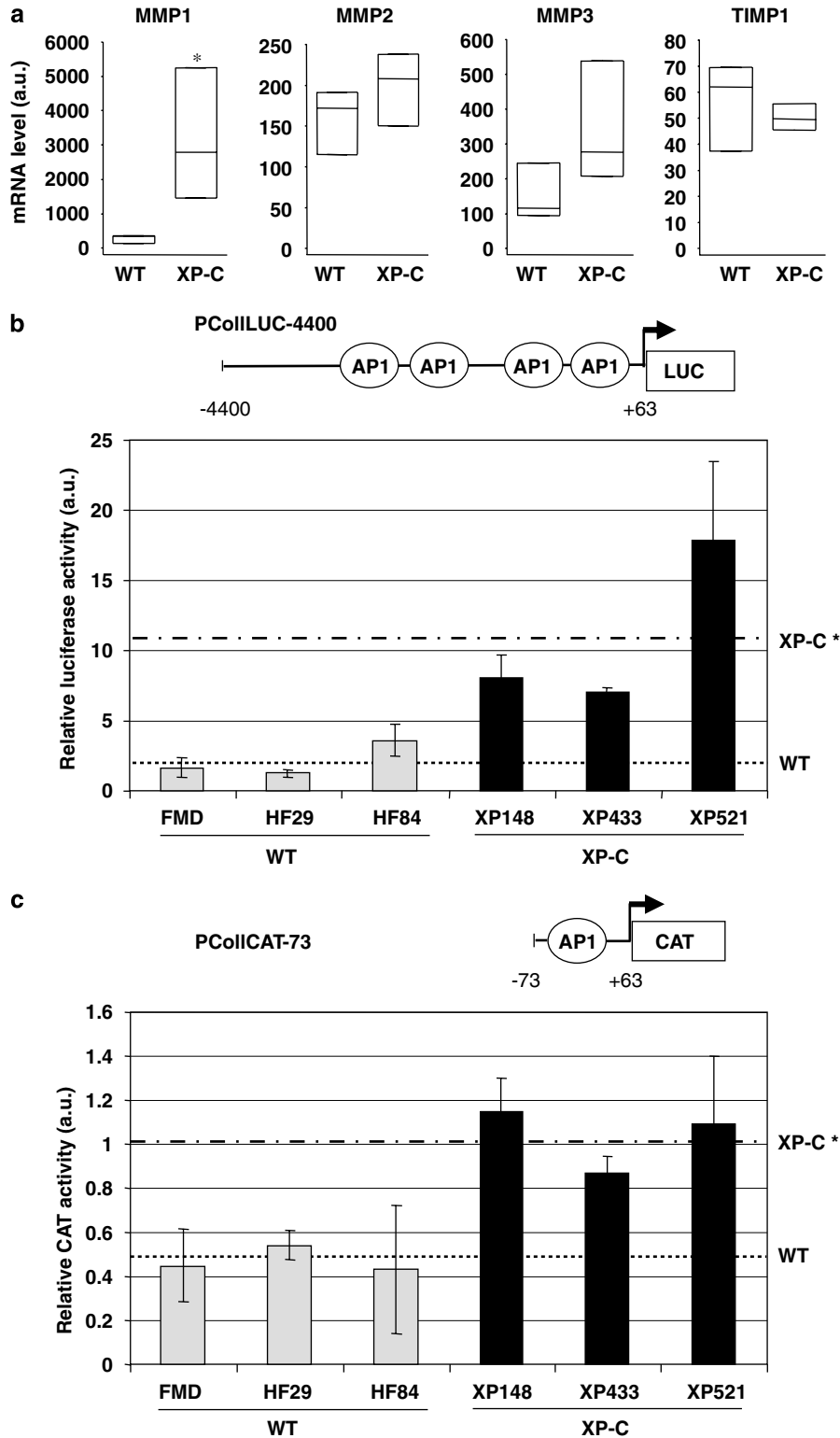


Figure 3 Increased transcription of the matrix metalloproteinase 1 (*MMP1*) gene promoter in xeroderma pigmentosum group C (XP-C) fibroblasts depends on the proximal AP-1 sequence. (a) mRNA levels of *MMP1*, 2, 3 and *TIMP1* in control (wild-type (WT): FMD, HF29 and HF84) and XP-C (XP148, XP433 and XP521) fibroblasts measured by real-time quantitative PCR. Amount of *MMP1* mRNA is significantly higher in XP-C than in control fibroblasts, $*P < 0.05$. (b) Relative transcriptional activity of the full-length (4.4 kb) *MMP1* promoter (pCollLUC -4400) and (c) of the proximal 136 bp 5'-regulatory region spanning from nucleotide -73 to +63 of the *MMP1* gene (pCollCAT-73). As illustrated, full-length and short *MMP1* promoter constructs contain four and one AP-1-binding sequences, respectively. Experiments were repeated at least two times in triplicates. Data are represented as the mean \pm s.d. of triplicates. The mean transcriptional activities in WT and XP-C fibroblasts strains are indicated as a thin and a large dotted line, respectively. $*P < 0.05$; a.u., arbitrary units.

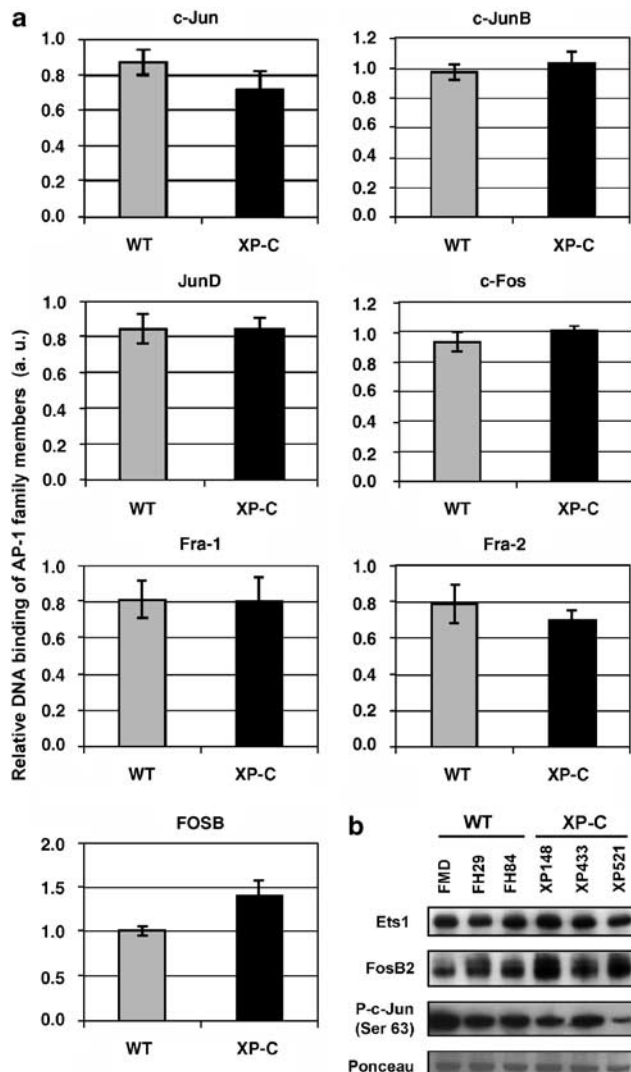


Figure 4 FOSB DNA binding is enhanced in xeroderma pigmentosum group C (XP-C) fibroblasts. **(a)** DNA-binding activity of AP-1 members analysed in nuclear extracts from primary control (wild-type (WT): FMD, HF29 and HF84) and XP-C (XP148, XP373 and XP521) fibroblasts. For each strain, relative DNA-binding activity was expressed as fold induction over FMD (control fibroblast strain used as a reference). Data are represented as mean \pm s.e.m. of the values of two independent experiments performed on two sets of independent nuclear extracts. Note that among all members of the AP-1 family, only FOSB showed a substantial increased binding activity. **(b)** Western blot analysis of phospho-c-JUN (P-c-JUN Ser63), FOSB and ETS1 in nuclear extracts from control and XP-C fibroblasts. Note that the FOSB2 isoform of FOSB appears increased in nuclear extracts from XP-C compared to control fibroblasts whereas P-c-JUN appears decreased. a.u., arbitrary units.

1987). A reporter plasmid containing solely the proximal AP-1 sequence of the human *MMP1* gene was sufficient for driving increased *MMP1* transcription in XP-C fibroblasts. Among members of the AP-1 family, FOSB isoforms (including FOSB and FOSB2) were the only ones presenting substantially increased binding to the AP-1 cognate sequence in nuclear extracts from XP-C fibroblasts. In contrast, DNA-binding and protein

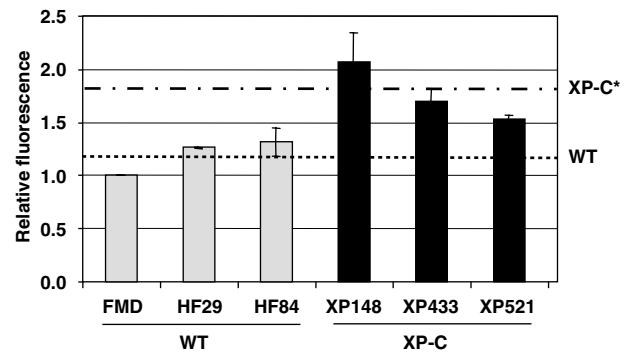


Figure 5 Increased production of intracellular reactive oxygen species (ROS) in xeroderma pigmentosum group C (XP-C) fibroblasts. Control (wild-type, WT) and XP-C fibroblasts were stained with CM-H₂DCFDA and analysed by flow cytometry. ROS levels are expressed as relative fluorescence units. Data are represented as mean \pm m.d. of two independent experiments (see also Supplementary data 1).

expression of P-c-JUN appeared both slightly decreased. These observations could be connected to the capacity of the FOSB2 isoform to form functional homodimers (Jorissen *et al.*, 2007). Alternatively, under some stress circumstances related to acidification, FOSB has been shown to functionally heterodimerize with MafG in DNA-binding complexes (Shimokawa *et al.*, 2005). Whether P-c-JUN decrease and FOSB increase in XP-C fibroblasts are connected or independent events remains to be determined. Interestingly, high FOSB expression has been significantly associated with *MMP1* overexpression in breast carcinomas (Milde-Langosch *et al.*, 2004). In addition, *FOSB* mRNA has been reported to increase upon early contraction of dermal equivalents containing human primary foreskin fibroblasts (Rosenfeldt *et al.*, 1998) and also upon mechanical stress of bone (Inoue *et al.*, 2004). In contrast, the level of ETS1, an other transcription factor that could also be potentially involved in the regulation of *MMP1* gene expression, was found very similar in control and XP-C fibroblasts nuclear extracts (Figure 4). Taken together, these observations suggest that higher contractile properties and *MMP1* overexpression observed in XP-C dermal equivalents could also be linked to increased FOSB binding. This does not exclude, however, the contribution of other transcription factors in upregulation of endogenous *MMP1* gene expression in XP-C fibroblasts.

All observations reported here were obtained in the absence of exogenous stress such as UV irradiation suggesting that AP-1-dependent *MMP1* transcription could be linked to an endogenous metabolic stress. The amount of ROS accumulation indicated higher (about 1.5) level of ROS in XP-C compared to control fibroblasts. These observations are in good agreement with previous reports indicating a lower level of enzymes such as superoxide dismutase (Nishigori *et al.*, 1989) or catalase in XP compared to non-XP fibroblasts (Vuillaume *et al.*, 1992). Activity of these enzymes counteracts ROS accumulation, but their decrease contributes

to aging, genetic instability and cancer development (Chung *et al.*, 2001; Radisky *et al.*, 2005; Cat *et al.*, 2006). Interestingly, recent investigations in HL60 cells have indicated that depletion of glutathione, a potent ROS scavenger, strongly elicits *FOSB* gene transcription in response to hydrogen peroxide (H₂O₂) pro-oxidant stress (Fratelli *et al.*, 2005). Diminished catalase activity and increased H₂O₂ concentration have also been reported in chronically and photoaged skin fibroblasts isolated from the general population. In wild-type (WT) fibroblasts, decreased catalase activity could be associated to the activation of c-JUN N-terminal kinase and P38 stress pathways, leading to increased phosphorylation of c-JUN, and consequently, increased in MMPs expression (Brenneisen *et al.*, 1997; Wenk *et al.*, 1999; Chung *et al.*, 2000; Rhie *et al.*, 2001; Shin *et al.*, 2005). In contrast, *FOSB* expression upon chronological and photo-induced skin aging in the general population has not been determined. Our data, however, suggest that chronically and photoaged fibroblasts may share similarities with non-photoexposed primary fibroblasts isolated from XP-C patients. This hypothesis is also supported by our previous investigations that revealed (1) higher sensitivity of XP-C compared to control cells toward the ROS-inducing UVA irradiation (Otto *et al.*, 1999), (2) 50% reduced rates of S-phase cells in primary XP-C keratinocytes absence of exogenous stress such as UV suggesting metabolism-induced impairment of cell cycle (Arnaudeau-Begard *et al.*, 2003). In addition, reports by Shimizu *et al.* (2003) and D'Errico *et al.* (2006) evidenced a role of XPC in the elimination of ROS-induced DNA adducts. The absence of the functional XPC protein in XP-C fibroblasts may thus explain ROS accumulation and hence activation of stress pathways including the AP-1 pathway.

Relevance of the increase in MMP1 expression in cultured XP-C fibroblasts was supported by indirect immunolabeling of nonlesional XP-C skin *in situ*. Numerous studies reported overexpression of MMPs during neoplasia and metastasis (Egeblad and Werb, 2002; Mueller and Fusenig, 2004). MMP1 has been shown to be mainly involved in the invasive/metastatic behavior of tumor cells through their interaction with the stroma (Benbow *et al.*, 1999; Brinckerhoff *et al.*, 2000; Airola and Fusenig, 2001). In the general population, BCCs account for approxi-

mately 75% and SCCs for 25% of non-melanocytic skin tumors. BCCs virtually never lead to metastasis whereas SCCs do at a significant rate (10⁻²). In the case of BCCs, MMP1 seems to be overexpressed solely in stromal cells surrounding the tumor (Monhian *et al.*, 2005). In the case of SCCs, high amount of *MMP1* mRNA has been detected in both the tumor and surrounding stromal cells, a pattern that could contribute to the significant metastatic potential of SCCs compared to BCCs (Gray *et al.*, 1992; Tsukifuji *et al.*, 1999). Importantly, the ratio of BCCs to SCCs is inverted in XP patients (about 25% BCCs and 75% SCCs) (Kraemer, 1997). Our data suggest that MMP1 overexpression in XP-C dermal fibroblasts could be determinant in promoting SCC development in these patients. This hypothesis will be addressed by long-term grafting of organotypic XP-C skin cultures on the mouse (Del Rio *et al.*, 2002).

In conclusion, our data indicate that absence of the XPC protein in primary patients fibroblasts not only impacts NER but may also be accompanied by MMP1 overexpression, an event documented in skin aging and carcinogenesis. In the absence of any curative treatment of the disease, identification of molecular targets such as the *MMP1* gene and/or upstream activating pathways might help develop innovative pharmacological approaches to skin cancer prevention and treatment.

Materials and methods

Patients and skin biopsies

Control human skin was obtained from mammary plastic surgery. All XP-C patients presented a marked photosensitivity and were unrelated (Table 1). XP-C skin biopsies from non-photoexposed sites (buttock) were obtained with the patients' or parents' informed consent in accordance with bioethical rules.

Human control and XP fibroblasts were isolated and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (D Dutscher, Brumath, France) and 1% antibiotics (penicillin/streptomycin), at 37 °C in a 10% CO₂ atmosphere. All experiments were carried out using cells at passage 5–9.

Determination of XP complementation group

XP fibroblasts were infected by retroviral particles expressing WT, *XPC* or other WT *XP* genes, and the complementation groups were determined as described (Fréchet *et al.*, 2006).

Table 1 Patients and cell characteristics

Fibroblasts	Age at biopsy	Race	Phenotype	Clinical characteristics	Onset of tumors
FMD	16 years	Caucasian	NA	NA	NA
FH29	30 years	Caucasian	NA	NA	NA
FH84	28 years	Black	NA	NA	NA
XP148	12 years	Caucasian	XP-C	Multiple BCCs and SCCs, face and exposed areas	9 years
XP188VI	7 years	Caucasian	XP-C	Several SCC and 1 BCC on the face	ND
XP373VI	4 years	Caucasian	XP-C	1 facial BCC	2 years
XP424VI	17 years	Caucasian	XP-C	3 facial BCC, several pigmented lesions (ephelides, naevus)	17 years
XP433VI	2 months	Caucasian	XP-C	NA	NA
XP521VI	29 years	Black	XP-C	Photophobia. SCC of the lip. Multiple lentiginos. Small eye carcinomas	14 years

Abbreviations: BCC, basal cell carcinomas; NA, not applicable; ND, not determined; SCC, squamous cell carcinomas; XP, xeroderma pigmentosum group C.

Dermal equivalent

Dermal equivalents were prepared as described initially (Asselineau *et al.*, 1985) using 10^6 human dermal fibroblasts (WT or XP-C) in 5 mg/ml native bovine type I collagen (Symatase Biomateriaux, Chaponost, France). Mean perimeter of dermal equivalents was measured 24 h after the beginning of the incubation at 37 °C, 5% CO₂ atmosphere.

Immunolabelings and confocal microscopy analysis

Dermal equivalents were embedded in Tissue Tek (Sakura Finetek, Zoeterwoude, the Netherlands) and frozen in liquid nitrogen. Immunofluorescence analysis was performed on 30 µm vertical cryosections, as previously described (Bernard and Asselineau, 1997). Sections were incubated with the first antibody for 1 h 30 min and then with the secondary antibody for 1 h. Antibodies were diluted in phosphate-buffered saline (PBS) as follows: vimentin: 1/10 (clone V9; Monosan, Uden, the Netherlands); β1-integrin: 1/50 (clone K20; Immunotech, Villepinte, France); rabbit anti-mouse immunoglobulin G fluorescein isothiocyanate-conjugate: 1/100 (Dako, Trappes, France). Nuclei were counterstained using propidium iodide (5 µg/ml; Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Stacks of confocal images were collected using a Zeiss LSM 510 laser scanning confocal microscope under a 20 × 0.75 NA apochromat plan objectif. Z-projection of slices and image analysis were performed using Zeiss LSM Image examiner software.

MMP1 labelings were carried out on 5 µm paraffin sections of control and XP-C skin or dermal equivalents. Endogenous peroxidases were quenched using 3% H₂O₂ for 10 min. Sections were then incubated overnight at 4 °C with anti-MMP1 antibody (clone 36665; R&D Systems, Lille, France) at a 1/200 dilution in Zymed Diluent Reagent (Invitrogen). MMP1 labelings were revealed using Envision + anti-mouse secondary antibody coupled to peroxidase (Dako) for 45 min and liquid diaminobenzidine substrate (Dako) for 10 min. Sections were counterstained with Mayer's haemalaun before mounting.

Detection of soluble MMP by enzyme-linked immunoassay

Culture supernatants were collected after 4 days of culture. The amount of secreted human MMP was analysed by ELISA (Biotrak Kit, Amersham Biosciences, Freiburg, Germany) according to the manufacturer's instructions.

Western blot analysis

Culture supernatants were concentrated using Vivaspins columns (Vivascience, Sartorius Group, Hannover, Germany). For analysis of intracellular proteins, fibroblasts were lysed in radioimmunoprecipitation assay buffer. Protein concentration was estimated using Bradford reagent (Bio-Rad, Marnes La Coquette, France). Proteins (50 µg for MMPs, 15 µg for nuclear extracts analysis) were separated by electrophoresis

on 10% SDS-polyacrylamide gels, and transferred onto a polyvinyl difluoride membrane (Amersham Biosciences). Membranes were saturated with 5% nonfat dried milk in PBS/0.1 % Tween (Sigma, St Louis, MO, USA) and probed using monoclonal antibodies at the indicated dilutions: MMP1: 1/400 (clone 36665; R&D Systems), MMP2: 1/1000 (clone 42-5D11; MP Biochemicals, Illkirch, France), MMP3: 1/100 (clone 55-2A4; Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), P-c-Jun (P-S63): 1/5000 (clone Y172; Epitomics, Burlingame, CA, USA), Ets1: 1/400 (clone N-276; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), FosB: 1/1000 (clone 5G4; Cell Signaling, Danvers, MA, USA); glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH): 1/5000 (clone 9484; Abcam, Cambridge, UK). Blots were revealed using electrochemiluminescence reagents (Amersham Biosciences). Quantification was performed using GeneGnome device and GeneTools software (Syngene, Synoptics Ltd, Cambridge, UK).

Zymography

Precast 10% zymogram blue casein gels from Novex (Invitrogen) were used to study MMP1 proteolytic activity. After gel electrophoresis, gels were washed twice in Zymogram Renaturing buffer (Bio-Rad), and incubated for 72 h at 37 °C in a Zymogram-Developing buffer (Bio-Rad). Caseinolytic proteins were identified as clear bands on a dark background.

Real-time quantitative PCR

Total RNA was extracted using the RNeasy Fibrous Tissue Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). RNA concentration and quality analysis were performed using the 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Massy, France). First-strand cDNA synthesis was performed from 1 µg total RNA, 1 h at 42 °C, using the Advantage RT-for-PCR Kit (Clontech, Montigny-le-Bretonneux, France).

Real-time quantitative PCR was performed using LightCycler (LC) system 2.0 (Roche Diagnostics, Meylan, France) in LightCycler capillary, using 0.4 pM primer oligonucleotides, 4 mM MgCl₂ and LightCycler FastStart-DNA Master SYBR Green I mixture. Primers and PCR conditions are described in Table 2. Template concentrations were deduced from a standard curve using the fit points method of the LightCycler software. Specificity of each amplification was assessed by systematically performing a melting curve analysis. Control PCR were run on GAPDH, β₂-microglobulin (β₂-M) and ribosomal protein L13a (RPL13a) cDNAs and analysed using GeNorm program to eliminate the worst-scoring house-keeping gene (Vandesompele *et al.*, 2002).

Transient transfection

Plasmids pCollLUC-4400 and pCollCAT-73 consist of 4400 and 136 bp subfragments of the 5'-regulatory region of the human MMP1 gene inserted upstream of either the luciferase

Table 2 Oligonucleotides used in quantitative reverse-transcription PCR experiments

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	An/Ac (°C) ^a
MMP1	CTCAGGATGACATTGATGGC	CCCCGAATCGTAGTTATAGC	60/81
MMP2	TGATCTTGACCAGAAATACCATCGA	GGCTTGCAGGGGAAGAAGTT	58/83
MMP3	TGGCATTTCAGTCCCTCTATGG	AGGACAAAGCAGGATCACAGTT	60/85
GAPDH	CAGTCCATGCCATCACTGCCACCCAG	CAGTGTAGCCCAGGATGCCCTTGAG	55/88
B-2M	TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT	CAATTTATGCCCGTTTGCGCCTGC	60/81
RPL13A	CCTGGAGGAGAAGAGGAAAGAGA	TTGAGGACCTCTGTGTATTTGTCAA	60/80

^aAn/Ac (°C), annealing temperature/acquisition temperature (°C).

(LUC) (Rutter *et al.*, 1997) or the chloramphenicol acetyl transferase (CAT) reporter gene (Collier *et al.*, 1988; Frisch *et al.*, 1990). pCollLUC-4400 and pCollCAT-73 were transfected along with the internal control plasmids pHR-TK and pRSV- β -galactosidase (pRSV- β gal), respectively.

Transfection assay A total of 500 000 cells were transfected with a mixture of either 1.5 μ g of pCollLUC-4400 and 0.5 μ g of pHR-TK or 2.5 μ g of pCollCAT-73 and 0.5 μ g of pRSV- β gal using the Nucleofector System (Amaxa Biosystems, Köln, Germany). Protein extracts were prepared 48 h after transfection and analysed using either the dual-luciferase reporter assay system (pCollLUC-4400; Promega, Charbonnières, France) or CAT ELISA and β -Gal ELISA assay kits (pCollCAT-73; Roche Diagnostics).

Nuclear extracts and AP-1 DNA-binding assay

Nuclear extracts were prepared from fibroblasts monolayers using the Nuclear Extract Kit (Active Motif, Rivesart, Belgium). To verify specificity of extraction, 15 μ g of either nuclear or cytoplasmic extracts were analysed by western blotting using anti-ATM (dilution 1/1000; clone 2C1; GeneTex, San Antonio, TX, USA) as a nuclear marker and anti-NF κ B p50 (dilution 1/500; clone E-10; Santa Cruz Biotechnology) as a cytoplasmic marker (data not shown). AP-1 DNA-binding assays were performed using the TransAM AP-1 Family Kit (Active Motif).

Measurement of intracellular ROS

Fibroblasts were incubated with 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM-H₂DCFDA; 5 μ M) in Hank's buffered salt solution (Invitrogen) for 30 min at 37 °C before the fluorescent intensity resulting from the

oxidation of H₂DCF by ROS was measured using a cytometer (CellQuest software; Calibur; BD Biosciences) at the excitation and emission wavelengths of 485 and 530 nm, respectively.

EGCG (Sigma-Aldrich) treatment of fibroblasts was carried out at 15 μ M for 3 days in the presence of 1% fetal calf serum.

Statistical analysis

Representation For the box plot representation (Figures 2 and 3), the line in the middle of the box represents the median. The box extends from the 25th percentile to the 75th percentile. The lines emerging from the box extend to the upper and lower adjacent values.

Statistical test Significance of the differences between experimental values measured in XP-C and in control fibroblasts was assessed using the Mann-Whitney *U*-test. **P* < 0.05; ***P* < 0.025.

Acknowledgements

Dr Asselineau and Dr J Leclaire are gratefully acknowledged for continuous support and encouragements. We are indebted to V Marty, C Pierrard and Dr C Marionnet for their expert help. We are also grateful to Dr A Jalil for confocal microscopy. We thank Professor P Herrlich and Professor CE Brinckerhoff for DNA reporter constructs. Many thanks to F Duvigneau for editing English usage in the article. TM gratefully acknowledges fundings from the Association pour la Recherche sur le Cancer (no. 3590), the Fondation de l'Avenir, the Société Française de Dermatologie, the Association Française contre les Myopathies. AS thanks the association 'Les enfants de la Lune' for its support.

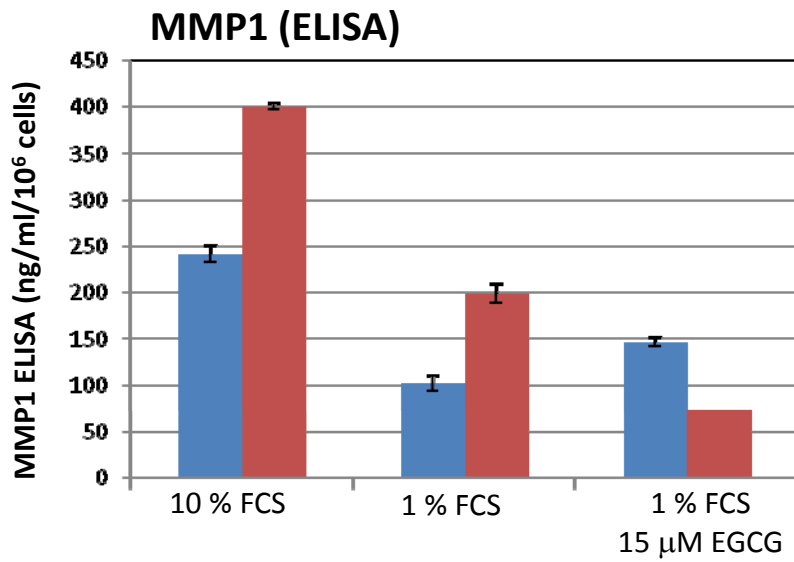
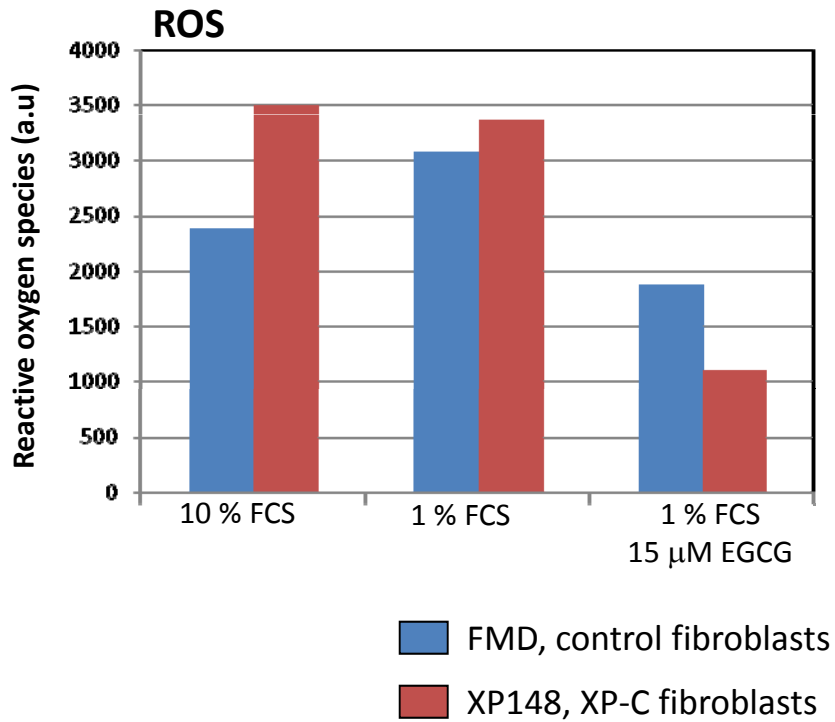
References

- Airola K, Fusenig NE. (2001). Differential stromal regulation of MMP-1 expression in benign and malignant keratinocytes. *J Invest Dermatol* **116**: 85–92.
- Angel P, Baumann I, Stein B, Delius H, Rahmsdorf HJ, Herrlich P. (1987). 12-*O*-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate induction of the human collagenase gene is mediated by an inducible enhancer element located in the 5'-flanking region. *Mol Cell Biol* **7**: 2256–2266.
- Arnaudeau-Begard C, Brellier F, Chevallier-Lagente O, Hoeijmakers J, Bernerd F, Sarasin A *et al.* (2003). Genetic correction of DNA repair-deficient/cancer-prone xeroderma pigmentosum group C keratinocytes. *Hum Gene Ther* **14**: 983–996.
- Asselineau D, Bernhard B, Bailly C, Darmon M. (1985). Epidermal morphogenesis and induction of the 67 kD keratin polypeptide by culture of human keratinocytes at the liquid–air interface. *Exp Cell Res* **159**: 536–539.
- Benbow U, Schoenemark MP, Mitchell TI, Rutter JL, Shimokawa K, Nagase H *et al.* (1999). A novel host/tumor cell interaction activates matrix metalloproteinase 1 and mediates invasion through type I collagen. *J Biol Chem* **274**: 25371–25378.
- Bernerd F, Asselineau D. (1997). Successive alteration and recovery of epidermal differentiation and morphogenesis after specific UVB-damages in skin reconstructed *in vitro*. *Dev Biol* **183**: 123–138.
- Bernerd F, Asselineau D, Fréchet M, Sarasin A, Magnaldo T. (2005). Reconstruction of DNA repair-deficient xeroderma pigmentosum skin *in vitro*: a model to study hypersensitivity to UV light. *Photochem Photobiol* **81**: 19–24.
- Bernerd F, Asselineau D, Vioux C, Chevallier-Lagente O, Bouadjar B, Sarasin A *et al.* (2001). Clues to epidermal cancer proneness revealed by reconstruction of DNA repair-deficient xeroderma pigmentosum skin *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 7817–7822.
- Bootsma D, Weeda G, Vermeulen W, van Vuuren H, Troelstra C, van der Spek P *et al.* (1995). Nucleotide excision repair syndromes: molecular basis and clinical symptoms. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **347**: 75–81.
- Brenneisen P, Briviba K, Wlaschek M, Wenk J, Scharffetter-Kochanek K. (1997). Hydrogen peroxide (H₂O₂) increases the steady-state mRNA levels of collagenase/MMP-1 in human dermal fibroblasts. *Free Radic Biol Med* **22**: 515–524.
- Brinckerhoff CE, Rutter JL, Benbow U. (2000). Interstitial collagenases as markers of tumor progression. *Clin Cancer Res* **6**: 4823–4830.
- Cat B, Stuhlmann D, Steinbrenner H, Alili L, Holtkotter O, Sies H *et al.* (2006). Enhancement of tumor invasion depends on transdifferentiation of skin fibroblasts mediated by reactive oxygen species. *J Cell Sci* **119**: 2727–2738.
- Chung JH, Kang S, Varani J, Lin J, Fisher GJ, Voorhees JJ. (2000). Decreased extracellular-signal-regulated kinase and increased stress-activated MAP kinase activities in aged human skin *in vivo*. *J Invest Dermatol* **115**: 177–182.
- Chung JH, Seo JY, Choi HR, Lee MK, Youn CS, Rhie G *et al.* (2001). Modulation of skin collagen metabolism in aged and photoaged human skin *in vivo*. *J Invest Dermatol* **117**: 1218–1224.
- Collier IE, Smith J, Kronberger A, Bauer EA, Wilhelm SM, Eisen AZ *et al.* (1988). The structure of the human skin fibroblast collagenase gene. *J Biol Chem* **263**: 10711–10713.
- Comoglio PM, Trusolino L. (2005). Cancer: the matrix is now in control. *Nat Med* **11**: 1156–1159.
- D'Errico M, Parlanti E, Teson M, de Jesus BM, Degan P, Calcagnile A *et al.* (2006). New functions of XPC in the protection of human skin cells from oxidative damage. *EMBO J* **25**: 4305–4315.

- Del Rio M, Larcher F, Serrano F, Meana A, Munoz M, Garcia M *et al.* (2002). A preclinical model for the analysis of genetically modified human skin *in vivo*. *Hum Gene Ther* **13**: 959–968.
- DePinho RA. (2000). The age of cancer. *Nature* **408**: 248–254.
- Egeblad M, Werb Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* **2**: 161–174.
- Fisher GJ, Datta SC, Talwar HS, Wang ZQ, Varani J, Kang S *et al.* (1996). Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature* **379**: 335–339.
- Fligel SE, Varani J, Datta SC, Kang S, Fisher GJ, Voorhees JJ. (2003). Collagen degradation in aged/photodamaged skin *in vivo* and after exposure to matrix metalloproteinase-1 *in vitro*. *J Invest Dermatol* **120**: 842–848.
- Fratelli M, Goodwin LO, Orom UA, Lombardi S, Tonelli R, Mengozzi M *et al.* (2005). Gene expression profiling reveals a signaling role of glutathione in redox regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 13998–14003.
- Fréchet M, Bergoglio V, Chevaller-Lagente O, Sarasin A, Magnaldo T. (2006). Complementation assays adapted for DNA repair-deficient keratinocytes. *Methods Mol Biol* **314**: 9–23.
- Frisch SM, Reich R, Collier IE, Genrich LT, Martin G, Goldberg GI. (1990). Adenovirus E1A represses protease gene expression and inhibits metastasis of human tumor cells. *Oncogene* **5**: 75–83.
- Gray ST, Wilkins RJ, Yun K. (1992). Interstitial collagenase gene expression in oral squamous cell carcinoma. *Am J Pathol* **141**: 301–306.
- Inoue D, Kido S, Matsumoto T. (2004). Transcriptional induction of FosB/DeltaFosB gene by mechanical stress in osteoblasts. *J Biol Chem* **279**: 49795–49803.
- Jorissen HJ, Ulery PG, Henry L, Gourneni S, Nestler EJ, Rudenko G. (2007). Dimerization and DNA-binding properties of the transcription factor DeltaFosB. *Biochemistry* **46**: 8360–8372.
- Karin M, Liu Z, Zandi E. (1997). AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* **9**: 240–246.
- Kerkela E, Ala-aho R, Klemi P, Grenman S, Shapiro SD, Kahari VM *et al.* (2002). Metalloelastase (MMP-12) expression by tumour cells in squamous cell carcinoma of the vulva correlates with invasiveness, while that by macrophages predicts better outcome. *J Pathol* **198**: 258–269.
- Kerkela E, Saarialho-Kere U. (2003). Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. *Exp Dermatol* **12**: 109–125.
- Khorrarnizadeh MR, Tredget EE, Telasky C, Shen Q, Ghahary A. (1999). Aging differentially modulates the expression of collagen and collagenase in dermal fibroblasts. *Mol Cell Biochem* **194**: 99–108.
- Kraemer KH. (1997). Sunlight and skin cancer: another link revealed. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 11–14.
- Milde-Langosch K, Roder H, Andritzky B, Aslan B, Hemminger G, Brinkmann A *et al.* (2004). The role of the AP-1 transcription factors c-Fos, FosB, Fra-1 and Fra-2 in the invasion process of mammary carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* **86**: 139–152.
- Monhian N, Jewett BS, Baker SR, Varani J. (2005). Matrix metalloproteinase expression in normal skin associated with basal cell carcinoma and in distal skin from the same patients. *Arch Facial Plast Surg* **7**: 238–243.
- Mueller MM, Fusenig NE. (2004). Friends or foes—bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer* **4**: 839–849.
- Nishigori C, Miyachi Y, Imamura S, Takebe H. (1989). Reduced superoxide dismutase activity in xeroderma pigmentosum fibroblasts. *J Invest Dermatol* **93**: 506–510.
- Otto AI, Riou L, Marionnet C, Mori T, Sarasin A, Magnaldo T. (1999). Differential behaviors toward ultraviolet A and B radiation of fibroblasts and keratinocytes from normal and DNA-repair-deficient patients. *Cancer Res* **59**: 1212–1218.
- Radisky DC, Levy DD, Littlepage LE, Liu H, Nelson CM, Fata JE *et al.* (2005). Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability. *Nature* **436**: 123–127.
- Rhie G, Shin MH, Seo JY, Choi WW, Cho KH, Kim KH *et al.* (2001). Aging- and photoaging-dependent changes of enzymic and non-enzymic antioxidants in the epidermis and dermis of human skin *in vivo*. *J Invest Dermatol* **117**: 1212–1217.
- Rosenfeldt H, Lee DJ, Grinnell F. (1998). Increased c-fos mRNA expression by human fibroblasts contracting stressed collagen matrices. *Mol Cell Biol* **18**: 2659–2667.
- Rutter JL, Benbow U, Coon CI, Brinckerhoff CE. (1997). Cell-type specific regulation of human interstitial collagenase-1 gene expression by interleukin-1 beta (IL-1 beta) in human fibroblasts and BC-8701 breast cancer cells. *J Cell Biochem* **66**: 322–336.
- Shimizu Y, Iwai S, Hanaoka F, Sugawara K. (2003). Xeroderma pigmentosum group C protein interacts physically and functionally with thymine DNA glycosylase. *EMBO J* **22**: 164–173.
- Shimokawa N, Kumaki I, Qiu CH, Ohmiya Y, Takayama K, Koibuchi N. (2005). Extracellular acidification enhances DNA binding activity of MafG-FosB heterodimer. *J Cell Physiol* **205**: 77–85.
- Shin MH, Rhie GE, Kim YK, Park CH, Cho KH, Kim KH *et al.* (2005). H₂O₂ accumulation by catalase reduction changes MAP kinase signaling in aged human skin *in vivo*. *J Invest Dermatol* **125**: 221–229.
- Stamenkovic I. (2003). Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol* **200**: 448–464.
- Stein B, Rahmsdorf HJ, Steffen A, Litfin M, Herrlich P. (1989). UV-induced DNA damage is an intermediate step in UV-induced expression of human immunodeficiency virus type 1, collagenase, c-fos, and metallothionein. *Mol Cell Biol* **9**: 5169–5181.
- Sternlicht MD, Werb Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**: 463–516.
- Tsukifuji R, Tagawa K, Hatamochi A, Shinkai H. (1999). Expression of matrix metalloproteinase-1, -2 and -3 in squamous cell carcinoma and actinic keratosis. *Br J Cancer* **80**: 1087–1091.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A *et al.* (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**: RESEARCH0034.
- Varani J, Schuger L, Dame MK, Leonard C, Fligel SE, Kang S *et al.* (2004). Reduced fibroblast interaction with intact collagen as a mechanism for depressed collagen synthesis in photodamaged skin. *J Invest Dermatol* **122**: 1471–1479.
- Vu TH, Werb Z. (2000). Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev* **14**: 2123–2133.
- Vuillaume M, Daya-Grosjean L, Vincens P, Pennetier JL, Tarroux P, Baret A *et al.* (1992). Striking differences in cellular catalase activity between two DNA repair-deficient diseases: xeroderma pigmentosum and trichothiodystrophy. *Carcinogenesis* **13**: 321–328.
- Wenk J, Brenneisen P, Wlaschek M, Poswig A, Briviva K, Oberley TD *et al.* (1999). Stable overexpression of manganese superoxide dismutase in mitochondria identifies hydrogen peroxide as a major oxidant in the AP-1-mediated induction of matrix-degrading metalloproteinase-1. *J Biol Chem* **274**: 25869–25876.
- White LA, Brinckerhoff CE. (1995). Two activator protein-1 elements in the matrix metalloproteinase-1 promoter have different effects on transcription and bind Jun D, c-Fos, and Fra-2. *Matrix Biol* **14**: 715–725.

Supplementary Information accompanies the paper on the Oncogene website (<http://www.nature.com/onc>).

Supplementary data 1



Control (FMD) and XP-C fibroblasts were incubated in DMEM medium containing 10% FCS, 1% FCS or 1% FCS and 15 μ M EGCG for 24h. ROS and MMP1 levels were then analyzed as described in Material and Methods.

Souche	Type de cellules	Génotype	Crible génomique	Type de peau	Age lors de la biopsie	Mutation XPC	Mutation XPC	Caractéristiques cliniques du patient
SK	K	WT	pool WT	Caucasien	2 ans		-	-
GK	K	WT	pool WT	Caucasien	7 mois		-	-
KAS728 / AS728	K / F	WT	pool WT	Caucasien	37 ans		-	-
FMD	F	WT	-	Caucasien	16 ans		-	-
FH84	F	WT	-	Caucasien	30 ans		-	-
FH29	F	WT	-	Caucasien	28 ans		-	-
KAS373 / AS373	K / F	XP-C	pool XP-C	Caucasien	4 ans	<i>1643_1644delTG</i> <i>homoz</i>	Val548AlafsX25	1 CBC sur le visage
KAS521 / AS521	K / F	XP-C	pool XP-C	Noir	29 ans	ND	ND	Photophobie. CSC de la lèvre. Carcinome in situ (œil). Ephélides.
KAS798 / AS798	K / F	XP-C	pool XP-C	Caucasien	2 ans	<i>1643_1644delTG</i> <i>homoz</i>	Val548AlafsX25	Photovieillissement (mains). Kératose actinique. Ephélides.

Tableau 11 : Caractéristiques des souches cellulaires utilisées pour le crible génomique et sa validation.

K, kératinocytes primaires. F, fibroblastes primaires. ND, non déterminé.

II. Analyse du profil d'expression génique des kératinocytes XP-C

II.1. Objectif

Les cellules XP-C présentent, en l'absence de toute exposition UV, des anomalies qui ne peuvent pas être liées de façon évidente au défaut de NER (voir Chapitre Objectifs de la thèse et Article n°1). Il semblerait donc que l'absence à long terme d'une protéine XPC fonctionnelle crée un déséquilibre cellulaire. Afin de déterminer s'il existe des voies de signalisation et des fonctions biologiques systématiquement altérées dans les kératinocytes XP-C, nous avons entrepris d'étudier le profil d'expression génique de ces cellules par comparaison à celui de kératinocytes contrôles (WT).

II.2. Stratégie expérimentale

Trois souches indépendantes de kératinocytes primaires XP-C et trois souches de kératinocytes primaires WT ont été cultivées jusqu'à pré-confluence (80-90%) (voir Matériel et Méthodes pour les détails). Les caractéristiques des souches utilisées pour cette étude sont résumées dans le tableau 11. Les ARN ont ensuite été extraits de ces cellules et mélangés en quantités égales en fonction de leur statut génétique pour former un pool XP-C (n=3) et un pool WT (n=3). Une hybridation comparative de ces deux pools a été réalisée sur une micropuce à ADN « Whole Genome 44K » (Agilent). Les résultats ont été analysés avec le logiciel Resolver® (Rosetta Inpharmatics LLC). Afin de sélectionner les gènes ayant la plus forte probabilité d'être exprimés de façon différentielle entre les deux pools, les tables de gènes ont été filtrées selon les critères suivants : $p\text{-value} < 10^{-5}$ et $|\text{ratio d'expression}| > 1,5$.

Une validation par RT-QPCR des résultats du crible transcriptomique a ensuite été réalisée sur une quinzaine de gènes exprimés de manière différentielle dans les kératinocytes XP-C par rapport aux kératinocytes WT¹⁶. Pour cela, le niveau de chaque ARNm a été mesuré indépendamment par RT-QPCR dans les trois souches XP-C et dans les trois souches WT, puis un test de Mann-Whitney a été réalisé pour déterminer si les résultats étaient significativement différents.

II.3. Résultats

A l'état basal, 596 gènes sont exprimés de manière différentielle dans les kératinocytes XP-C par rapport aux kératinocytes WT. Parmi eux, 336 gènes sont sur-exprimés et 260 gènes sont sous-exprimés dans les kératinocytes XP-C. Une étude ontologique de ces listes de gènes (Gene Ontology) a permis de mettre en évidence des fonctions moléculaires et biologiques particulièrement représentées dans la signature des kératinocytes XP-C. Les données issues de l'analyse ontologique

¹⁶ Ce travail a été réalisé avec l'aide de Jean-Christophe Alberti, stagiaire M2 (Université Nice Sophia Antipolis).

Gène	Ratio XP-C/WT (crible)	Souches WT			Souches XP-C			Ratio XP-C/WT (RT-QPCR)	p-value*
		SK	GK	KAS728	KAS373	KAS521	KAS798		
<i>ADRA1B</i>	+8,54	0,01	0,09	1,00	2,49	6,33	1,66	+9,52	p<0,05
<i>ALDH1A1</i>	-12,33	6,49	4,83	1,00	0,81	0,36	0,55	-7,18	p<0,05
<i>BAMBI</i>	-3,99	5,20	2,48	1,00	0,17	0,80	1,17	-4,05	NS
<i>BMP6</i>	+1,6	0,06	0,36	1,00	0,23	2,71	1,60	+3,19	NS
<i>CEBPA</i>	-1,67	2,78	1,72	1,00	1,24	0,76	1,18	-1,73	NS
<i>CXCR7</i>	+2,26	1,00	1,13	1,00	1,92	4,35	1,93	+2,61	p<0,05
<i>EDN1</i>	+1,53	0,38	0,71	1,00	0,82	1,68	1,81	+2,07	NS
<i>HOXB4</i>	+3,44	0,28	1,11	1,00	4,55	0,55	2,51	+3,18	NS
<i>S100A8</i>	-2,36	1,77	2,01	1,00	0,61	0,73	0,33	-2,88	p<0,05
<i>WISP2</i>	+1,94	0,29	0,78	1,00	1,13	5,01	0,61	+3,26	NS
<i>WNT4</i>	-3,15	28,50	5,97	1,00	3,15	2,70	3,80	-3,67	NS
<i>WNT5A</i>	-3,06	3,94	2,74	1,00	0,52	0,85	1,52	-2,66	NS
<i>XPC</i>	-5,25	0,72	0,77	1,00	0,08	0,10	0,08	-9,58	p<0,05

Tableau 12 : Résultats de la validation du crible génomique par RT-QPCR.

Le niveau d'ARNm a été mesuré dans chaque souche par RT-QPCR puis normalisé en utilisant la souche WT KAS728 comme référence. *La p-value a été évaluée par un test de Mann-Whitney. NS, non significatif (p>0,05).

sont présentées en Annexe 3. Les gènes choisis pour la validation du crible transcriptomique par RT-QPCR ont été sélectionnés en fonction de leur intérêt par rapport à notre modèle d'étude : notre attention s'est ainsi portée principalement sur les gènes impliqués dans le développement et l'homéostasie cutanés et les gènes associés à la cancérogénèse.

Voie WNT/ β -caténine et voie des BMP

La voie WNT/ β -caténine joue un rôle essentiel dans le développement de la peau et des annexes cutanées (pour revue voir : Grigoryan et al., 2008). Elle régule également la prolifération des cellules souches cutanées et leur engagement dans les différents lignages épithéliaux (Silva-Vargas et al., 2005). Plusieurs gènes codant pour des ligands de la voie WNT sont sous-exprimés dans les kératinocytes XP-C : *WNT4* (-3,2)¹⁷, *WNT5A* (-3,1) et *WNT6* (-2,1) (tableau 12). Un des gènes cibles de la voie WNT, *WISP2* (WNT1 inducible signaling pathway protein 2), est quant à lui surexprimé d'un facteur 1,9 dans les kératinocytes XP-C. L'analyse par RT-QPCR du niveau d'ARNm de *WNT5A*, *WNT4* et *WISP2* dans chaque souche de kératinocytes révèle une très forte hétérogénéité au sein de chaque pool (tableau 12). En moyenne, les résultats de RT-QPCR confirment les tendances observées lors du crible génomique mais ces résultats ne sont pas significatifs (Mann-Whitney, $p > 0,05$).

Les protéines de la famille BMP (Bone Morphogenetic Protein) régulent la prolifération et la différenciation des kératinocytes (Gosselet et al., 2007). Deux membres de cette famille sont différenciellement exprimés dans notre crible : le niveau d'ARNm de *BMP6* est augmenté d'un facteur 1,6 dans les kératinocytes XP-C tandis que le niveau d'ARNm de *BMP7* est diminué d'un facteur 3,6. En outre, le gène codant pour le pseudo-récepteur de la famille du TGF- β *BAMBI* (BMP and activin membrane-bound inhibitor) est fortement sous-exprimé dans les kératinocytes XP-C (-4). *BAMBI* régule les voies de signalisation du TGF- β , des BMP et la voie WNT/ β -caténine (Lin et al., 2008). La mesure du niveau d'ARNm de *BMP6* et *BAMBI* par RT-QPCR montre une forte hétérogénéité entre les différentes souches de kératinocytes WT et XP-C (tableau 12). En considérant la moyenne des trois souches XP-C par rapport aux trois souches WT, les résultats du crible sont confirmés mais ne sont pas statistiquement significatifs.

Activité enzymatique

66 gènes parmi les 596 gènes régulés de façon différentielle entre les kératinocytes XP-C et les kératinocytes WT (soit 11%) codent pour des protéines impliquées dans l'activité enzymatique de

¹⁷ Les chiffres entre parenthèses indiquent le rapport entre le niveau d'expression d'un gène dans les kératinocytes XP-C et son niveau d'expression dans les kératinocytes WT. Le signe « + » indique une surexpression dans les cellules XP-C tandis que le signe « - » indique une sous-expression. Par exemple, *WNT4* (-3,2) indique que le gène *WNT4* est sous-exprimé d'un facteur 3,2 dans les kératinocytes XP-C par rapport aux kératinocytes WT.

la cellule : activité transférase (9 gènes surexprimés, 11 sous-exprimés), oxydoréductase (8 gènes surexprimés, 17 gènes sous-exprimés) et hydrolase (9 gènes surexprimés, 12 gènes sous-exprimés). Le niveau d'ARNm de l'aldéhyde déshydrogénase ALDH1A1 (aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1) est diminué d'un facteur 12,3 dans les kératinocytes XP-C (tableau 12). L'aldéhyde déshydrogénase ALDH1A1 est impliquée dans la synthèse de l'acide rétinoïque, un facteur régulant l'équilibre entre prolifération et différenciation dans l'épiderme. Les résultats de RT-QPCR confirment la diminution significative du niveau d'expression du gène *ALDH1A1* dans les trois souches de kératinocytes XP-C.

Protéines de liaison à l'ADN

Sur les trois souches XP-C utilisées dans cette étude, deux sont issues de patients porteurs d'une délétion sur le gène *XPC* causant un décalage du cadre de lecture et la création d'un codon stop prématuré. Il est donc probable que les ARNm produits soient rapidement dégradés par le mécanisme de contrôle NMD (nonsense-mediated mRNA decay) (Khan et al., 2006). La mutation du troisième patient XP-C n'est pas connue mais il est vraisemblable qu'elle ait les mêmes conséquences puisque la protéine n'est pas détectée en western blot dans les kératinocytes de ce patient (voir Article n°2). Les résultats du crible montrent effectivement que le niveau d'ARNm de *XPC* est diminué d'un facteur 5,3 dans les kératinocytes XP-C par rapport aux kératinocytes WT. L'analyse en RT-QPCR révèle un niveau résiduel d'ARNm *XPC* de 10 à 15% dans les trois souches XP-C (tableau 12).

Les niveaux d'ARNm de deux facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la prolifération des kératinocytes épidermiques sont dérégulés dans les cellules XP-C : la quantité d'ARNm du gène *CEBPA* est diminuée (-1,7) tandis que celle du gène *HOXB4* est augmentée (+3,4). Les résultats de la RT-qPCR confirment globalement ces tendances bien que les résultats ne soient pas statistiquement significatifs en raison de la variabilité entre les souches (tableau 12).

Famille des protéines S100

Les protéines de la famille S100 (13 membres) sont des protéines de liaison au calcium participant à l'homéostasie de l'épiderme mais également à de nombreuses situations pathologiques cutanées (Eckert et al., 2004). Les gènes codant pour ces protéines sont localisés au sein du complexe de différenciation épidermique sur le chromosome 1q21. L'expression de quatre membres de cette famille est diminuée dans les kératinocytes XP-C : S100A7 (-2,6), S100A8 (-2,4), S100A9 (-1,7), S100A12 (-3,4). Comme le montrent les résultats de RT-QPCR, le niveau d'ARNm de *S100A8* est statistiquement plus faible dans les trois souches XP-C par rapport aux trois souches WT (tableau 12).

Récepteurs et protéines sécrétées

Le récepteur adrénergique alpha 1B (ADRA1B), dont le ligand principal est la norépinephrine, n'est normalement pas exprimé par les kératinocytes humains (Sivamani et al., 2007). Or, ce gène présente l'une des plus fortes variations entre les kératinocytes XP-C et les kératinocytes WT (+8,5). Les résultats de RT-QPCR confirment l'accumulation significative d'ARNm *ADRA1B* dans toutes les souches de kératinocytes XP-C, en particulier dans la souche KAS521, par rapport aux souches WT (tableau 12). ADRA1B peut être activé par l'intermédiaire de l'endothéline 1 (EDN1), dont l'expression est également augmentée dans les kératinocytes XP-C (+1,54). Cette tendance est confirmée par RT-QPCR malgré une forte hétérogénéité entre les souches.

CXCR7 (chemokine (C-X-C motif) receptor 7) est un récepteur secondaire de la cytokine pro-invasive et pro-angiogénique CXCL12 (aussi appelée SDF-1, stromal-derived factor-1) (Balabanian et al., 2005). Le rôle de CXCR7 est encore mal connu. Puisque CXCR7 est significativement surexprimé dans les kératinocytes XP-C par rapport aux kératinocytes WT (crible : +2,3 ; RT-QPCR : + 2,6, $p < 0,05$), nous avons émis l'hypothèse que cette dérégulation pourrait être liée à une altération de la production de CXCL12 par les fibroblastes XP-C. Nous avons donc exploré par RT-QPCR la quantité d'ARNm de la cytokine CXCL12 dans des fibroblastes XP-C cultivés en monocouche (figure 52). Les résultats montrent qu'en moyenne, les fibroblastes XP-C accumulent de plus forts niveaux d'ARNm *CXCL12* que les fibroblastes WT.

II.4. Conclusions

- De nombreux gènes sont exprimés de façon différentielle dans les kératinocytes XP-C par rapport aux kératinocytes WT : 336 gènes sont sur-exprimés et 260 gènes sont sous-exprimés dans les kératinocytes XP-C.
- Les grandes familles de gènes les plus représentées dans cette « signature XP-C » codent pour : des enzymes (66 gènes), des protéines de liaison à l'ADN (53 gènes), des protéines liant les ions (30 gènes) et des protéines de transduction du signal (23 gènes). Les grandes fonctions biologiques les plus représentées sont : le développement (25 gènes), la réponse immunitaire (21 gènes), l'adhésion cellulaire (18 gènes) et la communication cellulaire (17 gènes).
- Les analyses « souche à souche » par RT-QPCR ont révélé une forte hétérogénéité des niveaux d'expression de certains gènes au sein d'un même pool (XP-C ou WT). Cette hétérogénéité est probablement liée aux caractéristiques intrinsèques des cellules (âge du patient au moment de la biopsie, site anatomique, origine ethnique).
- Malgré cette hétérogénéité, quelques gènes sont significativement sur- ou sous-exprimés dans les trois souches de kératinocytes XP-C par rapport aux trois souches WT : c'est le cas des gènes *ALDH1A1*, *ADRA1B*, *CXCR7* et *S100A8*.

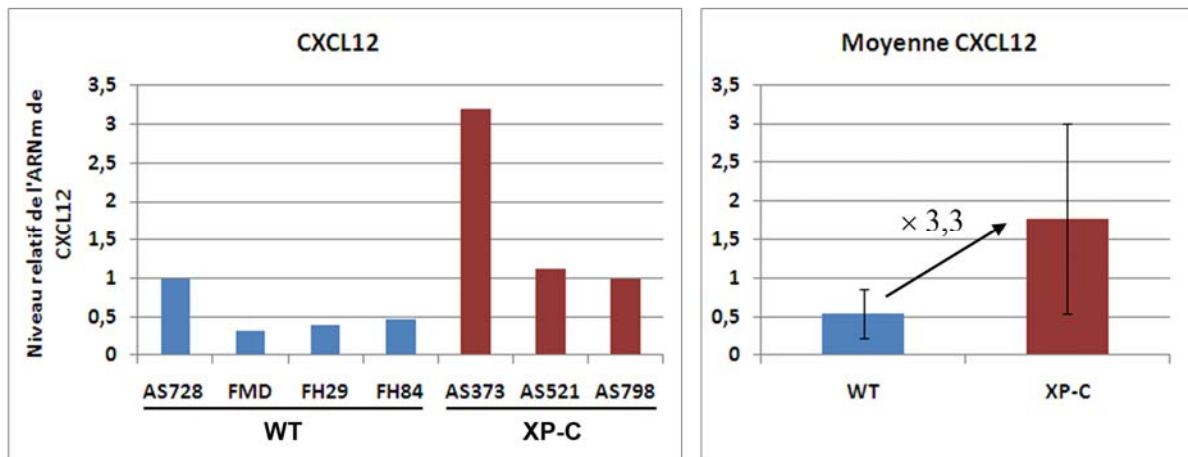


Figure 52 : Niveau d'ARNm de CXCL12 dans les fibroblastes contrôles (WT) et XP-C.

Le niveau d'ARNm a été mesuré dans chaque souche par RT-QPCR puis normalisé en utilisant la souche WT AS728 comme référence.

- La dérégulation de ces gènes dans les kératinocytes XP-C en dehors de tout stress UV suggère une implication de la protéine XPC dans un(des) processus biologique(s) participant au maintien de l'équilibre cellulaire à l'état stable. L'impact de la dérégulation de ces gènes dans le cadre de la pathologie XP-C sera discutée dans le chapitre Discussion et Perspectives.

II.5. Matériel et Méthodes

Culture cellulaire

Les biopsies de peau normale ont été obtenues suite à une chirurgie mammaire ou abdominale. Les biopsies de peau XP-C sont issues de sites non-exposés à la lumière du soleil et normalement pigmentés (fesse). Elles ont été obtenues avec le consentement des patients ou de leurs parents. Les informations relatives aux souches cellulaires utilisées pour cette étude sont regroupées dans le tableau 11. Les souches SK, GK et les souches appelées KAS sont des kératinocytes primaires humains ; la souche FMD et les souches notées AS et FH sont des fibroblastes primaires humains.

Les kératinocytes primaires sont cultivés en milieu CFAD en présence de fibroblastes murins 3T3 J2 (feeders) préalablement irradiés aux rayons gamma (42 Gy) (Rheinwald and Green, 1975). Ils sontensemencés à 4000 cellules/cm² sur des boîtes de diamètre 100 mm et cultivés dans une étuve à 37°C, 10% CO₂ jusqu'à pré-confluence (80-90%). Les feeders sont éliminés par un traitement à l'EDTA (0,02% en PBS) 24 heures avant l'extraction des ARN. Dans cette étude, les kératinocytes ont été utilisés à passage 7.

Les fibroblastes primaires sont cultivés dans du milieu DMEM (Gibco) additionné de 10% de sérum de veau fœtal (Fréchet et al., 2008). Ils sont utilisés entre les passages 6 et 9.

Extraction des ARN totaux

Après aspiration du milieu de culture, les cellules ont été directement lysées dans le tampon RLT (Qiagen) additionné de β-mercaptoéthanol. Les ARN ont été extraits à l'aide du kit RNeasy Minikit (Qiagen), selon le protocole du fournisseur. La concentration des ARN a été mesurée par spectrophotométrie (Nanodrop Technologies) puis la qualité et l'intégrité des ARN ont été vérifiées par une électrophorèse sur puce (Bioanalyser, Agilent).

Etude du profil d'expression génique sur micropuces

Pour l'hybridation sur les puces, les ARN totaux des trois souches XP-C (KAS373, KAS521 et KAS798) ont été mélangés en quantités égales (=pool XP-C). Le même protocole a été appliqué aux trois souches WT (SK, GK, KAS728) (=pool WT).

La préparation des échantillons, l'hybridation sur les puces, et l'analyse des données ont été réalisées sur la plateforme de génomique de l'Institut Gustave Roussy (P. Dessen, V. Lazar), selon le protocole décrit précédemment (pour les détails voir : Valin et al., 2009). Brièvement, la rétro-transcription des deux pools d'ARN a été réalisée en utilisant le rétro-transcriptase de MMLV. Des ARN complémentaires marqués avec la cyanine 3 (Cy3) ou la cyanine 5 (Cy5) ont alors été générés grâce à l'ARN polymérase T7. L'hybridation des sondes issues du pool XP-C et du pool WT (1 µg par pool) a été réalisée pendant 17h à 60°C sur une micro-puce à ADN « Whole Genome 44K » (Agilent). Une analyse en « dye swap » a été réalisée, ce qui signifie qu'une première hybridation avec le pool XP-C marqué en Cy3 et le pool WT en Cy5 et une deuxième hybridation avec le pool XP-C marqué en Cy5 et le pool WT en Cy3 ont été effectuées en parallèle pour éviter les biais de marquage. Les lames ont ensuite été lues dans le scanner 2565 AB DNAmicroarray (Agilent). Les images ont été analysées grâce au programme Feature extraction (version A.8.5.1.1, Agilent) puis les fichiers ont été importés dans le logiciel Resolver (Rosetta Inpharmatics LLC) pour l'analyse des données.

RT-QPCR

La rétro-transcription des ARN (1 µg) est réalisée grâce à la rétro-transcriptase SuperScriptII (Invitrogen). Les expériences de PCR quantitative en temps réel ont été réalisées sur l'appareil Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) en utilisant les amorces Taqman® décrites dans l'Annexe 4. *B2M*, *TBP*, *GAPDH*, *RPLO1* et *PPIA* ont été utilisés comme gènes de ménage. La normalisation des résultats de QPCR a été réalisée grâce au logiciel geNorm (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>). Un test de Mann-Whitney a été utilisé pour déterminer si les niveaux d'ARN dans les trois souches WT et les trois souches XP-C étaient significativement différents.

B. Correction génétique *ex vivo* des kératinocytes XP-C

I. Article n° 2 : Les kératinocytes XP-C corrigés permettent la régénération *in vivo*, après greffe chez la souris immunodéficiente, d'une peau humaine capable de réparer les lésions induites par les UV.

(Cet article est en préparation et sera soumis à Human Molecular Genetics ou Molecular Therapy)

En l'absence de traitement curatif, une photoprotection stricte, une surveillance dermatologique régulière et une exérèse chirurgicale des néoplasmes suspects demeurent les meilleures méthodes de prévention contre le développement de cancers cutanés chez les patients XP. Toutefois, à l'image du traitement des grands brûlés, certaines zones cutanées très altérées pourraient être remplacées chez les patients XP par autogreffe de feuillets épidermiques générés à partir de kératinocytes génétiquement corrigés *ex vivo*.

Dans ce contexte, nous avons développé des vecteurs rétroviraux dérivés de MMLV permettant l'expression de la cassette bicistronique *CD24-IRES-XPC* sous le contrôle d'un promoteur hybride LTR/CMV. Les kératinocytes XP-C transduits à l'aide de ces vecteurs rétroviraux puis sélectionnés grâce au marqueur CD24 expriment une protéine XPC fonctionnelle, permettant de restaurer la réparation par la NER et la survie après une irradiation UVB. Les kératinocytes XP-C corrigés permettent en outre la reconstruction *in vitro* d'un épithélium stratifié et différencié et la régénération *in vivo* d'une peau présentant toutes les caractéristiques d'une peau humaine normale. Les lésions induites par les UV sont efficacement réparées dans les épidermes régénérés *in vitro et in vivo* à partir des kératinocytes XP-C corrigés, tandis qu'elles persistent dans les épidermes XP-C. Les kératinocytes XP-C corrigés ont été propagés *in vitro* pendant plus de 100 générations, ce qui atteste la présence de cellules souches au sein de cette population. Une diminution progressive de l'expression de la protéine XPC est cependant observée dans la population corrigée ; elle semble résulter (1) d'une restriction clonale au cours des passages favorisant l'émergence de cellules exprimant faiblement la protéine XPC ; (2) d'une extinction plus ou moins marquée du transgène dans chaque clone.

Malgré cela, les résultats obtenus constituent une étape supplémentaire vers la thérapie génique *ex vivo* des patients XP-C puisqu'ils ont permis de montrer que : (1) il est possible d'obtenir des cellules souches XP-C génétiquement corrigées exprimant stablement la protéine XPC pendant plus de 50 générations ; (2) la présence de ces cellules souches permet la régénération *in vivo* d'une peau humaine capable de réparer normalement les lésions induites par les UV.

***In vivo* regeneration of DNA repair-proficient skin after genetic correction of epidermal keratinocytes isolated from xeroderma pigmentosum group C patients**

Emilie Warrick^{1,2,5}, Marta Garcia Diez³, Corinne Chagnoleau², Odile Chevallier⁴, Jaime Angulo-Mora⁶, Alain Sarasin⁴, Fernando Larcher³, Marcela Del Rio³, Françoise Bernerd², Thierry Magnaldo^{1,§}

¹Laboratory of genomes biology and pathologies, CNRS UMR6267/INSERM U998, Faculty of Medicine, Nice, France

²L’Oreal, Life Sciences Advanced Research, Centre C. Zviak, Clichy, France

³Cutaneous Disease Modeling Unit and Regenerative Medicine Unit, Epithelial Biomedicine Division, Centro de Investigaciones Energéticas Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT), Madrid, Spain

⁴Genomes and Cancers, CNRS FRE2939, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

⁵Pierre et Marie Curie University (UPMC), Paris, France

⁶Commissariat à l’Energie Atomique, Fontenay aux Roses, France

§ Corresponding author: tmagnaldo@unice.fr

ABSTRACT

Xeroderma pigmentosum (XP) is a rare, recessively inherited genetic disorder characterized by a severe predisposition to skin cancers following minimal ultraviolet (UV) exposure. Cells from XP patients are deficient in nucleotide excision repair (NER) of UV-induced DNA lesions. Seven NER-deficient XP complementation groups have been described (XP-A to XP-G) and, among them, XP-C is the most common one in Europe and North Africa. In contrast to other groups, neurological problems are rarely observed in XP-C patients. In the absence of any curative treatment, *ex vivo* cutaneous gene therapy represents a promising approach for XP-C patients. We have previously shown that retroviral-mediated *XPC* cDNA transfer into XP-C keratinocytes fully corrected the DNA repair defect and UV sensitivity of XP-C cells. As a next step toward gene therapy for XP-C patients, we have performed long-term *in vitro* and *in vivo* studies of reverted XP-C keratinocytes. In order to meet the specifications inherent to skin graft *in vivo*, we have set up a strategy allowing the selection of genetically modified clonogenic keratinocytes using the small epidermal protein CD24. Keratinocytes from XP-C patients were transduced with a retroviral vector driving the expression of both wild-type *XPC* and *CD24* cDNAs. In transduced XP-C cells, re-expression of the XPC protein was accompanied by recovery of full DNA repair capacity and cell survival properties after UVB irradiation. Furthermore, both *in vitro* and *in vivo* skins regenerated from reverted XP-C keratinocytes recovered normal repair capacity of UVB-induced DNA lesions. Our results represent an additional step toward *ex vivo* cutaneous gene therapy of the XP-C disease.

INTRODUCTION

Xeroderma pigmentosum (XP) is a rare autosomal recessive genodermatosis characterized by a marked sensitivity to sunlight and a severe predisposition to skin cancer (Kraemer et al., 1987). XP patients have a 2000-fold increased risk of developing skin tumors in sun-exposed areas, mostly basal and squamous cell carcinomas (BCCs, SCCs) arising from epidermal keratinocytes, and malignant melanomas (Kraemer et al., 1987). Most XP patients develop skin cancer before the age of 8 years which often results in compromised life expectancy. About 20% of XP patients also exhibit neurological abnormalities. Seven groups of genetic complementation (XP-A to XP-G) have been identified. XP cells from all these groups share a biochemical deficiency in nucleotide excision repair (NER). In addition, a variant form of XP (XP-V) has been described which is proficient in NER but suffers from error-prone replicative translesion DNA synthesis (Masutani et al., 1999; Broughton et al., 2002). NER is a versatile DNA repair mechanism involved in the removal of ultraviolet (UV)-induced DNA lesions such as cyclobutane pyrimidine dimers (CPD) and 6,4 pyrimidine-pyrimidone (6-4 PP) (Cleaver, 1968; Cleaver et al., 2009). The NER process operates through two subpathways that differ only in the initial step of DNA damage recognition. The transcription-coupled repair (TCR) subpathway takes place when a lesion is located on a transcribed DNA strand, blocking RNA polymerase II transcriptional activity (Svejstrup, 2002). In contrast, the global genome repair (GGR) subpathway is triggered by the recognition of DNA lesions anywhere in the genome by the XPC-RAD23B-Centrin2 complex (Sugasawa, 2009). This recognition step initiates the stepwise assembly of a multiprotein excision machinery, followed by the recruitment of DNA synthesis and DNA ligation proteins (de Laat et al., 1999; Volker et al., 2001; Riedl et al., 2003). Persistence of UV-induced DNA damage in NER-deficient XP cells results in elevated mutagenesis, eventually leading to skin tumor development in sun-exposed areas (Sarasin, 1999).

To date, no curative treatment can be proposed to XP patients, and the most effective mean of skin cancer prevention remains the stringent avoidance of all sources of UV radiation. However, genetic correction of XP cells might be a promising strategy for the treatment of XP patients. Indeed, early studies showed that full DNA repair capacity could be recovered in XP fibroblasts and keratinocytes from various complementation groups

following retroviral transduction of the adequate XP gene (Carreau et al., 1995; Quilliet et al., 1996; Zeng et al., 1997; Arnaudeau et al., 2003).

XP-C is the most commonly found XP complementation group in Europe and North Africa (> 50% of all XP patients) (Kleijer et al., 2008). Cells from XP-C patients have proficient TCR but defective GGR of damaged DNA. Neurological symptoms are rarely seen in XP-C patients (Khan et al., 2009). Since phenotypical traits of XP-C patients are mainly restricted to photo-exposed skin, XP-C group appears to be the best candidate for a cutaneous gene therapy protocol where genetically modified keratinocytes would be used to generate DNA repair-proficient skin equivalents for engraftment. However, prospects of reverted skin grafts on XP-C patients require the full selection of efficiently transduced XP-C cells since a unique NER-deficient keratinocyte could give rise to a tumor. The use of antibiotic resistance xenogenes may induce an immune response *in vivo* against the reverted cells and is therefore not recommended. To overcome this issue, we have recently developed a safe selection strategy, relying on a small epidermal marker, CD24 (Bergoglio et al., 2007). This strategy allows the full selection of genetically modified primary keratinocytes, while preserving cell growth and differentiation capacities, thereby allowing both *in vitro* and *in vivo* long-term studies of the transduced cells.

With a view to develop the most efficient strategy of gene therapy for XP-C patients, we designed a retroviral vector driving the expression of both wild-type *XPC* and *CD24* cDNAs. In CD24-selected transduced cells, re-expression of the XPC protein was accompanied by recovery of DNA repair and cell survival properties after UVB irradiation. Organotypic skin cultures and human skin regenerated in immunodeficient mice from reverted XP-C keratinocytes displayed normal repair capacity of UVB-induced DNA lesions. These results offer further perspectives for the long-term therapy of XP patients.

MATERIALS AND METHODS

Skin biopsies and cell culture

All XP-C patients presented a marked photosensitivity and were unrelated (table 1). XP-C skin biopsies from non-photoexposed sites (buttock) were obtained with the patients' or parents' informed consent in accordance with bioethical rules.

Normal and XP-C keratinocytes were cultured as previously described by Rheinwald and Green (Rheinwald and Green, 1975). Cells were seeded at a density of 3-4000 cells/cm² on a feeder layer of lethally γ -irradiated 3T3-J2 fibroblasts in cFAD medium. Cells were cultured at 37°C in a 10% CO₂ atmosphere

Retroviral production and transduction.

The human complementary DNA (cDNA) sequences of CD24 and XPC were cloned in the pCMMP vector (a generous gift from Généthon, Evry, France) on either side of the internal ribosome entry site (IRES) sequence. Infectious retroviral (RV) particles pseudotyped with the vesicular stomatitis virus glycoprotein (VSVG) were produced following triple transfection of helper plasmids in 293T cells as described (Merten, 2004). Culture supernatant was concentrated by ultrafiltration and RV particles were re-suspended in serum-free medium (SFM, Gibco-BRL).

Keratinocyte transduction: 48 hours after seeding at a density of 8000 cells/cm², cells were washed in SFM medium and re-fed with complete SFM containing 0.1 mmol/l calcium chloride, 0,2 ng/ml epidermal growth factor and 25 μ g/ml bovine pituitary extract for 16 hours. Keratinocytes were infected with concentrated RV supernatants (1,2.10⁹ vg/ml) for 10 hours at 37°C in the presence of 5 μ g/ml polybrene. Cells were then re-fed with cFAD medium until 80–90% confluence.

MACS CD24 cell sorting

3T3-J2 feeder cells were removed by incubation in 0.02% EDTA for 5 minutes. Keratinocytes were then dissociated with trypsin/ EDTA and re-suspended in PBS, 0.5% bovine serum albumin, 2 mmol/l EDTA (PBS+). Dissociated keratinocytes were incubated with CD24 monoclonal antibody (ABL9; Immunotech, Luminy, France) for 20 min at 4 °C, washed twice in cold PBS+ and incubated for 15 minutes at 4 °C with goat anti-mouse IgG coupled

microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Keratinocytes were washed twice in cold PBS+ before being sorted on MACS cell separation columns.

Irradiation sources and procedures

UVB irradiation was performed using a Philips TL20W/12 fluorescent tube as previously described (Otto *et al.*, 1999). Keratinocytes were washed twice with pre-warmed PBS before the irradiation, which was performed without PBS over the cells, owing to the short periods of time needed. Solar-simulated radiation was obtained as described previously (Bernerd *et al.*, 2003) using a 1000 W Xenon lamp equipped with a dichroic mirror (Oriel, Les Ulis, France) filtered by UG5 (2 mm) and WG 320 (1.5 mm) (Schott, Clichy, France). A spectroradiometer (Macam Photometrics, Livingston, UK) was used to measure spectral irradiance.

Western blot analysis

Keratinocytes were lysed in 8M urea buffer and protein concentration was estimated using Bradford reagent (Bio-Rad, Marne La Coquette, France). Proteins were separated on 10% SDS–polyacrylamide gels, transferred onto a polyvinyl difluoride membrane (GE Healthcare, Saclay, France) and probed using mouse polyclonal XPC antibody (a kind gift from Dr. Jaime Angulo, CEA, Fontenay aux Roses, France ; dilution 1/1000), CD24 monoclonal antibody (ALB9, Immunotech ; dilution 1/400) or GAPDH monoclonal antibody (clone 9484; Abcam, Cambridge, UK ; dilution 1/2000). Blots were revealed using electrochemiluminescence reagents (GE Healthcare).

Southern blot and Q-PCR analysis of provirus insertion sites

For Southern Blot analysis, genomic DNA from pre-confluent keratinocytes (20 µg) was digested overnight with AgeI/EcoRV restriction enzymes to release the full-length CD24-IRES-XPC cassette (4,7 kb). Digested DNA fragments were separated on a 0,7% agarose gel, transferred to a nylon membrane (GE Healthcare), and hybridized with a [³²P]-labeled XPC-specific probe obtained by PCR amplification (XPC: 5'AAAACACGATGATAATATGGCC/5'GCAGAGTAAATAGCAAATCTCC) of the pCMMP CD24-IRES-XPC plasmid.

The number of provirus integrations into the host genome was evaluated by quantitative PCR on genomic DNA isolated from XP-C and reverted XP-C keratinocytes, using specific

CD24 primers and Taqman probe (Agilent, Santa Clara, USA, CA ; Hs_02379687.s1). CEBPA was used as a reference gene (Agilent ; Hs_00269972.s1).

UDS analysis

Keratinocytes were seeded on glass coverslips, and DNA repair after UVB irradiation was followed by [3H]thymidine incorporation as described previously (Otto *et al.*, 1999). Coverslips with cells were mounted onto glass slides, dipped in EM-1 photoemulsion (GE Healthcare) and exposed for 1 week at 4°C. The mean number of grains per nucleus was obtained by counting at least 60 non-S phase nuclei for each UV dose. All UDS experiments were performed at least twice.

Cell survival analysis

Keratinocytes were grown in 60-mm dishes for 5 days prior to UVB irradiation. Immediately after irradiation, cells were trypsinized, counted, and seeded at clonal density (35 cells/cm² for WT and reverted XP-C cells and 70 cells/cm² for XP-C cells) onto lethally gamma-irradiated 3T3-J2 fibroblasts. After 12 days, keratinocyte colonies were fixed in 3.7% formaldehyde in PBS and colored by 1% rhodamine B (Sigma). The number of colonies was determined by eye and under binoculars to ensure that all colonies, including small, abortive colonies, were counted. The relative cell survival was calculated as follow: (number of colonies obtained after UV irradiation / number of colonies obtained from non-irradiated cells) ×100.

Assessment of long-term expression of the transgene

Reverted XP-C keratinocytes were seeded at clonal density (35 cells/cm²) onto lethally gamma-irradiated 3T3-J2 fibroblasts. Large colonies (∅ >5mm) with a smooth perimeter were individually trypsinized and seeded on a layer of lethally gamma-irradiated 3T3-J2 fibroblasts for serial passages. A fraction of these cells was used to perform secondary clonal analysis. Reverted XP-C mass population and reverted XP-C holoclones were serially passaged during 25 weeks (1 passage per week).

Reconstructed skin in vitro

Reconstructed skin was prepared essentially as previously described (Asselineau *et al.*, 1985) except for minor modifications. 10^6 normal (WT) fibroblasts were embedded in a type-I collagen gel. After contraction, $5 \cdot 10^4$ normal, $3 \cdot 10^5$ XP-C or $3 \cdot 10^5$ reverted XP-C keratinocytes were seeded onto the dermal equivalent (lattice). Keratinocytes overlying the lattice were then incubated for 7 days, immersed in the culture medium before being raised at the air-liquid interface at 37°C, 5% CO₂ for 8 days. They were then exposed without medium to 1,87 J/cm² SSR-UV (160 mJ/cm² UVB + 1,7 J/cm² UVA). Each condition was performed in duplicate. After SSR exposure, samples were immediately used for analysis or maintained for 24 h or 5 days at the air-liquid interface. Half of each sample was fixed for classical histology (hematoxylin, eosin, saffron, HES) and the other half was frozen in liquid nitrogen for immunolabeling.

Regeneration of genetically engineered human epidermis in vivo

A fibrin matrix populated with live fibroblasts was used as the dermal component of the bioengineered skin. The fibrin matrix was prepared following a procedure previously described (Del Rio *et al.*, 2002). In brief, 2 ml of fibrinogen solution (from cryoprecipitates of pig plasma) was added to 4,5 ml of cFAD medium containing 2×10^5 dermal fibroblasts. Immediately afterwards, 0,5 ml of human thrombin (15 NIH units/ml in 25 mM CaCl₂) (Sigma) was added. The mixture was poured in two 35-mm wells (in 6-well culture plates) and allowed to solidify at 37 °C for 2 hours. WT, CD24-GFP and CD24-XPC XP-C keratinocytes ($0,5-1 \times 10^6$ cells per well) were then seeded on the fibrin matrix to form the epidermal layer of the bioengineered skin. When confluent, bioengineered skins were manually detached from tissue culture wells and grafted onto immunodeficient mice. Grafting was performed under sterile conditions using 6-week-old female nude (nu/nu, NMRI background) mice (Elevage Janvier, Le Genest Saint Isle, France). In brief, mice were aseptically cleansed, and full thickness 35-mm diameter circular wounds were then created on the dorsum of the mice. Bioengineered equivalents were detached from the 6-well culture plate and placed orthotopically on the wound. The mouse skin removed to generate the wound was de-vitalized by three repeated cycles of freezing and thawing and used as a biological bandage and fixed with sutures to protect and hold the skin substitute in place during the take process. Dead mouse skin was sloughed off generally within 15–20 days after grafting and

regenerated human skin became visible. All animal studies have been approved by Centro de Investigaciones Energéticas Medioambientales y Tecnológicas's (CIEMAT) Institutional Review Board and all experimental procedures were conducted according to European and Spanish laws and regulations. Animals were housed in pathogen-free conditions, in individually ventilated type II cages, with 25 air changes per hour and 10 KGy gamma-irradiated soft wood pellets as bedding.

Immunostaining analysis.

Immunolabeling of XPC and CD24 proteins were performed on air-dried 5- μ m cryosections as described (Bernerd et al., 2001), using mouse polyclonal XPC antibody (1/400) and CD24 monoclonal antibody (1/50). Detection of thymine dimers on cryosections was carried out as previously described, using mouse monoclonal H3 antibody (Sigma ; 1/300) (Bernerd et al., 2001). For detection of p53 and thymine dimers on formalin-fixed paraffin-embedded sections, mouse monoclonal p53 (Diaclone, Besançon, France ; 1/50) and KTM53 (Kamiya Biomedicals, Seattle, WA, USA ; 1/1000) antibodies were used. Staining was revealed using a biotin/streptavidin detection kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

RT-PCR

Biopsies from regenerated skins (approximately 0,2 cm²) were excised 12 weeks after grafting. Samples were crushed using Lysing Matrix D beads and FastPrep 24 device (MP Biomedicals, Illkirch, France). Total RNA extraction was then performed using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Reverse transcription was performed using Advantage RT for PCR kit (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France) according to the manufacturer's protocol. cDNAs were amplified by PCR using specific primers : XPC 5'AAAACACGATGATAATATGGCC/ 5'GCAGAGTAAATAGCAAATCTCC ; GFP 5'GACGTAAACGGCCACAAGTT/ 5'GGGGTGTCTGCTG-GTAGTG ; GAPDH 5' CCAAGGCTGTGGGCAAGGTCAT / 5' TGACAAGGTGCGGCTCCCTAGG ; Full length CD24-IRES-XPC cassette 5' TAATCCGGATCCTCTAGAGC / 5' CCCTCAAAGTAGACGG-CATC.

RESULTS

Recovery of a functional XPC protein in vitro

We constructed a Moloney murine leukemia virus (MMLV)-derived retroviral vector containing the bicistronic cassette CD24-IRES-XPC driven by the strong cytomegalovirus (CMV) promoter (figure 1A). Primary keratinocytes from 3 independent XP-C donors (XP373, XP521 and XP798) were infected with high-titer ($1.2 \cdot 10^9$ vg/ml) retroviral supernatants and separated by magnetic-activated cell sorting (MACS) using a monoclonal CD24 antibody. No evidence of altered morphology or cytotoxicity was observed after transduction and cell sorting (data not shown). Expression of CD24 and XPC proteins in control (WT), parental (XP-C), and transduced XP-C cells (XP-C+CD24-XPC) was assessed by indirect immunofluorescence labeling and western blotting (figure 1C and 1D). The ectopic CD24 protein was properly detected at the membrane of transduced, clonogenic keratinocytes. No XPC protein was detected in XP-C keratinocytes while nuclei of all control and transduced XP-C cells were positive (figure 1C). In transduced cells, levels of nuclear XPC were heterogeneous from one colony to another, suggesting that the population was polyclonal. Accordingly, the number of provirus integrations in genomic DNA from individual transduced clones (XP798 + CD24-XPC) ranged over 13 to 40 (table 2). In addition, southern blot analysis of genomic DNA extracted from XP-C and transduced XP-C keratinocytes revealed no rearrangement of the integrated provirus (figure 1B). Western blotting analysis showed that the full-length XPC protein (125 kDa) was expressed in WT and transduced XP-C keratinocytes, but not in parental XP-C keratinocytes (figure 1D). In transduced XP-C keratinocytes, two additional bands migrating as ~ 110 and ~ 100 kDa proteins, respectively, were also detected, suggesting shorter forms of the XPC protein.

To assess the ability of transduced XP-C keratinocytes to perform NER, unscheduled DNA synthesis (UDS) was measured after UVB irradiation, as previously described (Arnaudeau et al.) (figure 1E). In XP-C keratinocytes, the residual DNA repair capacity was low (10–15% compared to WT keratinocytes), and almost no increase was observed after UVB irradiation. Conversely, transduced XP-C keratinocytes recovered levels of UDS in the range of two independent NER-proficient strains of primary keratinocytes (70% and 90% after the highest UVB dose, respectively).

Whether NER recovery in transduced keratinocytes was sufficient to counteract lethal effects of UVB irradiation was assessed by clonal analysis. In the absence of UV irradiation, colony forming efficiencies (CFE) of WT, XP-C and transduced XP-C keratinocytes ranged over 10 to 20%. After UVB irradiation, XP-C keratinocytes showed markedly reduced survival levels when compared to WT keratinocytes (figure 1F). In contrast, transduced XP-C keratinocytes exhibited UVB cell survival comparable to that of WT cells. Altogether, these data demonstrate efficient reversion of the DNA repair defect and UV sensitivity of XP-C keratinocytes following transduction with the CD24-IRES-XPC retroviral vector.

Assessment of long-term expression of XPC protein

Long-term expression of the transgene through efficient stem cell targeting is one of the most important prerequisite for any strategy of gene therapy. Some clonogenic keratinocytes – termed “holoclones” – possess virtually unlimited life span and correspond to epidermal stem cells (Barrandon and Green, 1987; Mathor et al., 1996). The presence of genetically corrected holoclones in the XP798+CD24-XPC reverted mass population was assessed by clonal analysis and serial propagation. First we isolated 32 independent colonies with large and smooth perimeter (Barrandon and Green, 1987): all of them expressed the XPC protein, although at variable levels, confirming the polyclonal feature of the reverted population (supplementary data 1). Three clones (clone 4, 8 and 25) with initial levels of XPC in the range of control cells (figure 3A) were serially propagated over 100 population doublings, along with the reverted mass population (figure 3B). In the reverted mass population, the exogenous XPC protein was still detected after 70 PDs but its relative expression was substantially reduced compared to its initial level (figure 3C). Whether this decrease in the amount of XPC was due to a loss of transduced cells or a loss of transgene expression was assessed in 8 clones derived from the high passage mass population. The full-length CD24-IRES-XPC cassette (4,7 kb) was detected in genomic DNA from all the clones (figure 3D). The XPC protein was expressed in the 8 clones but its expression was uniformly weak (figure 3E). Quantitative PCR analysis of genomic DNA from high passage reverted keratinocytes revealed a substantial decrease in the average number of provirus integrations in XP798+CD24-XPC mass population (~9 integrations after 70 PD vs ~24 integrations after 10 PD) (table 2). The distribution of proviral copy number among high passage clones was more homogeneous than among low passage clones, suggesting a fewer number of repopulating

clones. XPC expression was also gradually decreased in clone 8 and slightly decreased in high passage clones 4 and 25 (Figure 3C).

In vitro reconstruction of genetically reverted XP-C skin

The ability of reverted XP-C keratinocytes to complete epidermal morphogenesis, with satisfactory features of stratification and differentiation, was first assessed in organotypic skin cultures (Figure 4, HES). In accordance with our previous results (Bergoglio et al., 2007), endogenous expression of CD24 was restricted to suprabasal layers in WT and XP-C reconstructed epidermis, while ectopic CD24 was expressed in basal and suprabasal layers in epidermis reconstructed from *CD24-GFP*- and *CD24-XPC*-transduced XP-C keratinocytes (figure 4, CD24). Interestingly, in WT reconstructed epidermis, XPC protein expression was significantly higher in the basal layer than in the suprabasal layers (figure 4, XPC). XPC protein was not detected in XP-C and XP-C+*CD24-GFP* epidermis, whereas it was expressed at variable levels in all nuclei of the XP-C+*CD24-XPC* epidermis.

Organotypic skin cultures were then exposed to a single dose of UV-SSR (160 mJ/cm² UVB + 1700 mJ/cm² UVA). DNA repair efficiency was measured by immunostaining of cyclobutane pyrimidine dimers (CPD) at various times after UV exposure (figure 5A and 5B). Immediately after irradiation, CPD lesions were detected in all nuclei throughout each epidermis. Twenty-four hours after UVB irradiation, most nuclei remained positive in the XP-C epidermis, whereas fewer CPD lesions were detected in WT, XP-C+*CD24-GFP* and XP-C+*CD24-XPC* epidermis. Five days after irradiation, CPD lesions persisted in all layers of XP-C and XP-C+*CD24-GFP* epidermis. In contrast, they were no longer detectable in any layer of WT epidermis and only a few nuclei were still positive in XP-C+*CD24-XPC* epidermis.

In parallel, p53 protein rapidly accumulated in the nuclei of basal keratinocytes in each epidermis, as shown by the increased number of p53-positive cells 24h after irradiation (figure 5C). Five days after irradiation, p53 expression had returned to its basal level in WT and XP-C+*CD24-XPC* epidermis, whereas NER-deficient epidermis showed a strong and persistent p53 stabilization.

Genetically reverted skin regeneration in vivo

WT, XP-C+*CD24-GFP* and XP-C+*CD24-XPC* keratinocytes were grafted on immunodeficient mice to assess their ability to regenerate a normal epidermis *in vivo* using optimized organotypic culture and grafting methods (Del Rio et al., 2002). Both XP-C+*CD24-GFP* and XP-C+*CD24-XPC* regenerated skins showed excellent features of stratification and differentiation (figure 6A). Owing to the high background caused by the use of a polyclonal mouse antibody, we were not able to perform immunostaining of XPC in the grafts. However, RT-PCR analysis showed an accumulation of *XPC* transcript in XP-C+*CD24-XPC* regenerated skins 12 weeks after grafting (figure 6B). The full length *CD24-IRES-XPC* cassette could also be detected in the reverted skins.

Human skin grafts were submitted to a single UVB exposure corresponding to the biological efficient dose (BED), which is defined as the minimal UVB dose able to induce the formation of sunburn cells in suprabasals layers of the epidermis. Two hours after UV irradiation, CPD lesions were detectable in all nuclei of the regenerated skins and persisted in an amount virtually identical 24h later (figure 6C). Four days after UV exposure (96h), UV-induced DNA lesions were completely eliminated from WT and XP-C+*CD24-XPC* regenerated skins while numerous CPD-positive nuclei could still be detected in the basal and suprabasal layers of XP-C+*CD24-GFP* epidermis.

DISCUSSION

The most common skin tumors in XP patients arise from epidermal keratinocytes but virtually never from dermal fibroblasts. Approaches toward preclinical or clinical trials of *ex vivo* cutaneous gene therapy must therefore rely on the stable genetic correction of XP keratinocytes. Several reports have reported the successful phenotypic reversion of the NER defect in XP skin fibroblasts after *ex vivo* retroviral transduction of the appropriate *cDNAs* (Carreau et al., 1995; Quilliet et al., 1996; Zeng et al., 1997; Marchetto et al., 2006), but only one has addressed the *ex vivo* genetic correction of epidermal keratinocytes (Arnaudeau et al., 2003). In the latter case, expression of the exogenous XPC protein became hardly detectable after 8 weeks of serial propagation (30-40 PD), presumably due to G418 selection which does not seem compatible with full and safe selection of genetically corrected epidermal stem cells (Mathor et al., 1996). However, except if we could ensure a 100% transduction efficiency (a yield we are unable to reach), the selection step cannot be circumvented in the case of keratinocytes derived from cancer-prone patients. Using the safe selection strategy recently developed in our laboratory (Bergoglio et al., 2007), we report here the first sustained genetic correction of epidermal keratinocytes from XP-C patients that allowed long term *in vitro* and *in vivo* preclinical studies

Epidermal keratinocytes from 3 independent XP-C patients were transduced with a retroviral vector containing the *CD24-IRES-XPC* cassette driven by the hybrid LTR/CMV promoter. Two of the patients whose cells were used in this study carry a frameshift mutation resulting in the creation of a premature termination codon, predicting the production of truncated XPC proteins (Soufir et al., 2010). It has been suggested that *XPC* transcripts containing pre-termination signals might be rapidly degraded by the nonsense-mediated mRNA decay (NMD) pathway (Khan et al., 2006). Indeed, RT-QPCR analysis allowed us to confirm that very low levels of *XPC* mRNA were expressed in XP-C keratinocytes compared to WT keratinocytes (<10%; data not shown; see also figure 5B, lane 3). Consequently, the XPC protein could not be detected by immunofluorescence labeling or western blotting in XP-C keratinocytes, while it was successfully re-expressed in transduced XP-C cells. In addition to the full-length (125 kDa) XPC protein, two shorter and weaker bands (~100 and 110 kDa) were specifically detected by western blot analysis in the transduced XP-C keratinocytes. Analysis of *XPC* cDNA sequence revealed the presence of two in-frame ATG codons

(positions +457 and +685, respectively) downstream the *bona fide* initiation codon (+106). Translation initiation from these codons might produce amino-terminal truncated XPC proteins of 823 [XPC(118-940)] and 747 [XPC(194-940)] amino acids, respectively, that could correspond to the two bands observed in the transduced XP-C cells. The presence of an IRES sequence upstream XPC cDNA in our retroviral vector might promote translation from these multiple in-frame initiation codons. When Legerski et al. first cloned human XPC cDNA in 1992, they described a shorter form of the wild-type XPC protein lacking the 117 first amino acids [XPC(118-940)] (Legerski and Peterson, 1992), which might correspond to the 110 kDa band observed in our transduced cells. Expression of the XPC(118-940) truncated protein in an immortalized XP-C cell line restored normal UDS levels and UV survival properties, suggesting that this shorter protein is completely functional in NER (Legerski and Peterson, 1992). Although most of the interaction domains essential for XPC function in NER are located in the carboxy-terminal region of the protein (Cleaver et al., 2009), further experiments should determine whether the XPC(194-940) protein is functional in NER and whether the two truncated forms of XPC retain, or at least do not impede, the capacity of the full length XPC protein to interact with XPA and the base excision repair (BER) protein OGG1 (Bunick et al., 2006; Bernardes de Jesus et al., 2008). In any case, our functional analyses indicate that transduced XP-C keratinocytes expressing the three forms of XPC displayed a fully reverted phenotype, as assessed by UDS and cell survival after UVB irradiation.

Long term expression of a transgene relies on the efficient targeting of stem cells. In a keratinocyte population, holoclones exhibit the highest growth potential and are thought to be founded by epidermal stem cells (Barrandon and Green, 1987). To address the question of efficient transduction of epidermal stem cells, mass culture of genetically corrected XP-C keratinocytes and three independent clones isolated from this population were propagated *ex vivo* for more than 100 population doublings (PD). This, and clonal analyses, attested the presence of holoclones in the transduced population. A substantial and progressive decrease in the amount of the XPC protein was observed throughout serial propagation of the reverted mass population. At least three phenomena might explain this observation. First, as previously reported *ex vivo* (Mathor et al., 1996) and *in vivo* (Del Rio et al., 2002), analysis of the number of proviral DNA integrations in the course of serial propagation suggested a progressive selection of clonogenic cells bearing less (14 after 70 PD) copies of the proviral

genome than the average copy number estimated at the beginning of the culture (28 after 10 PD). This could account for the gradual decrease of XPC levels in high passage cultures. Second, in the three reverted holoclones isolated from the low passage mass population, the level of XPC expression was also gradually decreased, although to a variable extent. Silencing of the transgene, possibly through methylation of the LTR promoter sequences, might explain this loss of expression (Challita and Kohn, 1994). Third, a post-translational regulation of XPC in keratinocytes approaching growth capacity exhaustion cannot be ruled out, although a slight decrease of XPC protein expression can also be observed in clone 4 which does not seem to undergo the clonal transition associated with growth capacity exhaustion (supplementary data 2).

Taken together, these observations could result in a rather pessimistic view of therapeutic perspectives for XP-C patients, most notably due to the progressive decrease of XPC expression. However, much more optimistic conclusions can be drawn from results obtained in corrected organotypic skin cultures and, more importantly, in corrected XP-C skin regenerated at the long term on immunodeficient mice. Indeed, an important question here was to assess whether *CD24-XPC*-transduced keratinocytes not only were able to repair UV-induced DNA lesions and survive UV irradiation but also retained the full capacity to generate a normal epidermis in organotypic skin cultures and after grafting on immunodeficient mice, as *CD24-GFP* keratinocytes do (Bergoglio et al., 2007). Interestingly, we showed that in control (WT) reconstructed skin, XPC expression is mostly restricted to the basal layer of the epidermis. With respect to previous studies showing that ectopic or over-expression of XPC could impede cell homeostasis ((Ng et al., 2003)), LTR-driven *XPC* expression in all the layers of the epidermis could have resulted in an abnormal behavior. However, corrected organotypic skin cultures and skin grafts exhibited normal features, indicating that XPC expression in both basal and suprabasal layers was compatible with normal proliferation, stratification and differentiation (not shown). Due to the mouse origin of the antibody, we failed to reliably immunolabel XPC *in situ* on skin sections from the grafts, although it could be detected in control (basal layer) and reverted XP-C organotypic skin cultures (basal and suprabasal layers). Long term expression of XPC in the grafts was thus verified by PCR. Accumulation of XPC transcripts 12 weeks after grafting suggested that the clonal restriction observed *in vitro* might not occur *in vivo*, possibly because the number of population doublings required to maintain the epidermis for 12 weeks is insufficient to

generate this restriction (Kolodka et al., 1998). Importantly, in both organotypic skin cultures and skin regenerated *in vivo* from reverted XP-C keratinocytes (8 weeks after grafting), complete elimination of CPD DNA lesions was observed by 96 hours following a single UVB irradiation. Thus, in a 3D context, the expression of XPC in both basal and suprabasal epidermal layers remained compatible with normal rates of DNA repair by NER in corrected XP-C epidermis. Following UV irradiation, human keratinocytes undergo a DNA damage-induced cell cycle arrest mediated by the activation and stabilization of the tumor suppressor protein p53 (Van Laethem et al., 2009). In NER-deficient cells, persistence of unrepaired DNA lesions results in a prolonged p53 stabilization (Abrahams et al., 1995; Dumaz et al., 1998). Here, we show that this persistent p53 accumulation can be observed in skins reconstructed *ex vivo* from XP-C keratinocytes. In reverted XP-C reconstructed skin, p53 protein levels returned to normal levels five days after irradiation when CPD lesions were efficiently repaired in the epidermis. Taken together, these observations suggest that, in addition to efficient NER of CPD lesions, genetic correction of XP-C keratinocytes restored a normal cellular response to UV-induced DNA damage. Further experiments will determine whether appropriate p53 regulation and NER activity in corrected grafts protect epidermal cells from UV-induced tumorigenesis at the long term.

To further improve the sustained genetic correction of XP-C keratinocytes, we are currently investigating the possibility to insert the *XPC* promoter upstream the *XPC* cDNA sequence in a self-inactivating (SIN) retroviral or lentiviral vector. This construct would better preserve the steady state and UV-induced transcriptional regulation of XPC expression in the epidermis. It should also allow to limit the transgene silencing while decreasing the risk of insertional mutagenesis. Together, these improvements and the results presented here should open a rational perspective toward skin resurfacing of XP patients using genetically corrected keratinocytes.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to Dr. J. Leclaire for his continuous support and encouragement. We thank Sandra Del Bino and Juliette Sok for their expert help with RNA extraction and RT-PCR analysis on skin samples. We thank the Production and Control department of Genethon which is supported by the Association Française contre les Myopathies, within the Gene Vector Production Network. EW thanks the Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT) and gratefully acknowledges grants from the Fondation René Touraine and the Ligue Nationale Contre le Cancer.

REFERENCES

- Abrahams, P.J., R. Schouten, T. van Laar, A. Houweling, C. Terleth, and A.J. van der Eb. 1995. Different regulation of p53 stability in UV-irradiated normal and DNA repair deficient human cells. *Mutat Res.* 336:169-80.
- Arnaudeau, C., F. Brellier, O. Chevallier-Lagente, J.H. Hoeijmakers, F. Bernerd, A. Sarasin, and T. Magnaldo. 2003. Genetic correction of DNA repair deficient/cancer prone xeroderma pigmentosum group C keratinocytes. *Hum Gene Ther*, submitted.
- Barrandon, Y., and H. Green. 1987. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84:2302-6.
- Bergoglio, V., F. Larcher, O. Chevallier-Lagente, A. Bernheim, O. Danos, A. Sarasin, M.D. Rio, and T. Magnaldo. 2007. Safe selection of genetically manipulated human primary keratinocytes with very high growth potential using CD24. *Mol Ther.* 15:2186-93.
- Bernardes de Jesus, B.M., M. Bjoras, F. Coin, and J.M. Egly. 2008. Dissection of the molecular defects caused by pathogenic mutations in the DNA repair factor XPC. *Mol Cell Biol.* 28:7225-35.
- Bernerd, F., D. Asselineau, C. Vioux, O. Chevallier-Lagente, B. Bouadjar, A. Sarasin, and T. Magnaldo. 2001. Clues to epidermal cancer proneness revealed by reconstruction of DNA repair-deficient xeroderma pigmentosum skin in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:7817-7822.
- Broughton, B.C., A. Cordonnier, W.J. Kleijer, N.G. Jaspers, H. Fawcett, A. Raams, V.H. Garritsen, A. Stary, M.F. Avril, F. Boudsocq, C. Masutani, F. Hanaoka, R.P. Fuchs, A. Sarasin, and A.R. Lehmann. 2002. Molecular analysis of mutations in DNA polymerase eta in xeroderma pigmentosum-variant patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:815-20.
- Bunick, C.G., M.R. Miller, B.E. Fuller, E. Fanning, and W.J. Chazin. 2006. Biochemical and structural domain analysis of xeroderma pigmentosum complementation group C protein. *Biochemistry.* 45:14965-79.
- Carreau, M., X. Quilliet, E. Eveno, A. Salvetti, O. Danos, J.M. Heard, M. Mezzina, and A. Sarasin. 1995. Functional retroviral vector for gene therapy of xeroderma pigmentosum group D patients. *Hum Gene Ther.* 6:1307-15.
- Challita, P.M., and D.B. Kohn. 1994. Lack of expression from a retroviral vector after transduction of murine hematopoietic stem cells is associated with methylation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:2567-71.
- Cleaver, J.E. 1968. Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum. *Nature.* 218:652-6.
- Cleaver, J.E., E.T. Lam, and I. Revet. 2009. Disorders of nucleotide excision repair: the genetic and molecular basis of heterogeneity. *Nat Rev Genet.* 10:756-68.
- de Laat, W.L., N.G. Jaspers, and J.H. Hoeijmakers. 1999. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev.* 13:768-85.
- Del Rio, M., F. Larcher, F. Serrano, A. Meana, M. Munoz, M. Garcia, E. Munoz, C. Martin, A. Bernad, and J.L. Jorcano. 2002. A preclinical model for the analysis of genetically modified human skin in vivo. *Hum Gene Ther.* 13:959-68.
- Dumaz, N., C. Drougard, X. Quilliet, M. Mezzina, A. Sarasin, and L. Daya-Grosjean. 1998. Recovery of the normal p53 response after UV treatment in DNA repair- deficient fibroblasts by retroviral-mediated correction with the XPD gene. *Carcinogenesis.* 19:1701-4.
- Khan, S.G., K.S. Oh, T. Shahlavi, T. Ueda, D.B. Busch, H. Inui, S. Emmert, K. Imoto, V. Muniz-Medina, C.C. Baker, J.J. DiGiovanna, D. Schmidt, A. Khadavi, A. Metin, E. Gozukara, H. Slor, A. Sarasin, and K.H. Kraemer. 2006. Reduced XPC DNA repair gene mRNA levels in clinically normal parents of xeroderma pigmentosum patients. *Carcinogenesis.* 27:84-94.
- Khan, S.G., K.S. Oh, S. Emmert, K. Imoto, D. Tamura, J.J. Digiovanna, T. Shahlavi, N. Armstrong, C.C. Baker, M. Neuburg, C. Zalewski, C. Brewer, E. Wiggs, R. Schiffmann, and K.H. Kraemer. 2009.

- XPC initiation codon mutation in xeroderma pigmentosum patients with and without neurological symptoms. *DNA Repair (Amst)*. 8:114-25.
- Kleijer, W.J., V. Laugel, M. Berneburg, T. Nardo, H. Fawcett, A. Gratchev, N.G. Jaspers, A. Sarasin, M. Stefanini, and A.R. Lehmann. 2008. Incidence of DNA repair deficiency disorders in western Europe: Xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *DNA Repair (Amst)*. 7:744-50.
- Kolodka, T.M., J.A. Garlick, and L.B. Taichman. 1998. Evidence for keratinocyte stem cells in vitro: long term engraftment and persistence of transgene expression from retrovirus-transduced keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:4356-61.
- Kraemer, K., M. Lee, and J. Scotto. 1987. Xeroderma pigmentosum. Cutaneous, ocular and neurologic abnormalities in 830 published cases. *Arch. Dermatol.* 123:241-250.
- Legerski, R., and C. Peterson. 1992. Expression cloning of a human DNA repair gene involved in xeroderma pigmentosum group C. *Nature*. 359:70-3.
- Marchetto, M.C., R.G. Correa, C.F. Menck, and A.R. Muotri. 2006. Functional lentiviral vectors for xeroderma pigmentosum gene therapy. *J Biotechnol.* 126:424-30.
- Masutani, C., R. Kusumoto, A. Yamada, N. Dohmae, M. Yokoi, M. Yuasa, M. Araki, S. Iwai, K. Takio, and F. Hanaoka. 1999. The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase eta. *Nature*. 399:700-4.
- Mathor, M.B., G. Ferrari, E. Dellambra, M. Cilli, F. Mavilio, R. Cancedda, and M. De Luca. 1996. Clonal analysis of stably transduced human epidermal stem cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:10371-6.
- Merten, O.W. 2004. State-of-the-art of the production of retroviral vectors. *J Gene Med.* 6 Suppl 1:S105-24.
- Ng, J.M., W. Vermeulen, G.T. van der Horst, S. Bergink, K. Sugawara, H. Vrieling, and J.H. Hoeijmakers. 2003. A novel regulation mechanism of DNA repair by damage-induced and RAD23-dependent stabilization of xeroderma pigmentosum group C protein. *Genes Dev.* 17:1630-45.
- Quilliet, X., O. Chevallier-Lagente, E. Eveno, T. Stojkovic, A. Destee, A. Sarasin, and M. Mezzina. 1996. Long-term complementation of DNA repair deficient human primary fibroblasts by retroviral transduction of the XPD gene. *Mutat Res.* 364:161-9.
- Rheinwald, J.G., and H. Green. 1975. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*. 6:331-43.
- Riedl, T., F. Hanaoka, and J.M. Egly. 2003. The comings and goings of nucleotide excision repair factors on damaged DNA. *EMBO J.* 22:5293-303.
- Sarasin, A. 1999. The molecular pathways of ultraviolet-induced carcinogenesis. *Mutat Res.* 428:5-10.
- Soufir, N., C. Ged, A. Bourillon, F. Austerlitz, C. Chemin, A. Stary, J. Armier, D. Pham, K. Khadir, J. Roume, S. Hadj-Rabia, B. Bouadjar, A. Taieb, H. de Verneuil, H. Benchiki, B. Grandchamp, and A. Sarasin. 2010. A Prevalent Mutation with Founder Effect in Xeroderma Pigmentosum Group C from North Africa. *J Invest Dermatol.*
- Sugawara, K. 2009. Regulation of damage recognition in mammalian global genomic nucleotide excision repair. *Mutat Res.* 685:29-37.
- Svejstrup, J.Q. 2002. Mechanisms of transcription-coupled DNA repair. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:21-9.
- Van Laethem, A., M. Garmyn, and P. Agostinis. 2009. Starting and propagating apoptotic signals in UVB irradiated keratinocytes. *Photochem Photobiol Sci.* 8:299-308.
- Volker, M., M.J. Mone, P. Karmakar, A. van Hoffen, W. Schul, W. Vermeulen, J.H. Hoeijmakers, R. van Driel, A.A. van Zeeland, and L.H. Mullenders. 2001. Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo. *Mol Cell.* 8:213-24.
- Zeng, L., X. Quilliet, O. Chevallier-Lagente, E. Eveno, A. Sarasin, and M. Mezzina. 1997. Retrovirus-mediated gene transfer corrects DNA repair defect of xeroderma pigmentosum cells of complementation groups A, B and C. *Gene Ther.* 4:1077-84.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Recovery of a functional XPC protein in *CD24-XPC*-transduced XP-C keratinocytes.

(A) Schematic representation of the retroviral vectors pCMMP *CD24-IRES-GFP* and pCMMP *CD24-IRES-XPC*. LTRs: long terminal repeats; ψ : packaging signal. Cytomegalovirus immediate-early (CMV IE) promoter substitutes the 5'U3 sequence. **(B)** Southern blot analysis of provirus integrations into the host genome. Genomic DNA of WT (5), XP-C (4) and transduced XP-C keratinocytes (1: XP373 + *CD24-XPC* ; 2: XP521 + *CD24-XPC* ; 3: XP798 + *CD24-XPC*) was digested with *AgeI* and *EcoRV* to release the 4,7 kb bicistronic cDNA sequence (*CD24-IRES-XPC*). pCMMP *CD24-IRES-XPC* plasmid digested with *AgeI/EcoRV* and diluted in Hacat genomic DNA was used as a positive control (+). No rearrangement of the provirus could be detected. e*: endogenous *XPC* fragment. **(C)** Immunofluorescence analysis of XPC (in green) and CD24 (in red) expression in WT and XP-C keratinocyte cultures before (XP-C) and after (XP-C + *CD24-XPC*) retroviral transduction and CD24 selection. DAPI was used to stain nuclei. XPC protein was re-expressed in the nuclei of transduced cells (XP-C + *CD24-XPC*). Note that CD24 was detected at the membrane of all the cells within a corrected clone whereas it is only expressed in stratifying differentiated cells in non-transduced XP-C cells (compare CD24 in XP-C and XP-C + *CD24-XPC*). **(D)** Western blot analysis of WT (1: WT1 ; 2: WT2), XP-C (3: XP373 ; 4: XP521 ; 5: XP798) and transduced XP-C keratinocytes (6: XP373 + *CD24-XPC* ; 7: XP521 + *CD24-XPC* ; 8: XP798 + *CD24-XPC*). Protein extracts from cultured keratinocytes were prepared as described in Methods. Anti-XPC or anti-CD24 antibodies were used as probes and anti-GAPDH antibody was used as a control. **(E)** Unscheduled DNA synthesis (UDS) after UVB irradiation. Cells were incubated with [³H]thymidine, irradiated under UVB (0 to 1500 J/m²) and then processed for autoradiography. The number of grains was counted in 60-100 keratinocyte nuclei in each condition and NER efficiency was determined by the ratio of the average number of grains in a given strain to the average number of grains in WT#1 cells at 1500 J/m² (100%). Data are represented as mean \pm s.e.m. of at least two independent experiments. **(F)** UV-survival curves of WT, XP-C and transduced XP-C strains after UVB irradiation. Doses of UVB delivered were 200, 800 and 1200 J/m² for WT and *CD24-XPC*-transduced cells and 200, 400 and 800 J/m² for XP-C cells. The relative cell survival was calculated as the number of colonies obtained after UV irradiation per total

colony number obtained from unirradiated cells $\times 100$. For additional details, see “Materials and Methods.”

Figure 2 : Long-term analysis of reverted XP798 keratinocytes.

(A) Western blot analysis of XPC expression in holoclones (C8, C4 and C25) isolated from reverted XP798 keratinocytes (M, parental mass population). **(B)** Cumulative cell doublings of reverted mass population (open diamonds), clone 8 (black squares), clone 4 (black triangles) and clone 25 (black cross). **(C)** Western blot analysis of XPC expression in reverted XP798 mass culture (Mass) and isolated clones after the indicated population doublings (PD 1-75). A progressive decrease in XPC expression is observed in parental mass culture and in clone 8. In clones 4 and 25, a slight decrease of XPC expression is observed at late passages. **(D)** PCR amplification of the full-length *CD24-IRES-XPC* cassette in genomic DNA from XP798 (1), reverted XP798 mass population at low (2) and high (3) passages, clone 8 at low (4) and high (5) passages, clone 4 at low (6) and high (7) passages, clone 25 at low (8) and high (9) passages and from 8 independent clones isolated from high passage (70 PD) reverted XP798 mass population (10 to 17). **(E)** Western blot analysis of XPC expression in reverted XP798 mass culture at low (M) and high passage (M+70) and in 8 independent clones isolated from high passage (70 PD) reverted XP798 mass population (1 to 8).

Figure 3 : Re-expression of XPC protein in organotypic skin cultures.

In vitro reconstructed skins were prepared as previously described (Bernerd et al. 2001). XP-C keratinocytes transduced with pCMMP *CD24-IRES-GFP* retrovirus were used as a control (XP-C + *CD24-GFP*). All the strains of keratinocytes were seeded on a dermal equivalent containing normal (WT) fibroblasts. Histological staining (hematoxylin, eosin, and safran, HES ; a to d) shows that transduced XP-C keratinocytes present appropriate features of stratification and differentiation. Green fluorescent protein (GFP) expression was detected by direct fluorescence (e, parental XP-C cells; f, XP-C + *CD24-GFP* cells). Re-expression of XPC protein in all the layers of reverted XP-C epidermis was revealed by XPC immunofluorescence staining (compare j to h and i). Note that in WT epidermis (g), XPC expression is higher in the basal layer than in the suprabasal layers. As expected, endogenous *CD24* expression is restricted to the suprabasal layers of the epidermis (k, WT

epidermis ; l, XP-C epidermis) while exogenous CD24 is expressed in all the layers of the epidermis reconstructed from *CD24-GFP*- (m) or *CD24-XPC*-transduced keratinocytes (n).

Figure 4: Recovery of UV-induced DNA lesions repair in reverted XP-C organotypic skin cultures. (A) CPD immunolabeling was performed: in the absence of UV irradiation (no UV; a, e, l, m); immediately after a single UV-SSR exposure (UV + 0h; b, f, j, n); 24 hours after irradiation (UV + 24 h; c, g, k, o); five days after irradiation (UV + 5 days; d, h, l, p). Note the complete disappearance of CPD lesions from the basal and suprabasal layers of WT (d *versus* b) and reverted XP-C epidermis (p *versus* n) and the persistence of DNA damage in all epidermal cell layers of XP-C (h *versus* f) and XP-C+*CD24-GFP* epidermis (l *versus* j). (B) Quantification of UV-induced DNA damage repair in *in vitro* reconstructed epidermis. For each time point, CPD-positive cells were counted on four independent representative fields and their number was expressed with respect to the epidermis surface area (estimated using ImageJ software). (C) After p53 immunolabeling, quantification of p53-positive cells was performed as described in (B). Note the persistent accumulation of p53 in nuclei of NER-deficient XP-C and XP-C+*CD24-GFP* epidermis.

Figure 5: Reverted XP-C keratinocytes regenerate skin with normal DNA repair capacity after grating on immunodeficient mice. (A) (a) Fluorescent emission of green fluorescent protein (GFP) under blue light in XP-C+*CD24-GFP* regenerated skin. (b and c) Histological appearance of XP-C+*CD24-GFP* and XP-C+*CD24-XPC* epidermis, respectively, 8 weeks after grafting. (B) RT-PCR analysis of the full-length *CD24-IRES-XPC* transcript (Transgene) and of *XPC*, *GFP* and *GAPDH* transcripts in (1) XP-C+*CD24-GFP* and (2) XP-C+*CD24-XPC* regenerated skins, 12 weeks after grafting. (3) XP-C+*CD24-GFP* and (4) XP-C+*CD24-XPC* keratinocytes (10 PD) were used as controls. (C) Immunofluorescence indirect labeling of CPD lesions was performed: in the absence of UV irradiation (no UV; d, h, l); 2 hours after a single UVB exposure (UV + 0h; e, i, m); 24 hours after irradiation (UV + 24h; f, j, n); 96 hours after irradiation (UV + 96h ; g, k, o). While CPD lesions persist in the NER-deficient XP-C+*CD24-GFP* epidermis 96h after irradiation (k *versus* i), DNA damage-containing cells were undetectable in basal and suprabasal layers of WT (g *versus* e) and reverted XP-C epidermis (o *versus* m). The dashed line indicates the dermal–epidermal junction. (D) Immunoperoxidase staining of CPD lesions in (p) XP-C+*CD24-GFP* and (q) XP-C+*CD24-XPC* regenerated skins 96h after UV

irradiation confirm the efficient removal of DNA damage in reverted XP-C epidermis compared to XP-C skin.

FIGURES

FIGURE 1

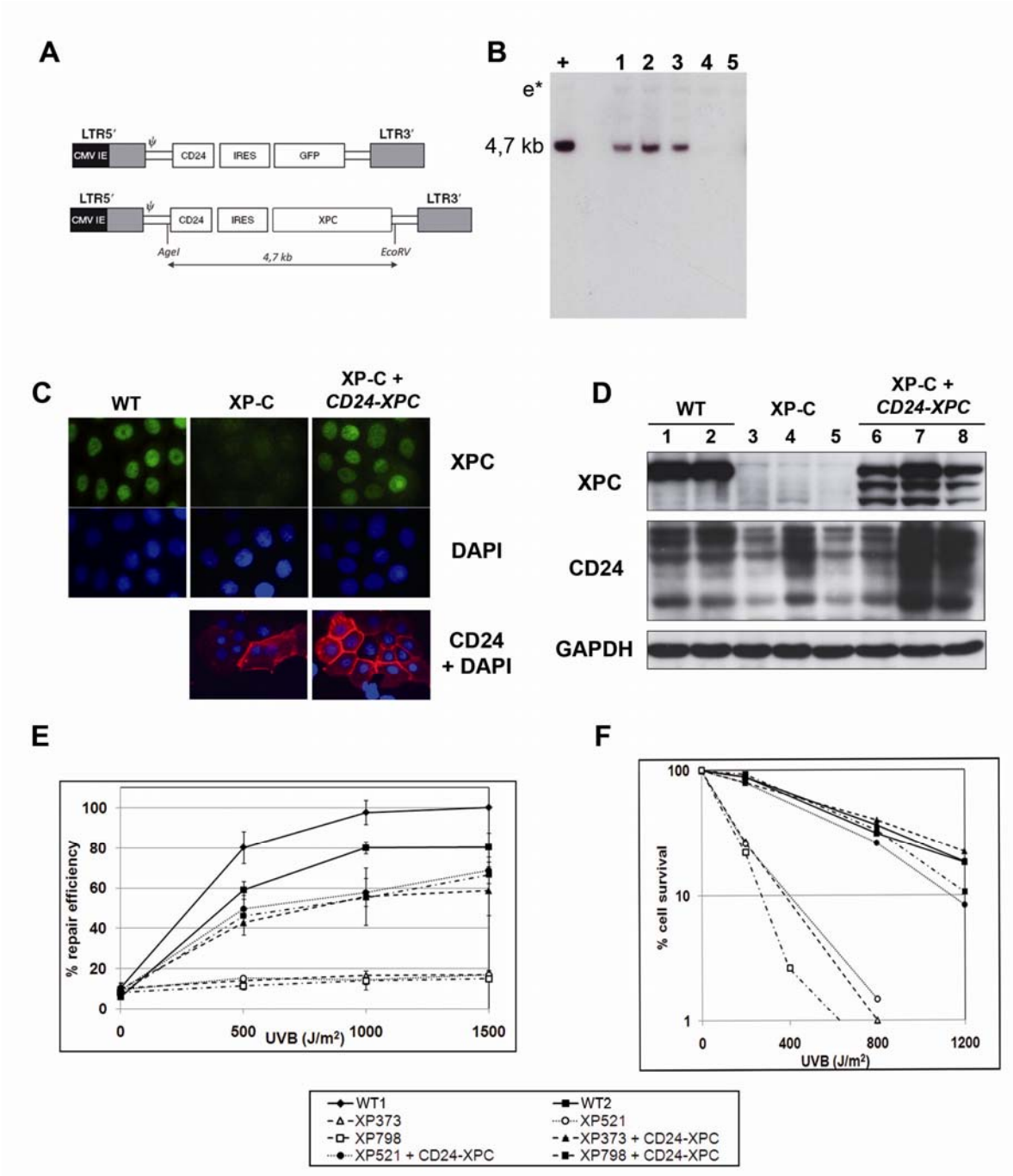


FIGURE 2

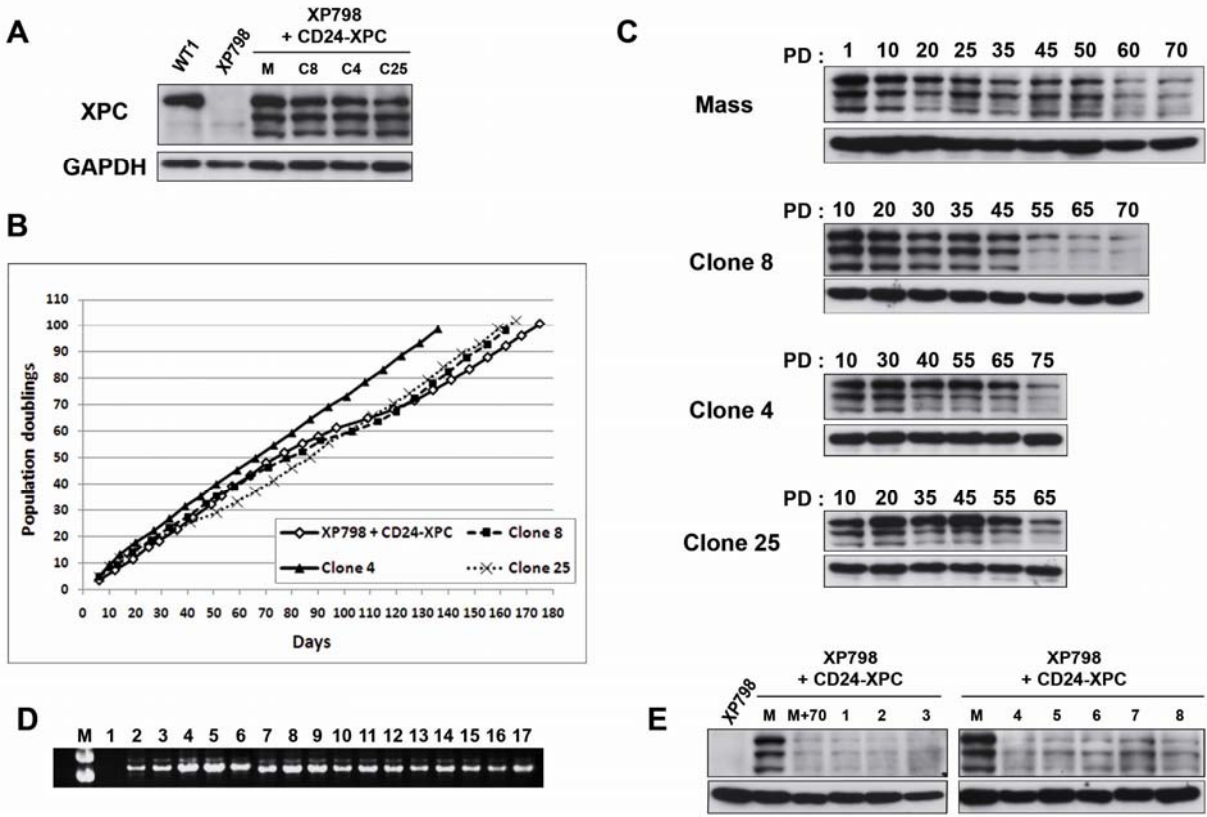


FIGURE 3

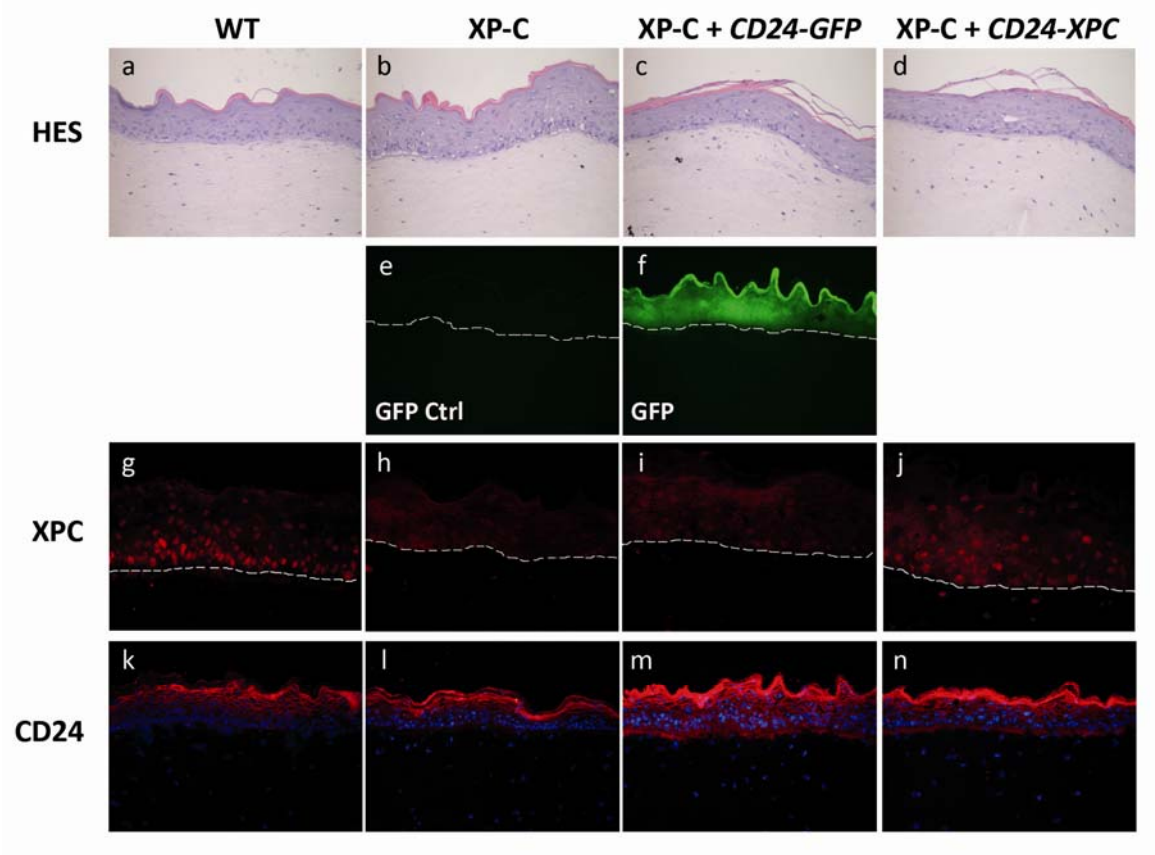


FIGURE 4

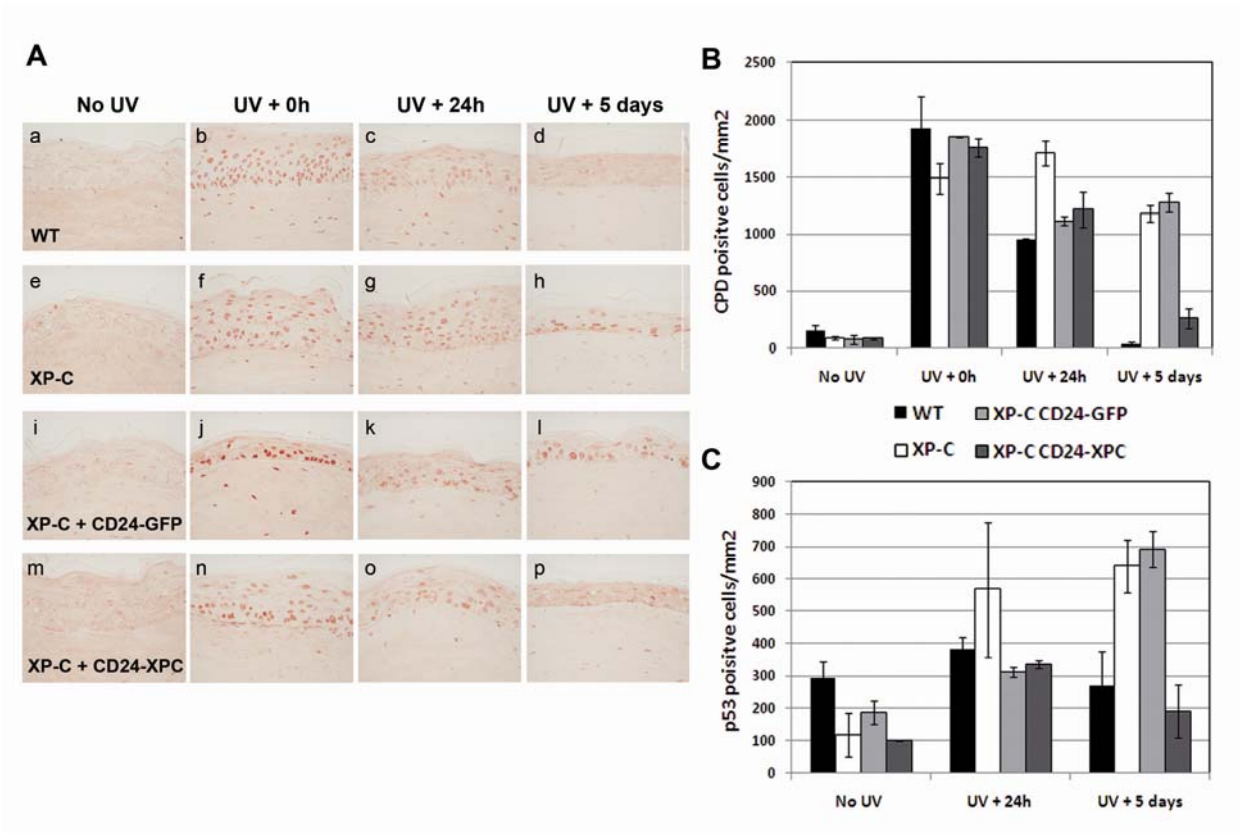
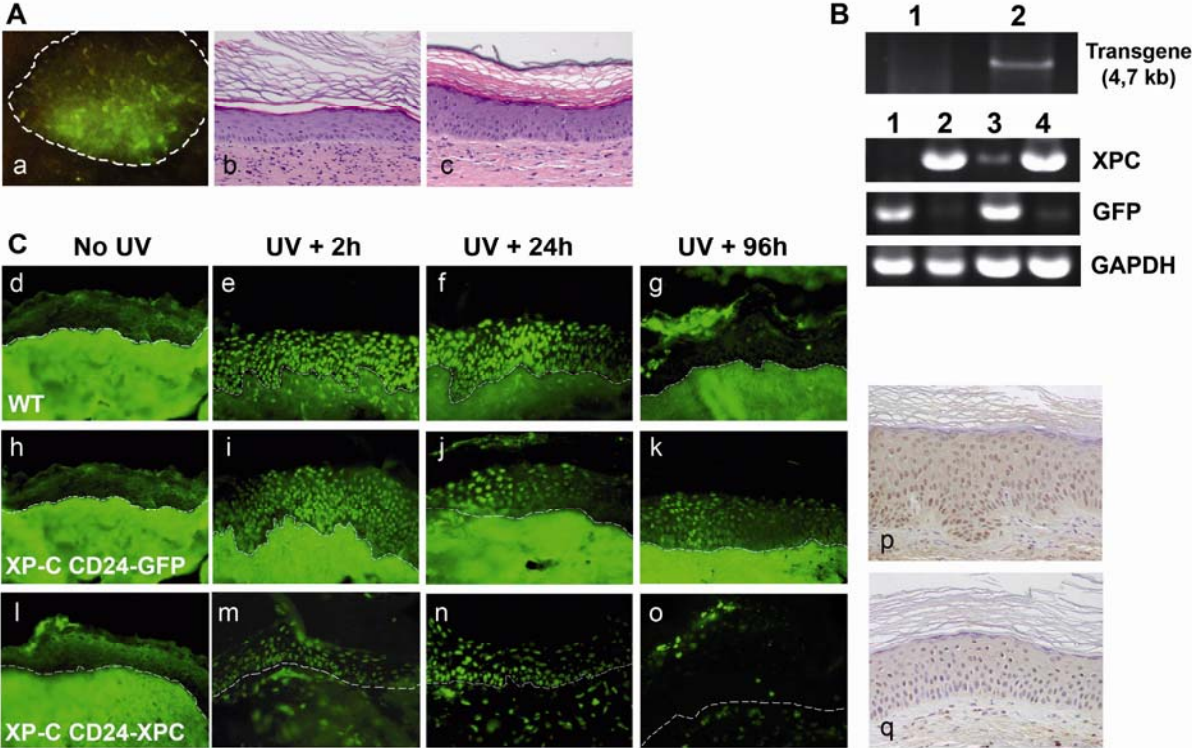


FIGURE 5



TABLES

Patient	Age at biopsy	Phenotype	XPC mutation (protein)	Clinical characteristics	Onset of tumors
WT1	2 years	WT	<i>wt</i>	NA	NA
WT2	6 months	WT	<i>wt</i>	NA	NA
XP373	4 years	XP-C	<i>c.1643_1644delTG homoz</i> (p.Val548AlafsX25)	1 facial BCC	2 years
XP521	29 years	XP-C	ND	Photophobia. SCC of the lip. Multiple lentigines. In situ carcinomas (eye).	13 years
XP798	28 months	XP-C	<i>c.1643_1644delTG homoz</i> (p.Val548AlafsX25)	Photoaging (hands). Keratosis. Ephelides.	NA

Table 1: Patients and cell characteristics.

	Low passage (10 PD)	High passage (70 PD)
XP373 + CD24-XPC	23	n.d.
XP521 + CD24-XPC	26	n.d.
XP798 + CD24-XPC	24	9
Clone 4	45	39
Clone 8	25	25
Clone 25	40	n.d.
Clone 8	13	n.d.
Clone 23	35	n.d.
Clone 27	18	n.d.
Clone 30	39	n.d.
Mean :	28	n.a.
Clone I	n.a.	11
Clone II	n.a.	13
Clone VI	n.a.	13
Clone VII	n.a.	18
Clone VIII	n.a.	14
Clone IX	n.a.	14
Clone X	n.a.	13
Clone XII	n.a.	12
Mean :	n.a.	14

Table 2: Q-PCR estimation of the number of provirus integrations into genomic DNA isolated from reverted XP-C strains at low (10 PD) and high passages (70 PD).

Clones 4, 8, 25, 18, 23, 27 and 30 were isolated from low passage XP798 + *CD24-XPC* strain. Clones I, II, VI, VII, VIII, IX, X and XII were isolated from high passage (70 PD) XP798 + *CD24-XPC* strain.

SUPPLEMENTARY DATA

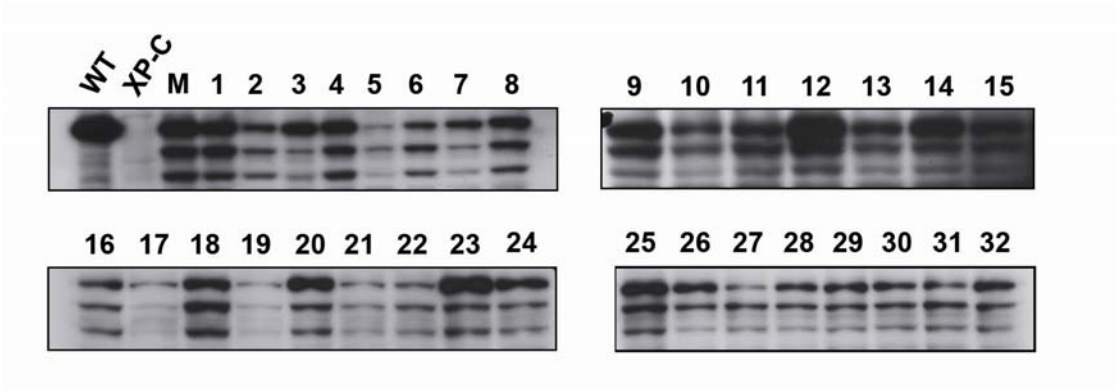
Supplementary data 1: Western blot analysis of XPC expression in 32 independent clones isolated from reverted XP798 mass population.

Note that all of the clones re-express XPC protein, although levels of expression are very heterogeneous from one clone to another. M, reverted XP798 mass population.

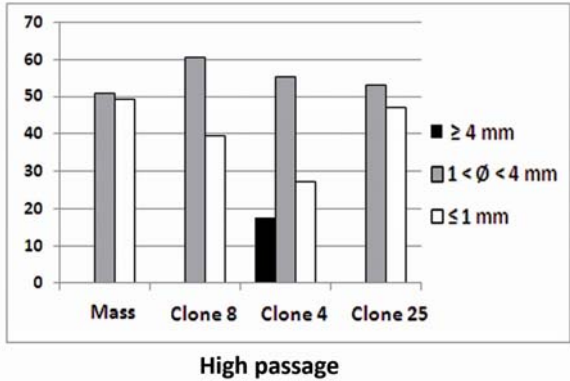
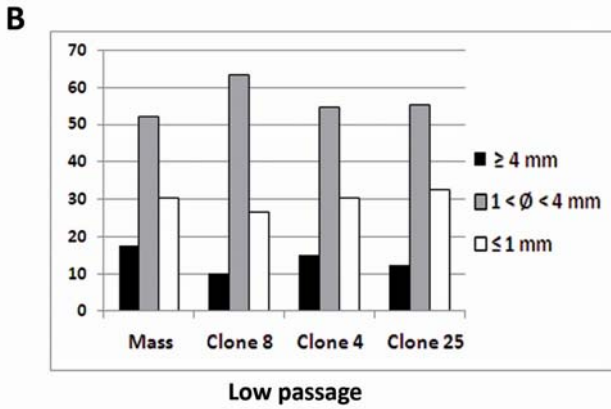
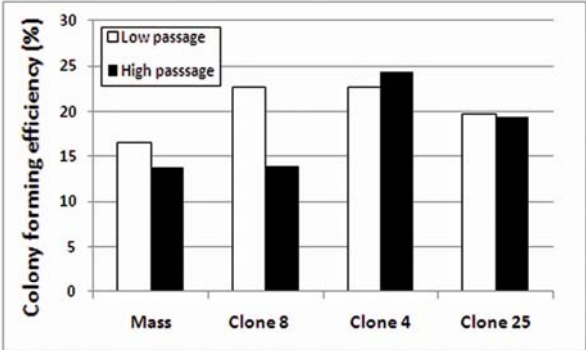
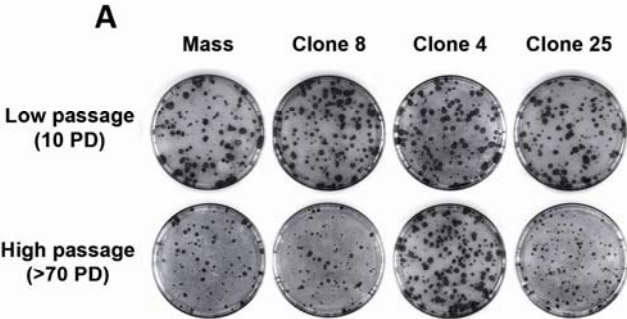
Supplementary data 2: (A) Colony forming efficiency of reverted XP798 mass population (Mass) and reverted holoclones (clone 8, 4 and 25) at low and high passages. Mass, reverted XP798 mass population; PD, population doublings. **(B) Colony type distribution of reverted mass population and holoclones at low and high passages.** Note the disappearance of large colonies (> 4mm) in mass population and in holoclones 8 and 25 following serial propagation. In contrast, clone 4 still generates large colonies after 70 PD, suggesting that this is a clone of stem cell origin.

Supplementary data 3: Histological appearance of regenerated human skin on immunodeficient mice at various times following UVB irradiation.

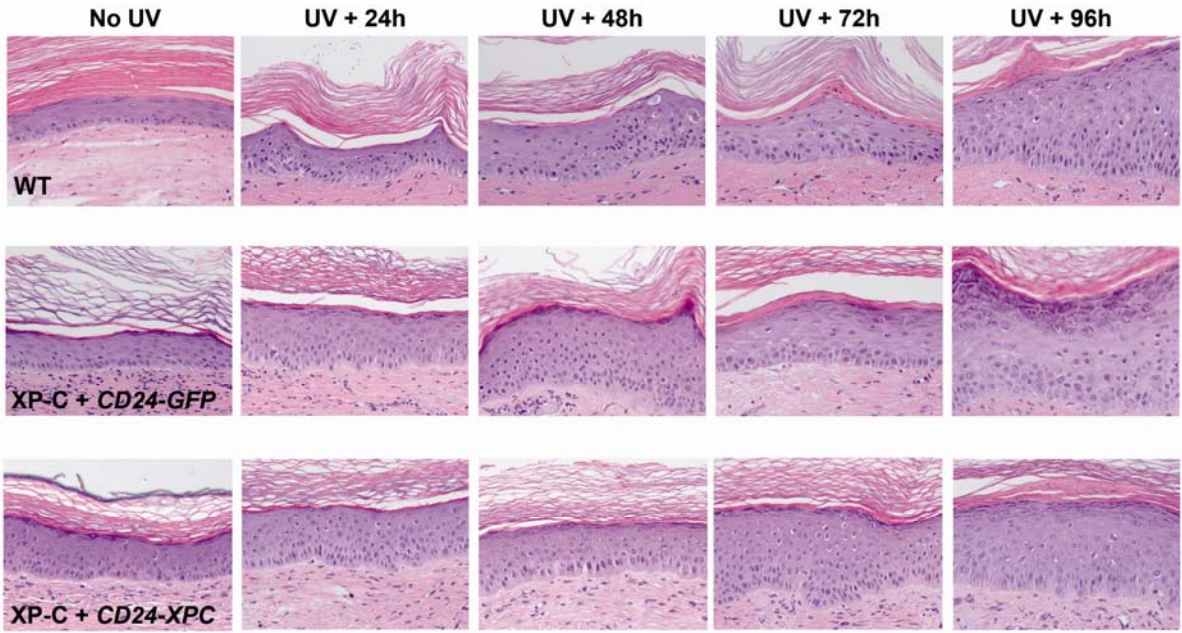
SUPPLEMENTARY DATA 1



SUPPLEMENTARY DATA 2



SUPPLEMENTARY DATA 3



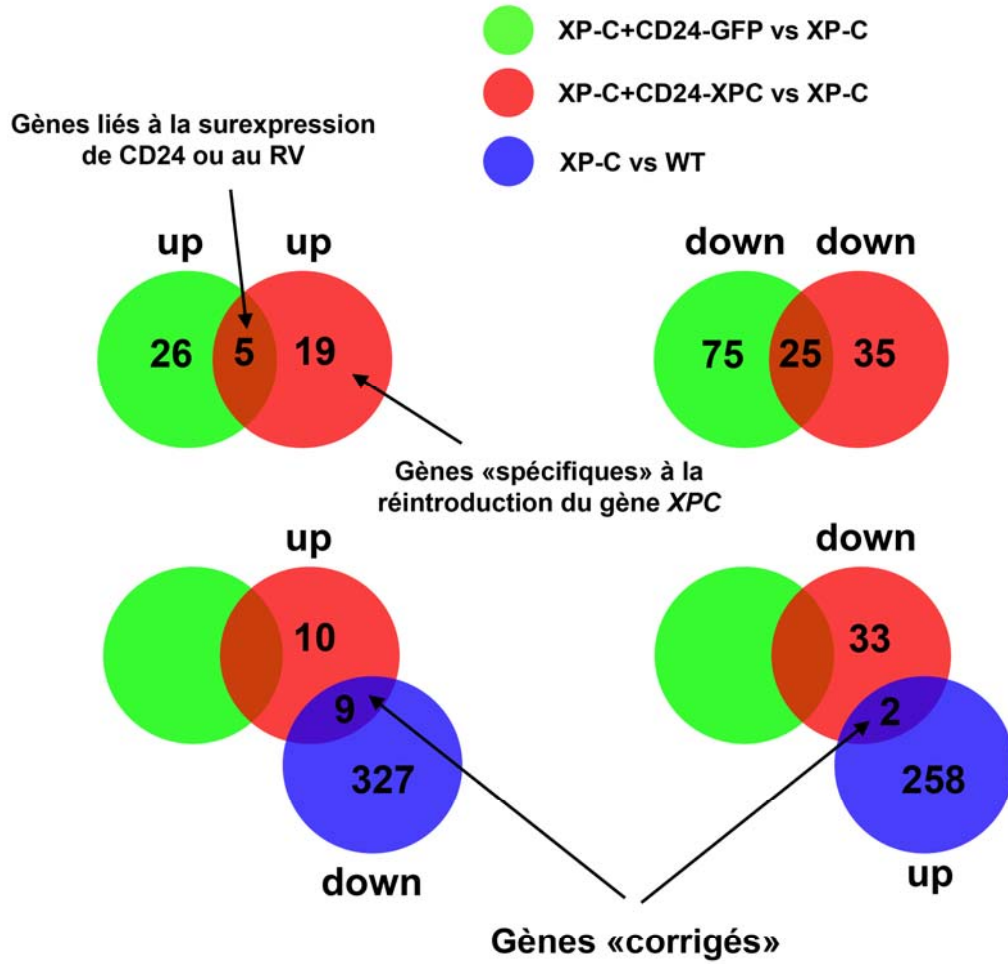


Figure 53 : Stratégie d'analyse du profil d'expression génique des kératinocytes XP-C après correction génétique.

RV, rétrovirus ; up, gènes surexprimés ; down, gènes sous-exprimés.

II. Effet global de la correction génétique : analyse du profil d'expression génique des kératinocytes XP-C génétiquement corrigés

II.1. Objectif

La réintroduction d'une copie intacte du gène *XPC* dans les kératinocytes XP-C permet de restaurer la réparation par excision de nucléotides des lésions induites par les UV et la survie des cellules après une irradiation UV (voir article n°2). Cependant, les kératinocytes XP-C présentent, à l'état stable, des anomalies qui ne peuvent pas être reliées directement avec le défaut de réparation. Certaines de ces altérations, comme la diminution d'activité de la catalase, peuvent être corrigées suite à la réexpression d'une protéine *XPC* fonctionnelle (Quilliet et al., 1997). Nous avons observé de nombreuses dérégulations géniques dans les kératinocytes XP-C à l'état stable (voir §A.II de ce chapitre), ce qui nous amène à la question suivante : la correction génétique permet-elle de normaliser le profil d'expression des kératinocytes XP-C ?

II.2. Stratégie expérimentale

Les vecteurs rétroviraux utilisés pour la correction génétique des kératinocytes XP-C induisent l'expression simultanée des ADNc *CD24* et *XPC* (vecteurs pCMMP *CD24-IRES-XPC*). La surexpression de *CD24* dans nos kératinocytes XP-C corrigés pourrait donc apporter un biais dans le cadre de notre étude. Afin de nous affranchir de l'effet de *CD24* (et de celui du vecteur rétroviral lui-même) nous avons utilisé comme contrôles des kératinocytes XP-C transduits à l'aide de vecteurs rétroviraux équivalents permettant l'expression simultanée des ADNc *CD24* et *GFP* (vecteurs pCMMP *CD24-IRES-GFP*). Deux analyses ont donc été menées en parallèle : d'une part une comparaison du profil d'expression génique de trois souches de kératinocytes XP-C corrigés (pool XP-C + *CD24-XPC*) avec les trois souches XP-C parentales (pool XP-C) et d'autre part une comparaison des trois souches XP-C transduites avec les vecteurs pCMMP *CD24-IRES-GFP* (pool XP-C + *CD24-GFP*) avec les trois souches XP-C parentales (figure 53). Pour les détails techniques, se reporter au Matériel et Méthodes du §A.II de ce chapitre. Les kératinocytes corrigés XP-C + *CD24-XPC* ont été utilisés 5 passages après leur transduction et leur sélection (P2+5).

Le profil « XP-C + *CD24-GFP* / XP-C » a ensuite été comparé au profil « XP-C + *CD24-XPC* / XP-C » pour éliminer tous les gènes étant induits ou réprimés dans le même sens dans les deux pools : nous avons considéré que leur régulation pouvait être liée à la surexpression de *CD24* ou à l'effet du rétrovirus lui-même (figure 53). Les gènes « spécifiquement » induits ou réprimés dans le pool XP-C + *CD24-XPC* par rapport au pool XP-C ont ensuite été comparés au profil d'expression génique des

Gène	Crible génomique		RT-QPCR			
	Ratio XP-C/WT	Ratio XP-C+CD24- XPC/XP-C	Ratio XP-C/WT	p-value	Ratio XP-C+CD24- XPC/XP-C	p-value
<i>GDF15</i> Growth differentiation factor 15	+1,64	-1,6	+2,03	NS	-1,72	NS
<i>TNFSF10</i> Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	+1,57	-1,55	-	-	-	-
<i>MEG3</i> Maternally expressed 3 (MEG3) on chromosome 14	-1,52	+2,12	-	-	-	-
<i>LCE3D</i> Late cornified envelope 3D	-2,41	+1,62	-	-	-	-
<i>EDNRA</i> Endothelin receptor type A (EDNRA)	-2,6	+1,5	-	-	-	-
<i>CXCL1</i> Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)	-2,7	+1,58	-2,18	NS	+1,4	NS
<i>SPRR2G</i> Small proline-rich protein 2G	-4,32	+2,4	-	-	-	-
<i>XPC</i> Xeroderma pigmentosum, complementation group C	-5,25	+22,8	-9,58	p<0,05	+320	p<0,05
<i>NEFM</i> Neurofilament, medium polypeptide 150kDa	-5,98	+2,5	-	-	-	-
<i>NEFL</i> Neurofilament, light polypeptide 68kDa	-6,2	+2,44	-	-	-	-

Tableau 13 : Gènes dont le niveau d'ARNm est normalisé après réintroduction du gène *XPC* dans les kératinocytes XP-C.

La p-value a été évaluée par un test de Mann-Whitney. NS, non significatif (p>0,05).

kératinocytes XP-C par rapport aux kératinocytes WT. Nous en avons alors extrait une liste de gènes dont le niveau d'expression revient à la normale dans les kératinocytes XP-C corrigés.

II.3. Résultats

Les résultats du crible génomique montrent que 24 gènes sont surexprimés et 60 gènes sont sous-exprimés dans les kératinocytes XP-C + CD24-XPC par rapport aux kératinocytes XP-C non transduits (figure 53). Parmi ces gènes, 5 sont également surexprimés et 25 sous-exprimés dans les kératinocytes XP-C + CD24-GFP. Une signature de 54 gènes (19 gènes induits et 35 gènes réprimés) semble donc spécifique à la réintroduction du gène *XPC* dans les cellules XP-C. Lorsque cette signature est comparée au profil d'expression génique des kératinocytes XP-C par rapport aux cellules WT, seuls 10 gènes dont le niveau d'expression est altéré dans les cellules XP-C retrouvent un niveau d'expression normal (ou proche de la normale) dans les cellules XP-C corrigées (tableau 13).

Parmi ces gènes « corrigés » se trouve évidemment le gène *XPC* dont l'ARNm s'accumule dans les kératinocytes XP-C + CD24-XPC (+23). Deux autres gènes ont également attiré notre attention : *CXCL1* (également appelé GRO- α ou MGSA, melanoma growth stimulating activity) code pour une cytokine impliquée dans l'inflammation et l'angiogénèse (Zaja-Milatovic and Richmond, 2008) ; *GDF15*, une cible transcriptionnelle de TAp63 α , régule la différenciation des kératinocytes (Ichikawa et al., 2008). L'analyse du niveau d'ARNm de ces deux gènes dans les différentes souches de kératinocytes a permis de confirmer globalement les tendances du crible génomique (tableau 13). Toutefois, les résultats ne sont pas statistiquement significatifs en raison d'une forte variabilité entre les souches au sein d'un même pool. En outre, la correction génétique ne semble pas affecter toutes les souches XP-C de la même manière.

II.4. Conclusions

- Le niveau d'expression de 54 gènes est spécifiquement modifié dans les kératinocytes XP-C après la réintroduction d'une copie intacte du gène *XPC*.
- Parmi ces gènes, seulement 10 (dont le gène *XPC*) retrouvent des niveaux d'ARNm comparables à ceux observés dans les kératinocytes WT.
- L'effet global de la correction génétique est donc très limité, ce qui suggère que les altérations observées dans les kératinocytes XP-C sont liées à l'« histoire » de la cellule, c'est-à-dire à l'accumulation d'anomalies au cours du temps dans un contexte cellulaire déséquilibré par l'absence à long terme de la protéine XPC. Cette hypothèse sera discutée dans le chapitre Discussion et Perspectives.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

A. Les cellules cutanées issues de patients XP-C présentent des anomalies à l'état stable : hypothèses sur leurs causes et leurs conséquences

I. Un rôle des fibroblastes dans la prédisposition des patients XP-C aux cancers cutanés ?

I.1. Implication du stroma dans la tumorigénèse

Les interactions mésenchyme/épithélium régulent la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales. Pourtant le stroma¹⁸ a longtemps été considéré comme un élément passif dans le processus de carcinogénèse, répondant seulement aux signaux envoyés par les cellules tumorales. Au cours de leur développement, les carcinomes induisent des modifications du stroma grâce à l'expression de facteurs de croissance et de cytokines qui stimulent l'angiogénèse, induisent le remodelage de la MEC et provoquent le recrutement des cellules inflammatoires. Les fibroblastes deviennent « activés » et expriment des marqueurs spécifiques aux myofibroblastes impliqués dans le processus de cicatrisation, comme l'actine des muscles lisse (α -SMA, alpha-smooth-muscle-actin). Ces fibroblastes activés dans le stroma tumoral sont appelés « fibroblastes péri-tumoraux » ou « fibroblastes associés aux carcinomes » (CAF, carcinoma-associated fibroblasts) (Bhowmick et al., 2004; Kalluri and Zeisberg, 2006). De nombreuses évidences suggèrent aujourd'hui un rôle actif des CAF dans l'induction et la progression tumorales. Les CAF interagissent avec les cellules tumorales, les cellules endothéliales et les cellules inflammatoires grâce à la sécrétion de facteurs de croissance et de cytokines (figure 54). Ils sécrètent des facteurs oncogéniques qui stimulent la prolifération et les propriétés invasives des cellules épithéliales cancéreuses. Ils contrôlent la composition et l'organisation de la MEC, notamment par l'intermédiaire des MMPs, et peuvent ainsi créer un environnement permissif à l'invasion tumorale. Les CAF régulent également les réponses inflammatoires et immunitaires. Enfin, ils favorisent la croissance tumorale et la formation de métastases en stimulant la néo-angiogénèse. Les CAF interviennent donc dans les différentes étapes de la transformation tumorale. Une étude transcriptomique réalisée au laboratoire a montré que le profil d'expression génique des fibroblastes issus de patients atteints du syndrome de Gorlin¹⁹ ressemble à celui des CAF des CBC (Valin et al., 2009). Les études de la voie de signalisation sonic

¹⁸ Le stroma définit le microenvironnement dans/sur lequel se développe un épithélium ; il comprend la matrice extracellulaire (MEC), les cytokines et les facteurs de croissance diffusibles qui y transitent, les fibroblastes, les cellules de l'immunité et de l'inflammation (lymphocytes, macrophages) et les cellules de la vascularisation (cellules endothéliales, péricytes, cellules du muscle lisse).

¹⁹ Le syndrome de Gorlin, ou naevomatose basocellulaire, est une maladie génétique autosomique dominante liée à des mutations dans le gène *PATCHED* et associée à une forte prédisposition aux CBC, mais pas aux CSC.

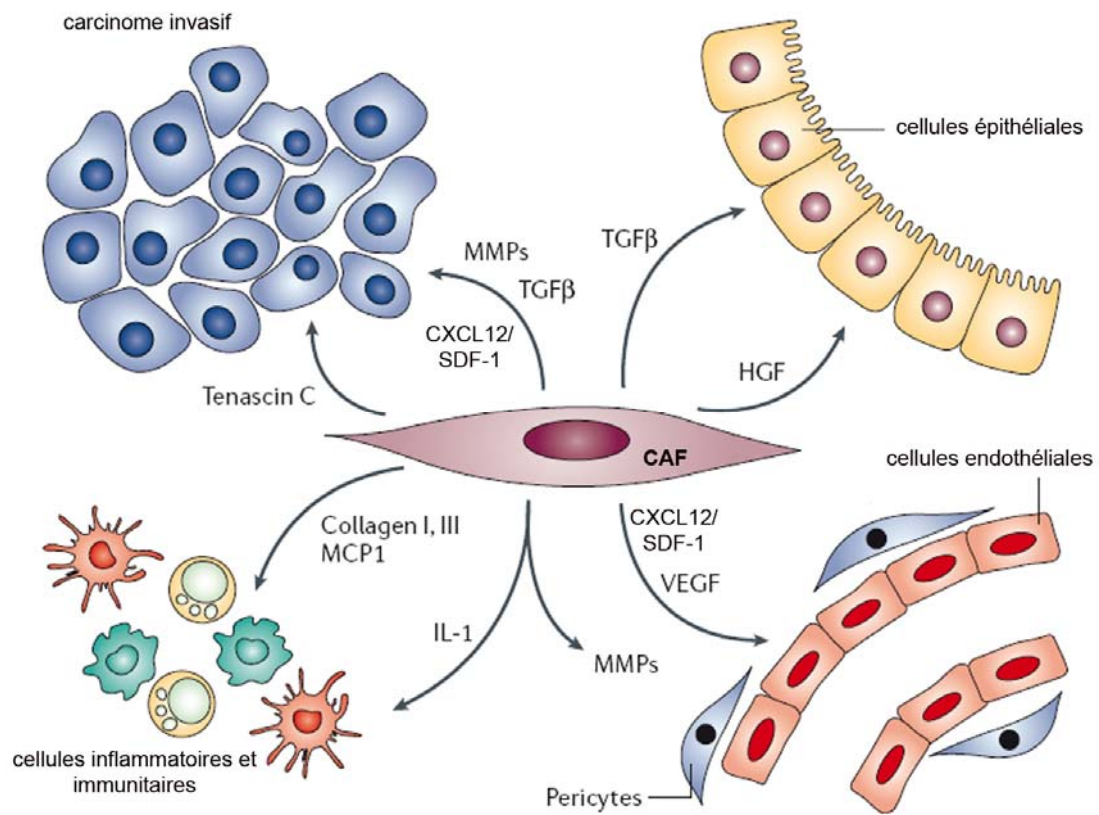


Figure 54 : Rôles des fibroblastes associés aux carcinomes (CAF) dans le processus tumoral.

TGFβ, transforming growth factor β. HGF, hepatocyte growth factor. VEGF, vascular endothelial growth factor. SDF-1, stromal-cell-derived factor 1. MCP1, monocyte chemotactic protein 1. MMPs, matrix metalloproteinases. (D'après : Kalluri and Zeisberg, 2006)

hedgehog (SHH) ont largement contribué à démontrer que le stroma ne doit donc pas être considéré comme un acteur secondaire dans la carcinogénèse cutanée (Yauch et al., 2008).

I.2. Les fibroblastes XP-C surexpriment constitutivement la MMP-1 : conséquences sur la carcinogénèse cutanée

Grâce à l'analyse du profil d'expression des MMP dans six souches de fibroblastes primaires XP-C et trois souches de fibroblastes contrôles (WT), nous avons montré que les fibroblastes XP-C surexpriment constitutivement la MMP-1, en l'absence de toute exposition UV. Dans un contexte tridimensionnel (équivalents de derme), une augmentation substantielle de la MMP-3 est également observée dans les fibroblastes XP-C. La surexpression de ces MMP n'est pas accompagnée par une augmentation du niveau d'expression de leur inhibiteur TIMP1 et se manifeste donc, dans le cas de la MMP-1, par un renforcement de l'activité protéolytique.

En dégradant les composants de la membrane basale et de la MEC, les MMP favorisent l'invasion tumorale mais aussi l'angiogénèse et la migration de cellules métastatiques. Elles régulent également les processus inflammatoires et immunitaires en inhibant ou en activant certaines chemokines et cytokines (Egeblad and Werb, 2002). D'autre part, la surexpression de la MMP-1 dans 25 à 30% des kératoses actiniques, les précurseurs des CSC, suggère un rôle des MMP dans les étapes précoces du développement tumoral (Tsukifuji et al., 1999). Une surexpression constitutive de la MMP-1 dans l'épiderme murin provoque des lésions hyperplasiques et hyperkératotiques spontanées et sensibilise les souris au développement de carcinomes cutanés suite à l'application d'un carcinogène chimique (DMBA, 7,12-dimethyl-benz[a]anthracene) (D'Armiento et al., 1995). Ainsi, la MMP-1 participe aussi bien à la progression qu'à l'induction des tumeurs cutanées. Elle jouerait donc un rôle crucial dans le processus de carcinogénèse chez les patients XP-C.

La surexpression de la MMP-1 est également observée dans des échantillons de peau non photo-exposée prélevés sur les patients XP-C, ce qui valide notre étude réalisée *ex vivo*. Cependant, dans les échantillons de peaux XP-C comme dans les greffes réalisées chez la souris Nude à partir de kératinocytes et de fibroblastes XP-C (voir Article n°2), aucune invagination kératinocytaire n'a pu être observée à l'état stable. Le système de culture en peaux reconstruites exacerbe donc une caractéristique des cellules XP-C qui est probablement contrôlée par d'autres facteurs (notamment par la composition de la MEC) dans un contexte *in vivo*. L'expression et l'activité de la MMP-1 étant induites dans la peau par les rayonnements UV (Fisher et al., 1996; Fisher et al., 1997), il est probable que ses effets pro-tumoraux soient amplifiés après une exposition UV. L'étude de l'influence des fibroblastes XP-C sur le processus de photocarcinogénèse nous paraît donc primordiale. Le système de greffes que nous avons utilisé pour la validation de notre étude de thérapie génique permet la régénération *in vivo*, chez la souris immunodéficiente, d'un épiderme humain sur un derme peuplé

par des fibroblastes humains (Del Rio et al., 2002). Comme dans le cas des peaux reconstruites, des greffes « composites » peuvent donc être réalisées en utilisant des kératinocytes WT ou XP-C en présence de fibroblastes WT ou XP-C. L'influence des fibroblastes XP-C sur la formation et la progression de lésions pré-tumorales et/ou de tumeurs cutanées pourra ainsi être étudiée *in vivo* après irradiation des greffes aux UV. Au cours de la validation de notre étude de thérapie génique, nous avons voulu apporter un début de réponse à cette question en essayant de suivre l'évolution des greffes XP-C contrôles (épiderme XP-C + CD24-GFP/ derme XP-C) après une irradiation UVB (1 MED). Cependant, le nombre restreint de souris et la mort prématurée des animaux après l'irradiation UV ne nous a pas permis de disposer des échantillons nécessaires. Une étude plus approfondie devra donc être réalisée afin de mieux caractériser l'impact des fibroblastes et du stroma sur les étapes précoces de la photocarcinogénèse chez les patients XP-C.

I.3. Les fibroblastes XP-C pourraient-ils être des « pré-CAF » ?

Il est essentiel de rappeler que toutes les cellules utilisées dans cette étude sont issues de zones saines non photo-exposées. Les fibroblastes XP-C présentent donc spontanément des anomalies qui ne peuvent pas être liées de façon évidente au défaut de réparation par la NER. Une accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et une activation des facteurs AP-1, et en particulier de la protéine FOSB2, sont à l'origine de l'augmentation de l'activité transcriptionnelle du promoteur du gène *MMP1* dans les fibroblastes XP-C. L'influence des ROS sur la régulation des MMP, par l'intermédiaire de l'activation des voies de stress (MAPK) et des facteurs AP-1, est maintenant bien connue (Nelson and Melendez, 2004; Nelson et al., 2006). Il est donc probable qu'une ou plusieurs voies de stress soient activées dans les fibroblastes XP-C en raison de l'augmentation du niveau de ROS intracellulaires. L'étude des MAPK par Western Blot et immunofluorescence dans les fibroblastes XP-C permettra de faire le lien entre les ROS et l'activation des complexes AP-1. D'autre part, nous avons pu observer une surexpression et une augmentation de la liaison à l'ADN de la protéine FOSB2, mais il est probable que d'autres facteurs interviennent dans l'activation transcriptionnelle du gène *MMP-1*. Les protéines AP-1 « canoniques » de la famille JUN peuvent ainsi interagir avec les facteurs de transcription de la famille ATF et se fixer sur les éléments de réponse TRE (Eferl and Wagner, 2003) (voir figure 24).

Il y a tout lieu de penser que l'activation des complexes AP-1 (et des voies de stress ?) induit d'autres dérégulations dans les fibroblastes XP-C. Ainsi, nous avons observé une augmentation du niveau d'ARNm de la cytokine CXCL12 dans les fibroblastes XP-C par rapport aux fibroblastes contrôles (WT). CXCL12 (également appelée SDF-1) est une cible des protéines JUN ; sécrétée par les fibroblastes, elle exerce un effet mitogène sur les kératinocytes primaires humains (Florin et al., 2005). Sa sécrétion par les CAF des carcinomes du sein invasifs stimule la croissance des cellules

tumorales et favorise l'angiogénèse (Orimo et al., 2005). CXCL12 est également impliquée dans l'invasion des CBC (Chu et al., 2007) et des CSC (Rehman and Wang, 2008).

Les fibroblastes XP-C surexpriment donc au moins deux protéines fréquemment associées aux CAF des cancers cutanés. Il se peut qu'un déséquilibre cellulaire donne aux fibroblastes XP-C des caractéristiques de « pré-CAF » à l'état stable. Un stress génotoxique comme les UV accentue probablement ce déséquilibre, accélérant de ce fait la progression tumorale. Une étude globale du profil d'expression génique (transcriptome) et/ou du protéome des fibroblastes XP-C dans des équivalents de derme, en présence ou en l'absence de kératinocytes, permettra de caractériser les autres défauts intrinsèques des fibroblastes XP-C. De nouveaux candidats susceptibles d'être ciblés par une approche pharmacologique pourraient alors être mis en évidence.

II. Les kératinocytes XP-C présentent également de nombreuses anomalies à l'état stable

II.1. Comment lier les altérations observées dans les kératinocytes XP-C à la pathologie XP-C ?

Pour la première fois, nous avons réalisé une analyse globale du profil d'expression génique des kératinocytes XP-C à l'état stable. Comme dans le cas des fibroblastes, les trois souches de kératinocytes primaires XP-C utilisées pour cette étude proviennent de zones saines non photo-exposées. Nos résultats montrent qu'en l'absence de toute exposition UV l'expression de nombreux gènes est dérégulée dans les kératinocytes XP-C par rapport aux kératinocytes contrôles : 336 gènes sont réprimés et 260 sont induits dans les kératinocytes XP-C. Une partie de ces résultats a été validée par RT-QPCR en analysant séparément le niveau d'ARNm des gènes sélectionnés dans chaque souche. L'analyse en RT-QPCR a globalement permis de valider le crible transcriptomique puisqu'en moyenne le ratio du niveau d'ARNm d'un gène donné dans les souches XP-C par rapport aux souches WT est similaire aux résultats du crible (voir tableau 12). Toutefois, une forte variabilité entre les souches est observée au sein de chaque pool. Cette hétérogénéité, impossible à prédire, est probablement liée à plusieurs paramètres intrinsèques à chaque souche (âge du donneur au moment de la biopsie, origine ethnique, etc.). Malgré cela, certains gènes systématiquement dérégulés dans le même sens dans les trois souches XP-C se sont dégagés de notre étude (tableau 14). Nous allons essayer ici d'émettre des hypothèses sur le rôle de ces candidats dans la pathologie XP, tout en mettant en relation d'autres résultats (non validés) du crible avec les principaux symptômes des patients XP-C.

Gène	Nom	Ratio XP-C/WT		Pertinence vis-à-vis de la pathologie XP-C
		Crible	RT-qPCR	
<i>ADRA1B</i>	Récepteur adrénergique alpha-1B	+8,54	+9,52	Normalement absent dans les kératinocytes humains normaux. Peut induire la transformation des fibroblastes Rat-1.
<i>CXCR7</i>	Chemokine (C-X-C motif) receptor 7	+2,26	+2,61	Récepteur secondaire de la cytokine pro-angiogénique et pro-métastatique CXCL12.
<i>ALDH1A1</i>	Aldehyde déshydrogenase 1, membre A1	-12,33	-7,18	Synthèse de l'acide rétinoïque. Conversion des aldéhydes en acide acétique. Jouerait un rôle de détoxification majeur dans la cornée.
<i>POMC</i>	Pro-opiomélanocortine	-2,95	ND	Précurseur de la α -MSH (α -melanocyte-stimulating hormone) et de l'ACTH (adrenocorticotrop hormone), des facteurs paracrines sécrétés par les kératinocytes pour stimuler la mélanogénèse.
<i>S100A8</i>	Protéine de liaison au calcium de la famille S100, membre A8	-2,36	-2,88	Associée à la cicatrisation, au psoriasis, aux carcinomes cutanés, aux stress environnementaux. Jouerait un rôle dans la réponse inflammatoire et immunitaire.
<i>S100A7</i>	Protéine de liaison au calcium de la famille S100, membre A7 (psoriasine)	-2,6	ND	Associée à la cicatrisation, au psoriasis, aux carcinomes cutanés. Induite lors de l'inflammation. Interagit avec FABP5
<i>S100A9</i>	Protéine de liaison au calcium de la famille S100, membre A9	-1,7	ND	Associée à la cicatrisation, au psoriasis, aux carcinomes cutanés, aux stress environnementaux. Jouerait un rôle dans la réponse inflammatoire et immunitaire.
<i>S100A12</i>	Protéine de liaison au calcium de la famille S100, membre A12	-3,4	ND	Associée au psoriasis, aux mélanomes. Pro-inflammatoire.
<i>FABP5</i>	Protéine de liaison aux acides gras (fatty acid binding protein 5) (associée au psoriasis)	-2	ND	Complexé avec S100A7, lie l'acide oléique. Rôle non déterminé.
<i>PTGS1</i>	Prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandine G/H synthase and cyclooxygénase) - COX-1	-3	ND	Exprimée de façon constitutive par les kératinocytes. Stimule la production de la prostaglandine E. Régule la réponse inflammatoire.
<i>PTGS2</i>	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandine G/H synthase and cyclooxygénase) - COX-2	-2,85	ND	Induite par une exposition UV. Stimule la production de la prostaglandine E. Pro-inflammatoire. Sa surexpression favorise la photocarcinogénèse cutanée.
<i>PTGER4</i>	Récepteur 4 de la prostaglandine E (sous-type EP4)	+2,36	ND	Récepteur de la prostaglandine E. Régule la réponse inflammatoire. Jouerait un rôle dans la carcinogénèse cutanée.

Tableau 14 : Résumé des résultats du crible génomique discutés dans ce chapitre.

ND, non déterminé. Les gènes validés par RT-QPCR ($p < 0,05$) sont en gris.

Prédisposition aux tumeurs cutanées

Les kératinocytes primaires humains expriment normalement le récepteur adrénérgique de type $\beta 2$ (ADRB2), mais pas le récepteur $\alpha 1$ (ADRA1B) dont l'expression est plutôt associée aux mélanocytes (Sivamani et al., 2007). Effectivement, nos trois souches de kératinocytes WT présentent des niveaux faibles (voire indétectables dans une des souches) d'ARNm *ADRA1B*. Par contre, le gène *ADRA1B* est surexprimé de façon significative dans les trois souches de kératinocytes XP-C. La contamination de notre culture de kératinocytes par des mélanocytes est peu probable car nos cellules ont été utilisées à passage 7-8 et les mélanocytes ne prolifèrent pas bien en milieu CFAD. De plus, si des mélanocytes étaient effectivement présents parmi les kératinocytes, leur nombre serait très limité et n'influencerait pas nos résultats à cette échelle. Toutefois, une influence des mélanocytes et/ou de la pigmentation sur le profil d'expression du récepteur ADRA1B dans les kératinocytes ne peut être exclue car la souche XP-C qui possède le plus fort niveau d'ARNm *ADRA1B* est issue du patient ayant la peau la plus foncée (voir tableau 12). L'effet de la surexpression du récepteur ADRA1B dans les kératinocytes XP-C est difficile à prévoir mais elle pourrait favoriser le développement de tumeurs cutanées car l'activation constitutive de ce récepteur dans les fibroblastes Rat-1 induit leur transformation (Allen et al., 1991). Les conséquences de l'activation du récepteur ADRA1B par ses agonistes (norépinephrine, endothéline 1) sur la prolifération et/ou les propriétés invasives des kératinocytes XP-C pourront être analysées grâce aux peaux reconstruites *in vitro* afin d'élucider l'impact de l'expression « ectopique » de cette protéine dans les cellules XP-C.

La sécrétion de la cytokine CXCL12/SDF-1 par les CAF et l'expression de son récepteur CXCR4 par les cellules tumorales sont des facteurs de mauvais pronostic pour de nombreuses tumeurs (pour revue voir : (Maksym et al., 2009)). Récemment, un nouveau récepteur de CXCL12, appelé CXCR7, a été découvert. Le rôle exact de CXCR7 est encore sujet à discussions car certaines évidences suggèrent qu'il serait en réalité un récepteur « leurre » impliqué dans la séquestration et la dégradation de CXCL12 (Naumann et al.). Néanmoins, son expression dans les carcinomes du sein et du poumon corrèle avec le potentiel prolifératif, pro-angiogénique et métastatique des cellules tumorales (Miao et al., 2007). Le niveau d'expression de CXCR7 n'a encore jamais été étudié dans les CBC et les CSC. La surexpression de la cytokine CXCL12 par les fibroblastes XP-C et du récepteur CXCR7 par les kératinocytes XP-C soulève de nombreuses questions sur le rôle de l'axe CXCL12/CXCR4/CXCR7 dans le développement des cancers cutanés chez les patients XP-C.

Lésions oculaires

Dans notre crible génomique, le gène *ALDH1A1* est l'un des gènes présentant les plus faibles niveaux d'ARNm dans les kératinocytes XP-C par rapport aux kératinocytes WT (tableau 14). Les membres de la famille des aldéhydes déshydrogénases (ALDH), auparavant connus sous le nom de

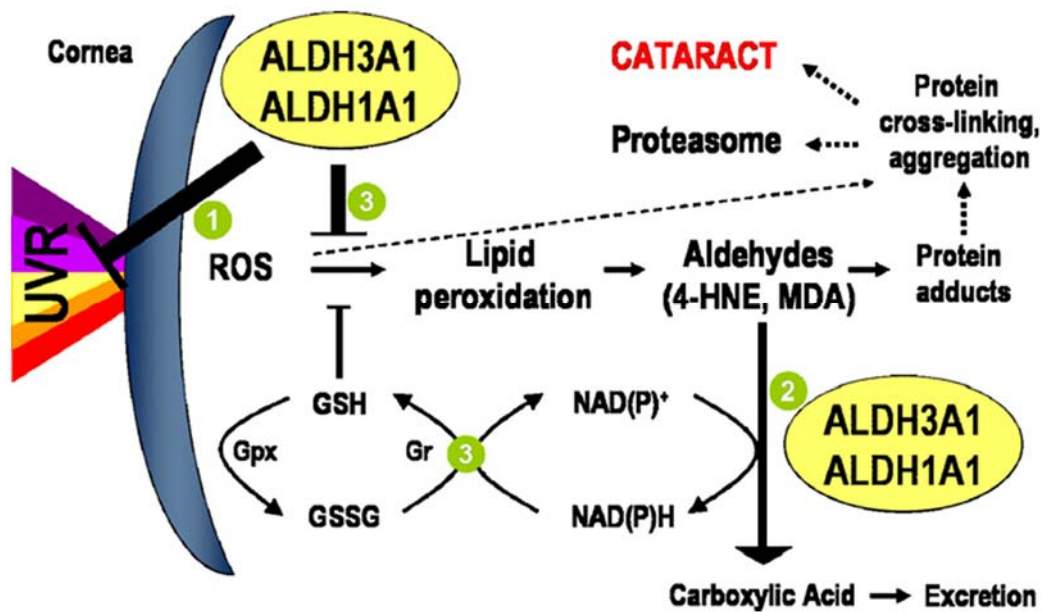


Figure 55 : Rôles de l'enzyme ALDH1A1 dans la cornée.

Les UV produisent des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui provoquent une peroxydation des lipides dont la dégradation génère des aldéhydes toxiques. L'accumulation de ces produits d'oxydation peut mener à la formation d'une cataracte. Les enzymes ALDH1A1 et ALDH3A1 pourraient jouer un rôle (1) dans l'absorption des UV, (2) dans la détoxification des aldéhydes, (3) dans la défense contre les ROS en générant la NADPH qui sert de co-facteur à de nombreux agents antioxydants dans la cellule. La NADPH permet par exemple la régénération du glutathion réduit (GSH) à partir de sa forme oxydée (GSSG). (D'après : Stagos et al., 2010)

« rétinaldéhydes déshydrogénases » (RALDH), sont impliqués dans la synthèse de l'acide rétinoïque, qui joue un rôle essentiel dans le développement et l'homéostasie de nombreux tissus, dont la peau et la cornée. L'enzyme ALDH1A1 est également impliquée dans la conversion des acétaldéhydes en acide acétique. Chez l'homme, ALDH1A1 est abondamment exprimée dans la cornée et le cristallin (pour revue voir : (Stagos et al.)). Des expériences menées chez le lapin ont montré que cette enzyme contribuait de façon significative aux propriétés de transparence et de réfraction de la cornée. Les souris *Aldh1a1* *-/-* développent spontanément plus de cataractes (opacification du cristallin) avec l'âge que les souris *Aldh1a1* *+/+* (Lassen et al., 2007). De plus, ALDH1A1 jouerait un rôle crucial dans la protection contre les dommages oxydatifs induits par les UV dans les tissus oculaires en participant à la détoxification des aldéhydes réactifs issus de la peroxydation des lipides (figure 55) (Stagos et al.). De faibles niveaux de cette enzyme dans les cellules épithéliales de la cornée pourraient contribuer au développement d'anomalies oculaires chez les patients XP-C. Une opacification de la cornée, parfois associée à une néo-vascularisation, est en effet observée chez 17 à 40% des patients XP (tous groupes de complémentation confondus) (Goyal et al., 1994; Kraemer et al., 1987a). De plus, une étude récente menée sur 16 patients XP révèle des anomalies oculaires particulièrement prononcées (touchant notamment la cornée) chez les deux patients du groupe XP-C par rapport aux autres groupes (Anttinen et al., 2008). Nos résultats concernant l'enzyme ALDH1A1, s'ils sont confirmés dans la cornée des patients XP, pourraient apporter un nouvel éclairage sur les mécanismes menant à l'apparition de ces anomalies oculaires.

Défauts de pigmentation

Les patients XP présentent des anomalies de la pigmentation se traduisant par l'apparition de taches (lentigo actinique) et de zones hyper- ou hypo-pigmentées. De façon étonnante (si l'on considère le nom de la maladie), il n'existe quasiment aucune étude ayant pour objet les mélanocytes et la pigmentation chez les patients XP. Deux équipes ont montré que les mélanocytes issus de patients XP présentent un défaut de réparation par la NER, avec des taux d'UDS proches de ceux des fibroblastes isolés chez les mêmes patients (Kraemer et al., 1989; Yamaguchi et al., 1990). Cependant les conséquences de l'altération de la NER dans les mélanocytes XP demeurent inconnues. Contrairement aux kératinocytes, les mélanocytes possèdent un potentiel prolifératif très limité et une résistance élevée à l'apoptose (Gilchrest et al., 1999). La longévité des mélanocytes dans la peau augmente leur risque d'accumuler des mutations suite à des expositions solaires répétées. Un système de réparation efficace est donc crucial pour limiter le risque de mélanome. Le gène *XPC* est induit dans les mélanocytes en culture après une exposition SSL (facteur $\times 2$ 15h après l'irradiation) (Marrot et al., 2005), ce qui souligne l'importance de la GGR dans les mélanocytes.

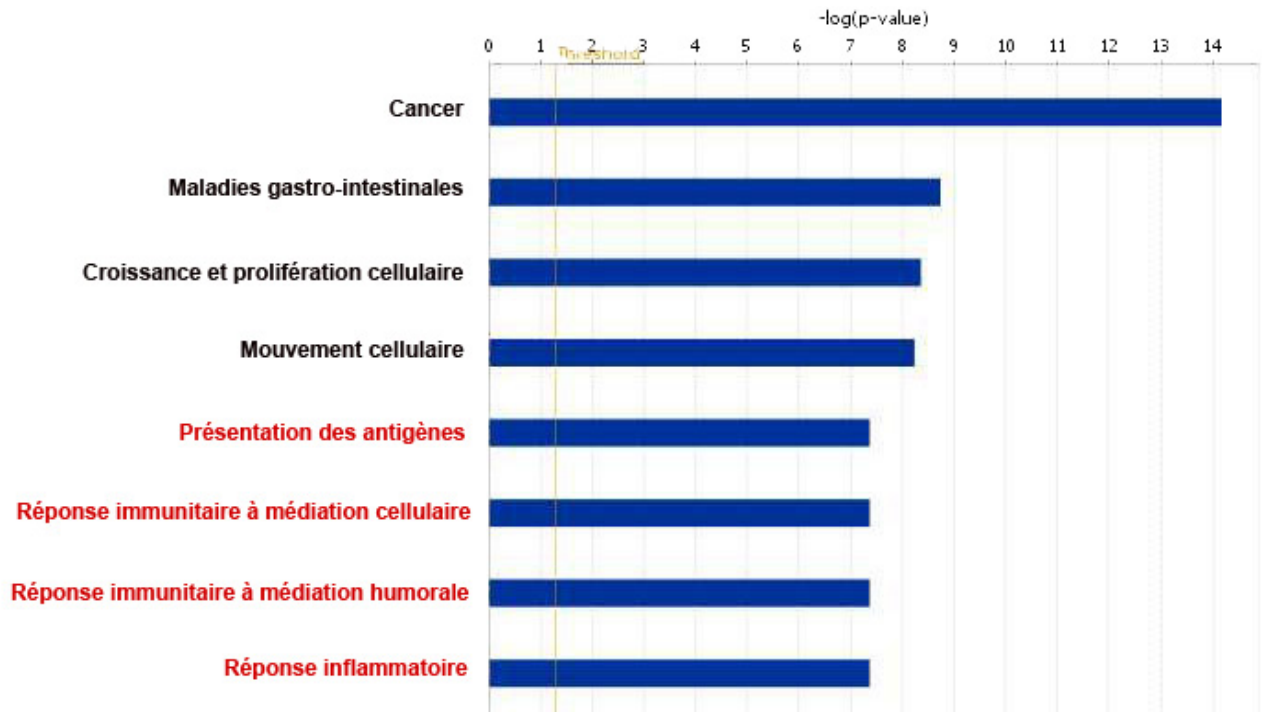


Figure 56 : Principales fonctions biologiques dérégulées dans les kératinocytes XP-C.

Les résultats sont issus d'une analyse réalisée avec le logiciel Ingenuity Pathway Analysis. Ce logiciel assigne à chaque fonction biologique une valeur statistique (p-value) en fonction du nombre de gènes associés à cette fonction parmi les résultats du criblé génomique.

La mélanogénèse est régulée par un réseau d'échanges paracrines et autocrines avec les différentes cellules cutanées. Parmi les facteurs paracrines sécrétés par les kératinocytes, les mélanocortines α -MSH (α -melanocyte-stimulating hormone) et ACTH (adrenocorticotrop hormone) jouent un rôle particulièrement important pour la stimulation des mélanocytes. Ces deux facteurs dérivent du même précurseur, la pro-opiomélanocortine (POMC). De façon très intéressante, les résultats de notre crible génomique montrent que la quantité d'ARNm du gène *POMC* est fortement diminuée (-2,95) dans les kératinocytes XP-C par rapport aux kératinocytes WT (tableau 14). Si ce résultat est confirmé par RT-QPCR de façon significative dans toutes les souches XP-C, il pourrait avoir des conséquences importantes sur la régulation de la mélanogénèse chez les patients XP-C. Récemment, le laboratoire de F. Bernerd (L'OREAL Recherche) a développé un modèle de peau reconstruite pigmentée sur un équivalent de derme vivant permettant l'étude des interactions entre les kératinocytes, les mélanocytes et les fibroblastes. Grâce à ce système, la régulation de la pigmentation sous l'influence des kératinocytes XP-C (et/ou des fibroblastes XP-C ?) pourrait être étudiée à l'état stable ou après une irradiation UV. Il semble également primordial de mieux caractériser les mélanocytes XP-C et l'influence de la persistance de lésions dans ces cellules après une irradiation UV. Ces données pourraient fournir des informations particulièrement intéressantes dans le cadre de l'étude des mécanismes menant au développement des mélanomes.

Erythème et réactions inflammatoires

Les rapports cliniques montrent que les patients XP sont photosensibles : ils présentent une réaction anormale à l'érythème, qui est atteint pour de plus faibles doses d'UV et qui est souvent retardé et prolongé. Peu de données sont toutefois disponibles sur ce type de symptômes. Pour des raisons éthiques, il est en effet impossible d'étudier la réponse cutanée aux UV chez les patients XP. Les études menées chez la souris montrent que les souris *Xpc* $-/-$ possèdent une MED similaire à celle des souris *wild-type* (*Xpc* $+/+$) (Garssen et al., 2000). Cependant, nous avons vu que les souris *wild-type* pouvaient être considérées comme des mutants *Xpc* par rapport à l'homme en raison de l'absence de réparation des CPD par la GGR murine. Les différences phénotypiques entre les souris *wild-type* et *Xpc* $-/-$ sont donc beaucoup plus faibles que celles observées chez l'homme entre un individu XP-C et un individu possédant une NER fonctionnelle.

Les résultats de notre crible génomique ont été analysés avec le logiciel Ingenuity Pathway Analysis afin de mettre en évidence certaines fonctions biologiques ou voies de signalisation particulièrement affectées dans les kératinocytes XP-C (figure 56). La « fonction biologique » la plus représentée est la fonction « Cancer ». Cette catégorie n'est pas forcément pertinente car elle regroupe de façon non spécifique tous les gènes impliqués dans les cancers, ce qui représente un très large champ. L'information la plus intéressante de notre analyse concerne la présence, parmi les

dix fonctions les plus représentées, de quatre catégories liées à l'inflammation et à l'immunité (figure 56). Les gènes impliqués dans la régulation de la présentation d'antigènes, la réponse immunitaire humorale et cellulaire et la réponse inflammatoire seraient ainsi particulièrement affectés dans les kératinocytes XP-C. De nombreux gènes sont communs à ces quatre fonctions, ce qui explique leur regroupement au cours de l'analyse Ingenuity. Néanmoins, ces résultats paraissent pertinents dans le sens où des anomalies inflammatoires (érythème) et immunitaires (voir paragraphe suivant) ont été relevées chez les patients XP.

Parmi les gènes classés dans la catégorie « réponse inflammatoire » se trouvent quatre gènes de la famille S100 (*S100A7*, *A8*, *A9* et *A12*) dont les niveaux d'ARNm sont diminués dans les kératinocytes XP-C par rapport aux kératinocytes WT (tableau 14). Les protéines S100A7, A8, A9 et A12 ont été impliquées, entre autres, dans le recrutement des cellules inflammatoires et immunitaires et la défense contre les microorganismes dans la peau, notamment lors de la cicatrisation (Eckert et al., 2004 ; Gebhardt et al., 2006). S100A7 (psoriasine) interagit en particulier avec la protéine E-FABP (Epidermal-Fatty Acid Binding Protein) dont le gène correspondant *FABP5* est également sous-exprimé d'un facteur 2 dans les kératinocytes XP-C. Le rôle de la protéine E-FABP n'est pas encore clairement défini mais son implication dans la régulation de processus inflammatoires a été suggéré (Eckert et al., 2004).

L'irradiation chronique de la peau aux UV conduit à l'induction de la cyclooxygénase COX-2, également appelée PTGS2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2), et à une augmentation de son principal produit dans la peau, la prostaglandine E2 (PGE2). PGE2 régule les réponses inflammatoires et immunitaires cutanées par l'intermédiaire de ses récepteurs PTGER1-4 (prostaglandin E receptor, également appelés EP1-4). L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de COX-2 et la modulation de son expression par manipulation génétique ont montré que l'induction de COX-2 contribue à l'hyperplasie épidermique, l'œdème et l'inflammation cutanés liés à l'exposition UV (pour revue voir : (Rundhaug and Fischer, 2008)). Les résultats de notre crible génomique montrent que les gènes codant pour la cyclooxygénase inductible PTGS2/COX-2 et la cyclooxygénase constitutive PTGS1/COX-1 sont sous-exprimés dans les kératinocytes XP-C à l'état stable (-2,85 et -3, respectivement) (tableau 14). Par contre, une augmentation du niveau d'ARNm du récepteur PTGER4 est observée dans les kératinocytes XP-C (+2,36). Ces résultats suggèrent une altération globale des éléments de régulation de la réponse inflammatoire dans les kératinocytes XP-C. Si les kératinocytes XP-C présentent déjà des altérations à l'état stable, la réponse inflammatoire induite par les UV est probablement anormale chez les patients XP-C. Les études menées chez les souris *Xpc* *-/-* n'ont pas permis de mettre en évidence une réponse inflammatoire anormale par rapport aux souris *wild-type* (Berg et al., 1998) alors que les souris *Xpa* *-/-* sont extrêmement photosensibles et présentent une inflammation accrue après une exposition UV (Garssen et al., 2000), probablement liée à une

surproduction de PGE2 (Kuwamoto et al., 2000). Ces données reflètent sans doute l'hétérogénéité génétique du XP et les différences entre une maladie de la GGR (XP-C) et une maladie de la NER « totale » (TCR + GGR, XP-A). De plus, comme nous l'avons vu, la souris n'est pas toujours un bon modèle d'étude par rapport à l'homme.

Il est intéressant de noter ici qu'une surexpression des protéines de la famille S100 et de COX-2 est généralement associée aux situations pathologiques et à la carcinogénèse cutanée. Les protéines S100 sont induites dans l'épiderme après un stress environnemental (UV, « tape stripping », blessure)(Marionnet et al., 2003) et en situation d'hyperprolifération (psoriasis). De plus le niveau de ces protéines est généralement plus élevé dans les cancers cutanés que dans la peau normale (Gebhardt et al., 2006). L'inhibition de l'activité de COX-2 ou la perte d'expression de Cox-2 dans les souris knockout provoquent une diminution significative de la photocarcinogénèse cutanée, tandis que la surexpression de Cox-2 chez la souris (transgénique) stimule le développement tumoral après une exposition UV (Rundhaug and Fischer, 2008). Intuitivement, nous aurions donc pu penser que ces gènes seraient induits dans les kératinocytes XP-C. Leur diminution ne paraît donc pas « logique » au premier abord dans le cadre d'une pathologie prédisposant fortement au développement de tumeurs UV-induites. Ces observations soulignent toute la complexité des mécanismes menant au développement tumoral.

Défauts immunitaires

Plusieurs anomalies immunitaires ont été rapportées chez les patients XP : une diminution de la prolifération des lymphocytes T après activation par un mitogène (PHA, phytohémagglutinine (Lafforet and Dupuy, 1975), une réduction de la réaction d'hypersensibilité de contact en réponse à des injections intradermiques d'antigènes (Dupuy and Lafforet, 1974; Wysenbeek et al., 1986), un faible rapport entre les lymphocytes T helpers CD4 et les lymphocytes T cytotoxiques CD8 (Wysenbeek et al., 1986), une réduction de la sensibilisation au dinitrochlorobenzène (DNCB) (Dupuy and Lafforet, 1974), une faible activité des cellules cytotoxiques naturelles (NK, natural killer) (Norris et al., 1988; Norris et al., 1990) et un défaut de production des interférons α et γ par les lymphocytes périphériques (Gaspari et al., 1993). La plupart de ces études sont assez anciennes et il est difficile de savoir si les anomalies observées sont intrinsèques ou liées à des expositions solaires répétées favorisant une immunosuppression locale (ce qui est plus probable). De plus, les groupes de complémentation sont rarement précisés dans ces études ou ne sont pas analysés séparément. Une étude récente décrivant les symptômes cliniques de 16 patients XP de différents groupes de complémentation rapporte une altération de l'hypersensibilité de contact (absence de réaction à un allergène appliqué de façon topique sur la peau) chez les 2 patients XP-C inclus dans l'étude (Anttinen et al., 2008). L'altération de l'hypersensibilité de contact pourrait être liée à une

diminution du nombre et/ou de la fonction des cellules de Langerhans dans la peau des patients XP-C suite à des expositions solaires répétées. Ces observations contredisent les résultats obtenus chez la souris *Xpc -/-* qui ne présente pas d'immunosuppression plus marquée que les souris *wild-type* après une irradiation UV (Garssen et al., 2000; Kolgen et al., 2003).

L'analyse des résultats de notre crible génomique grâce au logiciel Ingenuity suggère une dérégulation des interactions entre les kératinocytes et les cellules de l'immunité à l'état stable. Une sécrétion inappropriée de facteurs impliqués dans la régulation des réponses immunitaires à médiation humorale et cellulaire pourrait compromettre le recrutement et le bon fonctionnement des cellules de l'immunité. Cette altération de la réponse immunitaire, probablement exacerbée après une irradiation UV, pourrait favoriser le développement tumoral. Encore une fois, ce ne sont que des hypothèses. Il serait par exemple intéressant d'étudier le profil de sécrétion par les kératinocytes XP-C des cytokines régulant l'inflammation et la réponse immunitaire à l'état stable et après une exposition UV. Le statut immunologique des patients XP nécessite sans doute également une analyse plus approfondie : le nombre et la fonction des cellules de Langerhans sont-ils intacts dans la peau XP-C ? Quel est l'effet de la persistance de lésions UV-induites dans les cellules de Langerhans ? Une déplétion des cellules de Langerhans dans une zone photo-exposée et/ou la circulation dans l'organisme de cellules présentant des lésions peut-elle engendrer une diminution globale de la réponse immunitaire cutanée ?

II.2. Perspectives concernant la caractérisation des kératinocytes XP-C

Nous avons émis ici quelques hypothèses concernant les résultats de notre crible génomique. Avant toute chose, de nombreux candidats doivent encore être validés par RT-QPCR afin de déterminer s'ils sont significativement dérégulés de la même façon dans toutes les souches XP-C. Ensuite, une validation au niveau protéique devra être réalisée (par western blot, immunofluorescence et/ou ELISA selon les protéines) pour confirmer la pertinence de nos observations. Des analyses fonctionnelles pourront alors être réalisées : effet de l'activation du récepteur ADRA1B par ses agonistes, profil de sécrétion de cytokines de l'inflammation et de l'immunité avant et après UV, etc.

D'autre part, l'étude que nous avons menée a été réalisée sur des cultures de kératinocytes en monocouche. Le profil d'expression génique observé ne correspond probablement pas tout à fait à celui que nous aurions observé dans un contexte tridimensionnel. En reconstruisant *in vitro* des peaux XP-C « totales » (épiderme XP-C + derme XP-C), puis en séparant l'épiderme et le derme et en analysant le profil d'expression génique de chaque compartiment, l'influence du derme sur l'épiderme (et inversement) pourra être analysée. Ces profils pourront être comparés aux résultats obtenus sur des cultures de fibroblastes et de kératinocytes en monocouche.

II.3. Un stress latent dans les kératinocytes XP-C ?

La plupart des altérations observées dans les kératinocytes XP-C ne sont pas normalisées (à court terme) suite à la réexpression stable de la protéine XPC. Il est donc probable que l'absence à long terme de la protéine XPC crée dans les cellules XP-C un stress latent, favorisant l'accumulation d'anomalies au cours du temps et de l'« histoire » de la cellule. Pour valider cette hypothèse, nous avons développé des vecteurs rétroviraux permettant l'extinction stable de l'expression du gène *XPC* par une approche de shRNA (figure 57). La production d'une souche de kératinocytes primaires humains déficiente en GGR permettra, dans un premier temps, de déterminer les événements précoces liés à l'absence d'une protéine XPC fonctionnelle. Le passage sériel de ces cellules et l'analyse de l'évolution de leur profil d'expression génique au cours des passages devrait permettre de mieux comprendre les mécanismes menant aux dérégulations observées dans les kératinocytes XP-C. D'autres paramètres pourront également être étudiés au cours des passages sériés, comme l'accumulation de ROS dans les cellules²⁰. Il semblerait en effet que l'accumulation de ROS dans les fibroblastes XP-C s'accroisse au cours des passages (tendance observée mais non caractérisée). Les ROS pourraient être les acteurs majeurs d'un stress latent dans les cellules XP-C.

III. Quelle pourrait être l'origine du stress latent expliquant l'accumulation d'anomalies à l'état stable dans les cellules XP-C ?

III.1. Un rôle des dommages oxydatifs dans la pathologie XP-C ?

Un nombre croissant d'évidences suggèrent l'implication de la protéine XPC dans la prise en charge des dommages oxydatifs et un rôle de ces derniers dans la pathologie XP-C :

(1) Les fibroblastes XP-C accumulent les ROS (Fréchet et al., 2008) et ce phénomène semble s'amplifier au cours des passages.

(2) Sur les 596 gènes dérégulés dans les kératinocytes XP-C par rapport aux kératinocytes WT, au moins 27 (5%) sont des gènes codant pour des protéines impliqués dans l'oxydoréduction et/ou la détoxification, comme *ALDH1A1* (-12), l'enzyme mitochondriale *ALDH2* (-1,6), ou les glutathionne S-transférases *GSTT1* (+1,7) et *GSTT2* (-4,2).

²⁰ La mesure du niveau intracellulaire de ROS est plus difficile à réaliser dans les kératinocytes que dans les fibroblastes. En effet, les kératinocytes en culture constituent une population hétérogène de cellules plus ou moins différenciées. L'absorption du DCF, qui permet la mesure des ROS (voir Article n°1), n'est donc pas homogène dans les kératinocytes. Une mise au point du protocole pour favoriser l'absorption du DCF et une analyse par FACS prenant en compte l'état de différenciation des cellules seront nécessaires pour tirer des conclusions pertinentes sur la mesure des ROS dans les kératinocytes.

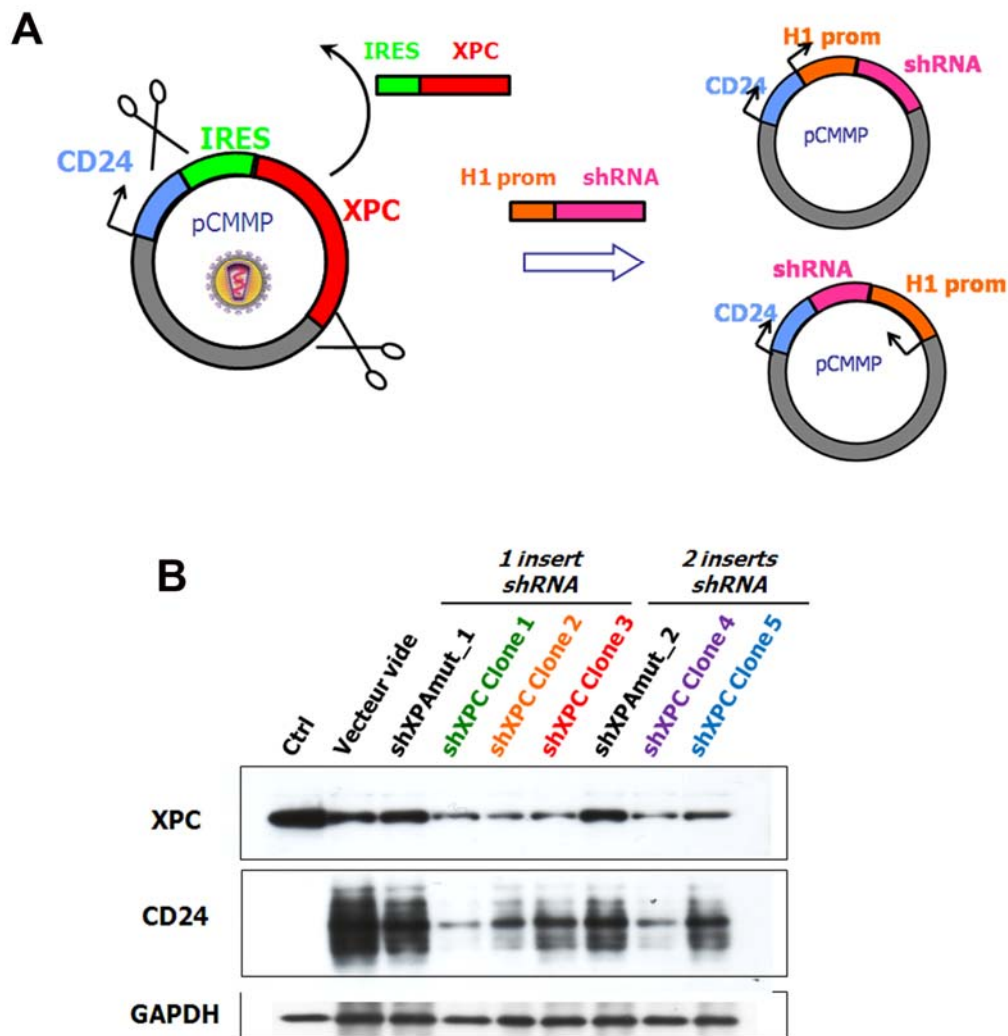


Figure 57 : Construction de vecteurs rétroviraux portant un shRNA dirigé contre XPC.

(A) Stratégie de construction des vecteurs rétroviraux. Le vecteur pCMMP *CD24-IRES-XPC* est digéré pour libérer les séquences *IRES* et *XPC*. Une cassette contenant le promoteur H1 et un shRNA ciblant spécifiquement *XPC* est insérée dans le vecteur pCMMP, en sens direct ou en antisens. L'ADNc *CD24* est conservé dans le vecteur pour permettre la sélection des cellules transduites grâce à la stratégie *CD24*. **(B) Test des constructions dans les cellules HeLa.** Les cellules HeLa ont été transfectées avec le vecteur vide pCMMP *CD24*, avec des vecteurs contrôle contenant un shRNA dirigé contre une forme mutée de *XPA* (shXPAmut) ou avec les vecteurs contenant le shRNA dirigé contre *XPC* (shXPC). Les différents clones correspondent à différents plasmides purifiés après le clonage. Noter que les cellules HeLa n'expriment pas *CD24* à l'état stable mais que la transfection avec les plasmides pCMMP induit l'expression de *CD24* dans les cellules. Noter aussi la diminution significative (50%) de l'expression de *XPC* dans les cellules transfectées avec les vecteurs shXPC.

(3) Une diminution d'activité de la catalase a été observée dans les fibroblastes XP-C (Fridovich, 1978; Vuillaume et al., 1986; Vuillaume et al., 1992). La catalase est une enzyme antioxydante qui catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène ($2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$). Elle joue donc un rôle essentiel dans la défense cellulaire contre l'accumulation des ROS endogènes ou induits par les rayonnements UV. La diminution de son activité dans les cellules XP-C serait directement liée à une concentration intracellulaire anormalement faible de son co-facteur, la NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) (Hoffschir et al., 1998). La NADPH est la source principale des électrons utilisés dans les réactions d'oxydoréduction mises en jeu par les mécanismes de protection contre les ROS et le stress oxydant. Il est intéressant de noter ici que l'activité de détoxification de l'enzyme ALDH1A1, qui est sous-exprimée dans les kératinocytes XP-C, conduit à la production de NADPH dans la cellule (figure 55).

(4) Une forte diminution de la survie des fibroblastes embryonnaires murins *Xpc* *-/-* est observée lorsque ces cellules sont cultivées dans une atmosphère contenant 20% d'oxygène, par comparaison aux fibroblastes cultivés sous une pression de 3% d'oxygène (Melis et al., 2008).

(5) Les kératinocytes et les fibroblastes issus de patients XP-C sont plus sensibles que les cellules WT aux UVA, producteurs de ROS (Otto et al., 1999a), et au KBrO₃, un puissant agent oxydant (D'Errico et al., 2006).

(6) Le promoteur du gène *XPC* contient cinq éléments putatifs de réponse à l'hypoxie (HRE, hypoxia responsive elements) permettant sa régulation par le facteur de transcription HIF1- α (Rezvani et al., 2009). HIF1- α régule la réponse cellulaire en conditions d'hypoxie mais peut également être activé suite à une production anormale de ROS par la mitochondrie (Rezvani et al., 2007) (Simon, 2006).

(7) La protéine XPC stimule l'activité d'OGG1, l'enzyme de la BER responsable de l'excision des 8-oxoG (D'Errico et al., 2006).

(8) Une augmentation significative de la fréquence des mutations spontanées au locus *hrpt* est observée dans les lymphocytes T des souris *Xpc* *-/-* par rapport aux souris *wild-type* et aux souris *Xpa* *-/-* et *Csb* *-/-* (Wijnhoven et al., 2000). L'incidence de ces mutations spontanées est fortement amplifiée avec l'âge et les mutations les plus fréquentes (45%) chez les souris âgées (> 12 mois) sont des transversions G \rightarrow T, généralement associées à la 8-oxoG.

(9) Les souris *Xpc* *-/-* développent spontanément de multiples tumeurs du poumon (principalement des adénomes bénins dont quelques uns progressent en carcinomes malins avec l'âge) (Hollander et al., 2005) (Melis et al., 2008). Un rôle des lésions oxydatives produites de façon endogène dans les poumons a été suggéré pour expliquer cette observation.

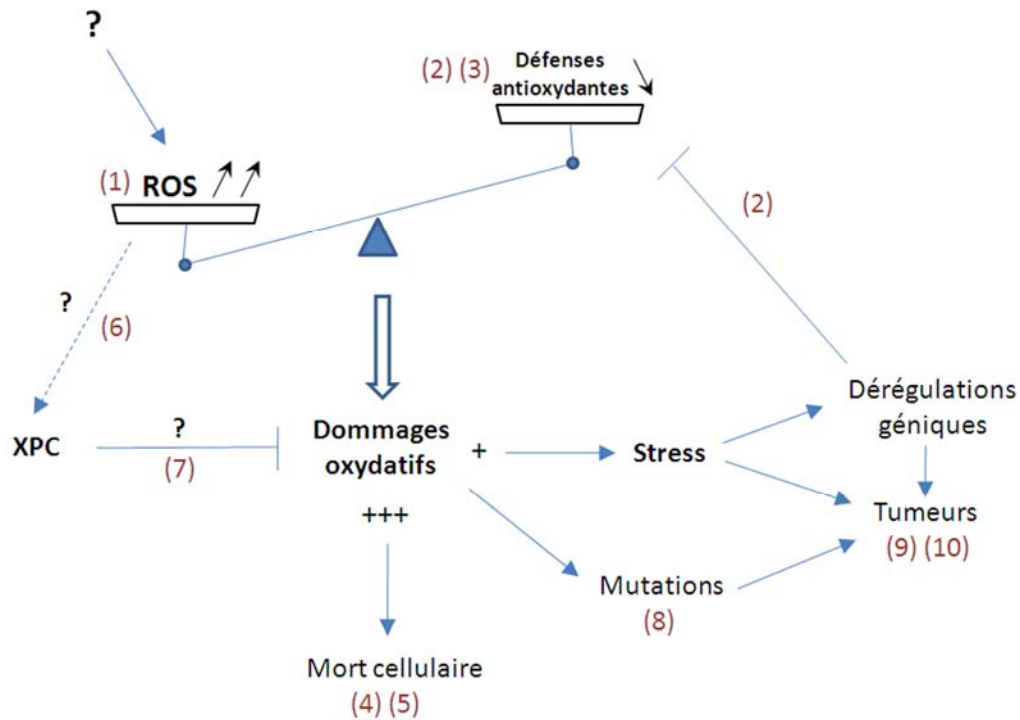


Figure 58 : Un rôle des dommages oxydatifs dans la pathologie XP-C ?

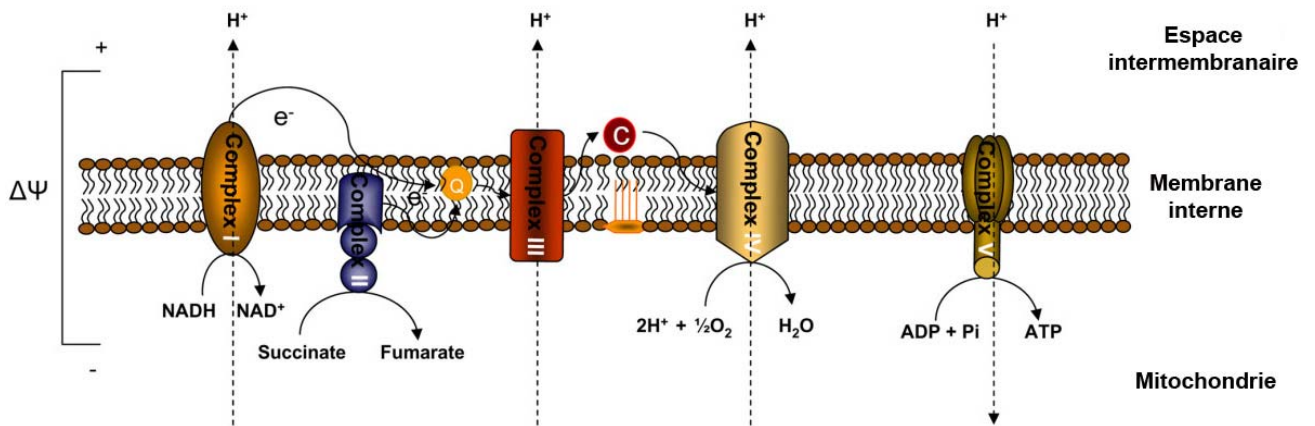


Figure 59 : Chaîne de transport des électrons.

La chaîne de transport des électrons est composée de cinq complexes multimériques. Le transport d'électrons entre les complexes I et IV est couplé à une extrusion de protons au niveau des complexes I, III et IV, ce qui crée un gradient électrochimique ($\Delta\Psi$) à travers la membrane interne de la mitochondrie. Le flux de protons traverse finalement le complexe V (ATP synthase), qui utilise son énergie pour synthétiser l'ATP à partir d'ADP.

(10) Les patients XP-C ont un risque 10 à 20 fois plus élevé de développer des tumeurs internes par rapport au reste de la population. Ces tumeurs internes pourraient être liées à l'accumulation de lésions d'oxydation dans les cellules XP-C (Giglia et al., 1998).

Les hypothèses que nous pouvons tirer de ces observations sont illustrées sur le schéma 58. Les cellules XP-C accumulent des ROS (1) et présentent un déséquilibre de la balance redox et des défenses antioxydantes (2)(3). Il est donc probable qu'il y ait une accumulation progressive de dommages oxydatifs dans les cellules XP-C. Or la protéine XPC semble être impliquée directement dans la prise en charge des lésions d'oxydation puisque : les cellules XP-C sont plus sensibles au stress oxydant que les cellules WT (4)(5) ; la protéine XPC pourrait être régulée directement par le niveau de ROS dans la cellule (6) ; la protéine XPC stimule la BER (7). L'accumulation de ROS et la persistance de dommages oxydatifs dans les cellules XP-C pourrait conduire à un stress latent expliquant les dérégulations que nous avons observées dans les kératinocytes XP-C. A long terme, la persistance de lésions d'oxydation pourrait favoriser l'apparition de mutations (8), puis de tumeurs (9) (10).

Il reste cependant une inconnue de taille dans cette représentation : d'où proviennent les ROS qui s'accumulent dans les cellules XP-C ? Pour tenter d'apporter un élément de réponse, nous nous intéressons au principal suspect généralement impliqué dans ce type d'anomalie : la mitochondrie.

III.2. Une dérégulation mitochondriale pourrait-elle être au centre des anomalies observées dans les cellules XP-C ?

La mitochondrie est la « centrale énergétique » de la cellule. C'est au sein de cette organelle que se déroulent les dernières étapes de la respiration cellulaire qui permettent la production d'adénosine triphosphate (ATP), la principale source d'énergie de la cellule. La chaîne de transport des électrons (CTE) est un ensemble de cinq complexes protéiques transmembranaires qui permettent, par une série de réactions d'oxydoréduction, la formation d'un gradient de protons aboutissant à la production d'ATP (figure 59). La mitochondrie possède son propre matériel génétique qui est répliqué indépendamment du génome nucléaire. L'ADN mitochondrial (ADNmt) humain est une molécule circulaire de 16 kb. Il code pour 13 composants essentiels de la chaîne de transport des électrons, 22 ARN de transfert et 2 ARN ribosomiaux impliqués dans leur traduction. Les mutations ou les délétions touchant l'ADNmt interfèrent avec la fonction de la mitochondrie et résultent généralement en un dysfonctionnement cellulaire.

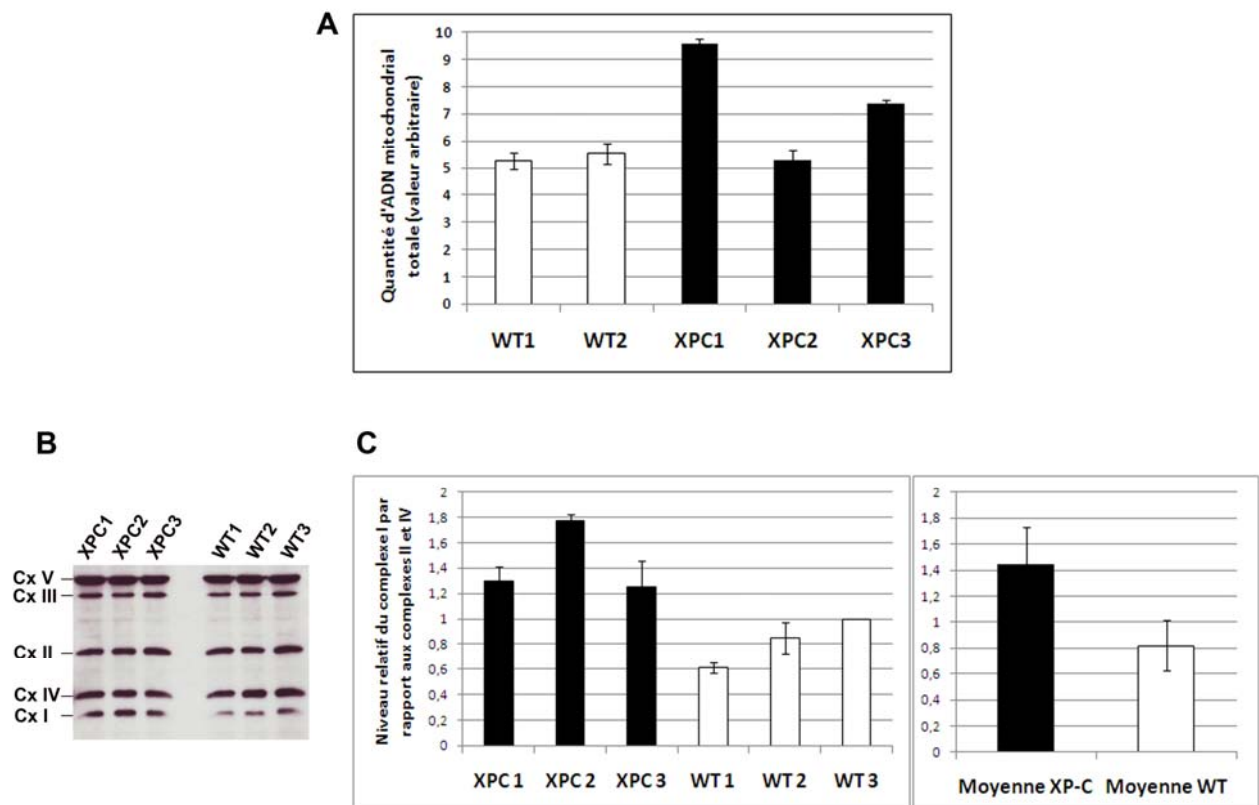


Figure 60 : Quantification de la quantité d'ADN mitochondrial et du niveau d'expression des complexes de la CTE dans les kératinocytes XP-C.

(A) La quantité d'ADN mitochondrial (ADNmt) est mesurée par PCR en temps réel en utilisant des amorces Taqman spécifiques du gène mitochondrial *12S rRNA*. Le gène nucléaire *MLH1* est amplifié en parallèle pour la normalisation. Le rapport entre le nombre de copies du gène *12S rRNA* (ADNmt) et le nombre de copies du gène *MLH1* donne une estimation de la quantité globale d'ADNmt dans chaque souche. **(B)** Le niveau d'expression des complexes de la chaîne de transport des électrons (CTE) est analysé par western blot grâce à un kit de détection (MitoProfile® Human Total OXPHOS Detection Kit, MitoSciences) contenant des anticorps dirigés contre la sous-unité ND6 (NADH déhydrogenase subunit 6) du complexe I, la sous-unité SDHB (succinate déhydrogenase iron-sulfur) du complexe II, la sous-unité UQCRC2 (ubiquinol-cytochrome c reductase core protein II) du complexe III, la sous-unité MT-CO2 (cytochrome c oxidase subunit II) du complexe IV, et la sous-unité ATP5A1 (subunit α of F1-ATPase) du complexe V. Les sous-unités ont été choisies car elles sont labiles et le niveau d'expression de chacune d'entre elles reflète celui du complexe dans lequel elle fonctionne. **(C)** Le niveau d'expression des complexes I, II et IV a été quantifié grâce au logiciel ImageJ. Le niveau d'expression du complexe I est normalisé dans chaque souche par rapport au niveau du complexe II et du complexe IV et la moyenne de ces deux normalisations est représentée ici. La souche WT3 est utilisée comme référence.

Grâce à une collaboration avec l'équipe du Pr. Paquis-Flucklinger²¹, nous avons mesuré la quantité totale d'ADNmt dans trois souches de kératinocytes XP-C et dans deux souches de kératinocytes WT par QPCR (figure 60A). Nous avons ainsi pu observer, dans deux souches XP-C, une augmentation de la quantité totale d'ADNmt par rapport à la quantité moyenne observée dans les kératinocytes WT (+78% et +37%, respectivement). Cette observation suggère donc un déséquilibre au niveau de la mitochondrie. L'accumulation d'ADNmt pourrait provenir d'une plus forte activité mitochondriale, car le nombre de mitochondries (et donc de génomes mitochondriaux) dépend des besoins énergétiques de la cellule. L'expérience réalisée ici est une analyse quantitative globale qui ne permet pas de tirer d'informations sur la qualité de l'ADNmt. Il est maintenant nécessaire de déterminer si l'ADNmt accumulé dans les mitochondries des cellules XP-C est intact ou s'il présente des mutations et/ou des délétions. En effet, la réplication des copies d'ADNmt intacts pourrait être stimulée pour compenser l'altération de certaines molécules d'ADNmt. Inversement, un avantage réplicatif de molécules d'ADNmt altérées pourrait conduire à leur accumulation dans la mitochondrie. Il est donc essentiel d'analyser de façon qualitative l'ADNmt des cellules XP-C.

Nous avons également analysé par western blot le profil d'expression des cinq complexes de la CTE dans trois souches de kératinocytes XP-C et trois souches de kératinocytes WT (figure 60B). Nous avons constaté une surexpression spécifique du complexe I dans les trois souches de kératinocytes XP-C, les autres complexes étant exprimés de la même façon dans les souches XP-C et les souches WT. Le complexe I est le plus important complexe de la CTE : il comporte 45 sous-unités dont 7 sont codées par le génome mitochondrial. Le complexe I est également un protagoniste majeur de la production de ROS par la mitochondrie (Hirst, 2010). Les électrons libérés par les réactions d'oxydoréduction au niveau du complexe I peuvent en effet réduire l'oxygène, aboutissant à la formation de l'anion superoxyde $O_2^{\bullet -}$. La surexpression du complexe I pourrait donc contribuer à l'accumulation de ROS dans les cellules XP-C.

La surexpression de plusieurs gènes mitochondriaux dans des fibroblastes XP de plusieurs groupes de complémentation a déjà été rapportée (Rothe et al., 1993). Sept gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales apparaissent parmi les résultats de notre crible génomique : cinq sont sous-exprimés et deux sont surexprimés dans les kératinocytes XP-C par rapport aux kératinocytes WT (tableau 15). Aucun d'entre eux ne code cependant pour des protéines du complexe I.

Globalement, l'ensemble de ces résultats suggèrent un déséquilibre de la mitochondrie dans les cellules XP-C à l'état stable. Comment lier ce dysfonctionnement mitochondrial à l'absence d'une protéine XPC fonctionnelle ?

²¹ Nous remercions particulièrement Alexia Figueroa et Meriame Abbassi qui ont réalisé ces expériences.

Accession #	Nom du gène	Description	Ratio XP-C/WT	P-value
NM_006111	ACAA2	Homo sapiens acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2 (ACAA2), nuclear gene encoding mitochondrial protein	-2.57	0
NM_176794	MRPL43	Homo sapiens mitochondrial ribosomal protein L43 (MRPL43), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 4	-2.28	1.5E-21
NM_000690	ALDH2	Homo sapiens aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial) (ALDH2), nuclear gene encoding mitochondrial protein	-1.62	1.1E-6
AK315296	IVD	Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial precursor (EC 1.3.99.10)	-1.57	3.0E-8
NM_004563	PCK2	Homo sapiens phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial) (PCK2), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 1	-1.51	1.6E-8
NM_020201	NT5M	Homo sapiens 5',3'-nucleotidase, mitochondrial (NT5M), nuclear gene encoding mitochondrial protein	+1.72	9.3E-16
NM_005763	AASS	Homo sapiens amino adipate-semialdehyde synthase (AASS), nuclear gene encoding mitochondrial protein	+1.99	3.6E-12

Tableau 15 : Gènes codant pour des protéines mitochondriales dérégulés dans les kératinocytes XP-C.

En raison de l'absence d'histones protectrices, l'ADNmt est particulièrement vulnérable aux dommages liés à des agents endogènes (ROS) et exogènes (UV, molécules chimiques). Les dommages oxydatifs liés à la proximité de la CTE y sont notamment plus fréquents que dans l'ADN nucléaire (pour revue voir : (Berneburg et al., 2006; Druzhyina et al., 2008)). Pendant longtemps, on a cru que l'ADNmt n'était pas réparé et que les molécules portant un nombre excessif de dommages étaient « mises au rebut » et/ou dégradées pour être remplacées par des copies intactes (voire par de nouvelles mitochondries). Cette hypothèse était fondée sur une étude de 1974 montrant que les CPD induits par les UV n'étaient pas réparés dans l'ADNmt (Clayton et al., 1974). Une étude plus récente a confirmé l'absence de réparation des CPD et des 6-4 PP dans l'ADNmt (Pascucci et al., 1997) : il n'y aurait donc pas de NER dans la mitochondrie. Par la suite, de nombreuses observations ont démontré que certains systèmes de réparation étaient tout de même actifs au sein de la mitochondrie. Plusieurs glycosylases de la BER sont ainsi présentes dans la mitochondrie, dont l'enzyme OGG1 (Nishioka et al., 1999). Les souris *Ogg1* *-/-* accumulent 20 fois plus de lésions 8-oxoG dans leur ADNmt que les souris *wild-type* (de Souza-Pinto et al., 2001). L'enzyme OGG1 existe dans la cellule sous deux formes : une forme exclusivement mitochondriale (β -OGG1) et une forme principalement nucléaire (α -OGG1). Paradoxalement, la forme mitochondriale β -OGG1 ne possède pas d'activité enzymatique et sa fonction est inconnue (Hashiguchi et al., 2004). La réparation des 8-oxoG dans la mitochondrie serait donc prise en charge par α -OGG1. Puisque la protéine XPC stimule l'activité d'OGG1 au cours de la BER, nous sommes en droit de nous demander si XPC est également présente dans la mitochondrie et si elle y joue un rôle dans la réparation des lésions d'oxydation. A notre connaissance, aucune étude ne rapporte l'expression des protéines XP dans la mitochondrie. En revanche, les protéines de la TCR CSA et CSB ont été impliquées dans la réparation de l'ADNmt grâce à leur interaction avec OGG1 (Kamenisch et al.).

La mitochondrie n'est pas une organelle facile à étudier et l'étude des mécanismes de réparation de l'ADNmt n'en est qu'à ses débuts. Nous pouvons toutefois imaginer qu'un défaut de réparation des lésions d'oxydation dans l'ADNmt pourrait induire un déséquilibre mitochondrial dans les cellules XP-C, menant à l'apparition d'un stress latent (accumulation de ROS, activité énergétique inappropriée) et favorisant, au cours du temps, l'accumulation d'anomalies dans les cellules XP-C. Des études plus approfondies sur le statut mitochondrial dans les cellules XP-C (qualité de l'ADNmt, activité de la CTE, accumulation des ROS mitochondriaux) et l'analyse du profil d'expression des protéines XP dans la mitochondrie (fractionnement cellulaire) apporteront des éléments de réponse à toutes les questions que nos observations soulèvent.

III.3. Implications concernant le vieillissement chez les patients XP-C

L'accumulation progressive de dommages oxydatifs dans la cellule a été mise en cause dans le processus de vieillissement chronologique. Comme nous l'avons vu, la mitochondrie est extrêmement vulnérable au stress oxydatif et ne dispose pas, *a priori*, d'un réseau de systèmes de réparation aussi élaboré que celui qui opère dans le noyau. Des mutations dans l'ADNmt peuvent donc s'accumuler au cours du temps dans une cellule et entraîner un dysfonctionnement de la fonction mitochondriale aboutissant à une augmentation de la production de ROS. Les ROS induisent à leur tour un accroissement de la fréquence des dommages et des mutations dans l'ADNmt, créant ainsi un « cercle vicieux » qui aboutit à l'accumulation de dommages oxydatifs dans la cellule, et finalement à la mort cellulaire. Cette théorie est soutenue par de nombreuses observations montrant (1) que la fréquence des mutations et/ou des délétions touchant l'ADNmt augmente avec l'âge, (2) que l'efficacité des systèmes de réparation de l'ADN nucléaire et mitochondrial diminue avec l'âge et (3) que l'accumulation de dommages dans l'ADNmt constitue un facteur étiologique commun à de nombreuses maladies neurodégénératives associées à un vieillissement prématuré (pour revue voir : Druzhyna et al., 2008) (Chen et al., 2007)). Ainsi les cellules de patients XP-A ou CS-B présentent une diminution de la réparation des dommages oxydatifs dans la mitochondrie (Driggers et al., 1996; Stevnsner et al., 2002). Toutefois, ce modèle de vieillissement a été récemment remis en cause par des expériences montrant que l'accumulation de mutations dans l'ADNmt de souris vieillissant prématurément n'est pas nécessairement associée à une augmentation de la production de ROS et des marqueurs du stress oxydatif (Chen et al., 2007; Kujoth et al., 2005). Il y aurait donc une implication de la mitochondrie et des dommages oxydatifs dans le vieillissement mais les relations cause/conséquence restent encore à définir.

La pathologie XP-C n'est pas considérée comme une maladie associée à un vieillissement chronologique prématuré, contrairement aux syndromes CS et TTD. Une étude a montré que l'espérance de vie des souris *Xpc* *-/-* était significativement plus courte que celle des souris *wild-type* (Melis et al., 2008), mais cette observation dépend fortement du fond génétique des souris (Wijnhoven et al., 2000). De plus, nous ne disposons d'aucune information sur l'espérance de vie des patients XP-C en l'absence d'exposition au soleil. En considérant l'ensemble de nos observations, il ne paraît pas impossible de penser que le processus de vieillissement puisse être altéré chez les patients XP-C. Les fibroblastes XP-C accumulent les ROS à l'état stable, présentent une morphologie allongée et dendritique très différente de celle des cellules WT et surexpriment la MMP-1 qui est un marqueur du vieillissement chronologique et du photovieillissement dans la peau *in vivo* (Fisher et al., 1996; Varani et al., 2000). Ces observations rappellent donc les caractéristiques associées aux fibroblastes âgés ou photo-âgés *in vivo* mais également aux fibroblastes sénescents *in vitro* (West et

al., 1989) (Passos and Von Zglinicki, 2006). Le profil des protéines sécrétées par les fibroblastes sénescents peut rappeler celui des CAF et, tout comme ces derniers, les fibroblastes sénescents peuvent induire la croissance tumorale (Krtolica et al., 2001). Un vieillissement prématuré des fibroblastes XP-C pourrait-il expliquer le phénotype de « pré-CAF » de ces derniers ? Il serait intéressant d'analyser les marqueurs du vieillissement dans les cellules XP-C, et notamment les télomères. Chez la levure *S. Cerevisiae*, la délétion du gène *ogg1* provoque une accumulation de 8-oxoG au niveau des télomères et un raccourcissement anormal de ces derniers (Lu and Liu, 2010). De plus, un raccourcissement accéléré des télomères est observé dans les fibroblastes XP-B après un stress oxydatif (H₂O₂) (Ting et al., 2009). Un phénomène similaire peut-il se produire dans les cellules XP-C à l'état stable en raison de l'accumulation de ROS endogènes et/ou d'un stress mitochondrial ? Qu'en est-il alors après une irradiation UV ? Peu de données sont encore disponibles sur le rôle de la NER au niveau des télomères ; pourrait-elle avoir un rôle dans le maintien de la stabilité génétique en intervenant au niveau des télomères après une irradiation UV ?

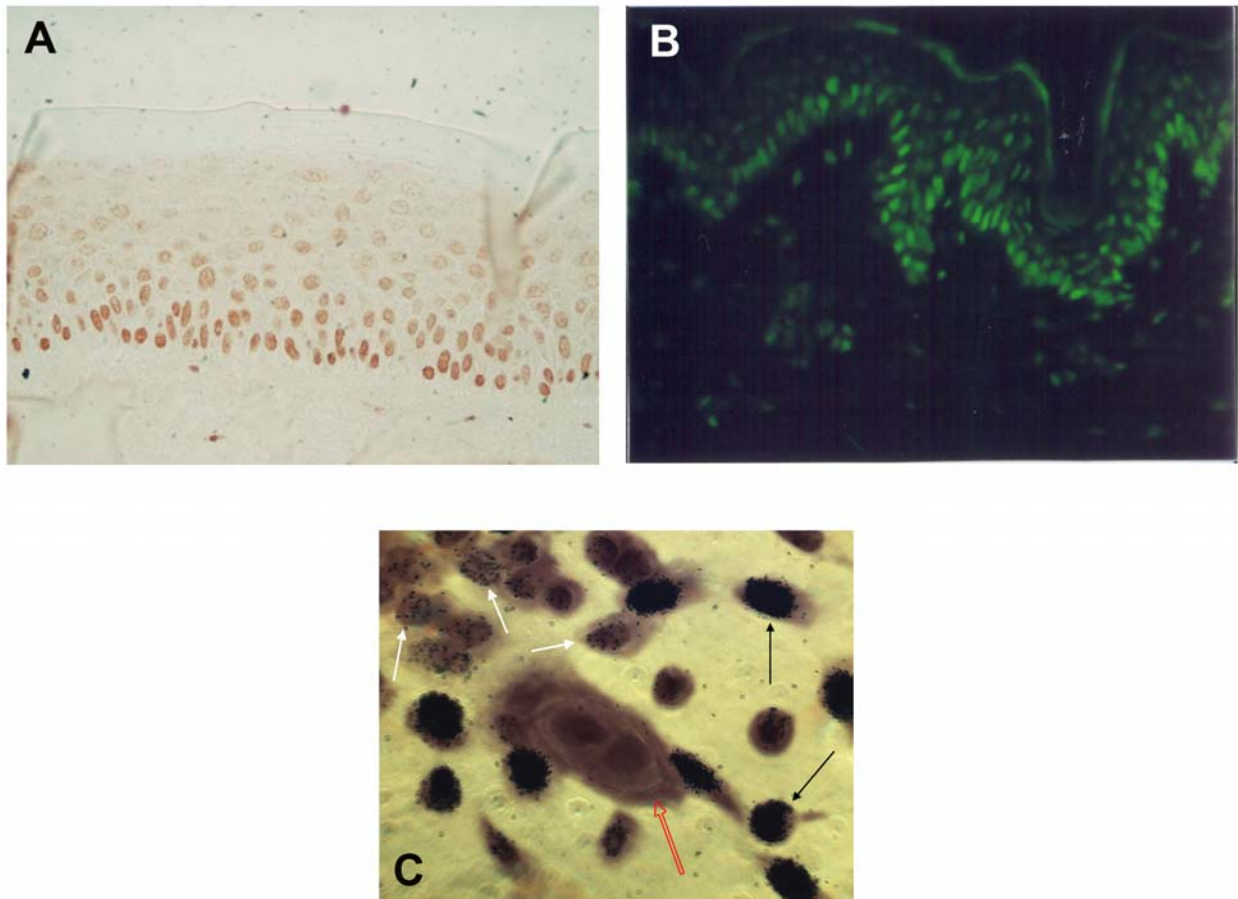


Figure 61 : Le profil d'expression de la protéine XPC dans l'épiderme corrèle-t-il avec l'activité de la NER ?

(A) Analyse par immunohistochimie de la protéine XPC dans une peau reconstruite *in vitro* à partir de kératinocytes humains normaux. **(B)** Analyse par immunofluorescence de la protéine XPC dans une peau humaine normale. **(C)** Analyse UDS (Unscheduled DNA synthesis) sur des kératinocytes primaires humains normaux après une irradiation UVB (1500 J/m^2). La flèche rouge indique les cellules différenciées. Les flèches blanches indiquent les cellules prolifératives. Les flèches noires indiquent les cellules en phase S. Noter l'absence de grains (et donc de NER ?) dans les cellules différenciées.

B. Réflexions autour de la NER, de la différenciation et du caractère « souche »

Le profil d'expression des protéines de la NER dans la peau humaine *in vivo* a été très peu étudié, voire pas du tout, probablement en raison d'un manque d'anticorps fiables pour l'analyse *in situ* ou de la difficulté à obtenir de véritables « contrôles négatifs » permettant de s'assurer de leur spécificité. Grâce à un anticorps spécifique dirigé contre XPC, nous avons observé que le niveau d'expression de la protéine XPC est plus élevé dans la couche basale des peaux reconstruites *in vitro* à partir de kératinocytes WT et qu'il diminue progressivement dans les couches suprabasales (figure 61A). Ce profil d'expression a été validé sur des coupes de peau humaine normale (figure 61B). L'expression préférentielle de la protéine XPC dans la couche basale de l'épiderme fait ressurgir une vieille question : comment est régulée l'activité de la NER au cours de la différenciation ? Les cellules engagées dans le processus de différenciation perdent leur activité mitotique et ne répliquent donc plus leur ADN. Par conséquent, la réparation globale du génome (GGR) devient d'une importance mineure et seule la TCR est nécessaire pour conserver l'intégrité des gènes transcriptionnellement actifs dans les cellules différenciées.

Les neurones sont des cellules non prolifératives, complètement différenciées, et ils constituent donc un bon modèle pour ce type d'étude. En analysant la réparation des CPD, des 6-4 PP et des adduits de benzo[a]pyrene diol-époxyde (BPDE) dans les cellules de neurotératome NT2 avant et après leur différenciation en neurones, T. Nospikel et P.C. Hanawalt ont observé une forte atténuation de la réparation des 6-4 PP et des adduits de BPDE et une perte quasiment totale de la réparation des CPD au cours de la différenciation (Nospikel and Hanawalt, 2002). Une faible diminution du niveau d'ARNm de XPC est également observée au cours de la différenciation (-30%). Des analyses plus fines ont permis de déterminer que les CPD sont efficacement éliminés sur les gènes actifs mais pas dans les zones silencieuses du génome dans les cellules NT2 après leur différenciation en neurones. De façon surprenante, le brin non-transcrit des gènes actifs est également réparé beaucoup plus efficacement que le reste du génome. Ce phénomène, confirmé sur des neurones primaires, a été appelé « réparation associée à la différenciation » (DAR, differentiation-associated repair). La réparation des gènes actifs par la TCR utilise le brin non-transcrit complémentaire comme matrice pour la synthèse d'un nouveau fragment d'ADN. Le brin non-transcrit doit donc rester intact pour éviter le blocage de l'ADN polymérase lors de la dernière étape de la TCR. Le mécanisme de la DAR n'a pas été élucidé et son existence dans les cellules *in vivo* demeure une hypothèse. Il peut sembler étrange que la cellule dispose d'un système de réparation différent de la TCR uniquement pour réparer le brin complémentaire non-transcrit. S'il y a dans la cellule suffisamment de lésions pour que le brin transcrit et son brin complémentaire soient

endommagés dans une région codante (3% du génome), c'est que la cellule est sérieusement altérée et a donc plus de chance de s'engager dans le processus d'apoptose que de réparer son ADN.

Dès qu'ils entrent dans le programme de différenciation, les kératinocytes épidermiques sont destinés à être éliminés de l'organisme. La réparation des régions de l'ADN qui ne sont pas indispensables à l'accomplissement de leur transformation en cornéocytes peut donc apparaître superflue. Les premières observations de la réparation des dommages induits par les UV dans la peau *in vivo* ont révélé que les lésions étaient éliminées beaucoup plus rapidement dans la couche basale que dans les couches suprabasales de l'épiderme (Eggset et al., 1983). Ces résultats ont été confirmés dans les peaux reconstruites *in vitro* à partir de kératinocytes humains normaux (Bernerd and Asselineau, 1997; Bernerd et al., 2001). Cependant, la rapide disparition des lésions UV-induites dans la couche basale de l'épiderme est-elle liée à une réparation plus efficace ou tout simplement à un taux de lésions moins important dans la couche basale que dans les couches supérieures de l'épiderme en raison des propriétés de pénétration des UV dans la peau ? Les résultats obtenus par Young *et al.* écartent la deuxième proposition car ils montrent que le taux de formation des dimères de pyrimidines dans la peau est le même dans toutes les couches de l'épiderme pour les UV de longueur d'onde > 300 nm (soit la plus grande partie du spectre solaire) (Young et al., 1998).

Les études menées sur les kératinocytes en culture ont abouti à des conclusions contradictoires. Liu *et al.* ont décrit une diminution de la réparation de l'ADN dans les cellules différenciées (suprabasales) par rapport aux cellules basales issues d'un même échantillon de peau humaine et cultivées sur un gel de collagène (Liu et al., 1983). Par la suite, Li *et al.* ont observé que la différenciation des kératinocytes murins et humains sous l'effet d'une augmentation du calcium dans le milieu de culture résultait en une diminution significative de l'activité de la NER (Li et al., 1997). Plus récemment, des mesures d'UDS dans des kératinocytes murins n'ont pas permis de révéler de diminution du taux de GGR après le passage des cellules dans un milieu pro-différenciant contenant une forte concentration en calcium (Backendorf et al., 2005). Toutefois, les analyses par UDS ont été menées 24h seulement après le changement de milieu, ce qui est probablement trop court pour observer une modification de la NER. Oh *et al.* ont analysé la réparation des CPD et des 6-4 PP par la GGR dans des kératinocytes différenciés humains 12 jours après leur passage dans un milieu de différenciation (Oh and Yeh, 2005). Aucune diminution de l'activité de la GGR n'a été observée dans les cellules différenciées. Cependant, les niveaux d'ARNm de XPC et de DDB2/XPE diminuent progressivement dans les kératinocytes au cours de la différenciation (-40% au bout de 12 jours). De plus, après une exposition UV, le taux d'induction des ARNm codant pour ces deux protéines est plus faible dans les cellules différenciées. La plupart des études *in vitro* sont réalisées dans un milieu sans sérum, contenant une très faible concentration en calcium, qui ne respecte pas la physiologie des kératinocytes puisqu'il inhibe la formation de desmosomes entre les cellules. L'élévation de la

concentration en calcium constitue donc une « désinhibition de la différenciation » plutôt qu'une induction de la différenciation. Ces modèles ne reflètent donc pas de façon satisfaisante le processus de différenciation épidermique.

Lors de nos analyses UDS, nous avons pu observer que les grosses cellules (cellules différenciées) contenaient systématiquement moins de grains que les petites cellules (cellules prolifératives) (figure 61C). Cependant, il est probable que la pénétration de la ^3H -Thymidine soit plus difficile dans les cellules différenciées, riches en protéines et en lipides, que dans les cellules prolifératives. De plus, la stratification des cellules différenciées en culture rend difficile l'interprétation des analyses UDS.

La question de la régulation de la NER dans la peau est intéressante et nécessite des analyses plus approfondies. L'expression du gène *XPC* dans l'épiderme semble être régulée au niveau transcriptionnel puisque (1) la réexpression de la protéine XPC est observée dans toutes les couches des épidermes reconstruits *in vitro* à partir de kératinocytes XP-C génétiquement corrigés ; (2) nous avons pu observer une faible accumulation d'ARNm *XPC* dans les kératinocytes XP-C en culture mais pas dans les greffes XP-C, où les cellules basales exprimant (faiblement) *XPC* sont probablement diluées parmi les cellules suprabasales qui l'expriment peu ou pas. Pour valider cette hypothèse, le profil d'expression du gène *XPC* (et des autres gènes de la NER) dans les différentes couches de l'épiderme pourrait être analysé par RT-QPCR après microdissection d'échantillons de peau humaine. En parallèle, des marquages par immunofluorescence sur des échantillons de peau humaine, en l'absence ou après une exposition UV, révéleront la régulation de l'expression des protéines de la NER dans les différentes couches de l'épiderme.

Si la NER – ou la réparation de l'ADN de façon générale – est régulée au cours de la différenciation, qu'en est-il dans le compartiment des cellules souches ? Les cellules souches sont les gardiennes du programme de différenciation épidermique et elles assurent la régénération de l'épiderme tout au long de la vie d'un individu. Sont-elles donc mieux protégées que les autres cellules de la couche basale ? Existe-t-il une corrélation entre le taux d'activité des complexes de réparation et la hiérarchie des cellules basales (cellules souches/progénéiteurs/cellules engagées dans le processus de différenciation) ? Il serait intéressant, dans un premier temps, de mesurer le niveau d'expression de la protéine XPC et l'activité de la NER dans les différents types de clones de kératinocytes (holoclones/méroclones/paraclones).

C. Quel(s) traitement(s) peut-on proposer aux patients XP-C ?

I. La thérapie génique cutanée *ex vivo* des patients XP-C : espoir ou réalité ?

I.1. Le transfert de gènes permet la correction des principales anomalies des kératinocytes XP-C : implications pour la photocarcinogénèse

La réexpression d'une protéine XPC fonctionnelle dans les kératinocytes XP-C permet de restaurer la réparation des lésions induites par les UV ainsi que la survie des cellules après une irradiation UV. Pour la première fois, nous avons également validé la correction génétique *ex vivo* des kératinocytes XP-C dans un contexte tridimensionnel en montrant une réparation efficace des lésions induites par les UV dans les peaux reconstruites *ex vivo* et dans les épidermes régénérés *in vivo* à partir des kératinocytes XP-C corrigés. La réexpression stable de la protéine XPC permet également de normaliser la stabilisation de la protéine p53 dans la couche basale des épidermes reconstruits *ex vivo*. La stabilisation de p53 dans les épidermes XP-C est vraisemblablement liée à l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire en raison de la persistance de lésions sur l'ADN. Cela suggère que la correction génétique permet de rétablir un contrôle normal du cycle cellulaire et/ou de l'apoptose dans les cellules XP-C.

Si la réexpression de la protéine XPC permet une réparation efficace des lésions dans les kératinocytes XP-C corrigés, il est probable qu'elle ait également un effet sur la mutagenèse induite par les UV. La fréquence des mutations est fortement accrue dans les cellules TTD/XP-D après une exposition UV mais la réexpression de la protéine XPD permet de réduire de façon significative la mutagenèse sur un vecteur navette introduit dans des fibroblastes TTD/XP-D transformés (Marionnet et al., 1996). Il serait intéressant de mettre en œuvre de type d'expérience dans des kératinocytes primaires avant et après correction génétique.

La présence de mutations dans le gène *p53* et la résistance des kératinocytes à l'apoptose ont été associés à la prédisposition des souris *Xpc* *-/-* au développement de carcinomes cutanés photo-induits (Ananthaswamy et al., 1999). Si la correction génétique permet un rétablissement du contrôle de l'apoptose, via la régulation de p53, et une diminution (probable) de la mutagenèse, elle devrait finalement permettre une réduction de la photocarcinogénèse cutanée. En utilisant des vecteurs adénoviraux, Marchetto *et al.* ont montré que la correction génétique cutanée *in vivo* des souris *Xpa* *-/-* prévenait la formation de carcinomes cutanés induits par les UV (Marchetto et al., 2004). Nous avons également essayé de montrer l'effet protecteur de notre protocole de thérapie génique sur le développement de carcinomes cutanés photo-induits en irradiant de façon chronique (3 fois/semaine) les épidermes XP-C et XP-C corrigés régénérés sur la souris Nude. Malheureusement, la mort précoce des souris (probablement liée aux anesthésies répétées) ne nous

a pas permis de conclure sur ce point. Cette expérience sera reproduite dans d'autres conditions (1 à 2 irradiations/semaine) car elle constitue le meilleur argument pour prouver l'efficacité de la thérapie génique cutanée *ex vivo* des kératinocytes XP-C.

I.2. Quel protocole de thérapie génique pour les patients XP-C ?

Les résultats obtenus sont très encourageants et constituent une étape importante vers la thérapie génique cutanée des patients XP-C. Toutefois, avant de proposer un protocole clinique de thérapie génique pour les patients XP-C, de nombreuses considérations sont à prendre en compte.

- *Quel vecteur viral ?*

Les vecteurs dérivés des gamma-rétrovirus (γ -RV) ont été les vecteurs les plus utilisés pour les essais pré-cliniques et cliniques de thérapie génique. Cependant, depuis la découverte des effets adverses des γ -RV chez cinq patients SCID-X1 ayant développé un syndrome lymphoprolifératif suite au traitement de leurs progéniteurs CD34+ par thérapie génique *ex vivo*, les γ -RV ont acquis une « mauvaise réputation ». Les γ -RV s'insèrent préférentiellement au niveau des promoteurs et des îlots CpG (Wu et al., 2003). L'insertion des séquences régulatrices des LTR viraux en amont des gènes cellulaires augmente le risque d'activation de proto-oncogènes et de transformation maligne. Cependant, aucun effet adverse n'a été rapporté dans d'autres essais cliniques, comme le traitement de l'ADA-SCID (Aiuti et al., 2002), ce qui suggère que d'autres facteurs liés à la pathologie elle-même, ou au transgène, puissent participer à la transformation maligne de certaines cellules transduites. De plus les progrès technologiques permettent désormais de déterminer *a priori* les sites d'insertion du RV grâce à des techniques comme la LM-PCR (linker-mediated nested PCR) (Mavilio et al., 2006). Si les risques ne pourront jamais être exclus, ils peuvent maintenant être prédits.

Les vecteurs lentiviraux (LV) dérivés de HIV sont aujourd'hui considérés par les autorités sanitaires (AFSSAPS) comme des vecteurs plus sûrs que les γ -RV. Ils sont en effet associés à une fréquence plus faible d'induction tumorale *in vivo* (Montini et al., 2006). Pourtant, même s'ils ne s'insèrent pas spécifiquement au niveau des sites d'initiation de la transcription comme les γ -RV, les vecteurs LV ont une préférence pour les régions transcriptionnellement actives du génome (Schroder et al., 2002). De plus, une étude récente montre que les séquences activatrices contenues dans les LTR viraux peuvent induire l'expression de gènes à distance indépendamment du type de vecteurs (LV ou γ -RV) et de la construction (transgène sous le contrôle du LTR ou vecteur SIN avec promoteur interne) (Maruggi et al., 2009). En outre, contrairement aux γ -RV, l'intégration des LV (SIN ou non SIN) peut provoquer une diminution de l'expression de certains gènes en induisant un épissage aberrant ou un arrêt précoce de la transcription du gène. Le potentiel génotoxique d'un vecteur RV dépend donc de l'activité des éléments contrôlant l'expression du transgène et non du type de

vecteur. L'utilisation de vecteurs SIN réduit le potentiel de dérégulation génique lié à l'intégration, à condition que le promoteur interne choisi ne soit pas lui-même capable d'induire une activation des gènes en aval.

L'incorporation de séquences « isolantes » (insulators) dans les vecteurs viraux permet de réduire la probabilité d'activation d'oncogènes à distance (Gaszner and Felsenfeld, 2006). Par exemple, l'élément HS4 contenu dans le locus β -globine chez le poulet (*Gallus gallus*) permet d'éviter l'activation inappropriée de gènes en dehors du locus par les séquences promotrices du gène β -globine tout en créant une barrière contre la formation d'hétérochromatine qui pourrait « éteindre » l'expression du gène.

Afin de limiter au maximum les risques liés aux vecteurs viraux, l'équipe de P. Leboulch (Harvard Medical School, Boston) a développé un vecteur pour la thérapie génique de la β -thalassémie contenant tous les éléments de biosécurité mentionnés ci-dessus. Le vecteur « LentiGlobin » est un vecteur LV SIN permettant l'expression du gène β -globine sous le contrôle de ses propres éléments de régulation. Il contient en outre l'élément isolant HS4. Malgré ses précautions, un an après le traitement d'un patient atteint de β -thalassémie, l'émergence d'un clone contenant une insertion activatrice au niveau du gène *HMG2* a suscité des inquiétudes (Kaiser, 2009). Il semblerait que la croissance du clone se soit stabilisée et ne présente pas de risque pour le patient. L'essai de thérapie génique est donc un succès mais prouve que le risque zéro n'existe pas, comme le mentionne M. Sadelain (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York) : "Safer does not mean absolutely safe." Comme pour tous les traitements, l'objectif est de faire en sorte que le bénéfice pour le patient soit toujours supérieur au risque lié au traitement lui-même. Ainsi, le fait que la très grande majorité des patients SCID-X1 traités par thérapie génique soient encore en vie à ce jour reste un succès, trop souvent ignoré.

- *Quel promoteur ?*

Le choix du promoteur détermine le niveau de sécurité du vecteur, comme nous l'avons mentionné ci-dessus, mais surtout le mode de régulation du gène thérapeutique dans la cellule. L'expression constitutive du transgène sous le contrôle des LTR viraux comporte trois inconvénients : (1) ce type de construction augmente le risque d'activation d'oncogènes à distance ; (2) le niveau d'expression du transgène n'est pas contrôlé et une accumulation excessive d'ARNm et de protéine peut se produire dans la cellule ; (3) les LTR viraux peuvent être éteints par méthylation dans les cellules de mammifère, provoquant la perte d'expression du transgène. Le point (1) a été abordé ci-dessus, et le point (3) sera développé par la suite. Le point (2) est particulièrement important dans le cas de la protéine XPC car il semble que son expression soit très finement régulée dans la cellule. La surexpression de la protéine de fusion XPC-GFP dans des fibroblastes murins ou de la protéine

taguée HA-Rad4 chez la levure provoquent la dégradation rapide de ces protéines par le protéasome (Lommel et al., 2002; Ng et al., 2003). Dans les cellules de mammifère, la synthèse de la protéine XPC est donc maintenue à un faible niveau (Ng et al., 2003). Pourquoi le niveau d'expression de la protéine XPC n'est pas constitutivement élevé ? Au premier abord, il semble avantageux qu'une activité maximale de la GGR soit maintenue en permanence pour répondre rapidement aux stress génétoxiqes, et éviter un lent processus d'induction des protéines de la réparation. Cependant, la protéine XPC reconnaît les distorsions de la double hélice et possède une forte affinité pour les bases non appariées de l'ADN. Elle est donc susceptible de se fixer, lors de processus métaboliques normaux comme la réplication ou la transcription de l'ADN, à des régions d'ADN présentant une conformation similaire à celle d'un ADN endommagé. Ce dilemme est commun à tous les senseurs des dommages de l'ADN : une quantité suffisante est nécessaire pour une réponse rapide et efficace contre les dommages, mais si leur nombre est excessif, les senseurs de l'ADN risquent de déclencher une réponse inappropriée perturbant toute l'activité cellulaire. L'expression et l'activité de la protéine XPC sont donc régulées à de nombreux niveaux (transcription, modifications post-traductionnelles, localisation cellulaire), à l'état stable comme après une irradiation UV. Ces régulations fines de la protéine XPC assurent une reconnaissance efficace des lésions dans le génome sans gêner les autres processus métaboliques de l'ADN. Il paraît donc essentiel de conserver une régulation appropriée de l'ADNc XPC dans l'épiderme lors des approches de thérapie génique.

Puisque la régulation transcriptionnelle du gène XPC semble favoriser son expression dans la couche basale de l'épiderme, l'ADNc XPC pourrait être placé sous le contrôle des séquences régulatrices des gènes codant pour la kératine K5 ou la kératine K14, des protéines spécifiquement exprimées dans la couche basale de l'épiderme. Toutefois, il est nécessaire dans ce cas de vérifier que l'expression ciblée de la protéine XPC dans la couche basale suffit à protéger contre la photocarcinogénèse cutanée. De plus, ces promoteurs conduisent généralement à un niveau de transcription élevé (Page and Brownlee, 1998), ce qui n'est pas compatible avec les exigences discutées ci-dessus.

La solution idéale consiste bien entendu à utiliser le propre promoteur du gène XPC. Nous avons déjà mentionné que la transcription du gène XPC après une irradiation UV est régulée par p53 et par HIF1- α , mais d'autres facteurs de transcription inductibles par les UV participent probablement à la régulation du gène XPC. La région proximale (-175 à -1) du promoteur XPC contient deux sites de liaison putatifs des facteurs AP-1 et Sp1 (Wu et al., 2007). Un élément de réponse au facteur EGR-1 (Early Growth Response protein 1) est également présent dans le promoteur (-722) (Adimoolam and Ford, 2002). Une région de 3000pb située en amont du gène XPC a été clonée au laboratoire. Sa caractérisation, notamment son inductibilité après une irradiation UV, est actuellement en cours. Placer l'ADNc XPC sous le contrôle de ses propres séquences

régulatrices dans un vecteur RV ou LV SIN permettrait de conserver le profil d'expression du gène dans l'épiderme et sa régulation par différents facteurs de transcription inductibles après une irradiation UV et/ou un stress oxydatif. En termes de biosécurité, un vecteur de ce type limiterait également le risque d'activation d'oncogènes à distance puisque le promoteur endogène du gène XPC semble avoir une faible activité transcriptionnelle à l'état stable.

- *Quels sont les critères de sélection des cellules « corrigées » ?*

La sélection des cellules génétiquement et phénotypiquement corrigées est indispensable dans le cadre d'une perspective de greffe chez les patients XP-C. Une seule cellule déficiente en NER au sein d'un épithélium régénéré à partir de cellules génétiquement corrigées peut suffire à induire l'apparition d'une tumeur cutanée, abolissant ainsi les effets bénéfiques de la thérapie génique. Il est donc nécessaire d'obtenir une population contenant 100% de cellules corrigées. Cependant ce critère impose également un seuil permettant de définir le statut de « cellule corrigée ». Dans une population de kératinocytes transduits à l'aide d'un RV ou d'un LV, le niveau d'expression de la protéine XPC sera hétérogène d'un clone à l'autre. Le taux d'activité de la GGR à un instant donné semble dépendre de la quantité disponible de protéine XPC (Khan et al., 2009b), puisque c'est elle qui initie la mise en place de la plateforme de réparation. S'il existe un seuil d'expression maximal pour la protéine XPC, il doit aussi exister un seuil d'expression minimal. A partir de quel niveau d'expression de la protéine XPC ou à partir de quelle valeur d'UDS doit-on considérer que la cellule est « corrigée » ? L'UDS donne une estimation du taux d'activité de la GGR à un instant t. Si le taux d'UDS n'est pas de 100%, cela ne veut pas dire que la réparation ne sera pas efficace à 100%, mais plutôt qu'elle prendra plus de temps. A partir de quand ce « retard » de réparation constitue-t-il un risque pour la cellule ? Doit-on éliminer systématiquement toutes les cellules n'ayant pas un taux d'UDS de 100% par rapport aux cellules contrôles ?

Le taux d'ARNm XPC chez les parents hétérozygotes des enfants XP-C est intermédiaire entre celui des individus de la population générale et celui des individus XP-C (environ 59% du taux normal) et le niveau de protéine XPC est également réduit chez ces individus (Chavanne et al., 2000; Khan et al., 2006). Ces faibles taux résultent probablement d'une dégradation des ARNm mutés et d'une compensation seulement partielle par l'allèle intact (haploinsuffisance partielle). Bien que l'activité de la NER n'ait pas été mesurée dans les cellules de ces individus, il a été suggéré que les parents hétérozygotes pourraient représenter une population à risque pour le développement de cancers cutanés. Une seule étude cherchant à établir le niveau de risque pour les individus hétérozygotes XP de développer un cancer a été publiée en 1979, avant même que les gènes XP ne soient clonés (Swift and Chase, 1979). Cette étude, menée sur 31 familles présentant des cas de XP, a montré que les hétérozygotes XP avaient en moyenne un risque 2,3 fois plus élevé de développer des carcinomes

cutanés par rapport à la population générale. De plus, les souris hétérozygotes *Xpc +/-* ont une prédisposition significative au développement de carcinomes cutanés par rapport aux souris *Xpc +/+*, même si elle est faible par rapport à celle des souris *Xpc -/-* (Cheo et al., 2000; Friedberg et al., 2000). Certains patients XP-C porteurs de mutations induisant des défauts d'épissage possèdent un niveau faible mais détectable de protéine XPC (<30% par rapport aux cellules contrôle) (Khan et al., 2009b). Ces patients présentent une forme plus modérée de la maladie, avec une fréquence extrêmement réduite des tumeurs cutanées par rapport aux autres patients (Khan et al., 2004). Toutes ces évidences suggèrent une relation directe entre le niveau de protéine XPC dans la cellule et la fréquence des tumeurs cutanées. Quel est alors le niveau acceptable de protéine XPC dans une cellule corrigée ? Il est extrêmement difficile de répondre à cette question. L'objectif, encore une fois, est d'apporter le meilleur bénéfice possible au patient en essayant de s'approcher au maximum d'une population pure à 100% de cellules possédant un taux d'UDS de 100%.

- *Quelle méthode de sélection ?*

La stratégie de sélection fondée sur l'utilisation du marqueur CD24 présente de nombreux avantages dans le cadre d'une approche de thérapie génique : (1) la petite taille du cadre de lecture de CD24 (environ 250 pb) n'utilise qu'une petite partie de la capacité cargo des vecteurs viraux ; (2) CD24 est une protéine naturellement exprimée dans l'épiderme, ce qui suggère que son expression ectopique dans les cellules basales devrait être tolérée par l'organisme après réimplantation chez le patient ; (3) cette stratégie permet un enrichissement de la population sélectionnée en kératinocytes génétiquement corrigés à fort potentiel clonogénique ; (4) elle n'altère pas le potentiel de croissance et de différenciation des kératinocytes et permet leur étude à long terme *in vitro* et *in vivo* après greffe chez la souris immunodéficente. Cependant, un nombre croissant d'études suggèrent un rôle pour la protéine CD24 dans la progression et l'invasion tumorales (Baumann et al., 2005; Fang et al., 2010; Lim, 2005; Sagiv and Arber, 2008; Smith et al., 2006). Aucune implication directe de la protéine CD24 dans la carcinogénèse cutanée n'a toutefois été rapportée à ce jour. De plus, nous n'avons observé aucun effet adverse de la surexpression de la protéine CD24 sur les propriétés des kératinocytes primaires *in vitro* et *in vivo* (voir article n°2 et (Bergoglio et al., 2007)). Quoiqu'il en soit, il paraît peu probable que les autorités sanitaires comme l'AFSSAPS autorisent l'utilisation d'une protéine qualifiée (un peu prématurément ?) d'oncogène pour le traitement de patients prédisposés au cancer. Il y a donc peu de chances que la stratégie CD24 puisse être utilisée pour un essai clinique chez les patients XP. Cette stratégie présente néanmoins de nombreux avantages pour l'étude des kératinocytes génétiquement modifiés *in vitro* et *in vivo*. Elle sera notamment utilisée pour la sélection et l'étude à long terme des kératinocytes déficients en XPC créés grâce aux vecteurs shRNA que nous avons construits.

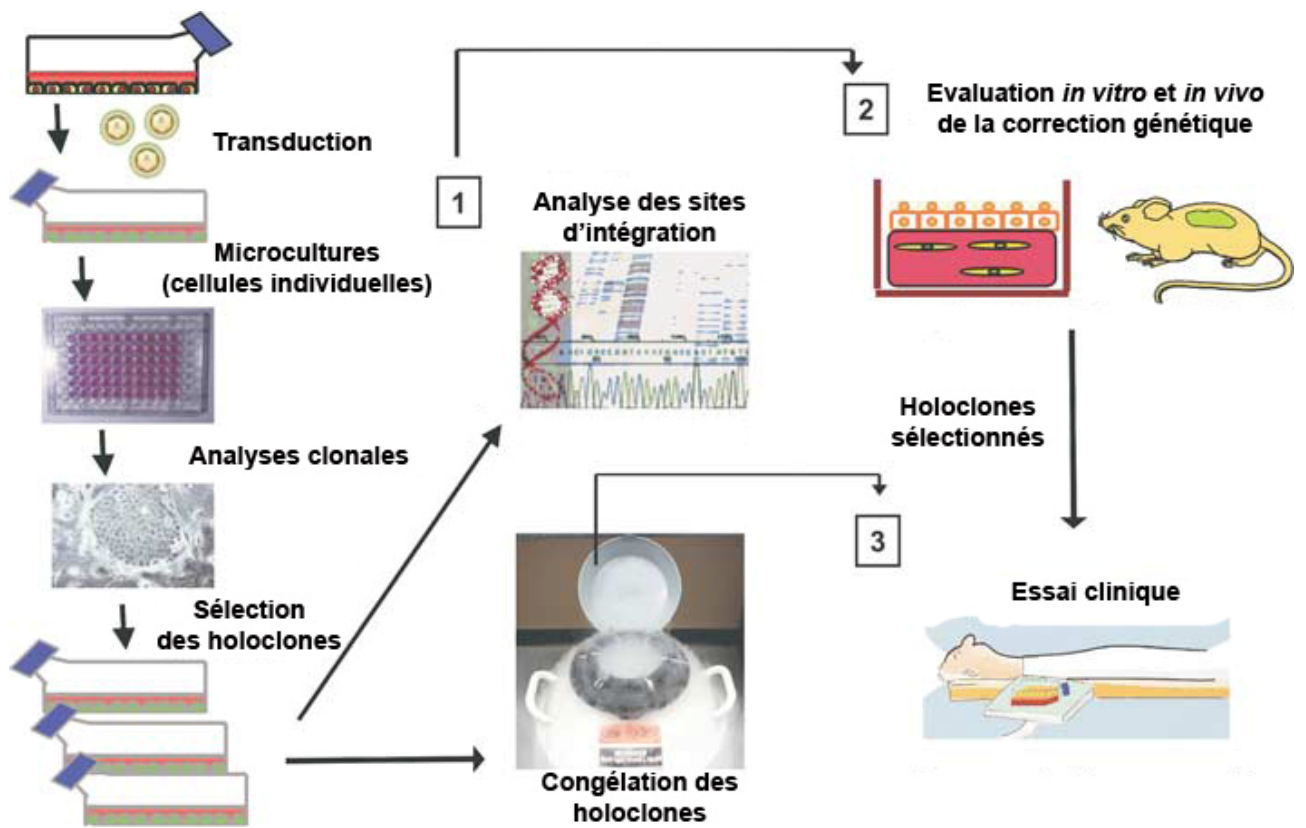


Figure 62 : Stratégie de thérapie génique *ex vivo* permettant l'évaluation complète des cellules en termes de biosécurité et d'efficacité de la correction génétique.
(D'après : Del Rio et al., 2002)

La pérennité de l'expression du transgène repose sur une quantité suffisante de cellules souches efficacement corrigées dans la population sélectionnée. Comme nous l'avons montré dans l'introduction (Chapitre Peau, §B.IV), un certain nombre de marqueurs ont été proposés pour permettre l'enrichissement d'une culture de kératinocytes en cellules à fort potentiel prolifératif. Cependant, la méthode la plus efficace pour caractériser le potentiel de croissance d'une population de kératinocytes reste l'analyse clonale. Larcher *et al.* ont proposé une stratégie d'analyse pré-clinique des kératinocytes génétiquement corrigés permettant de s'affranchir d'un marqueur de sélection tout en autorisant la caractérisation complète des cellules (figure 62) (Larcher et al., 2007). Des kératinocytes transduits individuels sont isolés en culture par dilution limite puis la capacité clonogénique (CFE) de chacune de ces cellules est évaluée. Les holoclones (clones « souches », voir figure 8) sont alors sélectionnés et propagés en culture de façon sériée. Les caractéristiques de chacun des holoclones peuvent alors être évaluées *in vitro* et *in vivo* : niveau d'expression du transgène, fonctionnalité de la protéine thérapeutique, potentiel de croissance à long terme des cellules, pérennité d'expression du transgène, caractérisation du nombre et de la localisation des insertions du RV/LV, potentiel de régénération d'un épiderme *in vitro* et *in vivo* après greffe chez la souris immunodéficiente. Ces analyses permettent de sélectionner les holoclones les plus performants et les plus sûrs. Seuls ces quelques clones parfaitement caractérisés seront alors réimplantés chez le patient. Cette stratégie apparaît comme un bon compromis pour évaluer la biosécurité d'une approche de thérapie génique tout en s'assurant de son efficacité à long terme. Une application de cette stratégie à la correction génétique de la RDEB (*COL7A1*) est actuellement en cours d'étude avant une première demande d'essai clinique (collaboration Alain Hovnanian, Fulvio Mavilio, Yann Barrandon ; communication SFTCG 2009).

• *La correction à long-terme des kératinocytes primaires est-elle possible ?*

Un des problèmes récurrents des approches de thérapie génique *ex vivo* des kératinocytes à l'aide de vecteurs rétroviraux concerne la perte d'expression du transgène observée après greffe des cellules génétiquement manipulées *in vivo* (Choate and Khavari, 1997; Fenjves et al., 1996). Cette expression transitoire a été attribuée à : (1) un mauvais ciblage des cellules souches lors de la transduction ; (2) un épuisement du compartiment souche dû à une mauvaise qualité de la culture et/ou de la greffe ; (3) une transduction efficace des cellules souches mais une inactivation transcriptionnelle des vecteurs viraux insérés dans leur génome en raison de la méthylation des séquences LTR *in vivo* (Challita and Kohn, 1994; Gram et al., 1998) ; (4) la dilution des cellules corrigées dans la greffe parmi des cellules non transduites. L'optimisation des vecteurs, des conditions de transduction et de culture, et des techniques de greffes ont permis de remédier en partie à ces problèmes. Les vecteurs ont été modifiés pour limiter leur inactivation par méthylation :

les LTR peuvent être remplacés par des promoteurs hybrides contenant des régions activatrices issues d'autres virus (ex. CMV) ou par des séquences de régulation issues de promoteurs endogènes (Choate and Khavari, 1997; Deng et al., 1997; Ghazizadeh et al., 2002; Page and Brownlee, 1998). La sélection des cellules corrigées garantit une régénération épidermique à partir d'une population homogène. Enfin, les protocoles de formation et de transplantation des feuillets épidermiques ont été améliorés pour préserver au mieux les caractéristiques des cellules souches. La croissance des kératinocytes sur une matrice de fibrine permet ainsi de faciliter la préparation, la manipulation et la mise en place des greffes chez le patient, tout en éliminant l'étape de dissociation enzymatique (dispase) du feuillet épidermique attaché à la boîte de culture (Ronfard et al., 2000).

Lorsque des conditions optimales de transduction et de manipulation des kératinocytes sont utilisées, la présence d'un nombre suffisant d'holoclones efficacement corrigés permet de maintenir l'expression du transgène *in vitro* pendant plus de 150 générations (environ 6 mois) (Mathor et al., 1996) et *in vivo* pendant 20 à 40 semaines après greffe des cellules transduites chez la souris athymique (Bergoglio et al., 2007; Del Rio et al., 2002; Kolodka et al., 1998; Levy et al., 1998).

Nous avons observé une diminution progressive de l'expression de la protéine XPC dans notre population de masse de kératinocytes corrigés, probablement en raison d'une restriction clonale et d'une perte progressive, plus ou moins marquée, de l'expression du transgène dans les holoclones. Les causes de cette extinction progressive du transgène ne sont pas connues. S'agit-il d'une extinction par méthylation des LTR viraux ? Cela semble peu probable en présence d'un promoteur fort LTR/CMV. La protéine XPC subit-elle une régulation post-traductionnelle aboutissant à sa dégradation au cours des passages, en lien avec la diminution progressive du potentiel de croissance des cellules ? Ce n'est pas impossible mais nous n'avons pas observé de diminution de l'expression de la protéine XPC dans des kératinocytes WT soumis à une propagation sériée. Des analyses à plus long terme chez la souris sont nécessaires afin de mieux caractériser la stabilité de l'expression du transgène *XPC in vivo* dans un contexte où la restriction clonale et la régulation de XPC ne se dérouleront probablement pas de la même façon.

Un autre paramètre important à prendre en compte est le problème de l'immunité. La plupart des approches de transfert de gènes *in vivo* ou de greffes de cellules génétiquement manipulées *ex vivo* sont réalisées sur des souris immunodéficientes. Toutefois, la question de la réponse immunitaire éventuellement associée à ce type d'approches chez la souris immunocompétente est très importante. En effet, dans la plupart des pathologies candidates à la thérapie génique cutanée, le produit protéique du gène muté est altéré, tronqué, voire totalement absent dans les cellules des patients. La réintroduction dans ces cellules d'une protéine fonctionnelle contenant des domaines potentiellement reconnus comme non-soi est donc susceptible d'initier une

réponse immunitaire ciblée pouvant mener au rejet de la greffe. Ainsi, Ghazizadeh a montré que l'expression d'une protéine produite suite à l'infection rétrovirale *in vivo* de l'épiderme interfolliculaire d'une souris immunocompétente conduit à l'élimination des cellules infectées en 3 semaines (Ghazizadeh et al., 1999). La réimplantation de cellules génétiquement manipulées *ex vivo* peut aussi conduire à leur élimination chez la souris immunocompétente (Armelini et al., 2005), une limitation qui pourrait être contournée par neutralisation des cytokines impliquées dans le rejet des greffes (Lu and Ghazizadeh, 2007).

Si la question de la réponse immunitaire est réelle, elle est aussi imprévisible et dépend beaucoup du contexte de la maladie. Dans les trois souches de kératinocytes XP-C que nous avons étudiées, de faibles niveaux d'ARNm *XPC* ont été détectés (<10% du niveau des kératinocytes WT). Cela signifie-t-il qu'il existe dans les cellules de faibles niveaux de protéine *XPC*, non détectables par western blot ? Dans deux de ces souches (et probablement aussi dans la troisième, comme dans la majorité des cellules XP-C), la mutation touchant sur le gène *XPC* cause un décalage du cadre de lecture et la création d'un codon stop prématuré. Si des protéines sont traduites à partir des quelques copies résiduelles d'ARNm dans les cellules, elles seront tronquées au niveau de leur partie C-terminale. L'extrémité C-terminale de la protéine réintroduite par correction génétique pourrait donc être considérée comme du non-soi.

La réponse cellulaire cytotoxique dirigée contre la protéine *XPC* peut être évaluée *a priori* grâce à la technique de l'ELISpot qui permet de mesurer les réponses cellulaires spécifiques à un antigène en quantifiant la sécrétion de cytokines par les lymphocytes T. Le principe est de mettre les lymphocytes des patients XP-C en présence de monocytes (cellules présentatrices d'antigène) et de protéine *XPC* recombinante purifiée, puis de mesurer la sécrétion de cytokines comme l'IFN- γ . La présence d'anticorps circulants anti-*XPC* peut être évaluée par ELISA en fixant la protéine *XPC* recombinante au fond d'une plaque de titration puis en mesurant la quantité d'immunoglobulines humaines dirigées contre cette protéine dans le sérum des patients. Ces analyses immunologiques permettront de déterminer le risque de réaction immunitaire pour chaque patient. En cas de détection d'une réponse immunitaire, l'induction d'un état de tolérance chez les patients XP-C ne sera pas aisée car l'immunosuppression, qui favorise la carcinogénèse cutanée, n'est pas une option pour ces patients.

- *Quel protocole de greffe ?*

La greffe d'épithélium de culture est aujourd'hui une technique parfaitement maîtrisée, utilisée en routine chez l'homme pour le traitement des grands brûlés. Il n'est bien sûr pas question de régénérer l'ensemble de l'épiderme d'un patient. Dans un premier temps, l'épithélium de culture génétiquement corrigé pourrait permettre de recouvrir les sites d'exérèse des carcinomes cutanés

chez les patients XP-C. Si la prise, le maintien, et la qualité des greffons sont convaincants, des greffes de surface plus importantes pourraient être proposées aux patients XP-C dans les zones photo-exposées.

La greffe d'un équivalent de derme contenant des fibroblastes vivants puis le recouvrement de ce substrat avec un feuillet épithélial permettent d'améliorer les propriétés mécaniques (souplesse, élasticité) et cosmétiques des greffes (Coulomb et al., 1998). Sur des petites portions de peaux, cette technique pourrait apporter un avantage pour la thérapie des patients XP-C. Des équivalents de derme contenant des fibroblastes génétiquement corrigés pourraient en effet servir de substrats aux feuillets épidermiques génétiquement corrigés. Puisque les fibroblastes présentent également des anomalies à l'état stable susceptibles de favoriser la progression tumorale, cette « double correction » permettrait de réduire au maximum le risque de transformation maligne dans les greffons.

Le chemin vers la proposition d'un essai clinique de thérapie génique est encore long. De nombreuses étapes doivent être validées : les études à long terme chez la souris (pérennité d'expression du transgène, effet protecteur sur la carcinogénèse cutanée) ; la construction d'un vecteur satisfaisant tous les critères de biosécurité mentionnés au cours de cette discussion ; la mise au point de tests immunologiques pour la prédiction des réponses immunitaires (et le suivi des patients après la greffe) ; la production de lots cliniques de vecteurs rétroviraux selon les normes G.M.P. (Good manufacturing Practice) ; l'obtention des autorisations auprès de l'AFSSAPS ; l'élaboration d'un protocole clinique consensuel ; la sélection des patients sur des bases cliniques, moléculaires et immunologiques ; la définition des zones à traiter ; l'obtention du financement pour l'essai clinique. A l'heure actuelle, il est impossible de prédire si un essai clinique de thérapie génique *ex vivo* sera un jour proposé aux patients XP-C. Nos résultats constituent tout de même une étape supplémentaire vers cet objectif.

- *Autres perspectives de thérapie génique*

La chirurgie génomique, qui consiste à corriger directement le défaut génétique au niveau du génome, constitue théoriquement l'approche de thérapie génique idéale. Une approche ciblée de correction génétique des cellules XP-C grâce aux méga-endonucléases est actuellement en cours d'étude (Arnould et al., 2007; Redondo et al., 2008). Cette stratégie consiste à transfecter les cellules XP-C avec un plasmide codant pour une méga-endonucléase spécifique capable d'induire une coupure double-brin dans le gène *XPC* à proximité de la mutation. Un plasmide contenant un fragment intact du gène *XPC* est transfecté en même que la méga-endonucléase dans la cellule et sert de matrice de réparation par recombinaison homologue. Cependant, il est probable que cette

technique se heurte à un problème d'efficacité. Le taux de recombinaison dans la lignée de cellules CHO est de 10^{-3} . Dans une population de kératinocytes primaires humains, il sera probablement plus faible. Néanmoins, en considérant que l'on peut atteindre un taux de recombinaison maximal de 10^{-3} et en estimant le pourcentage de cellules souches à 1%, le taux de cellules souches efficacement corrigées par cette technique sera de 10^{-5} . Comment sélectionner ensuite ces cellules ? L'introduction d'un marqueur de sélection dans la cellule fait perdre à la technologie tout son bénéfice. Seule l'analyse clonale (à très large échelle !) pourrait permettre de purifier les cellules souches efficacement corrigées. De plus, la sécurité de cette approche est encore difficile à évaluer, notamment en ce qui concerne les risques de coupures et d'insertions « hors cible » (Pingoud and Silva, 2007). Cette technologie a le potentiel de détrôner toutes les approches classiques par transfert de gènes. Cependant, des défis techniques majeurs doivent encore être relevés avant que cette technique ne puisse effectivement être utilisée pour des essais cliniques.

I.3. Les limites de la thérapie génique cutanée *ex vivo*

Nous avons montré que la réexpression stable de la protéine XPC ne corrige pas, à court terme, toutes les anomalies accumulées pendant l'histoire de la cellule. Au-delà de la cellule elle-même, réimplanter des kératinocytes XP-C corrigés dans un contexte pathologique permettra-t-il de rétablir des échanges paracrines normaux avec les cellules à proximité du greffon (fibroblastes, mélanocytes) ou avec les cellules susceptibles de s'infiltrer dans le greffon (cellules de Langerhans) ? Si les fibroblastes XP-C présentent également de nombreuses anomalies à l'état stable, les facteurs paracrines qu'ils sécrètent risquent de provoquer une dérégulation des kératinocytes dans le greffon. Il semble donc judicieux de pouvoir réimplanter également des fibroblastes génétiquement corrigés chez le patient, même si l'on ne peut exclure que le derme soit envahi au cours du temps par des fibroblastes XP-C non corrigés. De même, le greffon ne risque-t-il pas d'être envahi par des kératinocytes en provenance des follicules pileux adjacents (non corrigés), compromettant ainsi le bénéfice de la thérapie ? Enfin, la correction génétique des kératinocytes XP-C sera-t-elle suffisante pour rétablir une réponse inflammatoire et immunitaire normale dans le greffon ? Ce n'est pas évident car les cellules de Langerhans, non corrigées, continueront à être altérées après une irradiation UV.

II. Des approches pharmacologiques ciblées pourraient également être proposées aux patients XP-C

Dans le but de diminuer ou de ralentir le développement de CC chez les patients XP-C, plusieurs approches pharmacologiques peuvent être envisagées.

- *Les rétinoïdes.*

Les rétinoïdes possèdent une activité antitumorale partielle chez les patients XP (Kraemer et al., 1988; Kraemer et al., 1992). Les mécanismes permettant d'expliquer l'effet protecteur des rétinoïdes sur la carcinogénèse cutanée sont encore mal connus. Il est probable que leur action antagoniste sur l'activité des complexes AP-1 joue un rôle majeur dans ce contexte (Schule et al., 1991). L'application d'acide rétinoïque all-trans sur la peau avant une irradiation UV permet de réduire l'activation des complexes AP-1 et l'induction de la MMP-1 (Fisher et al., 1996). Les rétinoïdes pourraient donc contribuer à diminuer l'expression du gène *MMP-1* dans les fibroblastes XP-C et participer ainsi à réduire la progression tumorale chez les patients XP-C.

- *Les molécules et les enzymes antioxydantes*

Afin de réduire le niveau de ROS, et si possible le niveau de sécrétion de la MMP-1, dans les fibroblastes XP-C, nous avons testé trois molécules antioxydantes : la N-acétylcystéine (NAC), la vitamine C et l'épigallocatechine-3-gallate (EGCG). Les résultats obtenus avec la NAC sont peu reproductibles et en fonction de la concentration utilisée, la NAC induit aussi bien une diminution qu'une augmentation de la quantité de ROS intracellulaires. La vitamine C permet une réduction efficace des ROS mais ne permet pas d'induire, dans nos conditions expérimentales, une diminution du niveau de MMP-1 sécrétée par les fibroblastes XP-C. En revanche, l'EGCG permet à la fois une réduction des ROS et une diminution de la sécrétion de MMP-1 par les fibroblastes XP-C (voir Article n°1, Supplementary data). Ces résultats sont préliminaires et doivent être reproduits. L'EGCG est le principal antioxydant contenu dans le thé vert. Ses effets sur la peau ont été largement étudiés au cours des dernières années. L'EGCG aurait un effet antioxydant et anti-inflammatoire, il stimulerait l'activité des enzymes antioxydantes et favoriserait la réparation des dommages induits par les UV dans l'ADN (pour revue voir : (Nichols and Katiyar)). L'administration orale d'extraits de thé vert semble réduire la carcinogénèse cutanée photo-induite chez la souris en termes d'incidence et de croissance tumorales (Mantena et al., 2005; Meeran et al., 2009; Wang et al., 1992). Il y a peu de chance de protéger les patients XP du cancer en leur faisant boire du thé vert, mais l'application topique de polyphénols comme l'EGCG pourrait avoir un effet bénéfique à la fois sur l'épiderme et le derme.

Pour combler le déficit en catalase dans les cellules XP-C, un traitement par application topique de l'enzyme avait été suggéré mais n'a jamais donné lieu à une étude connue. Un cas isolé de diminution très importante du nombre des tumeurs cutanées grâce à l'utilisation topique de la pseudo-catalase (enzyme de synthèse, quinze fois plus active que la catalase) a été publié et reste à confirmer par une étude plus large (Schallreuter, 1999).

D'autre part, si une déficience en enzyme ALDH1A1 peut être démontrée dans les kératocytes de la cornée, il pourrait être intéressant de trouver des molécules pharmacologiques permettant de stimuler cette enzyme pour améliorer la détoxification des ROS dans l'œil et limiter le développement de cataractes.

- *Les analogues de α -MSH*

α -MSH stimule l'activité de la NER dans les mélanocytes (Bohm et al., 2005) et les protège également contre les dommages oxydatifs en stimulant l'activité des enzymes antioxydantes comme la catalase (Song et al., 2009). α -MSH est une hormone produite par les kératinocytes à partir du précurseur POMC. La diminution du niveau d'ARNm de *POMC* dans les kératinocytes XP-C pourrait donc avoir des conséquences importantes sur la capacité de réparation des mélanocytes après un stress UV. L'utilisation d'analogues de l'hormone α -MSH pourrait donc protéger les mélanocytes contre les dommages UV-induits (Abdel-Malek et al., 2009) et contribuer ainsi à réduire le développement de mélanomes chez les patients XP-C.

D. Conclusion

Nous avons mis en évidence, dans les fibroblastes et les kératinocytes XP-C, des anomalies qui suggèrent un déséquilibre cellulaire, vraisemblablement en lien avec une dérégulation de la mitochondrie. Le rôle exact de la protéine XPC (ou plutôt de son absence) dans la mise en place de ces événements reste encore à déterminer. Au-delà de son rôle dans la NER, la protéine XPC participe-t-elle à la maintenance du génome mitochondrial (et nucléaire) en stimulant l'activité de la BER ? La protéine XPC et toute la machinerie de la NER ont-ils un rôle plus important qu'on ne leur prête actuellement dans la prise en charge des dommages oxydatifs dans la cellule ? La création d'une souche de kératinocytes déficients en protéine XPC, grâce aux vecteurs shRNA que nous avons construits, constituera un système de choix pour la caractérisation du rôle de la protéine XPC dans la cellule à l'état stable. Grâce à la stratégie de sélection CD24, les kératinocytes « XP-C like » pourront être étudiés à long terme *in vitro* et *in vivo*. De plus, cette stratégie peut également appliquée aux fibroblastes, ce qui peut être utile pour la compréhension des mécanismes menant à la formation des invasions kératinocytaires en présence de fibroblastes XP-C dans les équivalents de derme des peaux reconstruites. Par exemple, l'extinction stable de l'expression du gène *XPC* dans des fibroblastes contrôle suffit-elle à induire ces invaginations ? La caractérisation globale (transcriptome et/ou protéome) des fibroblastes XP-C (et des fibroblastes « XP-C like ») permettra de mieux comprendre leur rôle dans la prédisposition des patients XP-C aux cancers cutanés.

Nos résultats ouvrent également de nouvelles perspectives pour la proposition de traitements pharmacologiques aux patients XP-C. Des approches ciblées au niveau des fibroblastes et peut-être des cellules épithéliales de la cornée pourraient bénéficier aux patients XP-C. Dans le cadre du développement d'une approche de thérapie génique cutanée *ex vivo*, nous avons montré pour la première fois qu'il est possible de régénérer *in vitro* et *in vivo* de la peau XP-C génétiquement corrigée capable de réparer les lésions induites par les UV aussi efficacement qu'une peau normale. Ces résultats sont très encourageants. Le récent succès d'une approche similaire de thérapie génique chez un patient atteint d'épidermolyse bulleuse jonctionnelle motive la poursuite de ce projet. Une amélioration des vecteurs de transfert de gènes sera sans doute nécessaire pour augmenter l'efficacité à long terme et la biosécurité de l'approche mais il est réaliste de penser qu'un jour une greffe de peau génétiquement corrigée pourrait être proposée aux patients XP-C.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdel-Malek, Z.A., A. Ruwe, R. Kavanagh-Starner, A.L. Kadekaro, V. Swope, C. Haskell-Luevano, L. Koikov, and J.J. Knittel. 2009. alpha-MSH tripeptide analogs activate the melanocortin 1 receptor and reduce UV-induced DNA damage in human melanocytes. *Pigment Cell Melanoma Res.* 22:635-44.
- Adachi, M., A. Gazel, G. Pintucci, A. Shuck, S. Shifteh, D. Ginsburg, L.S. Rao, T. Kaneko, I.M. Freedberg, K. Tamaki, and M. Blumenberg. 2003. Specificity in stress response: epidermal keratinocytes exhibit specialized UV-responsive signal transduction pathways. *DNA Cell Biol.* 22:665-77.
- Adimoolam, S., and J.M. Ford. 2002. p53 and DNA damage-inducible expression of the xeroderma pigmentosum group C gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:12985-90.
- Agar, N.S., G.M. Halliday, R.S. Barnetson, H.N. Ananthaswamy, M. Wheeler, and A.M. Jones. 2004. The basal layer in human squamous tumors harbors more UVA than UVB fingerprint mutations: a role for UVA in human skin carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:4954-9.
- Agrawal, K., A.J. Veliath, S. Mishra, and K.N. Panda. 1992. Xeroderma pigmentosum: resurfacing versus dermabrasion. *Br J Plast Surg.* 45:311-4.
- Aiuti, A., A.C. Bachoud-Levi, A. Blesch, M.K. Brenner, F. Cattaneo, E.A. Chiocca, G. Gao, K.A. High, A.M. Leen, N.R. Lemoine, I.A. McNeish, G. Meneguzzi, M. Peschanski, M.G. Roncarolo, D.S. Strayer, M.H. Tuszynski, D.J. Waxman, and J.M. Wilson. 2007. Progress and prospects: gene therapy clinical trials (part 2). *Gene Ther.* 14:1555-63.
- Aiuti, A., S. Slavin, M. Aker, F. Ficara, S. Deola, A. Mortellaro, S. Morecki, G. Andolfi, A. Tabucchi, F. Carlucci, E. Marinello, F. Cattaneo, S. Vai, P. Servida, R. Miniero, M.G. Roncarolo, and C. Bordignon. 2002. Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science.* 296:2410-3.
- Alam, M., and D. Ratner. 2001. Cutaneous squamous-cell carcinoma. *N Engl J Med.* 344:975-83.
- Aleman, R., C. Balague, and D.T. Curiel. 2000. Replicative adenoviruses for cancer therapy. *Nat Biotechnol.* 18:723-7.
- Alexander, B.L., R.R. Ali, E.W. Alton, J.W. Bainbridge, S. Braun, S.H. Cheng, T.R. Flotte, H.B. Gaspar, M. Grez, U. Griesenbach, M.G. Kaplitt, M.G. Ott, R. Seger, M. Simons, A.J. Thrasher, A.Z. Thrasher, and S. Yla-Herttuala. 2007. Progress and prospects: gene therapy clinical trials (part 1). *Gene Ther.* 14:1439-47.
- Ali, R.S., A. Falconer, M. Ikram, C.E. Bissett, R. Cerio, and A.G. Quinn. 2001. Expression of the peptide antibiotics human beta defensin-1 and human beta defensin-2 in normal human skin. *J Invest Dermatol.* 117:106-11.
- Allen, L.F., R.J. Lefkowitz, M.G. Caron, and S. Cotecchia. 1991. G-protein-coupled receptor genes as protooncogenes: constitutively activating mutation of the alpha 1B-adrenergic receptor enhances mitogenesis and tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:11354-8.
- Ananthaswamy, H.N., A. Ouhtit, R.L. Evans, A. Gorny, P. Khaskina, A.T. Sands, and C.J. Conti. 1999. Persistence of p53 mutations and resistance of keratinocytes to apoptosis are associated with the increased susceptibility of mice lacking the XPC gene to UV carcinogenesis. *Oncogene.* 18:7395-8.
- Andressoo, J.O., G. Weeda, J. de Wit, J.R. Mitchell, R.B. Beems, H. van Steeg, G.T. van der Horst, and J.H. Hoeijmakers. 2009. An Xpb mouse model for combined xeroderma pigmentosum and cockayne syndrome reveals progeroid features upon further attenuation of DNA repair. *Mol Cell Biol.* 29:1276-90.
- Angel, P., A. Szabowski, and M. Schorpp-Kistner. 2001. Function and regulation of AP-1 subunits in skin physiology and pathology. *Oncogene.* 20:2413-23.
- Anson, D.S. 2004. The use of retroviral vectors for gene therapy-what are the risks? A review of retroviral pathogenesis and its relevance to retroviral vector-mediated gene delivery. *Genet Vaccines Ther.* 2:9.
- Ansorge, S., S. Lanthier, J. Transfiguracion, Y. Durocher, O. Henry, and A. Kamen. 2009. Development of a scalable process for high-yield lentiviral vector production by transient transfection of HEK293 suspension cultures. *J Gene Med.* 11:868-76.

- Anttinen, A., L. Koulu, E. Nikoskelainen, R. Portin, T. Kurki, M. Erkinjuntti, N.G. Jaspers, A. Raams, M.H. Green, A.R. Lehmann, J.F. Wing, C.F. Arlett, and R.J. Marttila. 2008. Neurological symptoms and natural course of xeroderma pigmentosum. *Brain*. 131:1979-89.
- Araki, M., C. Masutani, M. Takemura, A. Uchida, K. Sugawara, J. Kondoh, Y. Ohkuma, and F. Hanaoka. 2001. Centrosome protein centrin 2/caltractin 1 is part of the xeroderma pigmentosum group C complex that initiates global genome nucleotide excision repair. *J Biol Chem*. 276:18665-72.
- Araujo, S.J., E.A. Nigg, and R.D. Wood. 2001. Strong functional interactions of TFIIH with XPC and XPG in human DNA nucleotide excision repair, without a preassembled repairosome. *Mol Cell Biol*. 21:2281-91.
- Araujo, S.J., F. Tirode, F. Coin, H. Pospiech, J.E. Syvaaja, M. Stucki, U. Hubscher, J.M. Egly, and R.D. Wood. 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 Dev*. 14:349-59.
- Armellini, M.G., A.R. Muotri, M.C. Marchetto, K.M. de Lima-Bessa, A. Sarasin, and C.F. Menck. 2005. Restoring DNA repair capacity of cells from three distinct diseases by XPD gene-recombinant adenovirus. *Cancer Gene Ther*. 12:389-96.
- Armstrong, J.D., and B.A. Kunz. 1990. Site and strand specificity of UVB mutagenesis in the SUP4-o gene of yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87:9005-9.
- Arnaudeau, C., F. Brellier, O. Chevallier-Lagente, J.H. Hoeijmakers, F. Bernerd, A. Sarasin, and T. Magnaldo. 2003. Genetic correction of DNA repair deficient/cancer prone xeroderma pigmentosum group C keratinocytes. *Hum Gene Ther*, submitted.
- Arnould, S., C. Perez, J.P. Cabaniols, J. Smith, A. Gouble, S. Grizot, J.C. Epinat, A. Duclert, P. Duchateau, and F. Paques. 2007. Engineered I-CreI derivatives cleaving sequences from the human XPC gene can induce highly efficient gene correction in mammalian cells. *J Mol Biol*. 371:49-65.
- Asahina, H., I. Kuraoka, M. Shirakawa, E.H. Morita, N. Miura, I. Miyamoto, E. Ohtsuka, Y. Okada, and K. Tanaka. 1994. The XPA protein is a zinc metalloprotein with an ability to recognize various kinds of DNA damage. *Mutat Res*. 315:229-37.
- Ashall, G., A.A. Quaba, and M.E. Hackett. 1987. Facial resurfacing in xeroderma pigmentosum: are we spoiling the ship for a ha'p'orth of tar? *Br J Plast Surg*. 40:610-3.
- Assefa, Z., M. Garmyn, R. Bouillon, W. Merlevede, J.R. Vandenheede, and P. Agostinis. 1997. Differential stimulation of ERK and JNK activities by ultraviolet B irradiation and epidermal growth factor in human keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 108:886-91.
- Asselineau, D., B.A. Bernard, C. Bailly, M. Darmon, and M. Prunieras. 1986. Human epidermis reconstructed by culture: is it "normal"? *J Invest Dermatol*. 86:181-6.
- Atabay, K., C. Celebi, S. Cenetoglu, N.K. Baran, and Z. Kiyamaz. 1991. Facial resurfacing in xeroderma pigmentosum with monoblock full-thickness skin graft. *Plast Reconstr Surg*. 87:1121-5.
- Avril, M.F., A. Auperin, A. Margulis, A. Gerbaulet, P. Duvillard, E. Benhamou, J.C. Guillaume, R. Chalon, J.Y. Petit, H. Sancho-Garnier, M. Prade, J. Bouzy, and D. Chassagne. 1997. Basal cell carcinoma of the face: surgery or radiotherapy? Results of a randomized study. *Br J Cancer*. 76:100-6.
- Backendorf, C., J. de Wit, M. van Oosten, G.J. Stout, J.R. Mitchell, A.M. Borgstein, G.T. van der Horst, F.R. de Gruijl, J. Brouwer, L.H. Mullenders, and J.H. Hoeijmakers. 2005. Repair characteristics and differentiation propensity of long-term cultures of epidermal keratinocytes derived from normal and NER-deficient mice. *DNA Repair (Amst)*. 4:1325-36.
- Baek, S.C., Q. Lin, P.B. Robbins, H. Fan, and P.A. Khavari. 2001. Sustainable systemic delivery via a single injection of lentivirus into human skin tissue. *Hum Gene Ther*. 12:1551-8.
- Balabanian, K., B. Lagane, S. Infantino, K.Y. Chow, J. Harriague, B. Moepps, F. Arenzana-Seisdedos, M. Thelen, and F. Bachelier. 2005. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem*. 280:35760-6.

- Barrandon, Y., and H. Green. 1987. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84:2302-6.
- Batista, L.F., B. Kaina, R. Meneghini, and C.F. Menck. 2009. How DNA lesions are turned into powerful killing structures: insights from UV-induced apoptosis. *Mutat Res.* 681:197-208.
- Batty, D., V. Rasic-Otrin, A.S. Levine, and R.D. Wood. 2000. Stable binding of human XPC complex to irradiated DNA confers strong discrimination for damaged sites. *J Mol Biol.* 300:275-90.
- Baumann, P., N. Cremers, F. Kroese, G. Orend, R. Chiquet-Ehrismann, T. Uede, H. Yagita, and J.P. Sleeman. 2005. CD24 expression causes the acquisition of multiple cellular properties associated with tumor growth and metastasis. *Cancer Res.* 65:10783-93.
- Bell, E., H.P. Ehrlich, D.J. Buttle, and T. Nakatsuji. 1981. Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. *Science.* 211:1052-4.
- Berg, R.J., H.J. Ruven, A.T. Sands, F.R. de Gruijl, and L.H. Mullenders. 1998. Defective global genome repair in XPC mice is associated with skin cancer susceptibility but not with sensitivity to UVB induced erythema and edema. *J Invest Dermatol.* 110:405-9.
- Bergoglio, V., F. Larcher, O. Chevallier-Lagente, A. Bernheim, O. Danos, A. Sarasin, M.D. Rio, and T. Magnaldo. 2007. Safe selection of genetically manipulated human primary keratinocytes with very high growth potential using CD24. *Mol Ther.* 15:2186-93.
- Bernard, B.A. 2006. [The life of human hair follicle revealed]. *Med Sci (Paris).* 22:138-43.
- Bernardes de Jesus, B.M., M. Bjoras, F. Coin, and J.M. Egly. 2008. Dissection of the molecular defects caused by pathogenic mutations in the DNA repair factor XPC. *Mol Cell Biol.* 28:7225-35.
- Berneburg, M., Y. Kamenisch, and J. Krutmann. 2006. Repair of mitochondrial DNA in aging and carcinogenesis. *Photochem Photobiol Sci.* 5:190-8.
- Berneburg, M., H. Plettenberg, and J. Krutmann. 2000. Photoaging of human skin. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 16:239-44.
- Bernerd, F., and D. Asselineau. 1997. Successive alteration and recovery of epidermal differentiation and morphogenesis after specific UVB-damages in skin reconstructed in vitro. *Dev Biol.* 183:123-38.
- Bernerd, F., and D. Asselineau. 1998. UVA exposure of human skin reconstructed in vitro induces apoptosis of dermal fibroblasts: subsequent connective tissue repair and implications in photoaging. *Cell Death Differ.* 5:792-802.
- Bernerd, F., D. Asselineau, M. Frechet, A. Sarasin, and T. Magnaldo. 2005. Reconstruction of DNA repair-deficient xeroderma pigmentosum skin in vitro: a model to study hypersensitivity to UV light. *Photochem Photobiol.* 81:19-24.
- Bernerd, F., D. Asselineau, C. Vioux, O. Chevallier-Lagente, B. Bouadjar, A. Sarasin, and T. Magnaldo. 2001. Clues to epidermal cancer proneness revealed by reconstruction of DNA repair-deficient xeroderma pigmentosum skin in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:7817-7822.
- Bernstein, C., H. Bernstein, C.M. Payne, and H. Garewal. 2002. DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. *Mutat Res.* 511:145-78.
- Besaratinia, A., S.I. Kim, and G.P. Pfeifer. 2008. Rapid repair of UVA-induced oxidized purines and persistence of UVB-induced dipyrimidine lesions determine the mutagenicity of sunlight in mouse cells. *FASEB J.* 22:2379-92.
- Bhowmick, N.A., E.G. Neilson, and H.L. Moses. 2004. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature.* 432:332-7.
- Blanpain, C., and E. Fuchs. 2009. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10:207-17.
- Blanpain, C., W.E. Lowry, A. Geoghegan, L. Polak, and E. Fuchs. 2004. Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell.* 118:635-48.
- Bohm, M., I. Wolff, T.E. Scholzen, S.J. Robinson, E. Healy, T.A. Luger, T. Schwarz, and A. Schwarz. 2005. alpha-Melanocyte-stimulating hormone protects from ultraviolet radiation-induced apoptosis and DNA damage. *J Biol Chem.* 280:5795-802.

- Bohr, V.A., C.A. Smith, D.S. Okumoto, and P.C. Hanawalt. 1985. DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. *Cell*. 40:359-69.
- Bolshakov, S., C.M. Walker, S.S. Strom, M.S. Selvan, G.L. Clayman, A. El-Naggar, S.M. Lippman, M.L. Kripke, and H.N. Ananthaswamy. 2003. p53 mutations in human aggressive and nonaggressive basal and squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res*. 9:228-34.
- Bonifas, J.M., A.L. Rothman, and E.H. Epstein, Jr. 1991. Epidermolysis bullosa simplex: evidence in two families for keratin gene abnormalities. *Science*. 254:1202-5.
- Boulais, N., and L. Misery. 2007. Merkel cells. *J Am Acad Dermatol*. 57:147-65.
- Brash, D.E., J.A. Rudolph, J.A. Simon, A. Lin, G.J. McKenna, H.P. Baden, A.J. Halperin, and J. Ponten. 1991. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88:10124-8.
- Brash, D.E., S. Seetharam, K.H. Kraemer, M.M. Seidman, and A. Bredberg. 1987. Photoproduct frequency is not the major determinant of UV base substitution hot spots or cold spots in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84:3782-6.
- Brash, D.E., A. Ziegler, A.S. Jonason, J.A. Simon, S. Kunala, and D.J. Leffell. 1996. Sunlight and sunburn in human skin cancer: p53, apoptosis, and tumor promotion. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 1:136-42.
- Braun-Falco, M., A. Doenecke, H. Smola, and M. Hallek. 1999. Efficient gene transfer into human keratinocytes with recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene Ther*. 6:432-41.
- Bregeon, D., P.A. Peignon, and A. Sarasin. 2009. Transcriptional mutagenesis induced by 8-oxoguanine in mammalian cells. *PLoS Genet*. 5:e1000577.
- Brenneisen, P., H. Sies, and K. Scharffetter-Kochanek. 2002. Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events. *Ann N Y Acad Sci*. 973:31-43.
- Brenner, M., and V.J. Hearing. 2008. The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochem Photobiol*. 84:539-49.
- Bukrinsky, M.I., N. Sharova, M.P. Dempsey, T.L. Stanwick, A.G. Bukrinskaya, S. Haggerty, and M. Stevenson. 1992. Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89:6580-4.
- Bunick, C.G., M.R. Miller, B.E. Fuller, E. Fanning, and W.J. Chazin. 2006. Biochemical and structural domain analysis of xeroderma pigmentosum complementation group C protein. *Biochemistry*. 45:14965-79.
- Burgeson, R.E., and A.M. Christiano. 1997. The dermal-epidermal junction. *Curr Opin Cell Biol*. 9:651-8.
- Burns, J.C., T. Friedmann, W. Driever, M. Burrascano, and J.K. Yee. 1993. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:8033-7.
- Cadet, J., T. Delatour, T. Douki, D. Gasparutto, J.P. Pouget, J.L. Ravanat, and S. Sauvaigo. 1999. Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat Res*. 424:9-21.
- Camenisch, U., R. Dip, S.B. Schumacher, B. Schuler, and H. Naegeli. 2006. Recognition of helical kinks by xeroderma pigmentosum group A protein triggers DNA excision repair. *Nat Struct Mol Biol*. 13:278-84.
- Camenisch, U., D. Trautlein, F.C. Clement, J. Fei, A. Leitenstorfer, E. Ferrando-May, and H. Naegeli. 2009. Two-stage dynamic DNA quality check by xeroderma pigmentosum group C protein. *EMBO J*. 28:2387-99.
- Campbell, C., A.G. Quinn, B. Angus, P.M. Farr, and J.L. Rees. 1993. Wavelength specific patterns of p53 induction in human skin following exposure to UV radiation. *Cancer Res*. 53:2697-9.
- Candi, E., R. Schmidt, and G. Melino. 2005. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6:328-40.

- Carreau, M., X. Quilliet, E. Eveno, A. Salvetti, O. Danos, J.M. Heard, M. Mezzina, and A. Sarasin. 1995. Functional retroviral vector for gene therapy of xeroderma pigmentosum group D patients. *Hum Gene Ther.* 6:1307-15.
- Carretero, M., M.J. Escamez, F. Prada, I. Mirones, M. Garcia, A. Holguin, B. Duarte, O. Podhajcer, J.L. Jorcano, F. Larcher, and M. Del Rio. 2006. Skin gene therapy for acquired and inherited disorders. *Histol Histopathol.* 21:1233-47.
- Carucci, J.A. 2004. Cutaneous oncology in organ transplant recipients: meeting the challenge of squamous cell carcinoma. *J Invest Dermatol.* 123:809-16.
- Cavazzana-Calvo, M., L. Dal-Cortivo, I. Andre-Schmutz, S. Hacein-Bey Abina, and A. Fischer. 2007. [Cell therapy for inherited diseases of the hematopoietic system.]. *C R Biol.* 330:538-42.
- Cavazzana-Calvo, M., S. Hacein-Bey, G. de Saint Basile, F. Gross, E. Yvon, P. Nusbaum, F. Selz, C. Hue, S. Certain, J.L. Casanova, P. Bousso, F.L. Deist, and A. Fischer. 2000. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science.* 288:669-72.
- Cavazzana-Calvo, M., C. Lagresle, S. Hacein-Bey-Abina, and A. Fischer. 2005. Gene therapy for severe combined immunodeficiency. *Annu Rev Med.* 56:585-602.
- Chakraborti, S., M. Mandal, S. Das, A. Mandal, and T. Chakraborti. 2003. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem.* 253:269-85.
- Challita, P.M., and D.B. Kohn. 1994. Lack of expression from a retroviral vector after transduction of murine hematopoietic stem cells is associated with methylation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:2567-71.
- Chang, L., and M. Karin. 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature.* 410:37-40.
- Chao, H., S.G. Mansfield, R.C. Bartel, S. Hiriyanna, L.G. Mitchell, M.A. Garcia-Blanco, and C.E. Walsh. 2003. Phenotype correction of hemophilia A mice by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Nat Med.* 9:1015-9.
- Charbonnier, J.B., E. Renaud, S. Miron, M.H. Le Du, Y. Blouquit, P. Duchambon, P. Christova, A. Shosheva, T. Rose, J.F. Angulo, and C.T. Craescu. 2007. Structural, thermodynamic, and cellular characterization of human centrin 2 interaction with xeroderma pigmentosum group C protein. *J Mol Biol.* 373:1032-46.
- Chavanne, F., B.C. Broughton, D. Pietra, T. Nardo, A. Browitt, A.R. Lehmann, and M. Stefanini. 2000. Mutations in the XPC gene in families with xeroderma pigmentosum and consequences at the cell, protein, and transcript levels. *Cancer Res.* 60:1974-82.
- Chen, B.F., L.H. Hwang, and D.S. Chen. 1993. Characterization of a bicistronic retroviral vector composed of the swine vesicular disease virus internal ribosome entry site. *J Virol.* 67:2142-8.
- Chen, J.H., C.N. Hales, and S.E. Ozanne. 2007. DNA damage, cellular senescence and organismal ageing: causal or correlative? *Nucleic Acids Res.* 35:7417-28.
- Chen, M., N. Kasahara, D.R. Keene, L. Chan, W.K. Hoeffler, D. Finlay, M. Barcova, P.M. Cannon, C. Mazurek, and D.T. Woodley. 2002. Restoration of type VII collagen expression and function in dystrophic epidermolysis bullosa. *Nat Genet.* 32:670-5.
- Chen, V.L., R. Fleischmajer, E. Schwartz, M. Palaia, and R. Timpl. 1986. Immunohistochemistry of elastotic material in sun-damaged skin. *J Invest Dermatol.* 87:334-7.
- Cheo, D.L., D.K. Burns, L.B. Meira, J.F. Houle, and E.C. Friedberg. 1999. Mutational inactivation of the xeroderma pigmentosum group C gene confers predisposition to 2-acetylaminofluorene-induced liver and lung cancer and to spontaneous testicular cancer in Trp53^{-/-} mice. *Cancer Res.* 59:771-5.
- Cheo, D.L., L.B. Meira, D.K. Burns, A.M. Reis, T. Issac, and E.C. Friedberg. 2000. Ultraviolet B radiation-induced skin cancer in mice defective in the Xpc, Trp53, and Apex (HAP1) genes: genotype-specific effects on cancer predisposition and pathology of tumors. *Cancer Res.* 60:1580-4.
- Cheo, D.L., H.J. Ruven, L.B. Meira, R.E. Hammer, D.K. Burns, N.J. Tappe, A.A. van Zeeland, L.H. Mullenders, and E.C. Friedberg. 1997. Characterization of defective nucleotide excision repair in XPC mutant mice. *Mutat Res.* 374:1-9.

- Chipuk, J.E., T. Kuwana, L. Bouchier-Hayes, N.M. Droin, D.D. Newmeyer, M. Schuler, and D.R. Green. 2004. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science*. 303:1010-4.
- Choate, K.A., and P.A. Khavari. 1997. Sustainability of keratinocyte gene transfer and cell survival in vivo. *Hum Gene Ther*. 8:895-901.
- Choate, K.A., T.M. Kinsella, M.L. Williams, G.P. Nolan, and P.A. Khavari. 1996a. Transglutaminase 1 delivery to lamellar ichthyosis keratinocytes. *Hum Gene Ther*. 7:2247-53.
- Choate, K.A., D.A. Medalie, J.R. Morgan, and P.A. Khavari. 1996b. Corrective gene transfer in the human skin disorder lamellar ichthyosis. *Nat Med*. 2:1263-7.
- Chouinard, N., K. Valerie, M. Rouabhia, and J. Huot. 2002. UVB-mediated activation of p38 mitogen-activated protein kinase enhances resistance of normal human keratinocytes to apoptosis by stabilizing cytoplasmic p53. *Biochem J*. 365:133-45.
- Chu, C.Y., S.T. Cha, C.C. Chang, C.H. Hsiao, C.T. Tan, Y.C. Lu, S.H. Jee, and M.L. Kuo. 2007. Involvement of matrix metalloproteinase-13 in stromal-cell-derived factor 1 alpha-directed invasion of human basal cell carcinoma cells. *Oncogene*. 26:2491-501.
- Chu, G., and E. Chang. 1988. Xeroderma pigmentosum group E cells lack a nuclear factor that binds to damaged DNA. *Science*. 242:564-7.
- Cimprich, K.A., and D. Cortez. 2008. ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9:616-27.
- Citterio, E., S. Rademakers, G.T. van der Horst, A.J. van Gool, J.H. Hoeijmakers, and W. Vermeulen. 1998. Biochemical and biological characterization of wild-type and ATPase-deficient Cockayne syndrome B repair protein. *J Biol Chem*. 273:11844-51.
- Clarkson, S.G. 2003. The XPG story. *Biochimie*. 85:1113-21.
- Claudinet, S., M. Nicolas, H. Oshima, A. Rochat, and Y. Barrandon. 2005. Long-term renewal of hair follicles from clonogenic multipotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:14677-82.
- Clayton, D.A., J.N. Doda, and E.C. Friedberg. 1974. The absence of a pyrimidine dimer repair mechanism in mammalian mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 71:2777-81.
- Clayton, E., D.P. Doupe, A.M. Klein, D.J. Winton, B.D. Simons, and P.H. Jones. 2007. A single type of progenitor cell maintains normal epidermis. *Nature*. 446:185-9.
- Cleaver, J.E. 1968. Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum. *Nature*. 218:652-6.
- Cleaver, J.E., E.T. Lam, and I. Revet. 2009. Disorders of nucleotide excision repair: the genetic and molecular basis of heterogeneity. *Nat Rev Genet*. 10:756-68.
- Coffin, J.M. 1996. Retroviridae : the viruses and their replication. In *Fundamental Virology - Third Edition*. B.N. Fields, P.M. Knipe, and P.M. Howley, editors. Lippincott - Raven, Philadelphia.
- Coin, F., J.C. Marinoni, C. Rodolfo, S. Fribourg, A.M. Pedrini, and J.M. Egly. 1998. Mutations in the XPD helicase gene result in XP and TTD phenotypes, preventing interaction between XPD and the p44 subunit of TFIIH. *Nat Genet*. 20:184-8.
- Coin, F., V. Oksenysh, and J.M. Egly. 2007. Distinct roles for the XPB/p52 and XPD/p44 subcomplexes of TFIIH in damaged DNA opening during nucleotide excision repair. *Mol Cell*. 26:245-56.
- Coin, F., V. Oksenysh, V. Mocquet, S. Groh, C. Blattner, and J.M. Egly. 2008. Nucleotide excision repair driven by the dissociation of CAK from TFIIH. *Mol Cell*. 31:9-20.
- Colella, S., T. Nardo, D. Mallery, C. Borrone, R. Ricci, G. Ruffa, A.R. Lehmann, and M. Stefanini. 1999. Alterations in the CSB gene in three Italian patients with the severe form of Cockayne syndrome (CS) but without clinical photosensitivity. *Hum Mol Genet*. 8:935-41.
- Compton, C.C., K.B. Nadire, S. Regauer, M. Simon, G. Warland, N.E. O'Connor, G.G. Gallico, and D.B. Landry. 1998. Cultured human sole-derived keratinocyte grafts re-express site-specific differentiation after transplantation. *Differentiation*. 64:45-53.
- Cortez, D., S. Guntuku, J. Qin, and S.J. Elledge. 2001. ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science*. 294:1713-6.

- Cotsarelis, G., T.T. Sun, and R.M. Lavker. 1990. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell*. 61:1329-37.
- Coulomb, B., L. Friteau, J. Baruch, J. Guilbaud, B. Chretien-Marquet, J. Glicenstein, C. Lebreton-Decoster, E. Bell, and L. Dubertret. 1998. Advantage of the presence of living dermal fibroblasts within in vitro reconstructed skin for grafting in humans. *Plast Reconstr Surg*. 101:1891-903.
- Coulombe, P.A., M.E. Hutton, A. Letai, A. Hebert, A.S. Paller, and E. Fuchs. 1991. Point mutations in human keratin 14 genes of epidermolysis bullosa simplex patients: genetic and functional analyses. *Cell*. 66:1301-11.
- Coura Rdos, S., and N.B. Nardi. 2007. The state of the art of adeno-associated virus-based vectors in gene therapy. *Virology*. 4:99.
- Courdavault, S., C. Baudouin, M. Charveron, A. Favier, J. Cadet, and T. Douki. 2004. Larger yield of cyclobutane dimers than 8-oxo-7,8-dihydroguanine in the DNA of UVA-irradiated human skin cells. *Mutat Res*. 556:135-42.
- Crowson, A.N. 2006. Basal cell carcinoma: biology, morphology and clinical implications. *Mod Pathol*. 19 Suppl 2:S127-47.
- Curran, S., and G.I. Murray. 1999. Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol*. 189:300-8.
- D'Armiento, J., T. DiColandrea, S.S. Dalal, Y. Okada, M.T. Huang, A.H. Conney, and K. Chada. 1995. Collagenase expression in transgenic mouse skin causes hyperkeratosis and acanthosis and increases susceptibility to tumorigenesis. *Mol Cell Biol*. 15:5732-9.
- D'Errico, M., E. Parlanti, M. Teson, B.M. de Jesus, P. Degan, A. Calcagnile, P. Jaruga, M. Bjoras, M. Crescenzi, A.M. Pedrini, J.M. Egly, G. Zambruno, M. Stefanini, M. Dizdaroglu, and E. Dogliotti. 2006. New functions of XPC in the protection of human skin cells from oxidative damage. *EMBO J*. 25:4305-15.
- Dahmane, N., J. Lee, P. Robins, P. Heller, and A. Ruiz i Altaba. 1997. Activation of the transcription factor Gli1 and the Sonic hedgehog signalling pathway in skin tumours. *Nature*. 389:876-81.
- Danos, O., and R.C. Mulligan. 1988. Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ecotropic host ranges. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85:6460-4.
- Dave, U.P., N.A. Jenkins, and N.G. Copeland. 2004. Gene therapy insertional mutagenesis insights. *Science*. 303:333.
- Davis, B.E., H.K. Koh, T.E. Rohrer, E. Gonzalez, and J.E. Cleaver. 1994. Sunlight avoidance and cancer prevention in xeroderma pigmentosum. *Arch Dermatol*. 130:806-8.
- Daya-Grosjean, L., and A. Sarasin. 2005. The role of UV induced lesions in skin carcinogenesis: an overview of oncogene and tumor suppressor gene modifications in xeroderma pigmentosum skin tumors. *Mutat Res*. 571:43-56.
- de Boer, J., I. Donker, J. de Wit, J.H. Hoeijmakers, and G. Weeda. 1998. Disruption of the mouse xeroderma pigmentosum group D DNA repair/basal transcription gene results in preimplantation lethality. *Cancer Res*. 58:89-94.
- de Laat, W.L., N.G. Jaspers, and J.H. Hoeijmakers. 1999. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev*. 13:768-85.
- de Souza-Pinto, N.C., L. Eide, B.A. Hogue, T. Thybo, T. Stevnsner, E. Seeberg, A. Klungland, and V.A. Bohr. 2001. Repair of 8-oxodeoxyguanosine lesions in mitochondrial dna depends on the oxoguanine dna glycosylase (OGG1) gene and 8-oxoguanine accumulates in the mitochondrial dna of OGG1-defective mice. *Cancer Res*. 61:5378-81.
- Del Bino, S., J. Sok, E. Bessac, and F. Bernerd. 2006. Relationship between skin response to ultraviolet exposure and skin color type. *Pigment Cell Res*. 19:606-14.
- Del Rio, M., F. Larcher, F. Serrano, A. Meana, M. Munoz, M. Garcia, E. Munoz, C. Martin, A. Bernad, and J.L. Jorcano. 2002. A preclinical model for the analysis of genetically modified human skin in vivo. *Hum Gene Ther*. 13:959-68.

- Dellambra, E., S. Prislei, A.L. Salvati, M.L. Madeddu, O. Golisano, E. Siviero, S. Bondanza, S. Cicuzza, A. Orecchia, F.G. Giancotti, G. Zambruno, and M. De Luca. 2001. Gene correction of integrin beta4-dependent pyloric atresia-junctional epidermolysis bullosa keratinocytes establishes a role for beta4 tyrosines 1422 and 1440 in hemidesmosome assembly. *J Biol Chem.* 276:41336-42.
- Dellambra, E., J. Vailly, G. Pellegrini, S. Bondanza, O. Golisano, C. Macchia, G. Zambruno, G. Meneguzzi, and M. De Luca. 1998. Corrective transduction of human epidermal stem cells in laminin-5- dependent junctional epidermolysis bullosa. *Hum Gene Ther.* 9:1359-70.
- Demarchez, M., D.J. Hartmann, M. Regnier, and D. Asselineau. 1992. The role of fibroblasts in dermal vascularization and remodeling of reconstructed human skin after transplantation onto the nude mouse. *Transplantation.* 54:317-26.
- Deng, H., Q. Lin, and P.A. Khavari. 1997. Sustainable cutaneous gene delivery. *Nat Biotechnol.* 15:1388-91.
- DePinho, R.A. 2000. The age of cancer. *Nature.* 408:248-54.
- Devary, Y., R.A. Gottlieb, T. Smeal, and M. Karin. 1992. The mammalian ultraviolet response is triggered by activation of Src tyrosine kinases. *Cell.* 71:1081-91.
- Devary, Y., C. Rosette, J.A. DiDonato, and M. Karin. 1993. NF-kappa B activation by ultraviolet light not dependent on a nuclear signal. *Science.* 261:1442-5.
- Di Nunzio, F., G. Maruggi, S. Ferrari, E. Di Iorio, V. Poletti, M. Garcia, M. Del Rio, M. De Luca, F. Larcher, G. Pellegrini, and F. Mavilio. 2008. Correction of laminin-5 deficiency in human epidermal stem cells by transcriptionally targeted lentiviral vectors. *Mol Ther.* 16:1977-85.
- Diepgen, T.L., and V. Mahler. 2002. The epidemiology of skin cancer. *Br J Dermatol.* 146 Suppl 61:1-6.
- Ditto, A.J., P.N. Shah, and Y.H. Yun. 2009. Non-viral gene delivery using nanoparticles. *Expert Opin Drug Deliv.* 6:1149-60.
- Dominguez-Brauer, C., Y.J. Chen, P.M. Brauer, J. Pimkina, and P. Raychaudhuri. 2009. ARF stimulates XPC to trigger nucleotide excision repair by regulating the repressor complex of E2F4. *EMBO Rep.* 10:1036-42.
- Douki, T., and J. Cadet. 2001. Individual determination of the yield of the main UV-induced dimeric pyrimidine photoproducts in DNA suggests a high mutagenicity of CC photolesions. *Biochemistry.* 40:2495-501.
- Douki, T., D. Perdiz, P. Grof, Z. Kuluncsics, E. Moustacchi, J. Cadet, and E. Sage. 1999. Oxidation of guanine in cellular DNA by solar UV radiation: biological role. *Photochem Photobiol.* 70:184-90.
- Douki, T., A. Reynaud-Angelin, J. Cadet, and E. Sage. 2003. Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation. *Biochemistry.* 42:9221-6.
- Drapkin, R., J.T. Reardon, A. Ansari, J.C. Huang, L. Zawel, K. Ahn, A. Sancar, and D. Reinberg. 1994. Dual role of TFIIH in DNA excision repair and in transcription by RNA polymerase II. *Nature.* 368:769-72.
- Driggers, W.J., V.I. Grishko, S.P. LeDoux, and G.L. Wilson. 1996. Defective repair of oxidative damage in the mitochondrial DNA of a xeroderma pigmentosum group A cell line. *Cancer Res.* 56:1262-6.
- Drobetsky, E.A., A.J. Grosovsky, and B.W. Glickman. 1987. The specificity of UV-induced mutations at an endogenous locus in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84:9103-7.
- Drobetsky, E.A., E. Moustacchi, B.W. Glickman, and E. Sage. 1994. The mutational specificity of simulated sunlight at the aprt locus in rodent cells. *Carcinogenesis.* 15:1577-83.
- Drobetsky, E.A., J. Turcotte, and A. Chateauneuf. 1995. A role for ultraviolet A in solar mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:2350-4.
- Drouin, R., and J.P. Therrien. 1997. UVB-induced cyclobutane pyrimidine dimer frequency correlates with skin cancer mutational hotspots in p53. *Photochem Photobiol.* 66:719-26.

- Druzhyna, N.M., G.L. Wilson, and S.P. LeDoux. 2008. Mitochondrial DNA repair in aging and disease. *Mech Ageing Dev.* 129:383-90.
- Dull, T., R. Zufferey, M. Kelly, R.J. Mandel, M. Nguyen, D. Trono, and L. Naldini. 1998. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol.* 72:8463-71.
- Dumaz, N., C. Drougard, X. Quilliet, M. Mezzina, A. Sarasin, and L. Daya-Grosjean. 1998. Recovery of the normal p53 response after UV treatment in DNA repair- deficient fibroblasts by retroviral-mediated correction with the XPD gene. *Carcinogenesis.* 19:1701-4.
- Dupuy, J.M., and D. Lafforet. 1974. A defect of cellular immunity in Xeroderma pigmentosum. *Clin Immunol Immunopathol.* 3:52-8.
- Eckert, R.L., A.M. Broome, M. Ruse, N. Robinson, D. Ryan, and K. Lee. 2004. S100 proteins in the epidermis. *J Invest Dermatol.* 123:23-33.
- Eckhart, L., W. Declercq, J. Ban, M. Rendl, B. Lengauer, C. Mayer, S. Lippens, P. Vandenameele, and E. Tschachler. 2000. Terminal differentiation of human keratinocytes and stratum corneum formation is associated with caspase-14 activation. *J Invest Dermatol.* 115:1148-51.
- Eferl, R., and E.F. Wagner. 2003. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer.* 3:859-68.
- Egeblad, M., and Z. Werb. 2002. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer.* 2:161-74.
- Eggset, G., G. Volden, and H. Krokan. 1983. U.v.-induced DNA damage and its repair in human skin in vivo studied by sensitive immunohistochemical methods. *Carcinogenesis.* 4:745-50.
- El-Mahdy, M.A., Q. Zhu, Q.E. Wang, G. Wani, M. Praetorius-Ibba, and A.A. Wani. 2006. Cullin 4A-mediated proteolysis of DDB2 protein at DNA damage sites regulates in vivo lesion recognition by XPC. *J Biol Chem.* 281:13404-11.
- Emmert, S., T. Ueda, U. Zumsteg, P. Weber, S.G. Khan, K.S. Oh, J. Boyle, P. Laspe, K. Zachmann, L. Boeckmann, C. Kuschal, A. Bircher, and K.H. Kraemer. 2009. Strict sun protection results in minimal skin changes in a patient with xeroderma pigmentosum and a novel c.2009delG mutation in XPD (ERCC2). *Exp Dermatol.* 18:64-8.
- Englaro, W., B. Derijard, J.P. Ortonne, and R. Ballotti. 1998. Solar ultraviolet light activates extracellular signal-regulated kinases and the ternary complex factor in human normal keratinocytes. *Oncogene.* 16:661-4.
- Ergun, S.S., D.I. Cek, and C. Demirkesen. 2002. Is facial resurfacing with monobloc full-thickness skin graft a remedy in xeroderma pigmentosum? *Plast Reconstr Surg.* 110:1290-3.
- Fagot, D., D. Asselineau, and F. Bernerd. 2002. Direct role of human dermal fibroblasts and indirect participation of epidermal keratinocytes in MMP-1 production after UV-B irradiation. *Arch Dermatol Res.* 293:576-83.
- Fagot, D., D. Asselineau, and F. Bernerd. 2004. Matrix metalloproteinase-1 production observed after solar-simulated radiation exposure is assumed by dermal fibroblasts but involves a paracrine activation through epidermal keratinocytes. *Photochem Photobiol.* 79:499-505.
- Fang, X., P. Zheng, J. Tang, and Y. Liu. 2010. CD24: from A to Z. *Cell Mol Immunol.* 7:100-3.
- Feaver, W.J., J.Q. Svejstrup, N.L. Henry, and R.D. Kornberg. 1994. Relationship of CDK-activating kinase and RNA polymerase II CTD kinase TFIIF/TFIIK. *Cell.* 79:1103-9.
- Felgner, P.L., M. Holm, and H. Chan. 1989. Cationic liposome mediated transfection. *Proc West Pharmacol Soc.* 32:115-21.
- Fenjves, E.S., S.N. Yao, K. Kurachi, and L.B. Taichman. 1996. Loss of expression of a retrovirus-transduced gene in human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 106:576-8.
- Ferguson, B.E., and D.H. Oh. 2005. Proficient global nucleotide excision repair in human keratinocytes but not in fibroblasts deficient in p53. *Cancer Res.* 65:8723-9.
- Fischer, A., and M. Cavazzana-Calvo. 2008. Gene therapy of inherited diseases. *Lancet.* 371:2044-7.
- Fisher, G.J., S.C. Datta, H.S. Talwar, Z.Q. Wang, J. Varani, S. Kang, and J.J. Voorhees. 1996. Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature.* 379:335-9.

- Fisher, G.J., and J.J. Voorhees. 1998. Molecular mechanisms of photoaging and its prevention by retinoic acid: ultraviolet irradiation induces MAP kinase signal transduction cascades that induce Ap-1-regulated matrix metalloproteinases that degrade human skin in vivo. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 3:61-8.
- Fisher, G.J., Z.Q. Wang, S.C. Datta, J. Varani, S. Kang, and J.J. Voorhees. 1997. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N Engl J Med.* 337:1419-28.
- Fitch, M.E., I.V. Cross, S.J. Turner, S. Adimoolam, C.X. Lin, K.G. Williams, and J.M. Ford. 2003. The DDB2 nucleotide excision repair gene product p48 enhances global genomic repair in p53 deficient human fibroblasts. *DNA Repair (Amst).* 2:819-26.
- Florin, L., N. Maas-Szabowski, S. Werner, A. Szabowski, and P. Angel. 2005. Increased keratinocyte proliferation by JUN-dependent expression of PTN and SDF-1 in fibroblasts. *J Cell Sci.* 118:1981-9.
- Foote, C.S. 1991. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem Photobiol.* 54:659.
- Ford, J.M., and P.C. Hanawalt. 1995. Li-Fraumeni syndrome fibroblasts homozygous for p53 mutations are deficient in global DNA repair but exhibit normal transcription-coupled repair and enhanced UV resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:8876-80.
- Fortunel, N.O., E. Cadio, P. Vaigot, L. Chadli, S. Moratille, S. Bouet, P.H. Romeo, and M.T. Martin. 2010. Exploration of the functional hierarchy of the basal layer of human epidermis at the single-cell level using parallel clonal microcultures of keratinocytes. *Exp Dermatol.* 19:387-92.
- Fortunel, N.O., J.A. Hatzfeld, P.A. Rosemary, C. Ferraris, M.N. Monier, V. Haydont, J. Longuet, B. Brethon, B. Lim, I. Castiel, R. Schmidt, and A. Hatzfeld. 2003. Long-term expansion of human functional epidermal precursor cells: promotion of extensive amplification by low TGF-beta1 concentrations. *J Cell Sci.* 116:4043-52.
- Fousteri, M., and L.H. Mullenders. 2008. Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. *Cell Res.* 18:73-84.
- Francisco, G., P.R. Menezes, J. Eluf-Neto, and R. Chammas. 2008. XPC polymorphisms play a role in tissue-specific carcinogenesis: a meta-analysis. *Eur J Hum Genet.* 16:724-34.
- Fréchet, M., E. Warrick, C. Vioux, O. Chevallier, S. A., S. Benhamou, A. Sarasin, F. Bernerd, and T. Magnaldo. 2008. Overexpression of matrix metalloproteinase 1 in dermal fibroblasts from DNA repair-deficient/cancer-prone xeroderma pigmentosum group C patients. *Oncogene.* 27:5223-32.
- Freiberg, R.A., K.A. Choate, H. Deng, E.S. Alperin, L.J. Shapiro, and P.A. Khavari. 1997. A model of corrective gene transfer in X-linked ichthyosis. *Hum Mol Genet.* 6:927-33.
- Fridovich, I. 1978. The biology of oxygen radicals. *Science.* 201:875-80.
- Friedberg, E.C., J.P. Bond, D.K. Burns, D.L. Cheo, M.S. Greenblatt, L.B. Meira, D. Nahari, and A.M. Reis. 2000. Defective nucleotide excision repair in xpc mutant mice and its association with cancer predisposition. *Mutat Res.* 459:99-108.
- Fuchs, E. 2007. Scratching the surface of skin development. *Nature.* 445:834-42.
- Fuchs, E., and H. Green. 1980. Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell.* 19:1033-42.
- Fuchs, E., and S. Raghavan. 2002. Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nature reviews genetics.* 3:199-209.
- Gache, Y., C. Baldeschi, M. Del Rio, L. Gagnoux-Palacios, F. Larcher, J.P. Lacour, and G. Meneguzzi. 2004. Construction of skin equivalents for gene therapy of recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Hum Gene Ther.* 15:921-33.
- Gagnoux-Palacios, L., C. Hervouet, F. Spirito, S. Roques, M. Mezzina, O. Danos, and G. Meneguzzi. 2005. Assessment of optimal transduction of primary human skin keratinocytes by viral vectors. *J Gene Med.* 7:1178-86.

- Gallico, G.G., 3rd, N.E. O'Connor, C.C. Compton, O. Kehinde, and H. Green. 1984. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N Engl J Med.* 311:448-51.
- Garinis, G.A., J.R. Mitchell, M.J. Moorhouse, K. Hanada, H. de Waard, D. Vandeputte, J. Jans, K. Brand, M. Smid, P.J. van der Spek, J.H. Hoeijmakers, R. Kanaar, and G.T. van der Horst. 2005. Transcriptome analysis reveals cyclobutane pyrimidine dimers as a major source of UV-induced DNA breaks. *EMBO J.* 24:3952-62.
- Garsen, J., H. van Steeg, F. de Gruijl, J. de Boer, G.T. van der Horst, H. van Kranen, H. van Loveren, M. van Dijk, A. Fluitman, G. Weeda, and J.H. Hoeijmakers. 2000. Transcription-coupled and global genome repair differentially influence UV-B-induced acute skin effects and systemic immunosuppression. *J Immunol.* 164:6199-205.
- Gaspar, H.B., K.L. Parsley, S. Howe, D. King, K.C. Gilmour, J. Sinclair, G. Brouns, M. Schmidt, C. Von Kalle, T. Barington, M.A. Jakobsen, H.O. Christensen, A. Al Ghonaium, H.N. White, J.L. Smith, R.J. Levinsky, R.R. Ali, C. Kinnon, and A.J. Thrasher. 2004. Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector. *Lancet.* 364:2181-7.
- Gaspari, A.A., T.A. Fleisher, and K.H. Kraemer. 1993. Impaired interferon production and natural killer cell activation in patients with the skin cancer-prone disorder, xeroderma pigmentosum. *J Clin Invest.* 92:1135-42.
- Gaszner, M., and G. Felsenfeld. 2006. Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. *Nat Rev Genet.* 7:703-13.
- Gebhardt, C., J. Nemeth, P. Angel, and J. Hess. 2006. S100A8 and S100A9 in inflammation and cancer. *Biochem Pharmacol.* 72:1622-31.
- Gentil, A., F. Le Page, A. Margot, C.W. Lawrence, A. Borden, and A. Sarasin. 1996. Mutagenicity of a unique thymine-thymine dimer or thymine-thymine pyrimidine pyrimidone (6-4) photoproduct in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 24:1837-40.
- Gerrard, A.J., D.L. Hudson, G.G. Brownlee, and F.M. Watt. 1993. Towards gene therapy for haemophilia B using primary human keratinocytes. *Nat Genet.* 3:180-3.
- Ghazizadeh, S., C. Doumeng, and L.B. Taichman. 2002. Durable and stratum-specific gene expression in epidermis. *Gene Ther.* 9:1278-85.
- Ghazizadeh, S., R. Harrington, and L. Taichman. 1999. In vivo transduction of mouse epidermis with recombinant retroviral vectors: implications for cutaneous gene therapy. *Gene Ther.* 6:1267-75.
- Ghazizadeh, S., A.B. Katz, R. Harrington, and L.B. Taichman. 2004. Lentivirus-mediated gene transfer to human epidermis. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 9:269-75.
- Ghazizadeh, S., and L.B. Taichman. 2001. Multiple classes of stem cells in cutaneous epithelium: a lineage analysis of adult mouse skin. *EMBO J.* 20:1215-22.
- Giglia-Mari, G., F. Coin, J.A. Ranish, D. Hoogstraten, A. Theil, N. Wijgers, N.G. Jaspers, A. Raams, M. Argentini, P.J. van der Spek, E. Botta, M. Stefanini, J.M. Egly, R. Aebersold, J.H. Hoeijmakers, and W. Vermeulen. 2004. A new, tenth subunit of TFIIH is responsible for the DNA repair syndrome trichothiodystrophy group A. *Nat Genet.* 36:714-9.
- Giglia-Mari, G., and A. Sarasin. 2003. TP53 mutations in human skin cancers. *Hum Mutat.* 21:217-28.
- Giglia, G., N. Dumaz, C. Drougard, M.F. Avril, L. Daya-Grosjean, and A. Sarasin. 1998. p53 mutations in skin and internal tumors of xeroderma pigmentosum patients belonging to the complementation group C. *Cancer Res.* 58:4402-9.
- Gilchrest, B.A., M.S. Eller, A.C. Geller, and M. Yaar. 1999. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *N Engl J Med.* 340:1341-8.
- Gilchrest, B.A., H.Y. Park, M.S. Eller, and M. Yaar. 1996. Mechanisms of ultraviolet light-induced pigmentation. *Photochem Photobiol.* 63:1-10.
- Gillette, T.G., S. Yu, Z. Zhou, R. Waters, S.A. Johnston, and S.H. Reed. 2006. Distinct functions of the ubiquitin-proteasome pathway influence nucleotide excision repair. *EMBO J.* 25:2529-38.

- Glover, M.T., J.J. Deeks, M.J. Raftery, J. Cunningham, and I.M. Leigh. 1997. Immunosuppression and risk of non-melanoma skin cancer in renal transplant recipients. *Lancet*. 349:398.
- Goldstein, A.M., M. Chan, M. Harland, E.M. Gillanders, N.K. Hayward, M.F. Avril, E. Azizi, G. Bianchi-Scarra, D.T. Bishop, B. Bressac-de Paillerets, W. Bruno, D. Calista, L.A. Cannon Albright, F. Demenais, D.E. Elder, P. Ghiorzo, N.A. Gruis, J. Hansson, D. Hogg, E.A. Holland, P.A. Kanetsky, R.F. Kefford, M.T. Landi, J. Lang, S.A. Leachman, R.M. Mackie, V. Magnusson, G.J. Mann, K. Niendorf, J. Newton Bishop, J.M. Palmer, S. Puig, J.A. Puig-Buttille, F.A. de Snoo, M. Stark, H. Tsao, M.A. Tucker, L. Whitaker, and E. Jakobson. 2006. High-risk melanoma susceptibility genes and pancreatic cancer, neural system tumors, and uveal melanoma across GenoMEL. *Cancer Res*. 66:9818-28.
- Gong, F., D. Fahy, and M.J. Smerdon. 2006. Rad4-Rad23 interaction with SWI/SNF links ATP-dependent chromatin remodeling with nucleotide excision repair. *Nat Struct Mol Biol*. 13:902-7.
- Goodell, M.A., K. Brose, G. Paradis, A.S. Conner, and R.C. Mulligan. 1996. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med*. 183:1797-806.
- Gosselet, F.P., T. Magnaldo, R.M. Culerrier, A. Sarasin, and J.C. Ehrhart. 2007. BMP2 and BMP6 control p57(Kip2) expression and cell growth arrest/terminal differentiation in normal primary human epidermal keratinocytes. *Cell Signal*. 19:731-9.
- Goyal, J.L., V.A. Rao, R. Srinivasan, and K. Agrawal. 1994. Oculocutaneous manifestations in xeroderma pigmentosa. *Br J Ophthalmol*. 78:295-7.
- Goyenvalle, A., A. Vulin, F. Fougousse, F. Leturcq, J.C. Kaplan, L. Garcia, and O. Danos. 2004. Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science*. 306:1796-9.
- Gram, G.J., S.D. Nielsen, and J.E. Hansen. 1998. Spontaneous silencing of humanized green fluorescent protein (hGFP) gene expression from a retroviral vector by DNA methylation. *J Hematother*. 7:333-41.
- Gray-Schopfer, V., C. Wellbrock, and R. Marais. 2007. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature*. 445:851-7.
- Greenhaw, G.A., A. Hebert, M.E. Duke-Woodside, I.J. Butler, J.T. Hecht, J.E. Cleaver, G.H. Thomas, and W.A. Horton. 1992. Xeroderma pigmentosum and Cockayne syndrome: overlapping clinical and biochemical phenotypes. *Am J Hum Genet*. 50:677-89.
- Grigoryan, T., P. Wend, A. Klaus, and W. Birchmeier. 2008. Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of beta-catenin in mice. *Genes Dev*. 22:2308-41.
- Grizot, S., J. Smith, F. Daboussi, J. Prieto, P. Redondo, N. Merino, M. Villate, S. Thomas, L. Lemaire, G. Montoya, F.J. Blanco, F. Paques, and P. Duchateau. 2009. Efficient targeting of a SCID gene by an engineered single-chain homing endonuclease. *Nucleic Acids Res*. 37:5405-19.
- Groisman, R., J. Polanowska, I. Kuraoka, J. Sawada, M. Saijo, R. Drapkin, A.F. Kisselev, K. Tanaka, and Y. Nakatani. 2003. The ubiquitin ligase activity in the DDB2 and CSA complexes is differentially regulated by the COP9 signalosome in response to DNA damage. *Cell*. 113:357-67.
- Hacein-Bey-Abina, S., C. Von Kalle, M. Schmidt, M.P. McCormack, N. Wulffraat, P. Leboulch, A. Lim, C.S. Osborne, R. Pawliuk, E. Morillon, R. Sorensen, A. Forster, P. Fraser, J.I. Cohen, G. de Saint Basile, I. Alexander, U. Wintergerst, T. Frebourg, A. Aurias, D. Stoppa-Lyonnet, S. Romana, I. Radford-Weiss, F. Gross, F. Valensi, E. Delabesse, E. Macintyre, F. Sigaux, J. Soulier, L.E. Leiva, M. Wissler, C. Prinz, T.H. Rabbitts, F. Le Deist, A. Fischer, and M. Cavazzana-Calvo. 2003. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*. 302:415-9.
- Hachiya, A., P. Sriwiranont, A. Patel, N. Saito, A. Ohuchi, T. Kitahara, Y. Takema, R. Tsuboi, R.E. Boissy, M.O. Visscher, J.M. Wilson, and G.P. Kobinger. 2007. Gene transfer in human skin with different pseudotyped HIV-based vectors. *Gene Ther*. 14:648-56.

- Hall, P.A., P.H. McKee, H.D. Menage, R. Dover, and D.P. Lane. 1993. High levels of p53 protein in UV-irradiated normal human skin. *Oncogene*. 8:203-7.
- Hanasoge, S., and M. Ljungman. 2007. H2AX phosphorylation after UV irradiation is triggered by DNA repair intermediates and is mediated by the ATR kinase. *Carcinogenesis*. 28:2298-304.
- Hardeland, U., M. Bentele, T. Lettieri, R. Steinacher, J. Jiricny, and P. Schar. 2001. Thymine DNA glycosylase. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 68:235-53.
- Harper, J.W., G.R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi, and S.J. Elledge. 1993. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*. 75:805-16.
- Hashiguchi, K., J.A. Stuart, N.C. de Souza-Pinto, and V.A. Bohr. 2004. The C-terminal alphaO helix of human Ogg1 is essential for 8-oxoguanine DNA glycosylase activity: the mitochondrial beta-Ogg1 lacks this domain and does not have glycosylase activity. *Nucleic Acids Res*. 32:5596-608.
- He, Z., L.A. Henricksen, M.S. Wold, and C.J. Ingles. 1995. RPA involvement in the damage-recognition and incision steps of nucleotide excision repair. *Nature*. 374:566-9.
- Henning, K.A., L. Li, N. Iyer, L.D. McDaniel, M.S. Reagan, R. Legerski, R.A. Schultz, M. Stefanini, A.R. Lehmann, L.V. Mayne, and E.C. Friedberg. 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*. 82:555-64.
- Hertle, M.D., J.C. Adams, and F.M. Watt. 1991. Integrin expression during human epidermal development in vivo and in vitro. *Development*. 112:193-206.
- Hirai, Y., Y. Kodama, S. Moriwaki, A. Noda, H.M. Cullings, D.G. Macphee, K. Kodama, K. Mabuchi, K.H. Kraemer, C.E. Land, and N. Nakamura. 2006. Heterozygous individuals bearing a founder mutation in the XPA DNA repair gene comprise nearly 1% of the Japanese population. *Mutat Res*. 601:171-8.
- Hirst, J. 2010. Towards the molecular mechanism of respiratory complex I. *Biochem J*. 425:327-39.
- Hiyama, H., M. Yokoi, C. Masutani, K. Sugawara, T. Maekawa, K. Tanaka, J.H. Hoeijmakers, and F. Hanaoka. 1999. Interaction of hHR23 with S5a. The ubiquitin-like domain of hHR23 mediates interaction with S5a subunit of 26 S proteasome. *J Biol Chem*. 274:28019-25.
- Hoeijmakers, J.H. 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*. 411:366-74.
- Hoffman, E.P., R.H. Brown, Jr., and L.M. Kunkel. 1987. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*. 51:919-28.
- Hoffschir, F., L. Daya-Grosjean, P.X. Petit, S. Nocentini, B. Dutrillaux, A. Sarasin, and M. Vuillaume. 1998. Low catalase activity in xeroderma pigmentosum fibroblasts and SV40-transformed human cell lines is directly related to decreased intracellular levels of the cofactor, NADPH. *Free Radic Biol Med*. 24:809-16.
- Hollander, M.C., R.T. Philburn, A.D. Patterson, S. Velasco-Miguel, E.C. Friedberg, R.I. Linnoila, and A.J. Fornace, Jr. 2005. Deletion of XPC leads to lung tumors in mice and is associated with early events in human lung carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:13200-5.
- Hoogstraten, D., S. Bergink, J.M. Ng, V.H. Verbiest, M.S. Luijsterburg, B. Geverts, A. Raams, C. Dinant, J.H. Hoeijmakers, W. Vermeulen, and A.B. Houtsmuller. 2008. Versatile DNA damage detection by the global genome nucleotide excision repair protein XPC. *J Cell Sci*. 121:2850-9.
- Hovnanian, A., P. Duquesnoy, C. Blanchet-Bardon, R.G. Knowlton, S. Amselem, M. Lathrop, L. Dubertret, J. Uitto, and M. Goossens. 1992. Genetic linkage of recessive dystrophic epidermolysis bullosa to the type VII collagen gene. *J Clin Invest*. 90:1032-6.
- Huang, X.X., F. Bernerd, and G.M. Halliday. 2009. Ultraviolet A within sunlight induces mutations in the epidermal basal layer of engineered human skin. *Am J Pathol*. 174:1534-43.
- Hutchinson, F. 1994. Induction of tandem-base change mutations. *Mutat Res*. 309:11-5.
- Hwang, B.J., J.M. Ford, P.C. Hanawalt, and G. Chu. 1999. Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:424-8.

- Ichikawa, T., Y. Suenaga, T. Koda, T. Ozaki, and A. Nakagawara. 2008. TAp63-dependent induction of growth differentiation factor 15 (GDF15) plays a critical role in the regulation of keratinocyte differentiation. *Oncogene*. 27:409-20.
- Ikegami, T., I. Kuraoka, M. Saijo, N. Kodo, Y. Kyogoku, K. Morikawa, K. Tanaka, and M. Shirakawa. 1998. Solution structure of the DNA- and RPA-binding domain of the human repair factor XPA. *Nat Struct Biol*. 5:701-6.
- Ikehata, H., H. Kudo, T. Masuda, and T. Ono. 2003. UVA induces C-->T transitions at methyl-CpG-associated dipyrimidine sites in mouse skin epidermis more frequently than UVB. *Mutagenesis*. 18:511-9.
- Itin, P.H., A. Sarasin, and M.R. Pittelkow. 2001. Trichothiodystrophy: update on the sulfur-deficient brittle hair syndromes. *J Am Acad Dermatol*. 44:891-920; quiz 921-4.
- Ito, M., Y. Liu, Z. Yang, J. Nguyen, F. Liang, R.J. Morris, and G. Cotsarelis. 2005. Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis. *Nat Med*. 11:1351-4.
- Ito, S., I. Kuraoka, P. Chymkowitch, E. Compe, A. Takedachi, C. Ishigami, F. Coin, J.M. Egly, and K. Tanaka. 2007. XPG stabilizes TFIIH, allowing transactivation of nuclear receptors: implications for Cockayne syndrome in XP-G/CS patients. *Mol Cell*. 26:231-43.
- Iyer, N., M.S. Reagan, K.J. Wu, B. Canagarajah, and E.C. Friedberg. 1996. Interactions involving the human RNA polymerase II transcription/nucleotide excision repair complex TFIIH, the nucleotide excision repair protein XPG, and Cockayne syndrome group B (CSB) protein. *Biochemistry*. 35:2157-67.
- Jacobelli, S., N. Soufir, J.J. Lacapere, S. Regnier, A. Bourillon, B. Grandchamp, G. Hetet, D. Pham, A. Palangie, M.F. Avril, N. Dupin, A. Sarasin, and I. Gorin. 2008. Xeroderma pigmentosum group C in a French Caucasian patient with multiple melanoma and unusual long-term survival. *Br J Dermatol*. 159:968-73.
- Jager, L., and A. Ehrhardt. 2007. Emerging adenoviral vectors for stable correction of genetic disorders. *Curr Gene Ther*. 7:272-83.
- Janicijevic, A., K. Sugasawa, Y. Shimizu, F. Hanaoka, N. Wijgers, M. Djurica, J.H. Hoeijmakers, and C. Wyman. 2003. DNA bending by the human damage recognition complex XPC-HR23B. *DNA Repair (Amst)*. 2:325-36.
- Jensen, K.B., C.A. Collins, E. Nascimento, D.W. Tan, M. Frye, S. Itami, and F.M. Watt. 2009. Lrig1 expression defines a distinct multipotent stem cell population in mammalian epidermis. *Cell Stem Cell*. 4:427-39.
- Jensen, K.B., and F.M. Watt. 2006. Single-cell expression profiling of human epidermal stem and transit-amplifying cells: Lrig1 is a regulator of stem cell quiescence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:11958-63.
- Jonason, A.S., S. Kunala, G.J. Price, R.J. Restifo, H.M. Spinelli, J.A. Persing, D.J. Leffell, R.E. Tarone, and D.E. Brash. 1996. Frequent clones of p53-mutated keratinocytes in normal human skin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:14025-9.
- Jones, P., and B.D. Simons. 2008. Epidermal homeostasis: do committed progenitors work while stem cells sleep? *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9:82-8.
- Jones, P.H., S. Harper, and F.M. Watt. 1995. Stem cell patterning and fate in human epidermis. *Cell*. 80:83-93.
- Jones, P.H., and F.M. Watt. 1993. Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell*. 73:713-24.
- Kaiser, J. 2009. Gene therapy. Beta-thalassemia treatment succeeds, with a caveat. *Science*. 326:1468-9.
- Kalinin, A., L.N. Marekov, and P.M. Steinert. 2001. Assembly of the epidermal cornified cell envelope. *J Cell Sci*. 114:3069-70.
- Kalluri, R., and M. Zeisberg. 2006. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*. 6:392-401.

- Kamenisch, Y., M. Fousteri, J. Knoch, A.K. von Thaler, B. Fehrenbacher, H. Kato, T. Becker, M.E. Dolle, R. Kuiper, M. Majora, M. Schaller, G.T. van der Horst, H. van Steeg, M. Rocken, D. Rapaport, J. Krutmann, L.H. Mullenders, and M. Berneburg. 2010. Proteins of nucleotide and base excision repair pathways interact in mitochondria to protect from loss of subcutaneous fat, a hallmark of aging. *J Exp Med.* 207:379-90.
- Kannouche, P., and A. Stary. 2003. Xeroderma pigmentosum variant and error-prone DNA polymerases. *Biochimie.* 85:1123-32.
- Kappes, U.P., D. Luo, M. Potter, K. Schulmeister, and T.M. Runger. 2006. Short- and long-wave UV light (UVB and UVA) induce similar mutations in human skin cells. *J Invest Dermatol.* 126:667-75.
- Kaur, P., and A. Li. 2000. Adhesive properties of human basal epidermal cells: an analysis of keratinocyte stem cells, transit amplifying cells, and postmitotic differentiating cells. *J Invest Dermatol.* 114:413-20.
- Kay, M.A., J.C. Glorioso, and L. Naldini. 2001. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med.* 7:33-40.
- Kay, M.A., C.S. Manno, M.V. Ragni, P.J. Larson, L.B. Couto, A. McClelland, B. Glader, A.J. Chew, S.J. Tai, R.W. Herzog, V. Arruda, F. Johnson, C. Scallan, E. Skarsgard, A.W. Flake, and K.A. High. 2000. Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat Genet.* 24:257-61.
- Kerkela, E., and U. Saarialho-Kere. 2003. Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. *Exp Dermatol.* 12:109-25.
- Khan, S.G., A. Metin, E. Gozukara, H. Inui, T. Shahlavi, V. Muniz-Medina, C.C. Baker, T. Ueda, J.R. Aiken, T.D. Schneider, and K.H. Kraemer. 2004. Two essential splice lariat branchpoint sequences in one intron in a xeroderma pigmentosum DNA repair gene: mutations result in reduced XPC mRNA levels that correlate with cancer risk. *Hum Mol Genet.* 13:343-52.
- Khan, S.G., V. Muniz-Medina, T. Shahlavi, C.C. Baker, H. Inui, T. Ueda, S. Emmert, T.D. Schneider, and K.H. Kraemer. 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 Res.* 30:3624-31.
- Khan, S.G., K.S. Oh, S. Emmert, K. Imoto, D. Tamura, J.J. DiGiovanna, T. Shahlavi, N. Armstrong, C.C. Baker, M. Neuburg, C. Zalewski, C. Brewer, E. Wiggs, R. Schiffmann, and K.H. Kraemer. 2009a. XPC initiation codon mutation in xeroderma pigmentosum patients with and without neurological symptoms. *DNA Repair (Amst).* 8:114-25.
- Khan, S.G., K.S. Oh, T. Shahlavi, T. Ueda, D.B. Busch, H. Inui, S. Emmert, K. Imoto, V. Muniz-Medina, C.C. Baker, J.J. DiGiovanna, D. Schmidt, A. Khadavi, A. Metin, E. Gozukara, H. Slor, A. Sarasin, and K.H. Kraemer. 2006. Reduced XPC DNA repair gene mRNA levels in clinically normal parents of xeroderma pigmentosum patients. *Carcinogenesis.* 27:84-94.
- Khan, S.G., K. Yamanegi, Z.M. Zheng, J. Boyle, K. Imoto, K.S. Oh, C.C. Baker, E. Gozukara, A. Metin, and K.H. Kraemer. 2009b. XPC branch-point sequence mutations disrupt U2 snRNP binding, resulting in abnormal pre-mRNA splicing in xeroderma pigmentosum patients. *Hum Mutat.* 31:167-75.
- Kikuchi, Y., K. Tamai, and Y. Kaneda. 2008. Cutaneous gene delivery. *J Dermatol Sci.* 50:87-98.
- Kim, J.K., D. Patel, and B.S. Choi. 1995. Contrasting structural impacts induced by cis-syn cyclobutane dimer and (6-4) adduct in DNA duplex decamers: implication in mutagenesis and repair activity. *Photochem Photobiol.* 62:44-50.
- Kim, M.Y., H.J. Park, S.C. Baek, D.G. Byun, and D. Houh. 2002. Mutations of the p53 and PTCH gene in basal cell carcinomas: UV mutation signature and strand bias. *J Dermatol Sci.* 29:1-9.
- Kim, V.N., K. Mitrophanous, S.M. Kingsman, and A.J. Kingsman. 1998. Minimal requirement for a lentivirus vector based on human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 72:811-6.
- Kinzler, K.W., and B. Vogelstein. 1997. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature.* 386:761, 763.

- Kleijer, W.J., V. Laugel, M. Berneburg, T. Nardo, H. Fawcett, A. Gratchev, N.G. Jaspers, A. Sarasin, M. Stefanini, and A.R. Lehmann. 2008. Incidence of DNA repair deficiency disorders in western Europe: Xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *DNA Repair (Amst)*. 7:744-50.
- Klotz, L.O., C. Pellieux, K. Briviba, C. Pierlot, J.M. Aubry, and H. Sies. 1999. Mitogen-activated protein kinase (p38-, JNK-, ERK-) activation pattern induced by extracellular and intracellular singlet oxygen and UVA. *Eur J Biochem*. 260:917-22.
- Kobayashi, K., A. RoCHAT, and Y. Barrandon. 1993. Segregation of keratinocyte colony-forming cells in the bulge of the rat vibrissa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:7391-5.
- Kolgen, W., H. van Steeg, G.T. van der Horst, J.H. Hoeijmakers, W.A. van Vloten, F.R. de Gruijl, and J. Garssen. 2003. Association of transcription-coupled repair but not global genome repair with ultraviolet-B-induced Langerhans cell depletion and local immunosuppression. *J Invest Dermatol*. 121:751-6.
- Kolodka, T.M., J.A. Garlick, and L.B. Taichman. 1998. Evidence for keratinocyte stem cells in vitro: long term engraftment and persistence of transgene expression from retrovirus-transduced keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:4356-61.
- Kondo, S., S. Fukuro, K. Nishioka, and Y. Satoh. 1992. Xeroderma pigmentosum: recent clinical and photobiological aspects. *J Dermatol*. 19:690-5.
- Konig, A., H.C. Friederich, R. Hoffmann, and R. Happle. 1998. Dermabrasion for the treatment of xeroderma pigmentosum. *Arch Dermatol*. 134:241-2.
- Koster, M.I., D. Dai, B. Marinari, Y. Sano, A. Costanzo, M. Karin, and D.R. Roop. 2007. p63 induces key target genes required for epidermal morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:3255-60.
- Koster, M.I., S. Kim, A.A. Mills, F.J. DeMayo, and D.R. Roop. 2004. p63 is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program. *Genes Dev*. 18:126-31.
- Kraemer, K., M. Lee, and J. Scotto. 1987a. Xeroderma pigmentosum. Cutaneous, ocular and neurologic abnormalities in 830 published cases. *Arch. Dermatol*. 123:241-250.
- Kraemer, K.H., J.J. DiGiovanna, A.N. Moshell, R.E. Tarone, and G.L. Peck. 1988. Prevention of skin cancer in xeroderma pigmentosum with the use of oral isotretinoin. *N Engl J Med*. 318:1633-7.
- Kraemer, K.H., J.J. DiGiovanna, and G.L. Peck. 1992. Chemoprevention of skin cancer in xeroderma pigmentosum. *J Dermatol*. 19:715-8.
- Kraemer, K.H., M. Herlyn, S.H. Yuspa, W.H. Clark, Jr., G.K. Townsend, G.R. Neises, and V.J. Hearing. 1989. Reduced DNA repair in cultured melanocytes and nevus cells from a patient with xeroderma pigmentosum. *Arch Dermatol*. 125:263-8.
- Kraemer, K.H., M.M. Lee, and J. Scotto. 1987b. Xeroderma pigmentosum. Cutaneous, ocular, and neurologic abnormalities in 830 published cases. *Arch Dermatol*. 123:241-50.
- Kripke, M.L. 1974. Antigenicity of murine skin tumors induced by ultraviolet light. *J Natl Cancer Inst*. 53:1333-6.
- Kripke, M.L. 1984. Immunological unresponsiveness induced by ultraviolet radiation. *Immunol Rev*. 80:87-102.
- Kripke, M.L., and M.S. Fisher. 1976. Immunologic responses of the autochthonous host against tumors induced by ultraviolet light. *Adv Exp Med Biol*. 66:445-9.
- Kripke, M.L., J.S. Lofgreen, J. Beard, J.M. Jessup, and M.S. Fisher. 1977. In vivo immune responses of mice during carcinogenesis by ultraviolet irradiation. *J Natl Cancer Inst*. 59:1227-30.
- Krtolica, A., S. Parrinello, S. Lockett, P.Y. Desprez, and J. Campisi. 2001. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:12072-7.
- Kujoth, G.C., A. Hiona, T.D. Pugh, S. Someya, K. Panzer, S.E. Wohlgemuth, T. Hofer, A.Y. Seo, R. Sullivan, W.A. Jobling, J.D. Morrow, H. Van Remmen, J.M. Sedivy, T. Yamasoba, M. Tanokura, R. Weindruch, C. Leeuwenburgh, and T.A. Prolla. 2005. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science*. 309:481-4.

- Kusumoto, R., C. Masutani, K. Sugasawa, S. Iwai, M. Araki, A. Uchida, T. Mizukoshi, and F. Hanaoka. 2001. Diversity of the damage recognition step in the global genomic nucleotide excision repair in vitro. *Mutat Res.* 485:219-27.
- Kutner, R.H., X.Y. Zhang, and J. Reiser. 2009. Production, concentration and titration of pseudotyped HIV-1-based lentiviral vectors. *Nat Protoc.* 4:495-505.
- Kuwamoto, K., H. Miyauchi-Hashimoto, K. Tanaka, N. Eguchi, T. Inui, Y. Urade, and T. Horio. 2000. Possible involvement of enhanced prostaglandin E2 production in the photosensitivity in xeroderma pigmentosum group A model mice. *J Invest Dermatol.* 114:241-6.
- Lafforet, D., and J.M. Dupuy. 1975. Inhibitory factors of lymphocyte proliferation in serum from patients with xeroderma pigmentosum. *Clin Immunol Immunopathol.* 4:165-73.
- Lajtha, L.G. 1979. Stem cell concepts. *Differentiation.* 14:23-34.
- Langbein, L., H.W. Heid, I. Moll, and W.W. Franke. 1993. Molecular characterization of the body site-specific human epidermal cytokeratin 9: cDNA cloning, amino acid sequence, and tissue specificity of gene expression. *Differentiation.* 55:57-71.
- Larcher, F., E. Dellambra, L. Rico, S. Bondanza, R. Murillas, C. Cattoglio, F. Mavilio, J.L. Jorcano, G. Zambruno, and M. Del Rio. 2007. Long-term engraftment of single genetically modified human epidermal holoclones enables safety pre-assessment of cutaneous gene therapy. *Mol Ther.* 15:1670-6.
- Larderet, G., N.O. Fortunel, P. Vaigot, M. Cegalerba, P. Maltère, O. Zobiri, X. Gidrol, G. Waksman, and M.T. Martin. 2006. Human side population keratinocytes exhibit long-term proliferative potential and a specific gene expression profile and can form a pluristratified epidermis. *Stem Cells.* 24:965-74.
- Lasaro, M.O., and H.C. Ertl. 2009. New insights on adenovirus as vaccine vectors. *Mol Ther.* 17:1333-9.
- Lassen, N., J.B. Bateman, T. Estey, J.R. Kuszak, D.W. Nees, J. Piatigorsky, G. Duester, B.J. Day, J. Huang, L.M. Hines, and V. Vasiliou. 2007. Multiple and additive functions of ALDH3A1 and ALDH1A1: cataract phenotype and ocular oxidative damage in Aldh3a1(-)/Aldh1a1(-) knock-out mice. *J Biol Chem.* 282:25668-76.
- Le Panse, R., L. Dubertret, and B. Coulomb. 2003. p38 mitogen-activated protein kinase activation by ultraviolet A radiation in human dermal fibroblasts. *Photochem Photobiol.* 78:168-74.
- LeClerc, J.E., A. Borden, and C.W. Lawrence. 1991. The thymine-thymine pyrimidine-pyrimidone(6-4) ultraviolet light photoproduct is highly mutagenic and specifically induces 3' thymine-to-cytosine transitions in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:9685-9.
- Lee, D.H., and G.P. Pfeifer. 2003. Deamination of 5-methylcytosines within cyclobutane pyrimidine dimers is an important component of UVB mutagenesis. *J Biol Chem.* 278:10314-21.
- Leech, S.N., and C. Moss. 2007. A current and online genodermatosis database. *Br J Dermatol.* 156:1115-48.
- Legerski, R., and C. Peterson. 1992. Expression cloning of a human DNA repair gene involved in xeroderma pigmentosum group C. *Nature.* 359:70-3.
- Legg, J., U.B. Jensen, S. Broad, I. Leigh, and F.M. Watt. 2003. Role of melanoma chondroitin sulphate proteoglycan in patterning stem cells in human interfollicular epidermis. *Development.* 130:6049-63.
- Lehmann, A.R., S. Kirk-Bell, C.F. Arlett, M.C. Paterson, P.H. Lohman, E.A. de Weerd-Kastelein, and D. Bootsma. 1975. Xeroderma pigmentosum cells with normal levels of excision repair have a defect in DNA synthesis after UV-irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 72:219-23.
- Lehmann, A.R., A. Niimi, T. Ogi, S. Brown, S. Sabbioneda, J.F. Wing, P.L. Kannouche, and C.M. Green. 2007. Translesion synthesis: Y-family polymerases and the polymerase switch. *DNA Repair (Amst).* 6:891-9.
- Lena, A.M., R. Shalom-Feuerstein, P. Rivetti di Val Cervo, D. Aberdam, R.A. Knight, G. Melino, and E. Candi. 2008. miR-203 represses 'stemness' by repressing DeltaNp63. *Cell Death Differ.* 15:1187-95.

- Levy, L., S. Broad, A.J. Zhu, J.M. Carroll, I. Khazaal, B. Peault, and F.M. Watt. 1998. Optimised retroviral infection of human epidermal keratinocytes: long-term expression of transduced integrin gene following grafting on to SCID mice. *Gene Ther.* 5:913-22.
- Levy, V., C. Lindon, B.D. Harfe, and B.A. Morgan. 2005. Distinct stem cell populations regenerate the follicle and interfollicular epidermis. *Dev Cell.* 9:855-61.
- Li, A., P.J. Simmons, and P. Kaur. 1998a. Identification and isolation of candidate human keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:3902-7.
- Li, G., V.C. Ho, D.L. Mitchell, M.J. Trotter, and V.A. Tron. 1997. Differentiation-dependent p53 regulation of nucleotide excision repair in keratinocytes. *Am J Pathol.* 150:1457-64.
- Li, G., V. Tron, and V. Ho. 1998b. Induction of squamous cell carcinoma in p53-deficient mice after ultraviolet irradiation. *J Invest Dermatol.* 110:72-5.
- Li, L., E.S. Bales, C.A. Peterson, and R.J. Legerski. 1993. Characterization of molecular defects in xeroderma pigmentosum group C. *Nat Genet.* 5:413-7.
- Lim, S.C. 2005. CD24 and human carcinoma: tumor biological aspects. *Biomed Pharmacother.* 59 Suppl 2:S351-4.
- Lin, Z., C. Gao, Y. Ning, X. He, W. Wu, and Y.G. Chen. 2008. The pseudoreceptor BMP and activin membrane-bound inhibitor positively modulates Wnt/beta-catenin signaling. *J Biol Chem.* 283:33053-8.
- Lindahl, T. 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature.* 362:709-15.
- Lippens, S., M. Kockx, M. Knaepen, L. Mortier, R. Polakowska, A. Verheyen, M. Garmyn, A. Zwijsen, P. Formstecher, D. Huylebroeck, P. Vandenabeele, and W. Declercq. 2000. Epidermal differentiation does not involve the pro-apoptotic executioner caspases, but is associated with caspase-14 induction and processing. *Cell Death Differ.* 7:1218-24.
- Lipscomb, L.A., M.E. Peek, M.L. Morningstar, S.M. Verghis, E.M. Miller, A. Rich, J.M. Essigmann, and L.D. Williams. 1995. X-ray structure of a DNA decamer containing 7,8-dihydro-8-oxoguanine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:719-23.
- Liu, L., S. Lee, J. Zhang, S.B. Peters, J. Hannah, Y. Zhang, Y. Yin, A. Koff, L. Ma, and P. Zhou. 2009. CUL4A abrogation augments DNA damage response and protection against skin carcinogenesis. *Mol Cell.* 34:451-60.
- Liu, S.C., S. Parsons, and P.C. Hanawalt. 1983. DNA repair in cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 81:179s-83s.
- Liu, X., Q. Jiang, S.G. Mansfield, M. Puttaraju, Y. Zhang, W. Zhou, J.A. Cohn, M.A. Garcia-Blanco, L.G. Mitchell, and J.F. Engelhardt. 2002. Partial correction of endogenous DeltaF508 CFTR in human cystic fibrosis airway epithelia by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Nat Biotechnol.* 20:47-52.
- Liu, Y., S. Lyle, Z. Yang, and G. Cotsarelis. 2003. Keratin 15 promoter targets putative epithelial stem cells in the hair follicle bulge. *J Invest Dermatol.* 121:963-8.
- Lloyd, S.A. 1993. Stratospheric ozone depletion. *Lancet.* 342:1156-8.
- Lockhart, D.J., and E.A. Winzeler. 2000. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature.* 405:827-36.
- Loeb, L.A., and R.J. Monnat, Jr. 2008. DNA polymerases and human disease. *Nat Rev Genet.* 9:594-604.
- Lommel, L., T. Ortolan, L. Chen, K. Madura, and K.S. Sweder. 2002. Proteolysis of a nucleotide excision repair protein by the 26 S proteasome. *Curr Genet.* 42:9-20.
- Lowell, S., P. Jones, I. Le Roux, J. Dunne, and F.M. Watt. 2000. Stimulation of human epidermal differentiation by delta-notch signalling at the boundaries of stem-cell clusters. *Curr Biol.* 10:491-500.
- Lu, J., and Y. Liu. 2010. Deletion of Ogg1 DNA glycosylase results in telomere base damage and length alteration in yeast. *EMBO J.* 29:398-409.

- Lu, Q.L., C.J. Mann, F. Lou, G. Bou-Gharios, G.E. Morris, S.A. Xue, S. Fletcher, T.A. Partridge, and S.D. Wilton. 2003. Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse. *Nat Med.* 9:1009-14.
- Lu, Z., and S. Ghazizadeh. 2007. Loss of transgene following ex vivo gene transfer is associated with a dominant Th2 response: implications for cutaneous gene therapy. *Mol Ther.* 15:954-61.
- Lutz, J., and U. Heemann. 2003. Tumours after kidney transplantation. *Curr Opin Urol.* 13:105-9.
- Lynch, H.T., B.C. Frichot, and J.F. Lynch. 1977. Cancer control in xeroderma pigmentosum. *Arch Dermatol.* 113:193-5.
- Lynley, A.M., and B.A. Dale. 1983. The characterization of human epidermal filaggrin. A histidine-rich, keratin filament-aggregating protein. *Biochim Biophys Acta.* 744:28-35.
- Maas-Szabowski, N., A. Shimotoyodome, and N.E. Fusenig. 1999. Keratinocyte growth regulation in fibroblast cocultures via a double paracrine mechanism. *J Cell Sci.* 112 (Pt 12):1843-53.
- Mackenzie, I.C. 1997. Retroviral transduction of murine epidermal stem cells demonstrates clonal units of epidermal structure. *J Invest Dermatol.* 109:377-83.
- Maeda, K., and M. Hatao. 2004. Involvement of photooxidation of melanogenic precursors in prolonged pigmentation induced by ultraviolet A. *J Invest Dermatol.* 122:503-9.
- Magnaldo, T., and Y. Barrandon. 1996. CD24 (heat stable antigen, nectadrin), a novel keratinocyte differentiation marker, is preferentially expressed in areas of the hair follicle containing the colony-forming cells. *J Cell Sci.* 109 (Pt 13):3035-45.
- Magnaldo, T., and A. Sarasin. 2001. Utilisation du gène marqueur CD24 pour la sélection des kératinocytes souches transformés par des séquences exogènes. *International Patent.* N° d'enregistrement : WO 03 004655.
- Magnaldo, T., and A. Sarasin. 2002. Genetic reversion of inherited skin disorders. *Mutat Res.* 509:211-220.
- Maguire, A.M., F. Simonelli, E.A. Pierce, E.N. Pugh, Jr., F. Mingozzi, J. Bennicelli, S. Banfi, K.A. Marshall, F. Testa, E.M. Surace, S. Rossi, A. Lyubarsky, V.R. Arruda, B. Konkle, E. Stone, J. Sun, J. Jacobs, L. Dell'Osso, R. Hertle, J.X. Ma, T.M. Redmond, X. Zhu, B. Hauck, O. Zeleniaia, K.S. Shindler, M.G. Maguire, J.F. Wright, N.J. Volpe, J.W. McDonnell, A. Auricchio, K.A. High, and J. Bennett. 2008. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med.* 358:2240-8.
- Maillard, O., S. Solyom, and H. Naegeli. 2007. An aromatic sensor with aversion to damaged strands confers versatility to DNA repair. *PLoS Biol.* 5:e79.
- Maksym, R.B., M. Tarnowski, K. Grymula, J. Tarnowska, M. Wysoczynski, R. Liu, B. Czerny, J. Ratajczak, M. Kucia, and M.Z. Ratajczak. 2009. The role of stromal-derived factor-1--CXCR7 axis in development and cancer. *Eur J Pharmacol.* 625:31-40.
- Mantena, S.K., S.M. Meeran, C.A. Elmets, and S.K. Katiyar. 2005. Orally administered green tea polyphenols prevent ultraviolet radiation-induced skin cancer in mice through activation of cytotoxic T cells and inhibition of angiogenesis in tumors. *J Nutr.* 135:2871-7.
- Maquat, L.E. 2005. Nonsense-mediated mRNA decay in mammals. *J Cell Sci.* 118:1773-6.
- Marchetto, M.C., R.G. Correa, C.F. Menck, and A.R. Muotri. 2006. Functional lentiviral vectors for xeroderma pigmentosum gene therapy. *J Biotechnol.* 126:424-30.
- Marchetto, M.C., A.R. Muotri, D.K. Burns, E.C. Friedberg, and C.F. Menck. 2004. Gene transduction in skin cells: preventing cancer in xeroderma pigmentosum mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:17759-64.
- Marini, F., T. Nardo, M. Giannattasio, M. Minuzzo, M. Stefanini, P. Plevani, and M. Muzi Falconi. 2006. DNA nucleotide excision repair-dependent signaling to checkpoint activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:17325-30.
- Marionnet, C., F. Bernerd, A. Dumas, F. Verrecchia, K. Mollier, D. Compan, B. Bernard, M. Lahfa, J. Leclaire, C. Medaisko, B. Mehul, S. Seite, A. Mauviel, and L. Dubertret. 2003. Modulation of gene expression induced in human epidermis by environmental stress in vivo. *J Invest Dermatol.* 121:1447-58.

- Marionnet, C., C. Pierrard, C. Vioux-Chagnoleau, J. Sok, D. Asselineau, and F. Bernerd. 2006. Interactions between fibroblasts and keratinocytes in morphogenesis of dermal epidermal junction in a model of reconstructed skin. *J Invest Dermatol.* 126:971-9.
- Marionnet, C., X. Quilliet, A. Benoit, J. Armier, A. Sarasin, and A. Stary. 1996. Recovery of normal DNA repair and mutagenesis in trichothiodystrophy cells after transduction of the *XPD* human gene. *Cancer Res.* 56:5450-5456.
- Markowitz, D., S. Goff, and A. Bank. 1988. A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids. *J Virol.* 62:1120-4.
- Marrot, L., J.P. Belaidi, C. Jones, P. Perez, and J.R. Meunier. 2005. Molecular responses to stress induced in normal human caucasian melanocytes in culture by exposure to simulated solar UV. *Photochem Photobiol.* 81:367-75.
- Maruggi, G., S. Porcellini, G. Facchini, S.K. Perna, C. Cattoglio, D. Sartori, A. Ambrosi, A. Schambach, C. Baum, C. Bonini, C. Bovolenta, F. Mavilio, and A. Recchia. 2009. Transcriptional enhancers induce insertional gene deregulation independently from the vector type and design. *Mol Ther.* 17:851-6.
- Masutani, C., M. Araki, K. Sugasawa, P.J. van der Spek, A. Yamada, A. Uchida, T. Maekawa, D. Bootsma, J.H. Hoeijmakers, and F. Hanaoka. 1997. Identification and characterization of XPC-binding domain of hHR23B. *Mol Cell Biol.* 17:6915-23.
- Masutani, C., R. Kusumoto, S. Iwai, and F. Hanaoka. 2000. Mechanisms of accurate translesion synthesis by human DNA polymerase eta. *EMBO J.* 19:3100-9.
- Masutani, C., R. Kusumoto, A. Yamada, N. Dohmae, M. Yokoi, M. Yuasa, M. Araki, S. Iwai, K. Takio, and F. Hanaoka. 1999. The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase eta. *Nature.* 399:700-4.
- Masutani, C., K. Sugasawa, J. Yanagisawa, T. Sonoyama, M. Ui, T. Enomoto, K. Takio, K. Tanaka, P.J. van der Spek, D. Bootsma, and et al. 1994. Purification and cloning of a nucleotide excision repair complex involving the xeroderma pigmentosum group C protein and a human homologue of yeast RAD23. *EMBO J.* 13:1831-43.
- Mathor, M.B., G. Ferrari, E. Dellambra, M. Cilli, F. Mavilio, R. Cancedda, and M. De Luca. 1996. Clonal analysis of stably transduced human epidermal stem cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:10371-6.
- Matsumura, Y., C. Nishigori, T. Yagi, S. Imamura, and H. Takebe. 1998. Characterization of molecular defects in xeroderma pigmentosum group F in relation to its clinically mild symptoms. *Hum Mol Genet.* 7:969-74.
- Matsunaga, T., D. Mu, C.H. Park, J.T. Reardon, and A. Sancar. 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. *J Biol Chem.* 270:20862-9.
- Matsuoka, S., B.A. Ballif, A. Smogorzewska, E.R. McDonald, 3rd, K.E. Hurov, J. Luo, C.E. Bakalarski, Z. Zhao, N. Solimini, Y. Lerenthal, Y. Shiloh, S.P. Gygi, and S.J. Elledge. 2007. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science.* 316:1160-6.
- Mavilio, F., G. Pellegrini, S. Ferrari, F. Di Nunzio, E. Di Iorio, A. Recchia, G. Maruggi, G. Ferrari, E. Provasi, C. Bonini, S. Capurro, A. Conti, C. Magnoni, A. Giannetti, and M. De Luca. 2006. Correction of junctional epidermolysis bullosa by transplantation of genetically modified epidermal stem cells. *Nat Med.* 12:1397-402.
- McAteer, K., Y. Jing, J. Kao, J.S. Taylor, and M.A. Kennedy. 1998. Solution-state structure of a DNA dodecamer duplex containing a Cis-syn thymine cyclobutane dimer, the major UV photoproduct of DNA. *J Mol Biol.* 282:1013-32.
- McGrath, J.A., B. Gatalica, A.M. Christiano, K. Li, K. Owaribe, J.R. McMillan, R.A. Eady, and J. Uitto. 1995. Mutations in the 180-kD bullous pemphigoid antigen (BPAG2), a hemidesmosomal transmembrane collagen (COL17A1), in generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. *Nat Genet.* 11:83-6.

- McMillan, J.R., M. Akiyama, and H. Shimizu. 2003. Epidermal basement membrane zone components: ultrastructural distribution and molecular interactions. *J Dermatol Sci.* 31:169-77.
- Medawar, A., T. Virolle, P. Rostagno, S. de la Forest-Divonne, K. Gambaro, M. Rouleau, and D. Aberdam. 2008. DeltaNp63 is essential for epidermal commitment of embryonic stem cells. *PLoS One.* 3:e3441.
- Meek, D.W. 2009. Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? *Nat Rev Cancer.* 9:714-23.
- Meeran, S.M., S. Akhtar, and S.K. Katiyar. 2009. Inhibition of UVB-induced skin tumor development by drinking green tea polyphenols is mediated through DNA repair and subsequent inhibition of inflammation. *J Invest Dermatol.* 129:1258-70.
- Melis, J.P., S.W. Wijnhoven, R.B. Beems, M. Roodbergen, J. van den Berg, H. Moon, E. Friedberg, G.T. van der Horst, J.H. Hoeijmakers, J. Vijg, and H. van Steeg. 2008. Mouse models for xeroderma pigmentosum group A and group C show divergent cancer phenotypes. *Cancer Res.* 68:1347-53.
- Mellon, I., G. Spivak, and P.C. Hanawalt. 1987. Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene. *Cell.* 51:241-9.
- Melo, J., and D. Toczyski. 2002. A unified view of the DNA-damage checkpoint. *Curr Opin Cell Biol.* 14:237-45.
- Menck, C.F., M.G. Armelini, and K.M. Lima-Bessa. 2007. On the search for skin gene therapy strategies of xeroderma pigmentosum disease. *Curr Gene Ther.* 7:163-74.
- Merad, M., F. Ginhoux, and M. Collin. 2008. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat Rev Immunol.* 8:935-47.
- Miao, C.H., R.O. Snyder, D.B. Schowalter, G.A. Patijn, B. Donahue, B. Winther, and M.A. Kay. 1998. The kinetics of rAAV integration in the liver. *Nat Genet.* 19:13-5.
- Miao, Z., K.E. Luker, B.C. Summers, R. Berahovich, M.S. Bhojani, A. Rehemtulla, C.G. Kleer, J.J. Essner, A. Nasevicius, G.D. Luker, M.C. Howard, and T.J. Schall. 2007. CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:15735-40.
- Miaskiewicz, K., J. Miller, M. Cooney, and R. Osman. 1996. Computational Simulations of DNA Distortions by a cis,syn-Cyclobutane Thymine Dimer Lesion. *Journal of the American Chemical Society.* 118:9156-9163.
- Miller, A.J., and M.C. Mihm, Jr. 2006. Melanoma. *N Engl J Med.* 355:51-65.
- Miller, D.G., M.A. Adam, and A.D. Miller. 1990. Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol Cell Biol.* 10:4239-42.
- Mills, A.A., B. Zheng, X.J. Wang, H. Vogel, D.R. Roop, and A. Bradley. 1999. p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature.* 398:708-13.
- Min, J.H., and N.P. Pavletich. 2007. Recognition of DNA damage by the Rad4 nucleotide excision repair protein. *Nature.* 449:570-5.
- Miron, S., P. Duchambon, Y. Blouquit, D. Durand, and C.T. Craescu. 2008. The carboxy-terminal domain of xeroderma pigmentosum complementation group C protein, involved in TFIIH and centrin binding, is highly disordered. *Biochemistry.* 47:1403-13.
- Mischke, D., B.P. Korge, I. Marenholz, A. Volz, and A. Ziegler. 1996. Genes encoding structural proteins of epidermal cornification and S100 calcium-binding proteins form a gene complex ("epidermal differentiation complex") on human chromosome 1q21. *J Invest Dermatol.* 106:989-92.
- Mitchell, D.L. 2000. Effects of cytosine methylation on pyrimidine dimer formation in DNA. *Photochem Photobiol.* 71:162-5.
- Mitchell, D.L., D.E. Brash, and R.S. Nairn. 1990. Rapid repair kinetics of pyrimidine(6-4)pyrimidone photoproducts in human cells are due to excision rather than conformational change. *Nucleic Acids Res.* 18:963-71.

- Mitchell, R.S., B.F. Beitzel, A.R. Schroder, P. Shinn, H. Chen, C.C. Berry, J.R. Ecker, and F.D. Bushman. 2004. Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences. *PLoS Biol.* 2:E234.
- Miyashita, T., and J.C. Reed. 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell.* 80:293-9.
- Miyoshi, H., U. Blomer, M. Takahashi, F.H. Gage, and I.M. Verma. 1998. Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J Virol.* 72:8150-7.
- Moggs, J.G., K.J. Yarema, J.M. Essigmann, and R.D. Wood. 1996. Analysis of incision sites produced by human cell extracts and purified proteins during nucleotide excision repair of a 1,3-intrastrand d(GpTpG)-cisplatin adduct. *J Biol Chem.* 271:7177-86.
- Moll, R., M. Divo, and L. Langbein. 2008. The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol.* 129:705-33.
- Montini, E., D. Cesana, M. Schmidt, F. Sanvito, M. Ponzoni, C. Bartholomae, L. Sergi Sergi, F. Benedicenti, A. Ambrosi, C. Di Serio, C. Doglioni, C. von Kalle, and L. Naldini. 2006. Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration. *Nat Biotechnol.* 24:687-96.
- Morgan, J.R., Y. Barrandon, H. Green, and R.C. Mulligan. 1987. Expression of an exogenous growth hormone gene by transplantable human epidermal cells. *Science.* 237:1476-9.
- Morris, R.J., Y. Liu, L. Marles, Z. Yang, C. Trempus, S. Li, J.S. Lin, J.A. Sawicki, and G. Cotsarelis. 2004. Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. *Nat Biotechnol.* 22:411-7.
- Morrison, S.J., N.M. Shah, and D.J. Anderson. 1997. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell.* 88:287-98.
- Moser, J., M. Volker, H. Kool, S. Alekseev, H. Vrieling, A. Yasui, A.A. van Zeeland, and L.H. Mullenders. 2005. The UV-damaged DNA binding protein mediates efficient targeting of the nucleotide excision repair complex to UV-induced photo lesions. *DNA Repair (Amst).* 4:571-82.
- Mouret, S., C. Baudouin, M. Charveron, A. Favier, J. Cadet, and T. Douki. 2006. Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:13765-70.
- Muotri, A.R., M.C. Marchetto, L.F. Zerbini, T.A. Libermann, A.M. Ventura, A. Sarasin, and C.F. Menck. 2002. Complementation of the DNA repair deficiency in human xeroderma pigmentosum group a and C cells by recombinant adenovirus-mediated gene transfer. *Hum Gene Ther.* 13:1833-44.
- Murray-Zmijewski, F., E.A. Slee, and X. Lu. 2008. A complex barcode underlies the heterogeneous response of p53 to stress. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:702-12.
- Nagase, H., and J.F. Woessner, Jr. 1999. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 274:21491-4.
- Nakabayashi, K., D. Amann, Y. Ren, U. Saarialho-Kere, N. Avidan, S. Gentles, J.R. MacDonald, E.G. Puffenberger, A.M. Christiano, A. Martinez-Mir, J.C. Salas-Alanis, R. Rizzo, E. Vamos, A. Raams, C. Les, E. Seboun, N.G. Jaspers, J.S. Beckmann, C.E. Jackson, and S.W. Scherer. 2005. Identification of C7orf11 (TTDN1) gene mutations and genetic heterogeneity in nonphotosensitive trichothiodystrophy. *Am J Hum Genet.* 76:510-6.
- Nakanishi, M., H. Niida, H. Murakami, and M. Shimada. 2009. DNA damage responses in skin biology-implications in tumor prevention and aging acceleration. *J Dermatol Sci.* 56:76-81.
- Nakazawa, H., D. English, P.L. Randell, K. Nakazawa, N. Martel, B.K. Armstrong, and H. Yamasaki. 1994. UV and skin cancer: specific p53 gene mutation in normal skin as a biologically relevant exposure measurement. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:360-4.
- Naumann, U., E. Cameroni, M. Pruenster, H. Mahabaleshwar, E. Raz, H.G. Zerwes, A. Rot, and M. Thelen. 2010. CXCR7 functions as a scavenger for CXCL12 and CXCL11. *PLoS One.* 5:e9175.
- Nelson, K.K., and J.A. Melendez. 2004. Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases. *Free Radic Biol Med.* 37:768-84.

- Nelson, K.K., S. Subbaram, K.M. Connor, J. Dasgupta, X.F. Ha, T.C. Meng, N.K. Tonks, and J.A. Melendez. 2006. Redox-dependent matrix metalloproteinase-1 expression is regulated by JNK through Ets and AP-1 promoter motifs. *J Biol Chem.* 281:14100-10.
- Nelson, M.A., J.G. Einspahr, D.S. Alberts, C.A. Balfour, J.A. Wymer, K.L. Welch, S.J. Salasche, J.L. Bangert, T.M. Grogan, and P.O. Bozzo. 1994. Analysis of the p53 gene in human precancerous actinic keratosis lesions and squamous cell cancers. *Cancer Lett.* 85:23-9.
- Nelson, W.G., and T.T. Sun. 1983. The 50- and 58-kdalton keratin classes as molecular markers for stratified squamous epithelia: cell culture studies. *J Cell Biol.* 97:244-51.
- Neumann, E., S. Kakorin, and K. Toensing. 1999. Fundamentals of electroporative delivery of drugs and genes. *Bioelectrochem Bioenerg.* 48:3-16.
- Newman, J.C., A.D. Bailey, and A.M. Weiner. 2006. Cockayne syndrome group B protein (CSB) plays a general role in chromatin maintenance and remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:9613-8.
- Ng, J.M., W. Vermeulen, G.T. van der Horst, S. Bergink, K. Sugasawa, H. Vrieling, and J.H. Hoeijmakers. 2003. A novel regulation mechanism of DNA repair by damage-induced and RAD23-dependent stabilization of xeroderma pigmentosum group C protein. *Genes Dev.* 17:1630-45.
- Ng, J.M., H. Vrieling, K. Sugasawa, M.P. Ooms, J.A. Grootegoed, J.T. Vreeburg, P. Visser, R.B. Beems, T.G. Gorgels, F. Hanaoka, J.H. Hoeijmakers, and G.T. van der Horst. 2002. Developmental defects and male sterility in mice lacking the ubiquitin-like DNA repair gene mHR23B. *Mol Cell Biol.* 22:1233-45.
- Nichols, J.A., and S.K. Katiyar. 2010. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Arch Dermatol Res.* 302:71-83.
- Nishi, R., Y. Okuda, E. Watanabe, T. Mori, S. Iwai, C. Masutani, K. Sugasawa, and F. Hanaoka. 2005. Centrin 2 stimulates nucleotide excision repair by interacting with xeroderma pigmentosum group C protein. *Mol Cell Biol.* 25:5664-74.
- Nishioka, K., T. Ohtsubo, H. Oda, T. Fujiwara, D. Kang, K. Sugimachi, and Y. Nakabeppu. 1999. Expression and differential intracellular localization of two major forms of human 8-oxoguanine DNA glycosylase encoded by alternatively spliced OGG1 mRNAs. *Mol Biol Cell.* 10:1637-52.
- Norris, P.G., G.A. Limb, A.S. Hamblin, and J.L. Hawk. 1988. Impairment of natural-killer-cell activity in xeroderma pigmentosum. *N Engl J Med.* 319:1668-9.
- Norris, P.G., G.A. Limb, A.S. Hamblin, A.R. Lehmann, C.F. Arlett, J. Cole, A.P. Waugh, and J.L. Hawk. 1990. Immune function, mutant frequency, and cancer risk in the DNA repair defective genodermatoses xeroderma pigmentosum, Cockayne's syndrome, and trichothiodystrophy. *J Invest Dermatol.* 94:94-100.
- Norval, M. 2006. The mechanisms and consequences of ultraviolet-induced immunosuppression. *Prog Biophys Mol Biol.* 92:108-18.
- Nouspikel, T., and P.C. Hanawalt. 2002. DNA repair in terminally differentiated cells. *DNA Repair (Amst).* 1:59-75.
- Ogi, T., S. Limsirichaikul, R.M. Overmeer, M. Volker, K. Takenaka, R. Cloney, Y. Nakazawa, A. Niimi, Y. Miki, N.G. Jaspers, L.H. Mullenders, S. Yamashita, M.I. Foustari, and A.R. Lehmann. 2010. Three DNA Polymerases, Recruited by Different Mechanisms, Carry Out NER Repair Synthesis in Human Cells. *Mol Cell.* 37:714-727.
- Oh, D.H., and K. Yeh. 2005. Differentiating human keratinocytes are deficient in p53 but retain global nucleotide excision repair following ultraviolet radiation. *DNA Repair (Amst).* 4:1149-59.
- Ohyama, M., A. Terunuma, C.L. Tock, M.F. Radonovich, C.A. Pise-Masison, S.B. Hopping, J.N. Brady, M.C. Udey, and J.C. Vogel. 2006. Characterization and isolation of stem cell-enriched human hair follicle bulge cells. *J Clin Invest.* 116:249-60.
- Ohyama, M., J.C. Vogel, and M. Amagai. 2007. Gene ontology analysis of human hair follicle bulge molecular signature. *J Dermatol Sci.* 45:147-50.

- Okuda, Y., R. Nishi, J.M. Ng, W. Vermeulen, G.T. van der Horst, T. Mori, J.H. Hoeijmakers, F. Hanaoka, and K. Sugawara. 2004. Relative levels of the two mammalian Rad23 homologs determine composition and stability of the xeroderma pigmentosum group C protein complex. *DNA Repair (Amst)*. 3:1285-95.
- Orimo, A., P.B. Gupta, D.C. Sgroi, F. Arenzana-Seisdedos, T. Delaunay, R. Naeem, V.J. Carey, A.L. Richardson, and R.A. Weinberg. 2005. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*. 121:335-48.
- Ortiz-Urda, S., Q. Lin, C.L. Green, D.R. Keene, M.P. Marinkovich, and P.A. Khavari. 2003a. Injection of genetically engineered fibroblasts corrects regenerated human epidermolysis bullosa skin tissue. *J Clin Invest*. 111:251-5.
- Ortiz-Urda, S., Q. Lin, S.R. Yant, D. Keene, M.A. Kay, and P.A. Khavari. 2003b. Sustainable correction of junctional epidermolysis bullosa via transposon-mediated nonviral gene transfer. *Gene Ther*. 10:1099-104.
- Ortiz-Urda, S., B. Thyagarajan, D.R. Keene, Q. Lin, M. Fang, M.P. Calos, and P.A. Khavari. 2002. Stable nonviral genetic correction of inherited human skin disease. *Nat Med*. 8:1166-70.
- Otto, A., L. Riou, C. Marionnet, T. Mori, A. Sarasin, and T. Magraldo. 1999a. Differential behaviors toward ultraviolet A and B radiations of fibroblasts and keratinocytes from normal and DNA-repair deficient individuals. *Cancer Res*. 59:1212-1218.
- Otto, A.I., L. Riou, C. Marionnet, T. Mori, A. Sarasin, and T. Magraldo. 1999b. Differential behaviors toward ultraviolet A and B radiation of fibroblasts and keratinocytes from normal and DNA-repair-deficient patients. *Cancer Res*. 59:1212-8.
- Owens, D.M., and F.M. Watt. 2003. Contribution of stem cells and differentiated cells to epidermal tumours. *Nat Rev Cancer*. 3:444-51.
- Page, S.M., and G.G. Brownlee. 1998. Differentiation-specific enhancer activity in transduced keratinocytes: a model for epidermal gene therapy. *Gene Ther*. 5:394-402.
- Pascucci, B., A. Versteegh, A. van Hoffen, A.A. van Zeeland, L.H. Mullenders, and E. Dogliotti. 1997. DNA repair of UV photoproducts and mutagenesis in human mitochondrial DNA. *J Mol Biol*. 273:417-27.
- Passeron, T., and J.P. Ortonne. 2003. [Skin ageing and its prevention]. *Presse Med*. 32:1474-82.
- Passos, J.F., and T. Von Zglinicki. 2006. Oxygen free radicals in cell senescence: are they signal transducers? *Free Radic Res*. 40:1277-83.
- Pear, W.S., G.P. Nolan, M.L. Scott, and D. Baltimore. 1993. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:8392-6.
- Peden, C.S., C. Burger, N. Muzyczka, and R.J. Mandel. 2004. Circulating anti-wild-type adeno-associated virus type 2 (AAV2) antibodies inhibit recombinant AAV2 (rAAV2)-mediated, but not rAAV5-mediated, gene transfer in the brain. *J Virol*. 78:6344-59.
- Pellegrini, G., E. Dellambra, O. Golisano, E. Martinelli, I. Fantozzi, S. Bondanza, D. Ponzin, F. McKeon, and M. De Luca. 2001. p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:3156-61.
- Pellegrini, G., R. Ranno, G. Stracuzzi, S. Bondanza, L. Guerra, G. Zambruno, G. Micali, and M. De Luca. 1999. The control of epidermal stem cells (holoclones) in the treatment of massive full-thickness burns with autologous keratinocytes cultured on fibrin. *Transplantation*. 68:868-79.
- Pelletier, R., S.O. Caron, and J. Puymirat. 2006. RNA based gene therapy for dominantly inherited diseases. *Curr Gene Ther*. 6:131-46.
- Peng, W., and B.R. Shaw. 1996. Accelerated deamination of cytosine residues in UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers leads to CC->TT transitions. *Biochemistry*. 35:10172-81.
- Perdiz, D., P. Grof, M. Mezzina, O. Nikaido, E. Moustacchi, and E. Sage. 2000. Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells. Possible role of Dewar photoproducts in solar mutagenesis. *J Biol Chem*. 275:26732-42.

- Persson, A.E., D.W. Edstrom, H. Backvall, J. Lundeberg, F. Ponten, A.M. Ros, and C. Williams. 2002. The mutagenic effect of ultraviolet-A1 on human skin demonstrated by sequencing the p53 gene in single keratinocytes. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 18:287-93.
- Peus, D., R.A. Vasa, A. Beyerle, A. Meves, C. Krautmacher, and M.R. Pittelkow. 1999. UVB activates ERK1/2 and p38 signaling pathways via reactive oxygen species in cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 112:751-6.
- Peus, D., R.A. Vasa, A. Meves, M. Pott, A. Beyerle, K. Squillace, and M.R. Pittelkow. 1998. H₂O₂ is an important mediator of UVB-induced EGF-receptor phosphorylation in cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 110:966-71.
- Pfeifer, G.P., R. Drouin, A.D. Riggs, and G.P. Holmquist. 1991. In vivo mapping of a DNA adduct at nucleotide resolution: detection of pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts by ligation-mediated polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:1374-8.
- Pfeifer, G.P., Y.H. You, and A. Besaratinia. 2005. Mutations induced by ultraviolet light. *Mutat Res.* 571:19-31.
- Pingoud, A., and G.H. Silva. 2007. Precision genome surgery. *Nat Biotechnol.* 25:743-4.
- Potten, C.S. 1974. The epidermal proliferative unit: the possible role of the central basal cell. *Cell Tissue Kinet.* 7:77-88.
- Puttaraju, M., S.F. Jamison, S.G. Mansfield, M.A. Garcia-Blanco, and L.G. Mitchell. 1999. Spliceosome-mediated RNA trans-splicing as a tool for gene therapy. *Nat Biotechnol.* 17:246-52.
- Quan, T., Z. Qin, W. Xia, Y. Shao, J.J. Voorhees, and G.J. Fisher. 2009. Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 14:20-4.
- Quilliet, X., O. Chevallier-Lagente, E. Eveno, T. Stojkovic, A. Destee, A. Sarasin, and M. Mezzina. 1996. Long-term complementation of DNA repair deficient human primary fibroblasts by retroviral transduction of the XPD gene. *Mutat Res.* 364:161-9.
- Quilliet, X., O. Chevallier-Lagente, L. Zeng, R. Calvayrac, M. Mezzina, A. Sarasin, and M. Vuillaume. 1997. Retroviral-mediated correction of DNA repair defect in xeroderma pigmentosum cells is associated with recovery of catalase activity. *Mutat Res.* 385:235-42.
- Rady, P., F. Scinicariello, R.F. Wagner, Jr., and S.K. Tying. 1992. p53 mutations in basal cell carcinomas. *Cancer Res.* 52:3804-6.
- Rass, K., and J. Reichrath. 2008. UV damage and DNA repair in malignant melanoma and nonmelanoma skin cancer. *Adv Exp Med Biol.* 624:162-78.
- Ravanat, J.L., T. Douki, and J. Cadet. 2001. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *J Photochem Photobiol B.* 63:88-102.
- Ray, A., S.N. Mir, G. Wani, Q. Zhao, A. Battu, Q. Zhu, Q.E. Wang, and A.A. Wani. 2009. Human SNF5/INI1, a component of the human SWI/SNF chromatin remodeling complex, promotes nucleotide excision repair by influencing ATM recruitment and downstream H2AX phosphorylation. *Mol Cell Biol.* 29:6206-19.
- Redondo, P., J. Prieto, I.G. Munoz, A. Alibes, F. Stricher, L. Serrano, J.P. Cabaniols, F. Daboussi, S. Arnould, C. Perez, P. Duchateau, F. Paques, F.J. Blanco, and G. Montoya. 2008. Molecular basis of xeroderma pigmentosum group C DNA recognition by engineered meganucleases. *Nature.* 456:107-11.
- Regl, G., G.W. Neill, T. Eichberger, M. Kasper, M.S. Ikram, J. Koller, H. Hintner, A.G. Quinn, A.M. Frischauf, and F. Aberger. 2002. Human GLI2 and GLI1 are part of a positive feedback mechanism in Basal Cell Carcinoma. *Oncogene.* 21:5529-39.
- Rehman, A.O., and C.Y. Wang. 2008. SDF-1alpha promotes invasion of head and neck squamous cell carcinoma by activating NF-kappaB. *J Biol Chem.* 283:19888-94.
- Rezvani, H.R., S. Dedieu, S. North, F. Belloc, R. Rossignol, T. Letellier, H. de Verneuil, A. Taieb, and F. Mazurier. 2007. Hypoxia-inducible factor-1alpha, a key factor in the keratinocyte response to UVB exposure. *J Biol Chem.* 282:16413-22.

- Rezvani, H.R., W. Mahfouf, N. Ali, C. Chemin, C. Ged, A.L. Kim, H. de Verneuil, A. Taieb, D.R. Bickers, and F. Mazurier. 2009. Hypoxia-inducible factor-1{alpha} regulates the expression of nucleotide excision repair proteins in keratinocytes. *Nucleic Acids Res.* 38:797-809.
- Rheinwald, J.G., and H. Green. 1975. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell.* 6:331-43.
- Rheinwald, J.G., and H. Green. 1977. Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes. *Nature.* 265:421-4.
- Ridley, A.J., J.R. Whiteside, T.J. McMillan, and S.L. Allinson. 2009. Cellular and sub-cellular responses to UVA in relation to carcinogenesis. *Int J Radiat Biol.* 85:177-95.
- Riedl, T., F. Hanaoka, and J.M. Egly. 2003. The comings and goings of nucleotide excision repair factors on damaged DNA. *EMBO J.* 22:5293-303.
- Rittie, L., and G.J. Fisher. 2002. UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Res Rev.* 1:705-20.
- Robbins, J.H., R.A. Brumback, M. Mendiones, S.F. Barrett, J.R. Carl, S. Cho, M.B. Denckla, M.B. Ganges, L.H. Gerber, R.A. Guthrie, and et al. 1991. Neurological disease in xeroderma pigmentosum. Documentation of a late onset type of the juvenile onset form. *Brain.* 114 (Pt 3):1335-61.
- Robbins, P.B., Q. Lin, J.B. Goodnough, H. Tian, X. Chen, and P.A. Khavari. 2001. In vivo restoration of laminin 5 beta 3 expression and function in junctional epidermolysis bullosa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:5193-5198.
- Robert, C., B. Muel, A. Benoit, L. Dubertret, A. Sarasin, and A. Stary. 1996. Cell survival and shuttle vector mutagenesis induced by ultraviolet A and ultraviolet B radiation in a human cell line. *J Invest Dermatol.* 106:721-8.
- Robinson, J.K., and M. Dahiya. 2003. Basal cell carcinoma with pulmonary and lymph node metastasis causing death. *Arch Dermatol.* 139:643-8.
- Rochat, A., K. Kobayashi, and Y. Barrandon. 1994. Location of stem cells of human hair follicles by clonal analysis. *Cell.* 76:1063-73.
- Rochette, P.J., J.P. Therrien, R. Drouin, D. Perdiz, N. Bastien, E.A. Drobetsky, and E. Sage. 2003. UVA-induced cyclobutane pyrimidine dimers form predominantly at thymine-thymine dipyrimidines and correlate with the mutation spectrum in rodent cells. *Nucleic Acids Res.* 31:2786-94.
- Roe, T., T.C. Reynolds, G. Yu, and P.O. Brown. 1993. Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *EMBO J.* 12:2099-108.
- Ronfard, V., J.M. Rives, Y. Neveux, H. Carsin, and Y. Barrandon. 2000. Long-term regeneration of human epidermis on third degree burns transplanted with autologous cultured epithelium grown on a fibrin matrix. *Transplantation.* 70:1588-98.
- Rothe, M., D. Werner, and H.W. Thielmann. 1993. Enhanced expression of mitochondrial genes in xeroderma pigmentosum fibroblast strains from various complementation groups. *J Cancer Res Clin Oncol.* 119:675-84.
- Routaboul, C., A. Denis, and A. Vinche. 1999. Immediate pigment darkening: description, kinetic and biological function. *Eur J Dermatol.* 9:95-9.
- Roy, R., J.P. Adamczewski, T. Seroz, W. Vermeulen, J.P. Tassan, L. Schaeffer, E.A. Nigg, J.H. Hoeijmakers, and J.M. Egly. 1994. The MO15 cell cycle kinase is associated with the TFIIH transcription-DNA repair factor. *Cell.* 79:1093-101.
- Rubin, A.I., E.H. Chen, and D. Ratner. 2005. Basal-cell carcinoma. *N Engl J Med.* 353:2262-9.
- Rundhaug, J.E., and S.M. Fischer. 2008. Cyclo-oxygenase-2 plays a critical role in UV-induced skin carcinogenesis. *Photochem Photobiol.* 84:322-9.
- Russell, D.W., A.D. Miller, and I.E. Alexander. 1994. Adeno-associated virus vectors preferentially transduce cells in S phase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:8915-9.

- Russo, A.E., E. Torrisi, Y. Bevelacqua, R. Perrotta, M. Libra, J.A. McCubrey, D.A. Spandidos, F. Stivala, and G. Malaponte. 2009. Melanoma: molecular pathogenesis and emerging target therapies (Review). *Int J Oncol.* 34:1481-9.
- Ruven, H.J., R.J. Berg, C.M. Seelen, J.A. Dekkers, P.H. Lohman, L.H. Mullenders, and A.A. van Zeeland. 1993. Ultraviolet-induced cyclobutane pyrimidine dimers are selectively removed from transcriptionally active genes in the epidermis of the hairless mouse. *Cancer Res.* 53:1642-5.
- Sage, E. 1993. Distribution and repair of photolesions in DNA: genetic consequences and the role of sequence context. *Photochem Photobiol.* 57:163-74.
- Sagiv, E., and N. Arber. 2008. The novel oncogene CD24 and its arising role in the carcinogenesis of the GI tract: from research to therapy. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2:125-33.
- Salisbury, J.L., K.M. Suino, R. Busby, and M. Springett. 2002. Centrin-2 is required for centriole duplication in mammalian cells. *Curr Biol.* 12:1287-92.
- Sancar, A., L.A. Lindsey-Boltz, K. Unsal-Kacmaz, and S. Linn. 2004. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem.* 73:39-85.
- Sands, A.T., A. Abuin, A. Sanchez, C.J. Conti, and A. Bradley. 1995. High susceptibility to ultraviolet-induced carcinogenesis in mice lacking XPC. *Nature.* 377:162-5.
- Schaeffer, L., R. Roy, S. Humbert, V. Moncollin, W. Vermeulen, J.H. Hoeijmakers, P. Chambon, and J.M. Egly. 1993. DNA repair helicase: a component of BTF2 (TFIIH) basic transcription factor. *Science.* 260:58-63.
- Schallreuter, K.U. 1999. Pseudocatalase treatment in xeroderma pigmentosum: a case report. *Br J Dermatol.* 140:1190-1.
- Schambach, A., J. Bohne, S. Chandra, E. Will, G.P. Margison, D.A. Williams, and C. Baum. 2006. Equal potency of gammaretroviral and lentiviral SIN vectors for expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in hematopoietic cells. *Mol Ther.* 13:391-400.
- Scharffetter, K., M. Wlaschek, A. Hogg, K. Bolsen, A. Schothorst, G. Goerz, T. Krieg, and G. Plewig. 1991. UVA irradiation induces collagenase in human dermal fibroblasts in vitro and in vivo. *Arch Dermatol Res.* 283:506-11.
- Scheidemann, F., M. Loser, A. Niedermeier, A. Kromminga, J.P. Therrien, J. Vogel, and W. Pflutzner. 2008. The skin as a biofactory for systemic secretion of erythropoietin: potential of genetically modified keratinocytes and fibroblasts. *Exp Dermatol.* 17:481-8.
- Schneider, T.E., C. Barland, A.M. Alex, M.L. Mancianti, Y. Lu, J.E. Cleaver, H.J. Lawrence, and R. Ghadially. 2003. Measuring stem cell frequency in epidermis: a quantitative in vivo functional assay for long-term repopulating cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:11412-7.
- Schroder, A.R., P. Shinn, H. Chen, C. Berry, J.R. Ecker, and F. Bushman. 2002. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell.* 110:521-9.
- Schule, R., P. Rangarajan, N. Yang, S. Kliewer, L.J. Ransone, J. Bolado, I.M. Verma, and R.M. Evans. 1991. Retinoic acid is a negative regulator of AP-1-responsive genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:6092-6.
- Scott, K.A., E.J. Wood, and E.H. Karran. 1998. A matrix metalloproteinase inhibitor which prevents fibroblast-mediated collagen lattice contraction. *FEBS Lett.* 441:137-40.
- Scrima, A., R. Konickova, B.K. Czyzewski, Y. Kawasaki, P.D. Jeffrey, R. Groisman, Y. Nakatani, S. Iwai, N.P. Pavletich, and N.H. Thoma. 2008. Structural basis of UV DNA-damage recognition by the DDB1-DDB2 complex. *Cell.* 135:1213-23.
- Segura, M.M., R. Alba, A. Bosch, and M. Chillon. 2008. Advances in helper-dependent adenoviral vector research. *Curr Gene Ther.* 8:222-35.
- Seitz, C.S., G.J. Giudice, S.D. Balding, M.P. Marinkovich, and P.A. Khavari. 1999. BP180 gene delivery in junctional epidermolysis bullosa. *Gene Ther.* 6:42-7.
- Selby, C.P., R. Drapkin, D. Reinberg, and A. Sancar. 1997. RNA polymerase II stalled at a thymine dimer: footprint and effect on excision repair. *Nucleic Acids Res.* 25:787-93.
- Sen, C.K., and L. Packer. 1996. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J.* 10:709-20.

- Senoo, M., F. Pinto, C.P. Crum, and F. McKeon. 2007. p63 Is essential for the proliferative potential of stem cells in stratified epithelia. *Cell*. 129:523-36.
- Serrano, F., M. Del Rio, F. Larcher, M. Garcia, E. Munoz, M.J. Escamez, M. Munoz, A. Meana, A. Bernad, and J.L. Jorcano. 2003. A comparison of targeting performance of oncoretroviral versus lentiviral vectors on human keratinocytes. *Hum Gene Ther*. 14:1579-85.
- Sesto, A., M. Navarro, F. Burslem, and J.L. Jorcano. 2002. Analysis of the ultraviolet B response in primary human keratinocytes using oligonucleotide microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:2965-70.
- Shaulian, E., and M. Karin. 2002. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol*. 4:E131-6.
- Shibutani, S., M. Takeshita, and A.P. Grollman. 1991. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature*. 349:431-4.
- Shimizu, Y., S. Iwai, F. Hanaoka, and K. Sugawara. 2003. Xeroderma pigmentosum group C protein interacts physically and functionally with thymine DNA glycosylase. *EMBO J*. 22:164-73.
- Shivji, K.K., M.K. Kenny, and R.D. Wood. 1992. Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair. *Cell*. 69:367-74.
- Silva-Vargas, V., C. Lo Celso, A. Giangreco, T. Ofstad, D.M. Prowse, K.M. Braun, and F.M. Watt. 2005. Beta-catenin and Hedgehog signal strength can specify number and location of hair follicles in adult epidermis without recruitment of bulge stem cells. *Dev Cell*. 9:121-31.
- Simon, M.C. 2006. Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypoxic HIF alpha stabilization. *Adv Exp Med Biol*. 588:165-70.
- Sivamani, R.K., S.T. Lam, and R.R. Isseroff. 2007. Beta adrenergic receptors in keratinocytes. *Dermatol Clin*. 25:643-53, x.
- Slor, H., S. Batko, S.G. Khan, T. Sobe, S. Emmert, A. Khadavi, A. Frumkin, D.B. Busch, R.B. Albert, and K.H. Kraemer. 2000. Clinical, cellular, and molecular features of an Israeli xeroderma pigmentosum family with a frameshift mutation in the XPC gene: sun protection prolongs life. *J Invest Dermatol*. 115:974-80.
- Smith, F.J., R.A. Eady, I.M. Leigh, J.R. McMillan, E.L. Rugg, D.P. Kelsell, S.P. Bryant, N.K. Spurr, J.F. Geddes, G. Kirtschig, G. Milana, A.G. de Bono, K. Owaribe, G. Wiche, L. Pulkkinen, J. Uitto, W.H. McLean, and E.B. Lane. 1996. Plectin deficiency results in muscular dystrophy with epidermolysis bullosa. *Nat Genet*. 13:450-7.
- Smith, S.C., G. Oxford, Z. Wu, M.D. Nitz, M. Conaway, H.F. Frierson, G. Hampton, and D. Theodorescu. 2006. The metastasis-associated gene CD24 is regulated by Ral GTPase and is a mediator of cell proliferation and survival in human cancer. *Cancer Res*. 66:1917-22.
- Smola, H., H.J. Stark, G. Thiekotter, N. Mirancea, T. Krieg, and N.E. Fusenig. 1998. Dynamics of basement membrane formation by keratinocyte-fibroblast interactions in organotypic skin culture. *Exp Cell Res*. 239:399-410.
- Soehnge, H., A. Ouhtit, and O.N. Ananthaswamy. 1997. Mechanisms of induction of skin cancer by UV radiation. *Front Biosci*. 2:d538-51.
- Sollitto, R.B., K.H. Kraemer, and J.J. DiGiovanna. 1997. Normal vitamin D levels can be maintained despite rigorous photoprotection: six years' experience with xeroderma pigmentosum. *J Am Acad Dermatol*. 37:942-7.
- Soneoka, Y., P.M. Cannon, E.E. Ramsdale, J.C. Griffiths, G. Romano, S.M. Kingsman, and A.J. Kingsman. 1995. A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Res*. 23:628-33.
- Song, X., N. Mosby, J. Yang, A. Xu, Z. Abdel-Malek, and A.L. Kadakaro. 2009. alpha-MSH activates immediate defense responses to UV-induced oxidative stress in human melanocytes. *Pigment Cell Melanoma Res*. 22:809-18.
- Sorrell, J.M., M.A. Baber, and A.I. Caplan. 2004. Site-matched papillary and reticular human dermal fibroblasts differ in their release of specific growth factors/cytokines and in their interaction with keratinocytes. *J Cell Physiol*. 200:134-45.

- Sorrell, J.M., and A.I. Caplan. 2004. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *J Cell Sci.* 117:667-75.
- Soufir, N., C. Ged, A. Bourillon, F. Austerlitz, C. Chemin, A. Stary, J. Armier, D. Pham, K. Khadir, J. Roume, S. Hadj-Rabia, B. Bouadjar, A. Taieb, H. de Verneuil, H. Benchiki, B. Grandchamp, and A. Sarasin. 2010. A Prevalent Mutation with Founder Effect in Xeroderma Pigmentosum Group C from North Africa. *J Invest Dermatol.*
- Spatz, A., G. Giglia-Mari, S. Benhamou, and A. Sarasin. 2001. Association between DNA repair-deficiency and high level of p53 mutations in melanoma of Xeroderma pigmentosum. *Cancer Res.* 61:2480-6.
- Spector, T.I., T.E. Cheatham, and P.A. Kollman. 1997. Unrestrained Molecular Dynamics of Photodamaged DNA in Aqueous Solution. *Journal of the American Chemical Society.* 119:7095-7104.
- Stagos, D., Y. Chen, M. Cantore, J.V. Jester, and V. Vasiliou. 2010. Corneal aldehyde dehydrogenases: multiple functions and novel nuclear localization. *Brain Res Bull.* 81:211-8.
- Staresinic, L., A.F. Fagbemi, J.H. Enzlin, A.M. Gourdin, N. Wijgers, I. Dunand-Sauthier, G. Giglia-Mari, S.G. Clarkson, W. Vermeulen, and O.D. Scharer. 2009. Coordination of dual incision and repair synthesis in human nucleotide excision repair. *EMBO J.* 28:1111-20.
- Sternlicht, M.D., and Z. Werb. 2001. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 17:463-516.
- Stevnsner, T., S. Nyaga, N.C. de Souza-Pinto, G.T. van der Horst, T.G. Gorgels, B.A. Hogue, T. Thorslund, and V.A. Bohr. 2002. Mitochondrial repair of 8-oxoguanine is deficient in Cockayne syndrome group B. *Oncogene.* 21:8675-82.
- Stiff, T., S.A. Walker, K. Cersaletti, A.A. Goodarzi, E. Petermann, P. Concannon, M. O'Driscoll, and P.A. Jeggo. 2006. ATR-dependent phosphorylation and activation of ATM in response to UV treatment or replication fork stalling. *EMBO J.* 25:5775-82.
- Stommel, J.M., and G.M. Wahl. 2004. Accelerated MDM2 auto-degradation induced by DNA-damage kinases is required for p53 activation. *EMBO J.* 23:1547-56.
- Stoyanova, T., N. Roy, D. Kopanja, S. Bagchi, and P. Raychaudhuri. 2009. DDB2 decides cell fate following DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:10690-5.
- Stoyanova, T., T. Yoon, D. Kopanja, M.B. Mokyry, and P. Raychaudhuri. 2008. The xeroderma pigmentosum group E gene product DDB2 activates nucleotide excision repair by regulating the level of p21Waf1/Cip1. *Mol Cell Biol.* 28:177-87.
- Sugasawa, K. 2006. UV-induced ubiquitylation of XPC complex, the UV-DDB-ubiquitin ligase complex, and DNA repair. *J Mol Histol.* 37:189-202.
- Sugasawa, K. 2009. Regulation of damage recognition in mammalian global genomic nucleotide excision repair. *Mutat Res.* 685:29-37.
- Sugasawa, K., J.M. Ng, C. Masutani, S. Iwai, P.J. van der Spek, A.P. Eker, F. Hanaoka, D. Bootsma, and J.H. Hoeijmakers. 1998. Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Mol Cell.* 2:223-32.
- Sugasawa, K., J.M. Ng, C. Masutani, T. Maekawa, A. Uchida, P.J. van der Spek, A.P. Eker, S. Rademakers, C. Visser, A. Aboussekhra, R.D. Wood, F. Hanaoka, D. Bootsma, and J.H. Hoeijmakers. 1997. Two human homologs of Rad23 are functionally interchangeable in complex formation and stimulation of XPC repair activity. *Mol Cell Biol.* 17:6924-31.
- Sugasawa, K., T. Okamoto, Y. Shimizu, C. Masutani, S. Iwai, and F. Hanaoka. 2001. A multistep damage recognition mechanism for global genomic nucleotide excision repair. *Genes Dev.* 15:507-21.
- Sugasawa, K., Y. Okuda, M. Saijo, R. Nishi, N. Matsuda, G. Chu, T. Mori, S. Iwai, K. Tanaka, and F. Hanaoka. 2005. UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-ubiquitin ligase complex. *Cell.* 121:387-400.
- Sung, P., V. Bailly, C. Weber, L.H. Thompson, L. Prakash, and S. Prakash. 1993. Human xeroderma pigmentosum group D gene encodes a DNA helicase. *Nature.* 365:852-5.

- Suzuki, Y., and R. Craigie. 2007. The road to chromatin - nuclear entry of retroviruses. *Nat Rev Microbiol.* 5:187-96.
- Svejstrup, J.Q. 2002. Mechanisms of transcription-coupled DNA repair. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:21-9.
- Swift, M., and C. Chase. 1979. Cancer in families with xeroderma pigmentosum. *J Natl Cancer Inst.* 62:1415-21.
- Sylvester, K.G., M. Nesbit, A. Radu, M. Herlyn, N.S. Adzick, and T.M. Crombleholme. 2000. Adenoviral-mediated gene transfer in wound healing: acute inflammatory response in human skin in the SCID mouse model. *Wound Repair Regen.* 8:36-44.
- Szabowski, A., N. Maas-Szabowski, S. Andrecht, A. Kolbus, M. Schorpp-Kistner, N.E. Fusenig, and P. Angel. 2000. c-Jun and JunB antagonistically control cytokine-regulated mesenchymal-epidermal interaction in skin. *Cell.* 103:745-55.
- Szymkowski, D.E., C.W. Lawrence, and R.D. Wood. 1993. Repair by human cell extracts of single (6-4) and cyclobutane thymine-thymine photoproducts in DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:9823-7.
- Tahara, M., R.G. Pergolizzi, H. Kobayashi, A. Krause, K. Luettich, M.L. Lesser, and R.G. Crystal. 2004. Trans-splicing repair of CD40 ligand deficiency results in naturally regulated correction of a mouse model of hyper-IgM X-linked immunodeficiency. *Nat Med.* 10:835-41.
- Talwar, H.S., C.E. Griffiths, G.J. Fisher, T.A. Hamilton, and J.J. Voorhees. 1995. Reduced type I and type III procollagens in photodamaged adult human skin. *J Invest Dermatol.* 105:285-90.
- Tanaka, K., S. Kamiuchi, Y. Ren, R. Yonemasu, M. Ichikawa, H. Murai, M. Yoshino, S. Takeuchi, M. Saijo, Y. Nakatsu, H. Miyauchi-Hashimoto, and T. Horio. 2001. UV-induced skin carcinogenesis in xeroderma pigmentosum group A (XPA) gene-knockout mice with nucleotide excision repair-deficiency. *Mutat Res.* 477:31-40.
- Tang, A., M. Amagai, L.G. Granger, J.R. Stanley, and M.C. Udey. 1993. Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. *Nature.* 361:82-5.
- Tani, H., R.J. Morris, and P. Kaur. 2000. Enrichment for murine keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:10960-5.
- Tantin, D., A. Kansal, and M. Carey. 1997. Recruitment of the putative transcription-repair coupling factor CSB/ERCC6 to RNA polymerase II elongation complexes. *Mol Cell Biol.* 17:6803-14.
- Taylor, G., M.S. Lehrer, P.J. Jensen, T.T. Sun, and R.M. Lavker. 2000. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell.* 102:451-61.
- Taylor, J.S., H.F. Lu, and J.J. Kotyk. 1990. Quantitative conversion of the (6-4) photoproduct of TpdC to its Dewar valence isomer upon exposure to simulated sunlight. *Photochem Photobiol.* 51:161-7.
- Terunuma, A., K.L. Jackson, V. Kapoor, W.G. Telford, and J.C. Vogel. 2003. Side population keratinocytes resembling bone marrow side population stem cells are distinct from label-retaining keratinocyte stem cells. *J Invest Dermatol.* 121:1095-103.
- Tessman, I., S.K. Liu, and M.A. Kennedy. 1992. Mechanism of SOS mutagenesis of UV-irradiated DNA: mostly error-free processing of deaminated cytosine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:1159-63.
- Teumer, J., A. Lindahl, and H. Green. 1990. Human growth hormone in the blood of athymic mice grafted with cultures of hormone-secreting human keratinocytes. *FASEB J.* 4:3245-50.
- Thomas, D.C., D.S. Okumoto, A. Sancar, and V.A. Bohr. 1989. Preferential DNA repair of (6-4) photoproducts in the dihydrofolate reductase gene of Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 264:18005-10.
- Thrasher, A.J., H.B. Gaspar, C. Baum, U. Modlich, A. Schambach, F. Candotti, M. Otsu, B. Sorrentino, L. Scobie, E. Cameron, K. Blyth, J. Neil, S.H. Abina, M. Cavazzana-Calvo, and A. Fischer. 2006. Gene therapy: X-SCID transgene leukaemogenicity. *Nature.* 443:E5-6; discussion E6-7.
- Tian, M., R. Shinkura, N. Shinkura, and F.W. Alt. 2004. Growth retardation, early death, and DNA repair defects in mice deficient for the nucleotide excision repair enzyme XPF. *Mol Cell Biol.* 24:1200-5.

- Ting, A.P., G.K. Low, K. Gopalakrishnan, and M.P. Hande. 2009. Telomere attrition and genomic instability in xeroderma pigmentosum type-B deficient fibroblasts under oxidative stress. *J Cell Mol Med.*
- Tommasi, S., M.F. Denissenko, and G.P. Pfeifer. 1997. Sunlight induces pyrimidine dimers preferentially at 5-methylcytosine bases. *Cancer Res.* 57:4727-30.
- Trempus, C.S., R.J. Morris, C.D. Bortner, G. Cotsarelis, R.S. Faircloth, J.M. Reece, and R.W. Tennant. 2003. Enrichment for living murine keratinocytes from the hair follicle bulge with the cell surface marker CD34. *J Invest Dermatol.* 120:501-11.
- Tsukifujii, R., K. Tagawa, A. Hatamochi, and H. Shinkai. 1999. Expression of metalloproteinase-1, -2 and -3 in squamous cell carcinoma and actinic keratosis. *Br J Cancer.* 80:1087-91.
- Tu, Y., R. Dammann, and G.P. Pfeifer. 1998. Sequence and time-dependent deamination of cytosine bases in UVB-induced cyclobutane pyrimidine dimers in vivo. *J Mol Biol.* 284:297-311.
- Uchida, A., K. Sugawara, C. Masutani, N. Dohmae, M. Araki, M. Yokoi, Y. Ohkuma, and F. Hanaoka. 2002. The carboxy-terminal domain of the XPC protein plays a crucial role in nucleotide excision repair through interactions with transcription factor IIIH. *DNA Repair (Amst).* 1:449-61.
- Uehara, Y., H. Ikehata, M. Furuya, S. Kobayashi, D. He, Y. Chen, J. Komura, H. Ohtani, I. Shimokawa, and T. Ono. 2009. XPC is involved in genome maintenance through multiple pathways in different tissues. *Mutat Res.* 670:24-31.
- Uuden, A.B., E. Holmberg, B. Lundh-Rozell, M. Stahle-Backdahl, P.G. Zaphiropoulos, R. Toftgard, and I. Vorechovsky. 1996. Mutations in the human homologue of Drosophila patched (PTCH) in basal cell carcinomas and the Gorlin syndrome: different in vivo mechanisms of PTCH inactivation. *Cancer Res.* 56:4562-5.
- Unsal-Kacmaz, K., A.M. Makhov, J.D. Griffith, and A. Sancar. 2002. Preferential binding of ATR protein to UV-damaged DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:6673-8.
- Urnov, F.D., J.C. Miller, Y.L. Lee, C.M. Beausejour, J.M. Rock, S. Augustus, A.C. Jamieson, M.H. Porteus, P.D. Gregory, and M.C. Holmes. 2005. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature.* 435:646-51.
- Vailly, J., L. Gagnoux-Palacios, E. Dell'Ambra, C. Romero, M. Pinola, G. Zambruno, M. De Luca, J.P. Ortonne, and G. Meneguzzi. 1998. Corrective gene transfer of keratinocytes from patients with junctional epidermolysis bullosa restores assembly of hemidesmosomes in reconstructed epithelia. *Gene Ther.* 5:1322-32.
- Valin, A., S. Barnay-Verdier, T. Robert, H. Ripoche, F. Brellier, O. Chevallier-Lagente, M.F. Avril, and T. Magnaldo. 2009. PTCH1 +/- dermal fibroblasts isolated from healthy skin of Gorlin syndrome patients exhibit features of carcinoma associated fibroblasts. *PLoS One.* 4:e4818.
- van Hoffen, A., J. Venema, R. Meschini, A.A. van Zeeland, and L.H. Mullenders. 1995. Transcription-coupled repair removes both cyclobutane pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts with equal efficiency and in a sequential way from transcribed DNA in xeroderma pigmentosum group C fibroblasts. *EMBO J.* 14:360-7.
- van Kranen, H.J., A. de Laat, J. van de Ven, P.W. Wester, A. de Vries, R.J. Berg, C.F. van Kreijl, and F.R. de Gruijl. 1997. Low incidence of p53 mutations in UVA (365-nm)-induced skin tumors in hairless mice. *Cancer Res.* 57:1238-40.
- Van Laethem, A., M. Garmyn, and P. Agostinis. 2009. Starting and propagating apoptotic signals in UVB irradiated keratinocytes. *Photochem Photobiol Sci.* 8:299-308.
- van Ommen, G.J., J. van Deutekom, and A. Aartsma-Rus. 2008. The therapeutic potential of antisense-mediated exon skipping. *Curr Opin Mol Ther.* 10:140-9.
- Varani, J., D. Spearman, P. Perone, S.E. Fligel, S.C. Datta, Z.Q. Wang, Y. Shao, S. Kang, G.J. Fisher, and J.J. Voorhees. 2001. Inhibition of type I procollagen synthesis by damaged collagen in photoaged skin and by collagenase-degraded collagen in vitro. *Am J Pathol.* 158:931-42.
- Varani, J., R.L. Warner, M. Gharaee-Kermani, S.H. Phan, S. Kang, J.H. Chung, Z.Q. Wang, S.C. Datta, G.J. Fisher, and J.J. Voorhees. 2000. Vitamin A antagonizes decreased cell growth and

- elevated collagen-degrading matrix metalloproteinases and stimulates collagen accumulation in naturally aged human skin. *J Invest Dermatol.* 114:480-6.
- Venema, J., A. van Hoffen, A.T. Natarajan, A.A. van Zeeland, and L.H. Mullenders. 1990. The residual repair capacity of xeroderma pigmentosum complementation group C fibroblasts is highly specific for transcriptionally active DNA. *Nucleic Acids Res.* 18:443-8.
- Veness, M.J., C.E. Palme, and G.J. Morgan. 2006. High-risk cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck: results from 266 treated patients with metastatic lymph node disease. *Cancer.* 106:2389-96.
- Verma, I.M., and M.D. Weitzman. 2005. Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu Rev Biochem.* 74:711-38.
- Vidal, F., D. Aberdam, C. Miquel, A.M. Christiano, L. Pulkkinen, J. Uitto, J.P. Ortonne, and G. Meneguzzi. 1995. Integrin beta 4 mutations associated with junctional epidermolysis bullosa with pyloric atresia. *Nat Genet.* 10:229-34.
- Volker, M., M.J. Mone, P. Karmakar, A. van Hoffen, W. Schul, W. Vermeulen, J.H. Hoeijmakers, R. van Driel, A.A. van Zeeland, and L.H. Mullenders. 2001. Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo. *Mol Cell.* 8:213-24.
- Vuillaume, M., R. Calvayrac, M. Best-Belpomme, P. Tarroux, M. Hubert, Y. Decroix, and A. Sarasin. 1986. Deficiency in the catalase activity of xeroderma pigmentosum cell and simian virus 40-transformed human cell extracts. *Cancer Res.* 46:538-44.
- Vuillaume, M., L. Daya-Grosjean, P. Vincens, J.L. Penner, P. Tarroux, A. Baret, R. Calvayrac, A. Taieb, and A. Sarasin. 1992. Striking differences in cellular catalase activity between two DNA repair-deficient diseases: xeroderma pigmentosum and trichothiodystrophy. *Carcinogenesis.* 13:321-8.
- Waga, S., G.J. Hannon, D. Beach, and B. Stillman. 1994. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature.* 369:574-8.
- Wakamatsu, K., R. Kavanagh, A.L. Kadekaro, S. Terzieva, R.A. Sturm, S. Leachman, Z. Abdel-Malek, and S. Ito. 2006. Diversity of pigmentation in cultured human melanocytes is due to differences in the type as well as quantity of melanin. *Pigment Cell Res.* 19:154-62.
- Wakasugi, M., A. Kawashima, H. Morioka, S. Linn, A. Sancar, T. Mori, O. Nikaido, and T. Matsunaga. 2002. DDB accumulates at DNA damage sites immediately after UV irradiation and directly stimulates nucleotide excision repair. *J Biol Chem.* 277:1637-40.
- Wakasugi, M., and A. Sancar. 1998. Assembly, subunit composition, and footprint of human DNA repair excision nuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:6669-74.
- Wally, V., A. Klausegger, U. Koller, H. Lochmuller, S. Krause, G. Wiche, L.G. Mitchell, H. Hintner, and J.W. Bauer. 2008. 5' trans-splicing repair of the PLEC1 gene. *J Invest Dermatol.* 128:568-74.
- Wan, H., M.G. Stone, C. Simpson, L.E. Reynolds, J.F. Marshall, I.R. Hart, K.M. Hodivala-Dilke, and R.A. Eady. 2003. Desmosomal proteins, including desmoglein 3, serve as novel negative markers for epidermal stem cell-containing population of keratinocytes. *J Cell Sci.* 116:4239-48.
- Wang, M., A. Mahrenholz, and S.H. Lee. 2000. RPA stabilizes the XPA-damaged DNA complex through protein-protein interaction. *Biochemistry.* 39:6433-9.
- Wang, Q.E., M. Praetorius-Ibba, Q. Zhu, M.A. El-Mahdy, G. Wani, Q. Zhao, S. Qin, S. Patnaik, and A.A. Wani. 2007a. Ubiquitylation-independent degradation of Xeroderma pigmentosum group C protein is required for efficient nucleotide excision repair. *Nucleic Acids Res.* 35:5338-50.
- Wang, Q.E., Q. Zhu, G. Wani, M.A. El-Mahdy, J. Li, and A.A. Wani. 2005. DNA repair factor XPC is modified by SUMO-1 and ubiquitin following UV irradiation. *Nucleic Acids Res.* 33:4023-34.
- Wang, X.W., H. Yeh, L. Schaeffer, R. Roy, V. Moncollin, J.M. Egly, Z. Wang, E.C. Freidberg, M.K. Evans, B.G. Taffe, and et al. 1995. p53 modulation of TFIIH-associated nucleotide excision repair activity. *Nat Genet.* 10:188-95.
- Wang, Y., R. Woodgate, T.P. McManus, S. Mead, J.J. McCormick, and V.M. Maher. 2007b. Evidence that in xeroderma pigmentosum variant cells, which lack DNA polymerase eta, DNA

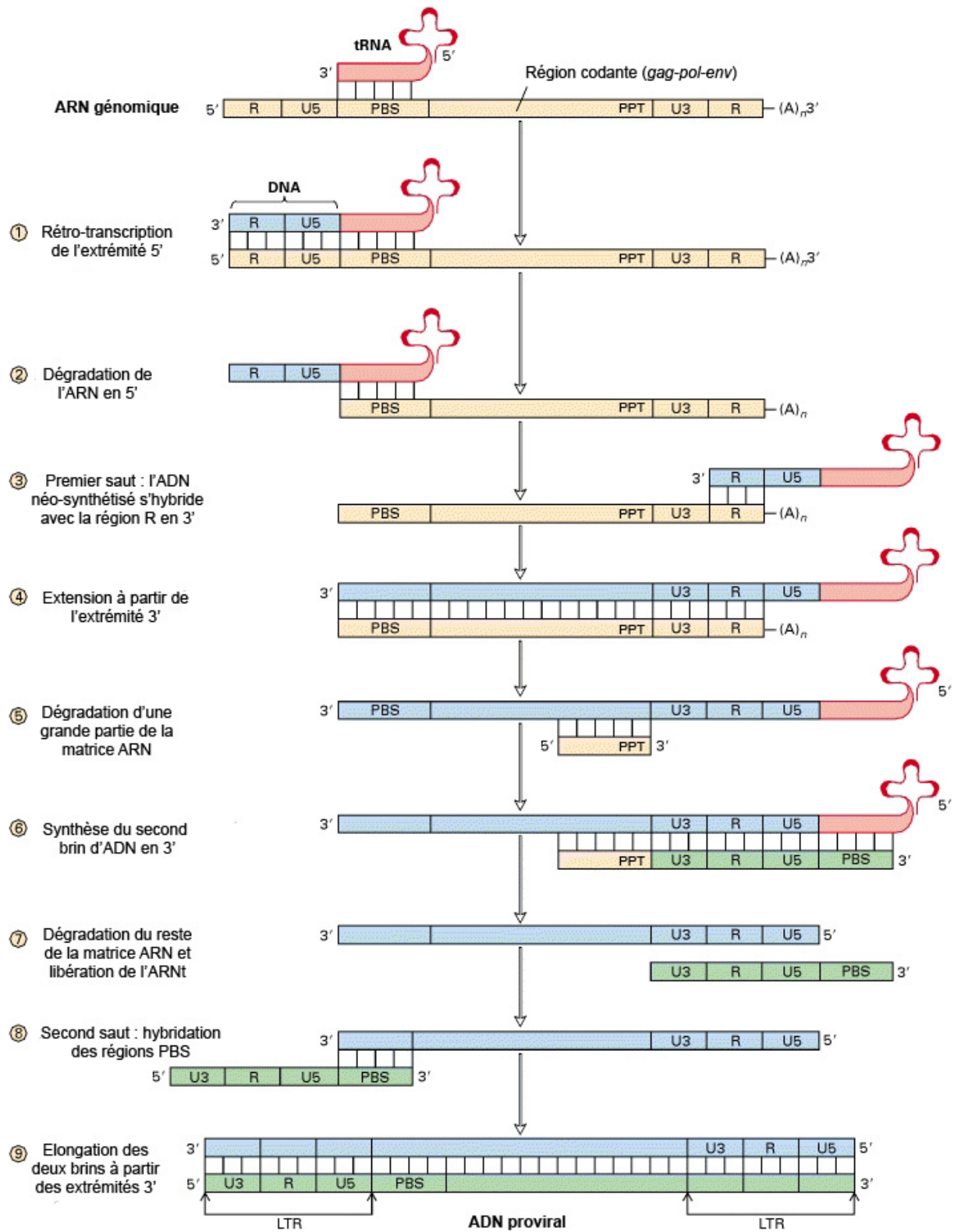
- polymerase iota causes the very high frequency and unique spectrum of UV-induced mutations. *Cancer Res.* 67:3018-26.
- Wang, Z.Y., M.T. Huang, T. Ferraro, C.Q. Wong, Y.R. Lou, K. Reuhl, M. Iatropoulos, C.S. Yang, and A.H. Conney. 1992. Inhibitory effect of green tea in the drinking water on tumorigenesis by ultraviolet light and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in the skin of SKH-1 mice. *Cancer Res.* 52:1162-70.
- Watt, F.M. 2002. Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. *EMBO J.* 21:3919-26.
- Weinberg, J.B., T.J. Matthews, B.R. Cullen, and M.H. Malim. 1991. Productive human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection of nonproliferating human monocytes. *J Exp Med.* 174:1477-82.
- Wenk, J., P. Brenneisen, M. Wlaschek, A. Poswig, K. Briviba, T.D. Oberley, and K. Scharffetter-Kochanek. 1999. Stable overexpression of manganese superoxide dismutase in mitochondria identifies hydrogen peroxide as a major oxidant in the AP-1-mediated induction of matrix-degrading metalloproteinase-1. *J Biol Chem.* 274:25869-76.
- West, M.D. 1994. The cellular and molecular biology of skin aging. *Arch Dermatol.* 130:87-95.
- West, M.D., O.M. Pereira-Smith, and J.R. Smith. 1989. Replicative senescence of human skin fibroblasts correlates with a loss of regulation and overexpression of collagenase activity. *Exp Cell Res.* 184:138-47.
- Westermarck, J., and V.M. Kahari. 1999. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J.* 13:781-92.
- White, S.J., S.M. Page, P. Margaritis, and G.G. Brownlee. 1998. Long-term expression of human clotting factor IX from retrovirally transduced primary human keratinocytes in vivo. *Hum Gene Ther.* 9:1187-95.
- Wijnhoven, S.W., H.J. Kool, L.H. Mullenders, A.A. van Zeeland, E.C. Friedberg, G.T. van der Horst, H. van Steeg, and H. Vrieling. 2000. Age-dependent spontaneous mutagenesis in Xpc mice defective in nucleotide excision repair. *Oncogene.* 19:5034-7.
- Wilkinson, C.R., M. Seeger, R. Hartmann-Petersen, M. Stone, M. Wallace, C. Semple, and C. Gordon. 2001. Proteins containing the UBA domain are able to bind to multi-ubiquitin chains. *Nat Cell Biol.* 3:939-43.
- Willenbrock, F., and G. Murphy. 1994. Structure-function relationships in the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Am J Respir Crit Care Med.* 150:S165-70.
- Wittschieben, B.O., S. Iwai, and R.D. Wood. 2005. DDB1-DDB2 (xeroderma pigmentosum group E) protein complex recognizes a cyclobutane pyrimidine dimer, mismatches, apurinic/apyrimidinic sites, and compound lesions in DNA. *J Biol Chem.* 280:39982-9.
- Wolff, J.A., R.W. Malone, P. Williams, W. Chong, G. Acsadi, A. Jani, and P.L. Felgner. 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science.* 247:1465-8.
- Wondrak, G.T., M.K. Jacobson, and E.L. Jacobson. 2006. Endogenous UVA-photosensitizers: mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection. *Photochem Photobiol Sci.* 5:215-37.
- Wong, T., L. Gammon, L. Liu, J.E. Mellerio, P.J. Dopping-Hepenstal, J. Pacy, G. Elia, R. Jeffery, I.M. Leigh, H. Navsaria, and J.A. McGrath. 2008. Potential of fibroblast cell therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol.* 128:2179-89.
- Woodley, D.T., D.R. Keene, T. Atha, Y. Huang, K. Lipman, W. Li, and M. Chen. 2004a. Injection of recombinant human type VII collagen restores collagen function in dystrophic epidermolysis bullosa. *Nat Med.* 10:693-5.
- Woodley, D.T., D.R. Keene, T. Atha, Y. Huang, R. Ram, N. Kasahara, and M. Chen. 2004b. Intradermal injection of lentiviral vectors corrects regenerated human dystrophic epidermolysis bullosa skin tissue in vivo. *Mol Ther.* 10:318-26.
- Woodley, D.T., G.G. Krueger, C.M. Jorgensen, J.A. Fairley, T. Atha, Y. Huang, L. Chan, D.R. Keene, and M. Chen. 2003. Normal and gene-corrected dystrophic epidermolysis bullosa fibroblasts

- alone can produce type VII collagen at the basement membrane zone. *J Invest Dermatol.* 121:1021-8.
- Woods, N.B., V. Bottero, M. Schmidt, C. von Kalle, and I.M. Verma. 2006. Gene therapy: therapeutic gene causing lymphoma. *Nature.* 440:1123.
- Wu, X., Y. Li, B. Crise, and S.M. Burgess. 2003. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science.* 300:1749-51.
- Wu, Y.H., J.H. Tsai Chang, Y.W. Cheng, T.C. Wu, C.Y. Chen, and H. Lee. 2007. Xeroderma pigmentosum group C gene expression is predominantly regulated by promoter hypermethylation and contributes to p53 mutation in lung cancers. *Oncogene.* 26:4761-73.
- Wysenbeek, A.J., H. Weiss, M. Duczyniner-Kahana, M.H. Grunwald, and A.I. Pick. 1986. Immunologic alterations in xeroderma pigmentosum patients. *Cancer.* 58:219-21.
- Yamaguchi, J., A. Mamada, S. Kondo, and Y. Satoh. 1990. Defective DNA repair in cultured melanocytes from xeroderma pigmentosum patients. *J Dermatol.* 17:465-72.
- Yamaguchi, Y., M. Brenner, and V.J. Hearing. 2007. The regulation of skin pigmentation. *J Biol Chem.* 282:27557-61.
- Yamaguchi, Y., K. Takahashi, B.Z. Zmudzka, A. Kornhauser, S.A. Miller, T. Tadokoro, W. Berens, J.Z. Beer, and V.J. Hearing. 2006. Human skin responses to UV radiation: pigment in the upper epidermis protects against DNA damage in the lower epidermis and facilitates apoptosis. *FASEB J.* 20:1486-8.
- Yang, A., R. Schweitzer, D. Sun, M. Kaghad, N. Walker, R.T. Bronson, C. Tabin, A. Sharpe, D. Caput, C. Crum, and F. McKeon. 1999. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature.* 398:714-8.
- Yang, N.S., J. Burkholder, B. Roberts, B. Martinell, and D. McCabe. 1990. In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:9568-72.
- Yang, Y., H.C. Ertl, and J.M. Wilson. 1994a. MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes to viral antigens destroy hepatocytes in mice infected with E1-deleted recombinant adenoviruses. *Immunity.* 1:433-42.
- Yang, Y., F.A. Nunes, K. Berencsi, E.E. Furth, E. Gonczol, and J.M. Wilson. 1994b. Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:4407-11.
- Yant, S.R., L. Meuse, W. Chiu, Z. Ivics, Z. Izsvak, and M.A. Kay. 2000. Somatic integration and long-term transgene expression in normal and haemophilic mice using a DNA transposon system. *Nat Genet.* 25:35-41.
- Yarosh, D., J. Klein, A. O'Connor, J. Hawk, E. Rafal, and P. Wolf. 2001. Effect of topically applied T4 endonuclease V in liposomes on skin cancer in xeroderma pigmentosum: a randomised study. Xeroderma Pigmentosum Study Group. *Lancet.* 357:926-9.
- Yasuda, G., R. Nishi, E. Watanabe, T. Mori, S. Iwai, D. Orioli, M. Stefanini, F. Hanaoka, and K. Sugasawa. 2007. In vivo destabilization and functional defects of the xeroderma pigmentosum C protein caused by a pathogenic missense mutation. *Mol Cell Biol.* 27:6606-14.
- Yauch, R.L., S.E. Gould, S.J. Scales, T. Tang, H. Tian, C.P. Ahn, D. Marshall, L. Fu, T. Januario, D. Kallop, M. Nannini-Pepe, K. Kotkow, J.C. Marsters, L.L. Rubin, and F.J. de Sauvage. 2008. A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. *Nature.* 455:406-10.
- Yee, J.K., T. Friedmann, and J.C. Burns. 1994. Generation of high-titer pseudotyped retroviral vectors with very broad host range. *Methods Cell Biol.* 43 Pt A:99-112.
- Yee, J.K., J.C. Moores, D.J. Jolly, J.A. Wolff, J.G. Respass, and T. Friedmann. 1987. Gene expression from transcriptionally disabled retroviral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84:5197-201.
- Yi, R., M.N. Poy, M. Stoffel, and E. Fuchs. 2008. A skin microRNA promotes differentiation by repressing 'stemness'. *Nature.* 452:225-9.

- Yokoi, M., C. Masutani, T. Maekawa, K. Sugawara, Y. Ohkuma, and F. Hanaoka. 2000. The xeroderma pigmentosum group C protein complex XPC-HR23B plays an important role in the recruitment of transcription factor IIH to damaged DNA. *J Biol Chem.* 275:9870-5.
- You, Y.H., D.H. Lee, J.H. Yoon, S. Nakajima, A. Yasui, and G.P. Pfeifer. 2001. Cyclobutane pyrimidine dimers are responsible for the vast majority of mutations induced by UVB irradiation in mammalian cells. *J Biol Chem.* 276:44688-94.
- You, Y.H., C. Li, and G.P. Pfeifer. 1999. Involvement of 5-methylcytosine in sunlight-induced mutagenesis. *J Mol Biol.* 293:493-503.
- You, Y.H., P.E. Szabo, and G.P. Pfeifer. 2000. Cyclobutane pyrimidine dimers form preferentially at the major p53 mutational hotspot in UVB-induced mouse skin tumors. *Carcinogenesis.* 21:2113-7.
- Young, A.R., C.A. Chadwick, G.I. Harrison, O. Nikaido, J. Ramsden, and C.S. Potten. 1998. The similarity of action spectra for thymine dimers in human epidermis and erythema suggests that DNA is the chromophore for erythema. *J Invest Dermatol.* 111:982-8.
- Yu, S.F., T. von Ruden, P.W. Kantoff, C. Garber, M. Seiberg, U. Ruther, W.F. Anderson, E.F. Wagner, and E. Gilboa. 1986. Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:3194-8.
- Yu, S.L., R.E. Johnson, S. Prakash, and L. Prakash. 2001. Requirement of DNA polymerase eta for error-free bypass of UV-induced CC and TC photoproducts. *Mol Cell Biol.* 21:185-8.
- Zaja-Milatovic, S., and A. Richmond. 2008. CXCL chemokines and their receptors: a case for a significant biological role in cutaneous wound healing. *Histol Histopathol.* 23:1399-407.
- Zeng, L., X. Quilliet, O. Chevallier-Lagente, E. Eveno, A. Sarasin, and M. Mezzina. 1997. Retrovirus-mediated gene transfer corrects DNA repair defect of xeroderma pigmentosum cells of complementation groups A, B and C. *Gene Ther.* 4:1077-84.
- Zhang, D., C. Chen, X. Fu, S. Gu, Y. Mao, Y. Xie, Y. Huang, and Y. Li. 2008. A meta-analysis of DNA repair gene XPC polymorphisms and cancer risk. *J Hum Genet.* 53:18-33.
- Zhang, H., X.L. Ping, P.K. Lee, X.L. Wu, Y.J. Yao, M.J. Zhang, D.N. Silvers, D. Ratner, R. Malhotra, M. Peacocke, and H.C. Tsou. 2001. Role of PTCH and p53 genes in early-onset basal cell carcinoma. *Am J Pathol.* 158:381-5.
- Zhang, Y., W.Y. Ma, A. Kaji, A.M. Bode, and Z. Dong. 2002. Requirement of ATM in UVA-induced signaling and apoptosis. *J Biol Chem.* 277:3124-31.
- Ziegler, A., A.S. Jonason, D.J. Leffell, J.A. Simon, H.W. Sharma, J. Kimmelman, L. Remington, T. Jacks, and D.E. Brash. 1994. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature.* 372:773-6.
- Ziegler, A., D.J. Leffell, S. Kunala, H.W. Sharma, M. Gailani, J.A. Simon, A.J. Halperin, H.P. Baden, P.E. Shapiro, A.E. Bale, and et al. 1993. Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of nonmelanoma skin cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:4216-20.
- Zou, L., and S.J. Elledge. 2003. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science.* 300:1542-8.
- Zufferey, R., T. Dull, R.J. Mandel, A. Bukovsky, D. Quiroz, L. Naldini, and D. Trono. 1998. Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol.* 72:9873-80.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Mécanisme de rétro-transcription du génome rétroviral.



ANNEXE 2 : Revue publiée dans le Journal de la Société de Biologie (2008)

[Epidermal stem cells and ex vivo cutaneous gene therapy: application to xeroderma pigmentosum]

Cellules souches épidermiques et thérapie génique cutanée ex vivo : application au xeroderma pigmentosum

Warrick E, Bergoglio V, Bernerd F, Magnaldo T.

J Soc Biol. 2008;202(1):33-41.

Cellules souches épidermiques et thérapie génique cutanée *ex vivo* : application au *xeroderma pigmentosum*

Emilie Warrick^{1,2}, Valérie Bergoglio¹, Françoise Bernerd² et Thierry Magnaldo¹

¹ Génétique et physiopathologie des cancers épidermiques. Génomes et cancers, CNRS FRE 2939, Institut Gustave Roussy, 39, rue Camille Desmoulins, 94805 Villejuif, France

² L'OREAL, Sciences du vivant, Recherche avancée, Centre C. Zviak, 90, Rue du Général Roguet, 92583 Clichy, France

Auteur correspondant : Thierry Magnaldo, magnaldo@igr.fr

Reçu le 30 Novembre 2007

Résumé – La plupart des pathologies génétiques récessives à expression cutanée, les génodermatoses, restent, à ce jour, sans traitement. Le transfert, dans les cellules en culture du patient, de l'allèle sain du gène dont l'altération est responsable de la maladie puis la réimplantation chez le patient des cellules génétiquement corrigées pourraient constituer un traitement alternatif.

La pérennité de la correction génétique des greffons chez le patient s'appuie nécessairement sur la correction des cellules souches épidermiques. Ainsi, la première greffe de cellules souches génétiquement corrigées *ex vivo* a été rapportée très récemment chez un patient atteint d'épidermolyse bulleuse jonctionnelle. En complément de ce succès, nous décrivons ici une nouvelle méthode de sélection non invasive et non immunogène des cellules souches épidermiques génétiquement manipulées. Cette stratégie pourrait être applicable à la thérapie génique cutanée *ex vivo* des génodermatoses associées à une prédisposition au cancer, comme notamment le *xeroderma pigmentosum*.

Mots clés : peau / cellules souche / thérapie génique / *xeroderma pigmentosum*

Abstract – Epidermal stem cells and *ex vivo* cutaneous gene therapy: application to *xeroderma pigmentosum*.

Ex vivo cutaneous gene therapy is an alternative treatment for recessively inherited diseases with cutaneous traits. It relies on the transfer in cultured epidermal keratinocytes of the wild-type allele of the gene whose mutation is responsible for the disease. As for severely burnt patients, epithelial sheets developed from genetically corrected cells may then be grafted back to the patients. Long term correction and graft take depend on the genetic correction of stem cells. Success of such an approach has recently been reported in the case of one patient suffering from a severe case of junctional *epidermolysis bullosa*. Here we report a method for safely selecting keratinocytes populations after genetic manipulation. The method is non invasive and non immunogenic and allows high enrichment of genetically manipulated stem keratinocytes. This could perhaps contribute to *ex vivo* gene therapy approaches of cancer prone genodermatoses such as *xeroderma pigmentosum*.

Introduction

Les progrès réalisés dans le domaine de la génétique moléculaire ont permis d'identifier de nombreux gènes impliqués dans le large panel des maladies héréditaires

affectant l'épiderme. Celles-ci peuvent résulter de la mutation d'un gène exprimé exclusivement dans la peau, ou dont le rôle y est particulièrement essentiel, comme les gènes codant pour des protéines impliquées dans la structure même de l'épiderme. Ces maladies

peuvent aussi être dues à des mutations dans un gène exprimé de façon ubiquitaire mais dont l'altération peut affecter une fonction particulièrement importante dans la peau ou ses annexes. Ainsi, les mutations touchant les gènes impliqués dans la réparation de l'ADN et la maintenance du génome peuvent, comme dans le cas de patients souffrant de *xeroderma pigmentosum*, être à l'origine d'une prédisposition dramatique des individus aux cancers cutanés induits par les radiations ultraviolettes dans les zones photo-exposées. Certaines des maladies génétiques exprimées au travers d'un phénotype cutané peuvent être particulièrement graves et parfois compromettre le pronostic vital du patient. Pour la plupart d'entre elles, les rares traitements proposés restent insuffisants. La peau est l'organe le plus accessible du corps humain. Elle constitue donc une cible privilégiée pour les approches thérapeutiques par transfert de gène, ce qui constitue aujourd'hui un espoir réaliste de traitement de certains désordres héréditaires cutanés. Les progrès des méthodes de sélection non invasives des kératinocytes humains génétiquement manipulés décrits ici pourraient contribuer aux approches de thérapie génique cutanée *ex vivo* des génodermatoses prédisposées au cancer de la peau comme le *xeroderma pigmentosum*.

La cellule souche épidermique : clé de voûte de la thérapie génique cutanée

Structure de la peau et cellules souches épidermiques interfolliculaires

La peau est un organe complexe composé de deux tissus : l'épiderme, en contact avec l'environnement extérieur, et le derme sous-jacent qui joue un rôle support et nourricier. L'épiderme, qui repose sur une membrane basale délimitant physiquement sa jonction avec le derme, est un épithélium stratifié composé principalement de cellules hautement spécialisées appelées kératinocytes. Le processus de différenciation épidermique est illustré schématiquement sur la figure 1. Lorsqu'ils s'engagent dans le processus de différenciation, les kératinocytes de la couche basale cessent de proliférer, et migrent progressivement vers la surface de l'épiderme tout en subissant des modifications morphologiques et biochimiques, ce qui permet de distinguer successivement les couches spineuse, granuleuse et cornée. Le stade ultime de différenciation est une structure cellulaire morte, le cornéocyte, continuellement éliminé (Green, 1980). Chaque cornéocyte ainsi perdu par desquamation doit être remplacé grâce au recrutement d'un kératinocyte de la couche basale. L'épiderme humain est ainsi renouvelé de façon permanente tout au long de la vie

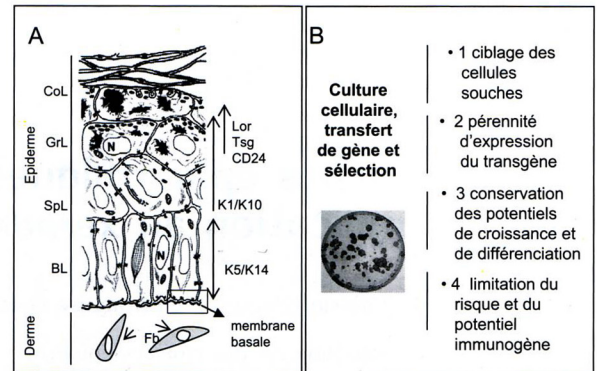


Fig. 1. (A) Représentation schématique de la peau et du processus de différenciation épidermique. Les kératinocytes de la couche basale (BL), parmi lesquels se trouvent les cellules souches, expriment les kératines K5 et K14. Lorsqu'ils s'engagent dans le processus de différenciation, les kératinocytes cessent d'exprimer K5 et K14 pour produire les kératines K1 et K10, spécifiques des couches suprabasales. La loricrine (Lor) et la transglutaminase (Tsg) sont des marqueurs plus tardifs exprimés dans la couche granuleuse (GrL). Noter que le CD24 n'est exprimé qu'à partir de la couche spineuse (SpL) et qu'il n'est donc pas exprimé par les cellules prolifératives de la couche basale. Fb, fibroblastes dermiques; CoL, couche cornée. (B) Exigences de la thérapie génique cutanée *ex vivo*. La thérapie génique *ex vivo* consiste à propager *in vitro* les kératinocytes issus de biopsies cutanées prélevées chez le patient puis à introduire le gène thérapeutique dans ces cellules en culture avant de les réimplanter chez le patient. Cette stratégie permet l'évaluation *ex vivo* de l'efficacité de la correction génétique et du respect du « cahier des charges » indispensable à toute perspective de greffe chez le patient.

d'un individu. Ce renouvellement est possible grâce à la présence de cellules souches dans la couche basale de l'épiderme. Les cellules souches sont définies comme des cellules capables (1) de s'autorégénérer et (2) de générer une progéniture engagée dans le processus de différenciation. Le passage de la cellule souche vers la cellule différenciée passe par une population intermédiaire, constituant le compartiment des cellules en amplification transitoire. Ces cellules possèdent un potentiel prolifératif limité à cinq divisions et représentent la majorité des cellules prolifératives au sein de la couche basale épidermique (Lajtha, 1979; Gambardella & Barrandon, 2003; Kaur, 2006; Watt *et al.*, 2006).

L'identification des cellules souches

Les techniques de culture cellulaire des kératinocytes, développées grâce aux travaux fondateurs de Rheinwald et Green (Rheinwald & Green, 1975), ont

fortement contribué à la caractérisation des cellules souches épidermiques. Dans les conditions adéquates, les kératinocytes mis en culture à partir d'un fragment d'épiderme humain sont capables de former trois types de colonies, en fonction du potentiel de croissance de la cellule fondatrice : les holoclones, les méroclones et les paraclones (Barrandon & Green, 1987).

Les holoclones, larges colonies ($d > 4$ mm) au contour régulier, ont probablement pour origine une cellule souche épidermique. Plus de 95 % des cellules descendant d'un holoclone sont clonogéniques et forment elles aussi des colonies de grande taille. Les paraclones sont des colonies de petite taille ($d < 1$ mm), différenciées et initiées par une cellule présentant un potentiel de prolifération limité à 15 divisions au maximum. La descendance d'un paraclone présente une clonogénicité inférieure à 5%. Les méroclones sont des colonies de taille intermédiaire ($1 \text{ mm} < d < 4 \text{ mm}$), au contour irrégulier. Elles sont initiées par des cellules fondatrices à la descendance hétérogène, présentant une clonogénicité comprise entre 95 % et 5 %. L'analyse clonale permet donc d'estimer assez précisément la proportion de cellules souches épidermiques au sein d'une culture de kératinocytes.

La présence de ces cellules souches en culture a été attestée par le succès de l'autogreffe chez les grands brûlés de feuillet épithéliaux générés en laboratoire à partir des kératinocytes épidermiques issus d'une biopsie de peau saine prélevée chez le patient (Green *et al.*, 1979; Gallico *et al.*, 1984; Pellegrini *et al.*, 1998; Pellegrini *et al.*, 1999; Ronfard *et al.*, 2000). Le renouvellement à très long terme (plus de 20 ans) d'un épiderme aux caractéristiques normales, malgré l'absence d'annexes cutanées, prouve que les cellules souches ont été préservées en culture et ont conservé tous leurs potentiels après transplantation chez l'homme.

La thérapie génique *ex vivo* des génodermatoses

Exigences de la thérapie génique cutanée

La correction génétique des affections héréditaires touchant la peau nécessite une expression à très long terme du gène thérapeutique. Dans ce but il faut : (1) cibler les cellules souches épidermiques ; (2) permettre l'intégration du matériel génétique dans le génome de la cellule hôte afin d'assurer la persistance du transgène lors du renouvellement de l'épiderme, tout en évitant l'interruption de gènes vitaux ou l'activation d'oncogènes ; (3) préserver l'intégrité des potentiels de prolifération et de différenciation des cellules génétiquement manipulées ; (4) limiter les réponses

immunitaires de l'organisme hôte envers le matériel inséré dans la cellule (figure 1B). A cet effet, beaucoup d'efforts ont été déployés dans le domaine de la vectorologie afin de trouver des solutions adaptées à ces exigences.

Thérapie génique *in vivo* ou *ex vivo* ?

Deux stratégies de thérapie génique cutanée peuvent être envisagées : d'une part l'approche *in vivo* et d'autre part l'approche *ex vivo*. La première consiste à introduire directement dans la peau le matériel génétique thérapeutique, nu ou intégré au sein d'une particule virale infectieuse. L'ADN nu peut être administré par injection, électroporation ou « bombardement » de microparticules couvertes d'ADN (« Gene Gun »). La transduction virale de l'ADN implique l'utilisation de particules capables d'infecter les cellules en état de quiescence, comme c'est le cas pour la majorité des cellules somatiques en condition d'homéostasie au sein d'un tissu. Grâce à leur importante capacité cargo et à leur fort pouvoir infectieux *in vivo*, les nouvelles générations de lentivirus recombinants pourraient être les meilleures candidates pour ce type d'approche (Ghazizadeh *et al.*, 2004; Gagnoux-Palacios *et al.*, 2005).

La thérapie génique cutanée *ex vivo* consiste quant à elle à : (1) propager *in vitro* les kératinocytes, issus de biopsies cutanées prélevées chez le patient ; (2) introduire le matériel génétique thérapeutique (gène correctif) dans ces cellules en culture ; (3) vérifier *ex vivo* l'activité, la fonctionnalité et l'innocuité à long terme du gène thérapeutique dans les cellules génétiquement corrigées, avant (4) de les réimplanter chez le patient. Ce schéma stratégique ne concerne pas uniquement les pathologies cutanées. Il a démontré son efficacité dans le traitement des « enfants bulles » souffrant d'un grave déficit immunitaire (Cavazzana-Calvo *et al.*, 2000). Dans ce cas, la population corrigée par transduction rétrovirale a pu être préalablement enrichie en cellules souches grâce à l'expression d'un marqueur de surface caractéristique des progéniteurs hématopoïétiques, le CD34. Toutefois, contrairement au cas des cellules hématopoïétiques, aucun marqueur équivalent au CD34 ne permet d'enrichir efficacement une population de kératinocytes en cellules souches. La qualité de la culture, et notamment la proportion d'holoclones, restent les meilleures garanties de réussite des approches de thérapie génique cutanée *ex vivo* (Mavilio *et al.*, 2006). Un autre problème concerne le rendement du transfert du gène thérapeutique : (1) quelle est la proportion de cellules effectivement corrigées dans la culture ? (2) la population cellulaire transplantée doit-elle être pure ? Les réponses à ces questions dépendent de la pathologie, et en particulier du fait qu'elle soit liée ou non

à une prédisposition des patients au cancer. Ainsi, le traitement des génodermatoses telles que le *xeroderma pigmentosum*, associées à une dramatique prédisposition au cancer, impose la sélection des cellules génétiquement corrigées avant toute perspective de greffes chez le patient.

Le problème de la pérennité d'expression du gène thérapeutique

Les vecteurs rétroviraux dérivés du virus de la leucémie murine (MLV) ont permis les premières approches de thérapie génique cutanée *ex vivo* (Morgan *et al.*, 1987) et restent à ce jour les plus couramment utilisés. Au fil des applications visant à corriger aussi bien des pathologies liées au défaut de sécrétion d'une protéine dans l'organisme, comme l'hémophilie de type B (Gerrard *et al.*, 1993), que des désordres cutanés héréditaires comme l'ichtyose lamellaire (Choate *et al.*, 1996; Choate & Khavari, 1997) ou l'épidermolyse bulleuse jonctionnelle (Dellambra *et al.*, 1998; Seitz *et al.*, 1999; Dellambra *et al.*, 2001; Robbins *et al.*, 2001) et dystrophique (Chen *et al.*, 2002; Baldeschi *et al.*, 2003; Gache *et al.*, 2004), les vecteurs ont été améliorés afin de diminuer l'inactivation par méthylation des séquences LTR promotrices de la transcription *in vivo* (Gram *et al.*, 1998; Challita & Kohn, 1994; Choate & Khavari, 1997; Fenjves *et al.*, 1996) et d'optimiser la transduction des kératinocytes en culture (Deng *et al.*, 1998; Ghazizadeh *et al.*, 2002).

La pérennité de l'expression du gène thérapeutique dépend aussi de la correction génétique des cellules souches. Mathor et collègues (1996) ont montré que la transduction d'holoclonés isolés par clonage en culture permet effectivement de maintenir l'expression du transgène *in vitro* pendant plus de 150 générations (environ 6 mois) et *in vivo* pendant 40 semaines après greffe des cellules transduites chez la souris athymique (Kolodka *et al.*, 1998; Levy *et al.*, 1998). En revanche, jusqu'à notre étude décrite ci-dessous (Bergoglio *et al.*, 2007) aucune investigation n'avait rapporté jusqu'alors la sélection de cellules souches épidermiques génétiquement modifiées.

Sélection et greffe des cellules génétiquement corrigées : le problème de l'immunité

Dans le cas des génodermatoses associées à une prédisposition au cancer de la peau, en particulier le *xeroderma pigmentosum* ou les épidermolyses bulleuses dystrophiques (Gache *et al.*, 2004), la sélection des cellules génétiquement corrigées est une exigence supplémentaire à prendre à compte. Il est en effet

nécessaire, pour ces pathologies, de limiter la possibilité de réimplanter chez le patient des cellules susceptibles d'initier une tumeur dans le greffon. Les techniques classiques de sélection consistent généralement à co-exprimer le gène thérapeutique avec un gène dont le produit confère la résistance à un antibiotique (Deng *et al.*, 1998). Toutefois, la plupart des gènes de sélection proviennent de micro-organismes (par exemple le gène bactérien *neo*/TN5 qui confère la résistance à la néomycine), leurs produits protéiques sont donc potentiellement immunogènes chez l'individu immunocompétent et conduiraient sans doute au rejet du greffon. L'utilisation de tels gènes de sélection est donc tout simplement exclue des perspectives de greffe.

Dans la plupart des pathologies candidates à la thérapie génique cutanée, le produit protéique du gène muté est partiellement tronqué, voire totalement absent, dans les cellules des patients. La réintroduction dans ces cellules d'une protéine fonctionnelle, contenant des domaines potentiellement reconnus comme non-soi, est donc susceptible d'initier une réponse immunitaire ciblée pouvant aussi mener au rejet de la greffe. Ainsi, Ghazizadeh a montré que l'expression d'une protéine produite à la suite d'une l'infection rétrovirale *in vivo* de l'épiderme interfolliculaire d'une souris immunocompétente conduit à l'élimination des cellules infectées en 3 semaines (Ghazizadeh *et al.*, 1999). La réimplantation de cellules génétiquement manipulées *ex vivo* peut aussi conduire à leur élimination chez la souris immunocompétente (Lu & Ghazizadeh, 2005), une limitation qui pourrait être contournée par neutralisation des cytokines impliquées dans le rejet des greffes (Lu & Ghazizadeh, 2007). Si la question du potentiel de réponse immunitaire est réelle, elle est aussi imprévisible et dépend hautement du contexte de la maladie.

Ainsi, un patient atteint d'épidermolyse bulleuse jonctionnelle a récemment été greffé à long terme, et sans qu'aucune réponse immunitaire ne soit détectée, grâce à la correction *ex vivo* de ses kératinocytes à l'aide de vecteurs rétroviraux classiques permettant de réexprimer la protéine laminine 5 qui fait défaut dans la maladie (Mavilio *et al.*, 2006). Le succès de cet essai suscite un immense espoir pour le traitement des nombreuses génodermatoses candidates à ce type d'approche.

Des progrès dans la thérapie génique cutanée sélective *ex vivo*

L'originalité de notre stratégie de sélection est basée sur l'expression ectopique d'une protéine ancrée à la membrane, CD24, à la surface des kératinocytes à fort potentiel prolifératif.

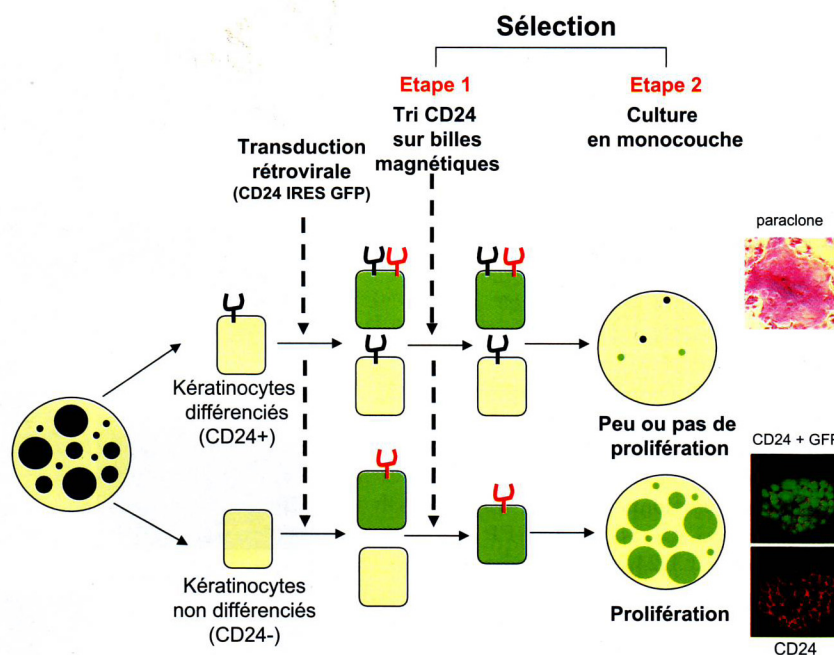


Fig. 2. Schéma théorique de la stratégie de sélection CD24. Les kératinocytes cultivés à partir d'une petite biopsie cutanée sont transduits à l'aide d'un rétrovirus (*CD24 IRES GFP*) permettant d'exprimer à la fois l'antigène de surface CD24 et le gène d'intérêt (ici le « gène fluorescent *GFP* »). Après cette étape de transduction, les kératinocytes exprimant le CD24 à leur surface sont sélectionnés grâce à un anticorps anti-CD24 et un système de tri par billes magnétiques. Toutes les cellules exprimant le CD24 de façon naturelle et/ou ectopique sont ainsi isolées et remises en culture. Après quelques passages, seules les cellules de la couche basale efficacement transduites (et exprimant donc à la fois le CD24 ectopique et la *GFP*) persisteront en culture car ce sont les seules à conserver un pouvoir prolifératif.

L'expression de CD24 a été mise en évidence à la surface des cellules suprabasales de l'épiderme. Les cellules prolifératives de la couche basale n'expriment pas ce marqueur (Magnaldo & Barrandon, 1996) (figure 1, figure 2). Cette observation souligne deux points essentiels qui sont à la base du développement de notre stratégie : (1) la co-expression ectopique de CD24 et du gène thérapeutique d'intérêt dans les cellules prolifératives (i.e. dans les cellules d'amplification transitoire et dans les cellules souches) devrait permettre de les sélectionner à l'aide d'un anticorps spécifique ; (2) CD24 est une protéine naturellement exprimée dans l'épiderme, ce qui suggère que son expression ectopique dans les cellules basales devrait être tolérée par l'organisme après réimplantation chez le patient immunocompétent.

La stratégie mise en œuvre est illustrée par la figure 2. Une culture de masse de kératinocytes primaires (contenant à la fois des cellules souches et des cellules engagées dans la différenciation) est infectée par des rétrovirus permettant l'expression de CD24 et du gène d'intérêt (gène thérapeutique ou gène traceur, ici la protéine fluorescente *GFP*). La sélection des cellules transduites se déroule en deux étapes. La première étape consiste à isoler toutes les cellules qui expriment le CD24 à leur surface

après la transduction grâce à un anticorps spécifique couplé à des billes magnétiques. Les kératinocytes prolifératifs qui expriment CD24 de façon ectopique et les kératinocytes différenciés qui expriment de façon naturelle (et/ou ectopique) ce marqueur seront ainsi isolés. La population kératinocytaire ainsi sélectionnée est ensuite remise en culture en conditions standards. A ce stade, une étape de « sélection naturelle » va permettre d'éliminer en un ou deux passages les cellules différenciées car elles sont incapables de proliférer (figure 2). Grâce à cette stratégie, il est possible d'obtenir en quelques passages une population homogène de cellules présentant un potentiel prolifératif élevé. Mais quelle est la nature des cellules transduites et ainsi sélectionnées et surtout, cette population contient-elle des cellules souches ?

Quel est le potentiel de croissance des cellules sélectionnées ?

Afin de répondre à cette question, il a été nécessaire de réaliser des passages en série des cellules transduites et sélectionnées (*CD24+/GFP+*) et des cellules non transduites et non sélectionnées (cellules témoins). Plus de 45 passages ont été réalisés et à chacun de ces passages, nous avons déterminé de façon quantitative

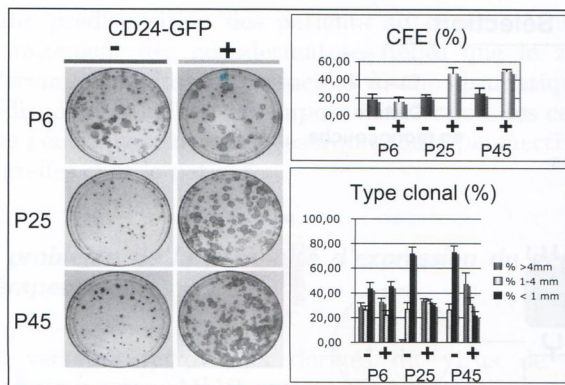


Fig. 3. Analyses clonales des kératinocytes transduits et sélectionnés à l'aide du marqueur CD24. Tout au long de leur passage sérié, les kératinocytes primaires humains témoins (non transduits et non sélectionnés, (-)) ou transduits par les vecteurs rétroviraux CD24 IRES GFP et sélectionnés à l'aide du marqueur CD24 (+) ont été soumis à des analyses clonales. Les passages intermédiaires (P6, P25, P45) sont indiqués sur la gauche. La CFE (colony forming efficiency, %) donne la capacité relative des cellules à former des colonies. Le type clonal (%) indique la représentation relative des trois types clonaux dans les cellules contrôle (-) et les cellules transduites et sélectionnées (+).

(colony forming efficiency, CFE) et qualitative (distribution en fonction du type de colonie) l'efficacité de ces cellules à former des colonies (figure 3). Grâce aux critères morphologiques du classement de Barandon et Green (1987), nous avons pu mettre en évidence qu'aux premiers passages après transduction, les cellules CD24+/GFP+ présentent une efficacité de clonage et une distribution des types de colonies identiques à celles des cellules témoins. Entre le passage 6 et le passage 15, la CFE augmente de 20 % à 50%, et reste stabilisée jusqu'au passage 45. L'analyse qualitative montre une augmentation progressive du nombre de colonies de plus de 4 mm (comprenant les holoclones) au cours des passages, associée à une diminution du nombre de paraclones dans la population CD24+/GFP+. Au contraire, dans la population témoin, on observe une diminution du pourcentage d'holoclones au profit des paraclones. La capacité des cellules CD24+/GFP+ à : (1) proliférer pendant plus de 300 générations; (2) atteindre une CFE d'environ 50% et, (3) former une majorité d'holoclones suggère que la stratégie de sélection CD24 permet d'enrichir la population transduite en cellules souches (figure 3).

Les cellules sélectionnées expriment-elles le transgène à long terme ex vivo ?

Cette question est évidemment primordiale dans toute approche de thérapie génique. Les protéines extraites

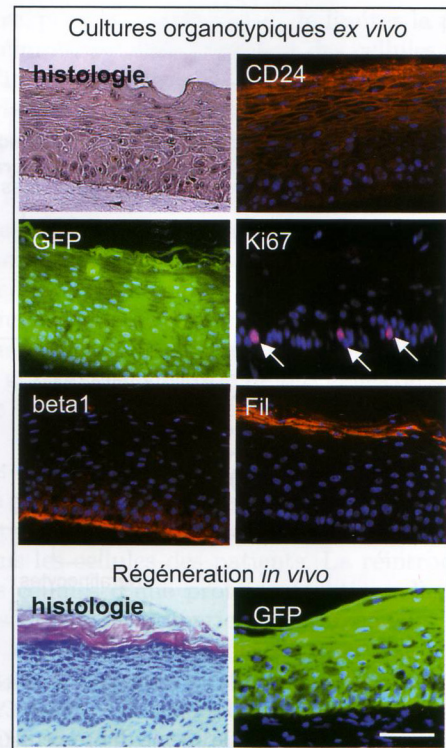


Fig. 4. Reconstruction d'un épiderme *in vitro* puis *in vivo* chez la souris SCID. Des cultures organotypiques de peau ont été générées *ex vivo* à partir des kératinocytes génétiquement modifiés exprimant le CD24. L'expression du marqueur de surface CD24, révélée par immunofluorescence indirecte, est homogène dans tout l'épiderme. C'est donc bien la version exogène du CD24 qui est exprimée dans les cellules basales et directement suprabasales. La fluorescence de la GFP a été révélée sous lumière ultraviolette. Ki67 est un antigène associé aux cellules en division ; son expression, révélée ici par immunofluorescence indirecte (flèches), témoigne d'un taux de prolifération normal. Les profils d'expression de l'intégrine beta 1 (*beta1*), marqueur de la couche basale, et de la flaggrine (*Fil*), marqueur tardif, sont tout à fait normaux et témoignent du bon déroulement de la différenciation épidermique des cellules génétiquement manipulées.

La régénération *in vivo*, chez la souris athymique, d'un épiderme normal à partir des kératinocytes génétiquement manipulés est illustrée par l'histologie du greffon après 22 semaines de greffe. La fluorescence de la GFP est présente sans atténuation tout au long de la survie de la greffe, ce qui témoigne de la pérennité d'expression du transgène. Barre : 100 μ m.

à chaque passage à partir des cellules transduites ou témoins ont été analysées par les techniques de western blot et d'immunofluorescence (données non montrées et figure 4) (Bergoglio *et al.*, 2007). Les résultats montrent que l'expression ectopique du CD24 et du gène traceur de la GFP restent stables au cours de la propagation des cellules CD24+/GFP+.

La sélection est-elle compatible avec le respect du programme de différenciation épidermique *ex vivo* ?

Le bon déroulement du programme de différenciation des kératinocytes CD24+/GFP+ a été démontré par leur capacité à former un épiderme normalement stratifié en culture organotypique *ex vivo*. Les épidermes formés par les cellules CD24+/GFP+ sont histologiquement comparables aux épidermes formés par les cellules contrôles. De plus, la détection par immunomarquage de marqueurs de différenciation spécifiques de la couche basale (intégrine β 1) ou des couches suprabasales (kératine 10 et filaggrine) ont permis de confirmer le bon déroulement du programme de différenciation épidermique dans les peaux CD24+/GFP+ organotypiques reconstruites *in vitro*.

Grâce à la technique de greffe orthotopique sur des souris athymiques, nous avons également vérifié la capacité des kératinocytes CD24+/GFP+ à régénérer à long terme un épiderme normal *in vivo*. Tout comme les cultures de peau organotypique *ex vivo*, les épidermes régénérés *in vivo* présentent des caractéristiques histologiques normales et un programme de différenciation respecté.

Application au xeroderma pigmentosum

Rayonnement ultraviolet et cancérogénèse cutanée

La peau, enveloppe protectrice de l'organisme, est la première cible du rayonnement ultraviolet (UVB, 280-320 nm; UVA, 320-400 nm) issu de la lumière solaire. Ce rayonnement constitue le principal facteur environnemental responsable des dégradations structurales et fonctionnelles de la peau. Les UVB sont en effet absorbés par les cycles aromatiques de l'ADN et provoquent la formation de photoproduits génotoxiques au niveau des séquences bipyrimidiques de la double hélice : les dimères cyclobuténiques de pyrimidines (CPD) et les dimères (6-4) pyrimidine-pyrimidone (6-4PP). Au cours de la division cellulaire, la répllication de ces lésions peut être mutagène et donc potentiellement oncogénique. Ainsi, l'introduction de mutations dans une cellule souche de la couche basale épidermique conduit au développement des cancers de la peau les plus fréquents chez l'homme : les carcinomes baso- et spino-cellulaires, dont l'étiologie est clairement liée à l'exposition solaire. La réparation de l'ADN constitue donc la première ligne de défense des cellules de la peau. Le mécanisme de réparation par excision de nucléotides (NER) est le processus le plus polyvalent prenant en charge la réparation des dommages présents sur l'ADN. Les principaux substrats du NER, et les plus importants d'un point de vue clinique, sont les dimères de pyrimidines induits par les UV (Bergoglio & Magnaldo, 2006).

Le xeroderma pigmentosum, maladie du NER (Nucleotide Excision Repair)

Le *xeroderma pigmentosum* (XP) est une maladie génétique rare (1/500.000 naissances environ dans notre région du globe), transmise sur le mode autosomique et récessif. Les patients XP souffrent d'une photosensibilité exacerbée, associée à une prédisposition dramatique au développement de tumeurs cutanées (carcinomes cutanés baso- et spino-cellulaires, mélanomes malins) dans les zones corporelles photo-exposées (Kraemer *et al.*, 1987). Les analyses biochimiques et génétiques ont montré que les cellules de ces patients présentent une incapacité majeure à éliminer les lésions introduites dans l'ADN par les UV en raison de l'altération du fonctionnement du NER. Le décryptage moléculaire du XP a été compliqué par la variabilité des symptômes cliniques indépendants de la photosensibilité. Ainsi, alors que certains patients XP présentent des désordres neurologiques, d'autres en sont épargnés. L'hétérogénéité clinique reflète en réalité une hétérogénéité génétique. On sait maintenant que les cellules des patients XP forment sept groupes de complémentation, XP-A à XP-G, tous déficitaires pour le NER puisque les sept gènes correspondants (*XPA* à *XPG*) codent tous pour des protéines impliquées directement dans ce processus de réparation (Hoeijmakers, 2001).

Environ 50 % de patients XP appartiennent au groupe de complémentation XP-C. La protéine XPC joue un rôle essentiel dans la reconnaissance de la lésion et le recrutement du complexe multiprotéique chargé de sa résolution. Le taux de NER résiduel chez ces patients est donc très faible (environ 10 %). Les symptômes des patients XP-C sont, en principe, limités à la photosensibilité et à la prédisposition aux cancers cutanés. Le groupe XP-C semble donc être le meilleur candidat à la thérapie génique cutanée (Magnaldo, 2004).

La thérapie génique cutanée *ex vivo* : un véritable espoir pour le xeroderma pigmentosum

En dehors d'une surveillance dermatologique très sérieuse, associée à une photoprotection maximale, il n'existe pas de solution thérapeutique pour les patients XP. Comme pour le cas des grands brûlés, les zones cutanées trop endommagées par le développement, puis l'exérèse des tumeurs épidermiques peuvent être remplacées par de la peau saine par autogreffe. Les cellules greffées demeurent toutefois incapables de réparer leur ADN. La thérapie génique *ex vivo* des cellules souches épidermiques pourrait donc constituer, pour les patients XP-C notamment, un réel espoir thérapeutique. Une des

premières étapes a été de réaliser la première re-contruction organotypique de peau XP *ex vivo*, d'en décrire pour la première fois les anomalies (Bernerd *et al.*, 2001; Bernerd *et al.*, 2005) puis d'en proposer la première étape de la thérapie génique épidermique *ex vivo*, bien que toutefois à court terme (six semaines) (Arnaudeau-Begard *et al.*, 2003). Ainsi la réintroduction d'une ou de plusieurs copies saines du gène *XPC* à l'aide des moyens appropriés dans des kératinocytes de patients XP-C propagés en culture permettrait de générer, puis de greffer chez le patient, de petites surfaces d'épithélium de culture génétiquement corrigé. La mise au point d'un système de sélection non invasif des cellules souches épidermiques génétiquement corrigées devrait être une aide précieuse à cet égard.

Conclusions :

Les efforts de manipulation génétique des cellules souches épidermiques à visée thérapeutique devraient apporter beaucoup d'informations sur la connaissance fondamentale de ces cellules. Chez les patients aux conditions de vie particulièrement difficiles, les greffes de feuillets épidermiques génétiquement corrigés constituent un espoir réel.

Remerciements

La recherche a été soutenue par l'Association pour la Recherche sur le Cancer, la Fondation de l'Avenir, la Société Française de Dermatologie, l'Association Française contre les Myopathies. Ces associations sont vivement remerciées pour leur aide. Emilie Warrick est titulaire d'une allocation CIFRE CNRS/L'Oréal.

Références

- Arnaudeau-Begard, C., Brellier, F., Chevallier-Lagente, O., Hoeijmakers, J., Bernerd, F., Sarasin, A. & Magnaldo, T. Genetic correction of DNA repair-deficient/cancer-prone xeroderma pigmentosum group C keratinocytes. *Hum Gene Ther.* 2003, 14, 983-96.
- Baldeschi, C., Gache, Y., Rattenholl, A., Bouille, P., Danos, O., Ortonne, J. P., Bruckner-Tuderman, L. & Meneguzzi, G. Genetic correction of canine dystrophic epidermolysis bullosa mediated by retroviral vectors. *Hum Mol Genet.* 2003, 12, 1897-905.
- Barrandon, Y. & Green, H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987, 84, 2302-6.
- Bergoglio, V., Larcher, F., Chevallier-Lagente, O., Bernheim, A., Danos, O., Sarasin, A., Rio, M. D. & Magnaldo, T. Safe Selection of Genetically Manipulated Human Primary Keratinocytes with Very High Growth Potential Using CD24. *Mol Ther.* 2007.
- Bergoglio, V. & Magnaldo, T. Nucleotide Excision Repair and Related Human Diseases. Volff J-N (ed) : *Genome and Disease. Genome Dyn. Basel, Karger.* 2006, vol 1, 35-52.
- Bernerd, F., Asselineau, D., Frechet, M., Sarasin, A. & Magnaldo, T. Reconstruction of DNA repair-deficient xeroderma pigmentosum skin in vitro : a model to study hypersensitivity to UV light. *Photochem Photobiol.* 2005, 81, 19-24.
- Bernerd, F., Asselineau, D., Vioux, C., Chevallier-Lagente, O., Bouadjar, B., Sarasin, A. & Magnaldo, T. Clues to epidermal cancer proneness revealed by reconstruction of DNA repair-deficient xeroderma pigmentosum skin in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2001, 98, 7817-22.
- Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J. L., Bousso, P., Deist, F. L. & Fischer, A. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science.* 2000, 288, 669-72.
- Challita, P. M. & Kohn, D. B. Lack of expression from a retroviral vector after transduction of murine hematopoietic stem cells is associated with methylation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994, 91, 2567-71.
- Chen, M., Kasahara, N., Keene, D. R., Chan, L., Hoefler, W. K., Finlay, D., Barcova, M., Cannon, P. M., Mazurek, C. & Woodley, D. T. Restoration of type VII collagen expression and function in dystrophic epidermolysis bullosa. *Nat. Genet.* 2002, 32, 670-5.
- Choate, K. A. & Khavari, P. A. Sustainability of keratinocyte gene transfer and cell survival in vivo. *Hum. Gene Ther.* 1997, 8, 895-901.
- Choate, K. A., Medalie, D. A., Morgan, J. R. & Khavari, P. A. Corrective gene transfer in the human skin disorder lamellar ichthyosis. *Nat. Med.* 1996, 2, 1263-7.
- Dellambra, E., Prislei, S., Salvati, A. L., Madeddu, M. L., Golisano, O., Siviero, E., Bondanza, S., Ciczuzza, S., Orecchia, A., Giancotti, F. G., Zambruno, G. & De Luca, M. Gene correction of integrin beta4-dependent pyloric atresia-junctional epidermolysis bullosa keratinocytes establishes a role for beta4 tyrosines 1422 and 1440 in hemidesmosome assembly. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 41336-42.
- Dellambra, E., Vailly, J., Pellegrini, G., Bondanza, S., Golisano, O., Macchia, C., Zambruno, G., Meneguzzi, G. & De Luca, M. Corrective transduction of human epidermal stem cells in laminin-5-dependent junctional epidermolysis bullosa. *Hum. Gene Ther.* 1998, 9, 1359-70.
- Deng, H., Choate, K. A., Lin, Q. & Khavari, P. A. High-efficiency gene transfer and pharmacologic selection of genetically engineered human keratinocytes. *Biotechniques.* 1998, 25, 274-80.
- Fenjves, E. S., Yao, S. N., Kurachi, K. & Taichman, L. B. Loss of expression of a retrovirus-transduced gene in human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 1996, 106, 576-8.
- Gache, Y., Baldeschi, C., Del Rio, M., Gagnoux-Palacios, L., Larcher, F., Lacour, J. P. & Meneguzzi, G.

- Construction of skin equivalents for gene therapy of recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Hum. Gene Ther.* 2004, 15, 921-33.
- Gagnoux-Palacios, L., Hervouet, C., Spirito, F., Roques, S., Mezzina, M., Danos, O. & Meneguzzi, G. Assessment of optimal transduction of primary human skin keratinocytes by viral vectors. *J. Gene Med.* 2005, 7, 1178-86.
- Gallico, G. G., 3rd, O'Connor, N. E., Compton, C. C., Kehinde, O. & Green, H. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N. Engl. J. Med.* 1984, 311, 448-51.
- Gambardella, L. & Barrandon, Y. The multifaceted adult epidermal stem cell. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2003, 15, 771-7.
- Gerrard, A. J., Hudson, D. L., Brownlee, G. G. & Watt, F. M. Towards gene therapy for haemophilia B using primary human keratinocytes. *Nat. Genet.* 1993, 3, 180-3.
- Ghazizadeh, S., Doumeng, C. & Taichman, L. B. Durable and stratum-specific gene expression in epidermis. *Gene Ther.* 2002, 9, 1278-85.
- Ghazizadeh, S., Harrington, R. & Taichman, L. In vivo transduction of mouse epidermis with recombinant retroviral vectors : implications for cutaneous gene therapy. *Gene Ther.* 1999, 6, 1267-75.
- Ghazizadeh, S., Katz, A. B., Harrington, R. & Taichman, L. B. Lentivirus-mediated gene transfer to human epidermis. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 2004, 9, 269-75.
- Gram, G. J., Nielsen, S. D. & Hansen, J. E. Spontaneous silencing of humanized green fluorescent protein (hGFP) gene expression from a retroviral vector by DNA methylation. *J. Hematother.* 1998, 7, 333-41.
- Green, H. The keratinocyte as differentiated cell type. *Harvey. Lect.* 1980, 74, 101-39.
- Green, H., Kehinde, O. & Thomas, J. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1979, 76, 5665-8.
- Hoeijmakers, J. H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 2001, 411, 366-74.
- Kaur, P. Interfollicular epidermal stem cells : identification, challenges, potential. *J. Invest. Dermatol.* 2006, 126, 1450-8.
- Kolodka, T. M., Garlick, J. A. & Taichman, L. B. Evidence for keratinocyte stem cells in vitro : long term engraftment and persistence of transgene expression from retrovirus-transduced keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1998, 95, 4356-61.
- Kraemer, K. H., Lee, M. M. & Scotto, J. Xeroderma pigmentosum. Cutaneous, ocular, and neurologic abnormalities in 830 published cases. *Arch. Dermatol.* 1987, 123, 241-50.
- Lajtha, L. G. Stem cell concepts. *Differentiation.* 1979, 14, 23-34.
- Levy, L., Broad, S., Zhu, A. J., Carroll, J. M., Khazaal, I., Peault, B. & Watt, F. M. Optimised retroviral infection of human epidermal keratinocytes : long-term expression of transduced integrin gene following grafting on to SCID mice. *Gene Ther.* 1998, 5, 913-22.
- Lu, Z. & Ghazizadeh, S. Host immune responses in ex vivo approaches to cutaneous gene therapy targeted to keratinocytes. *Exp. Dermatol.* 2005, 14, 727-35.
- Lu, Z. & Ghazizadeh, S. Loss of transgene following ex vivo gene transfer is associated with a dominant Th2 response : implications for cutaneous gene therapy. *Mol. Ther.* 2007, 15, 954-61.
- Magnaldo, T. Xeroderma pigmentosum : from genetics to hopes and realities of cutaneous gene therapy. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2004, 4, 169-79.
- Magnaldo, T. & Barrandon, Y. CD24 (heat stable antigen, nectadrin), a novel keratinocyte differentiation marker, is preferentially expressed in areas of the hair follicle containing the colony-forming cells. *J. Cell. Sci.* 1996, 109 (Pt 13), 3035-45.
- Mathor, M. B., Ferrari, G., Dellambra, E., Cilli, M., Mavilio, F., Cancedda, R. & De Luca, M. Clonal analysis of stably transduced human epidermal stem cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1996, 93, 10371-6.
- Mavilio, F., Pellegrini, G., Ferrari, S., Di Nunzio, F., Di Iorio, E., Recchia, A., Maruggi, G., Ferrari, G., Provasi, E., Bonini, C., Capurro, S., Conti, A., Magnoni, C., Giannetti, A. & De Luca, M. Correction of junctional epidermolysis bullosa by transplantation of genetically modified epidermal stem cells. *Nat. Med.* 2006, 12, 1397-402.
- Morgan, J. R., Barrandon, Y., Green, H. & Mulligan, R. C. Expression of an exogenous growth hormone gene by transplantable human epidermal cells. *Science*, 1987, 237, 1476-9.
- Pellegrini, G., Bondanza, S., Guerra, L. & De Luca, M. Cultivation of human keratinocyte stem cells : current and future clinical applications. *Med. Biol. Eng. Comput.* 1998, 36, 778-90.
- Pellegrini, G., Ranno, R., Stracuzzi, G., Bondanza, S., Guerra, L., Zambruno, G., Micali, G. & De Luca, M. The control of epidermal stem cells (holoclones) in the treatment of massive full-thickness burns with autologous keratinocytes cultured on fibrin. *Transplantation*, 1999, 68, 868-79.
- Rheinwald, J. G. & Green, H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes : the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell.* 1975, 6, 331-43.
- Robbins, P. B., Lin, Q., Goodnough, J. B., Tian, H., Chen, X. & Khavari, P. A. In vivo restoration of laminin 5 beta 3 expression and function in junctional epidermolysis bullosa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2001, 98, 5193-8.
- Ronfard, V., Rives, J. M., Neveux, Y., Carsin, H. & Barrandon, Y. Long-term regeneration of human epidermis on third degree burns transplanted with autologous cultured epithelium grown on a fibrin matrix. *Transplantation*, 2000, 70, 1588-98.
- Seitz, C. S., Giudice, G. J., Balding, S. D., Marinkovich, M. P. & Khavari, P. A. BP180 gene delivery in junctional epidermolysis bullosa. *Gene Ther.* 1999, 6, 42-7.
- Watt, F. M., Lo Celso, C. & Silva-Vargas, V. Epidermal stem cells : an update. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2006, 16, 518-24.

ANNEXE 3 : Revue publiée dans Médecine/Science (2008)

[Cutaneous gene therapy : the graft takes]

Thérapie génique cutanée : la greffe prend.

Valérie Bergoglio, Emilie Warrick, Odile Chevallier-Lagente, Thierry Magnaldo

Med/Sci 2008 ;6-7(24) :607-14.

► La thérapie génique *ex vivo* consiste à exprimer de façon stable, dans des cellules de patients en culture, une version saine du gène muté responsable de la maladie, puis à réimplanter ces cellules « corrigées » chez le patient. La correction génétique n'est pérenne que si le gène thérapeutique est transféré dans les cellules souches du tissu concerné. Dans le cas des maladies génétiques cutanées prédisposant au cancer, un impératif est de réimplanter chez le patient des populations pures de cellules épidermiques génétiquement corrigées, ce qui nécessite leur sélection. Toutefois, l'étape de sélection peut altérer les cellules souches et augmenter le risque de rejet immunitaire. Ces difficultés ont pu être contournées en « étiquetant » les cellules souches épidermiques génétiquement manipulées à l'aide d'une petite protéine de surface naturellement exprimée dans la peau. Les cellules souches génétiquement manipulées et sélectionnées par cette méthode conservent toutes leurs propriétés et sont ainsi capables, lorsqu'elles sont greffées chez la souris, de régénérer une peau humaine normale à très long terme. Ces avancées devraient contribuer à améliorer les approches de thérapie génique cutanée des maladies prédisposant aux cancers de la peau et qui restent aujourd'hui sans traitement, notamment le *xeroderma pigmentosum*. Si ces avancées paraissent significatives, d'autres efforts sont encore nécessaires pour améliorer la qualité des greffons cutanés qui restent jusqu'à présent dépourvus d'annexes (follicules pileux, glandes sudorales), un inconvénient majeur en termes d'esthétique et de confort. ◀

Thérapie génique cutanée

La greffe prend

Valérie Bergoglio, Emilie Warrick,
Odile Chevallier-Lagente, Thierry Magnaldo

Génomés et Cancers,
CNRS FRE 2939,
Institut Gustave Roussy,
39, rue Camille Desmoulins,
94805 Villejuif, France.
magnaldo@igr.fr

Depuis près d'une vingtaine d'années, les maladies génétiques touchant différents organes ou tissus ont fait l'objet de recherches intenses dans l'espoir de les traiter par des approches de « correction génétique ». L'option la plus commune est l'introduction dans le génome de la cellule malade d'une ou de plusieurs copies saines du gène dont la mutation est à l'origine de la maladie, soit *in vivo* chez le patient, soit *ex vivo* dans les cellules en culture du patient. Les stratégies *in vivo* sont confrontées aux problèmes de l'accessibilité du tissu cible, de la spécificité et du rendement de la correction. Dans le cas de l'approche *ex vivo*, il faut, bien entendu, maîtriser la culture des cellules appropriées (provenant de l'organe ou du tissu ciblé) et pouvoir corriger fonctionnellement et à long terme leur défaut génétique tout en préservant les perspectives de réimplantation chez le patient.

L'épiderme, le tissu superficiel de la peau, occupe une place de premier plan dans le domaine de la thérapie génique [1-7]. L'accessibilité du tissu cutané est un avantage évident. Certaines maladies génétiques cutanées (les génodermatoses), parfois extrêmement invalidantes et compromettant le pronostic vital des patients, ne bénéficient d'aucun traitement curatif efficace. Dans ces cas rares, dont la liste figure dans le *Tableau 1*, la correction génétique des cellules pourrait donc être une solution thérapeutique [8].

Dès 1975, Rheinwald et Green [9] établissent dans un travail pionnier les conditions de la culture des kératinocytes épidermiques sains à très long terme. Dans les



Maladie	Gène	Protéine	Site d'expression	Altérations
Ichtyose lamellaire	TGM1	Transglutaminase	Granuleuse	Fonction barrière
Ichtyose lié à l'X	STS	Aryl-C-sulfatase	Granuleuse	Fonction barrière
Épidermolyse hyperkératotique	KRT1/KRT10	Kératines K1/K10	Spineuses	Épidermolyse
Épidermolyse hyperkératotique palmoplantaire	KRT9	Kératine K9	Spineuses	Épidermolyse
Épidermolyse bulleuse « simplex »	KRT5/KRT14	Kératines K5/K14	Basale	Épidermolyse
Épidermolyse bulleuse jonctionnelle	LAMA3, LAMB2, LAMC2	Laminine 5 sous-unités, $\alpha 3, \beta 2, \gamma 2$	Membrane basale	Épidermolyse
	ITGA6, ITGB4	Intégrines $\alpha 6$, Intégrine $\beta 4$	Membrane basale	Épidermolyse
	Col17A1	Collagène 17/BP180	Membrane basale	Épidermolyse
Épidermolyse bulleuse dystrophique	Col7A1	Collagène 7	Membrane basale	Épidermolyse
Xeroderma pigmentosum	XPA à XPG	XPA à XPG	Ubiquitaire	Cancer cutané précoce

Tableau 1. Exemples de génodermatoses qui pourraient bénéficier d'une thérapie génique cutanée.

conditions optimales, il est possible d'obtenir 1,5 m² d'épithélium en culture en deux à trois semaines, à partir d'une biopsie de peau saine de quelques cm². L'autogreffe des épithélium de culture ainsi obtenus a permis de sauver des milliers de personnes très gravement brûlées [10-12]. En 1987, les équipes de Richard Mulligan et de Howard Green avec Yann Barrandon réussirent la première modification génétique de kératinocytes épidermiques humains en culture par transfert du gène de l'hormone de croissance à l'aide de rétrovirus recombinants [13]. À cette époque, la plupart des gènes responsables des génodermatoses étaient inconnus, mais les grandes lignes du schéma stratégique de la thérapie génique cutanée étaient néanmoins tracées. Vingt années de recherches plus tard, le groupe de Michele DeLuca a récemment rapporté la première greffe d'un épithélium de culture génétiquement modifié chez un patient atteint d'épidermolyse bulleuse jonctionnelle, une maladie due à la mutation d'un composant de la membrane basale (la laminine 5), support de l'épiderme [14, 38]. Si ce résultat concrétise l'aboutissement longtemps espéré de nombreux travaux expérimentaux antérieurs, et que le principe général de la thérapie génique cutanée *ex vivo* semble aujourd'hui acquis, certains aspects de la stratégie devront être adaptés à la nature de la pathologie ciblée, et, parmi ceux-ci, la nécessité ou non de sélectionner les cellules génétiquement corrigées. En effet, dans le cas des génodermatoses associées à une prédisposition aux cancers de la peau, en particulier le xeroderma pigmentosum ou certaines épidermolyses bulleuses (jonctionnelle ou dystrophiques), la sélection des cellules génétiquement corrigées est une exigence supplémentaire afin de limiter la possibilité de réimplanter chez le patient des cellules susceptibles d'initier une tumeur dans le greffon. À cet égard, une étude très récente de notre équipe CNRS à l'Institut Gustave Roussy « Génétique et physiopathologie des cancers épidermiques », montre qu'il est maintenant possible de sélectionner très efficacement et sans

altération des potentiels de croissance et de différenciation, une population kératinocytaire génétiquement manipulée et contenant une très forte proportion de cellules souches [15].

Thérapie génique cutanée : un cahier des charges contraignant

L'épiderme est un tissu stratifié dans lequel deux compartiments peuvent être distingués. La couche basale représente le compartiment prolifératif et contient une petite proportion de cellules souches (environ 1 %) [16, 17]. La cellule souche est une cellule capable d'assurer le renouvellement d'un organe ou d'un tissu au cours de la vie d'un individu [18]. Dans l'épiderme interfolliculaire, la localisation des cellules souches n'est pas clairement déterminée. Il faut donc distinguer les cellules souches interfolliculaires des cellules souches folliculaires qui, chez les rongeurs, occupent une localisation bien déterminée dans la partie supérieure du feuillet externe du follicule pileux appelée « bulge » (renflement en français) [19, 20 + blanpain] ; bien que le « bulge » ne soit pas détecté dans le follicule pileux humain, les cellules souches folliculaires y sont également concentrées dans une zone circonscrite du feuillet épithélial externe [21]. Les couches suprabasales de l'épiderme sont formées de cellules qui ne se divisent plus et sont engagées dans un processus séquentiel et irréversible de différenciation. Le renouvellement permanent

de l'épiderme et sa capacité régénérative en cas de blessure limitée attestent de la présence de cellules souches. L'équilibre entre prolifération dans la couche basale et différenciation dans les couches cellulaires suprabasales témoigne de l'homéostasie épidermique [22]. Cet équilibre est perdu dans les pathologies non cancéreuses comme par exemple le psoriasis, ainsi que dans les carcinomes cutanés.

Le schéma général de la thérapie génique cutanée *ex vivo* est présenté sur la Figure 1. Comme dans le cas des grands brûlés, il faut pouvoir répondre à plusieurs contraintes : (1) obtenir une culture de grande qualité, c'est-à-dire contenant des cellules souches en proportion suffisante pour y assurer l'introduction du gène approprié ; (2) assurer un très fort pourcentage de cellules corrigées fonctionnellement et la pérennité à long terme de la correction dans la descendance des cellules corrigées ; (3) valider l'efficacité de la correction chez l'animal, par exemple après régénération de peau à long terme à partir des cellules corrigées. Ainsi, des feuilletts épithéliaux humains génétiquement manipulés et cultivés *ex vivo* peuvent être greffés en lieu et place de la peau endogène chez des souris immunodéficientes [23]. Après quelques semaines, l'épiderme humain est produit et il est possible d'étudier sa fonction à long terme *in vivo* ; (4) établir l'innocuité de la correction génétique, en excluant les problèmes de mutagenèse insertionnelle,

de transactivation d'oncogènes et de rejet immunitaire potentiel des cellules corrigées [14]. L'accessibilité du greffon cutané permettrait cependant, en cas de nécessité, de le retirer beaucoup plus facilement que dans le cas d'une greffe de cellules hématopoïétiques génétiquement corrigées [24]. (5) Enfin, étape ultime à l'issue de ces vérifications, réaliser la greffe d'un épithélium de culture génétiquement corrigé chez le patient [14].

La présence de cellules souches, leur correction génétique et leur maintien sont les facteurs limitants de toute approche de thérapie génique cutanée, faute de quoi la pérennité de la correction génétique est compromise [25, 26].

Justification d'une stratégie de sélection des cellules génétiquement modifiées

Quelle que soit la pathologie, l'objectif le plus raisonnable est, en général, d'obtenir « le maximum » de cellules souches génétiquement corrigées, pour assurer une proportion élevée de cellules fonctionnelles génétiquement corrigées dans un épithélium de culture destiné à la greffe. Dans le cas des gnodermatoses associées à une prédisposition au cancer de la peau, en particulier *le xeroderma pigmentosum* ou les épidermolyses bulleuses dystrophiques ou jonctionnelles [27], il faut de plus limiter la possibilité de réimplanter avec le greffon des cellules potentiellement pré- cancéreuses ou cancéreuses - qui n'auraient pas reçu le gène thérapeutique. Il est alors nécessaire de « sélectionner » les cellules génétiquement corrigées, par exemple en co-exprimant dans les mêmes cellules le gène thérapeutique et un gène dont le produit confère la résistance à un

antibiotique [28]. La plupart des gènes de sélection proviennent de micro-organismes et leurs produits protéiques sont donc potentiellement immunogènes chez l'individu immunocompétent, excluant leur utilisation dans une perspective de greffe. C'est pourquoi l'essai rapporté par Mavilio *et al.* n'a été possible qu'en l'absence de transfert d'un gène de sélection mais, d'après les auteurs, « virtuellement » 100 % des cellules réimplantées chez le patient étaient corrigées [14, 38]. En revanche, dans la mesure où l'épidermolyse bulle jonctionnelle peut être associée aux carcinomes cutanés, la sélection des cellules génétiquement corrigées sera nécessaire dans les cas où l'efficacité de la correction génétique est inférieure à 100 %.

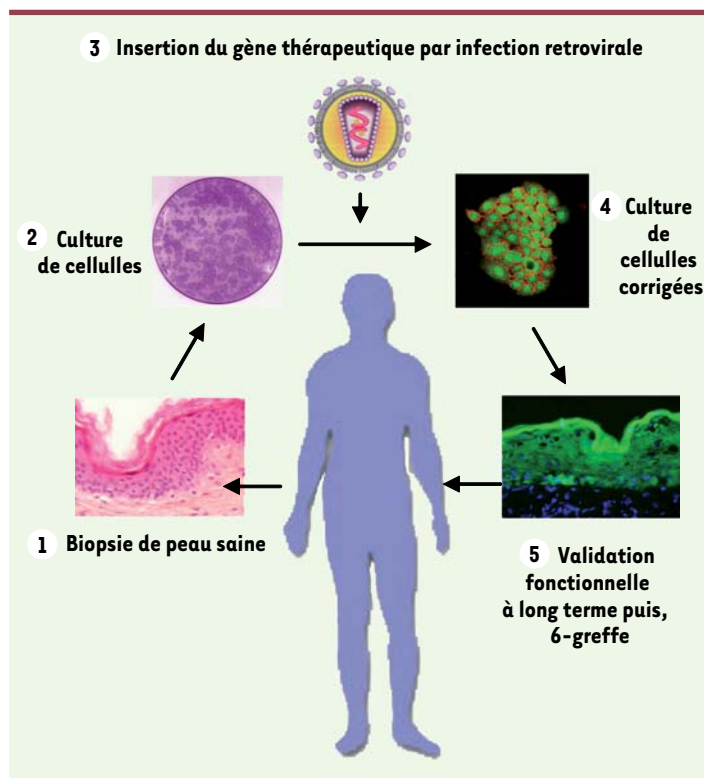


Figure 1. De la biopsie à l'autogreffe. À partir d'une biopsie de peau saine de quelques cm², il est possible, dans des conditions optimisées, d'obtenir des cultures de kératinocytes primaires *ex vivo* (1), et de suivre les étapes indiquées (2-5) pour arriver jusqu'à l'autogreffe chez le patient (6). Mavilio *et al.* [14] ont pu démontrer la faisabilité de cette stratégie dans le cas d'un patient atteint d'une épidermolyse bulleuse jonctionnelle.

Correction génétique *ex vivo* des kératinocytes épidermiques de xeroderma pigmentosum

Le *xeroderma pigmentosum* (XP) est une génodermatose très rare à transmission autosomique récessive, dont la caractéristique majeure est, précisément, une prédisposition extrême aux cancers de la peau. Dès le plus jeune âge, les patients atteints de XP présentent une forte intolérance au soleil, illustrée par d'importants coups de soleil à la moindre exposition. Les ultraviolets de la lumière solaire introduisent des lésions dans l'ADN. Chez les patients XP, le système de réparation de ces lésions par excision de nucléotide est inefficace [29, 30]. L'absence de réparation de ces lésions mutagènes peut être à l'origine du développement tumoral. Les enfants atteints de XP ne bénéficient d'aucun traitement réellement efficace, et la prise en charge n'inclut qu'une photoprotection et une surveillance dermatologique strictes, afin de limiter l'apparition des tumeurs. Comme dans le cas des épidermolyses bulleuses, l'absence de traitement efficace motive les approches de correction génétique *ex vivo* des kératinocytes épidermiques de patients XP [31, 32]. Dans ce cas, la forte prédisposition aux cancers cutanés d'origine kératinocytaire impose la sélection des cellules génétiquement corrigées susceptibles d'être réimplantées chez le patient. Une stratégie inédite de sélection des cellules corrigées a récemment été proposée par notre équipe. La Figure 2 illustre cette stratégie. Les cellules différenciées de l'épiderme, qui ont perdu tout potentiel prolifératif, expriment à leur surface une petite protéine appelée CD24 [33].

Aucune cellule de la couche basale n'exprime cette protéine, ce qui exclut son expression par les cellules souches. En culture, les cellules prolifératives sont issues de la couche basale. La stratégie a donc été de faire exprimer la protéine CD24 à la surface de ces cellules basales à l'aide d'un vecteur rétroviral. Grâce à cette petite « étiquette de surface », les cellules prolifératives (y compris les cellules souches) ayant été transduites avec succès et exprimant l'antigène CD24 peuvent être purifiées à l'aide d'un anticorps spécifique reconnaissant la petite protéine CD24. Si la culture contient également des cellules différenciées (qui expriment le CD24 naturellement), celles-ci seront également sélectionnées mais, compte tenu de leur état différencié, seront incapables de proliférer et seront donc éliminées au cours de la culture. Ainsi, si la petite étiquette CD24 est co-exprimée avec un gène d'intérêt, toutes les cellules purifiées sur le critère d'expression de CD24 exprimeront également le gène d'intérêt [34]. L'étude démontre que le schéma théorique de cette nouvelle stratégie de sélection est vérifié [15]. L'utilisation d'un gène traceur (*green fluorescent protein*, GFP) a permis de suivre l'évolution des kératinocytes épidermiques génétiquement modifiés. Le gène *CD24* et le gène codant la GFP ont été insérés dans un vecteur rétroviral dérivé du virus leucémogène de Moloney. Après leur infection par ces rétrovirus, les kératinocytes génétiquement manipulés ont été sélectionnés par immunoaffinité. De cette façon nous avons obtenu des populations quasiment pures (99,9 %) de cellules fluorescentes. La stabilité de l'expression des gènes codant la GFP et le CD24 exogènes a été observée pendant plus d'une année en culture au cours de laquelle les analyses clonales ont indiqué que la technique permettait d'enrichir fortement la population en cellules souches génétiquement manipulées (Figure 3). Ces cellules ont conservé un caryotype normal ainsi que tous leurs potentiels : elles sont ainsi capables de former une peau normale en

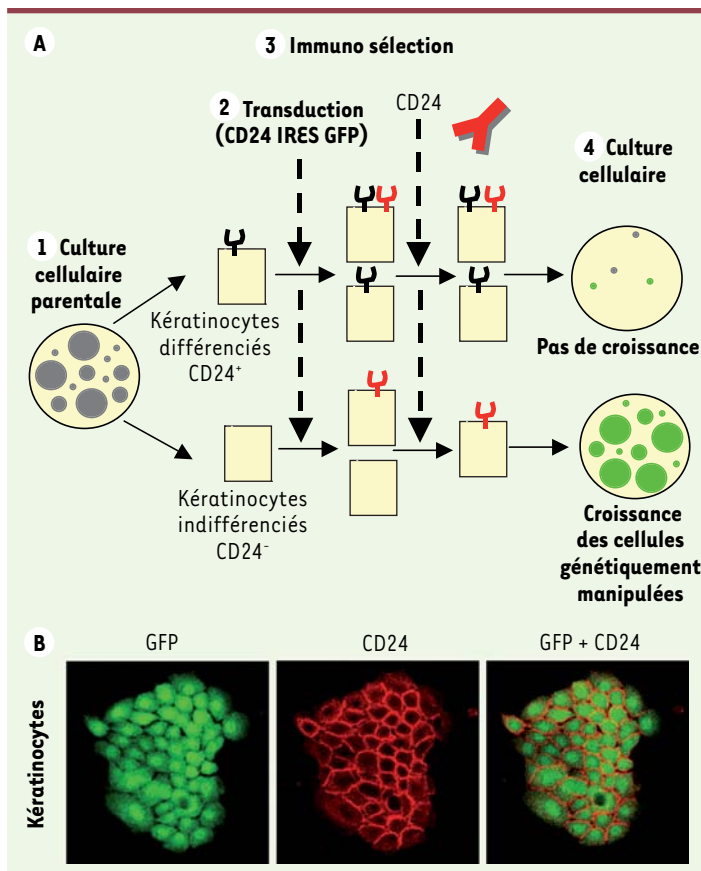


Figure 2. A. Schéma théorique de la stratégie de sélection CD24. Les cellules cultivées (1) à partir d'une petite biopsie cutanée sont infectées par un rétrovirus (CD24 IRES GFP, 2) permettant d'exprimer le gène de complément génétique aux vertus thérapeutiques. Ici, le gène choisi code pour la protéine GFP, qui émet de la fluorescence. Les cellules génétiquement modifiées sont ensuite sélectionnées à l'aide d'un anticorps spécifique (3), puis propagées en culture (4). B. Tous les kératinocytes infectés par le rétrovirus CD24 IRES GFP puis sélectionnés pour l'expression du CD24, expriment à la fois la GFP et le CD24 exogène, comme indiqué.

terme de différenciation et de prolifération en culture organotypique *ex vivo* et, également, de régénérer à long terme (22 semaines) une peau normale *in vivo* après greffe chez la souris immunodéficiente (nu/nu) (Figure 3).

Cette méthode de sélection respecte donc le cahier des charges de la thérapie génique cutanée *ex vivo*. L'enrichissement des populations sélectionnées en cellules souches interfolliculaires devrait aussi permettre de progresser dans leur caractérisation. En effet, en raison de leur « dispersion » dans la couche basale de l'épiderme interfolliculaire, celles-ci ont été beaucoup moins étudiées que les cellules souches folliculaires qui occupent une localisation précise dans le follicule pileux [20, 35].

Perspectives thérapeutiques dans le xeroderma pigmentosum

Grâce à cette nouvelle technique de sélection non invasive, une priorité de l'équipe est maintenant de corriger à très long terme les défauts de réparation de l'ADN des kératinocytes isolés à partir de patients XP atteints du groupe de complémentarité le plus fréquent, XP-C [29, 30]. Il faudra non seulement vérifier que les peaux XP-C génétiquement corrigées sont capables de réparation après irradiation UV, mais aussi que les altérations de la différenciation épidermique rapportées dans les cultures organotypiques de peau XP-C sont également corrigées [36]. Une fois toutes les vérifications décrites ci-dessus réalisées, il sera alors possible d'envisager, dans un premier temps, de greffer chez les patients des petites surfaces d'épithélium de culture génétiquement corrigé. Cette possibilité dépendra elle-même de l'obtention d'autorisations légales.

Plusieurs questions restent toutefois posées, notamment celle du rôle de CD24 dans l'épiderme, qui reste inconnu. Chez l'homme, le CD24 est une petite protéine de 80 acides aminés. L'enchaînement peptidique ancré à la membrane cellulaire *via* un glycophosphatidyl inositol subit de nombreuses glycosylations augmentant considérablement son poids moléculaire apparent (environ 45 à 65 kDa en fonction des tissus). La petite taille du cadre de lecture de CD24 est un avantage, car elle n'utilise qu'une petite partie de la capacité cargo des vecteurs rétroviraux. L'inactivation du gène *cd24* par recombinaison homologue chez la souris n'a provoqué aucun phénotype cutané [33].

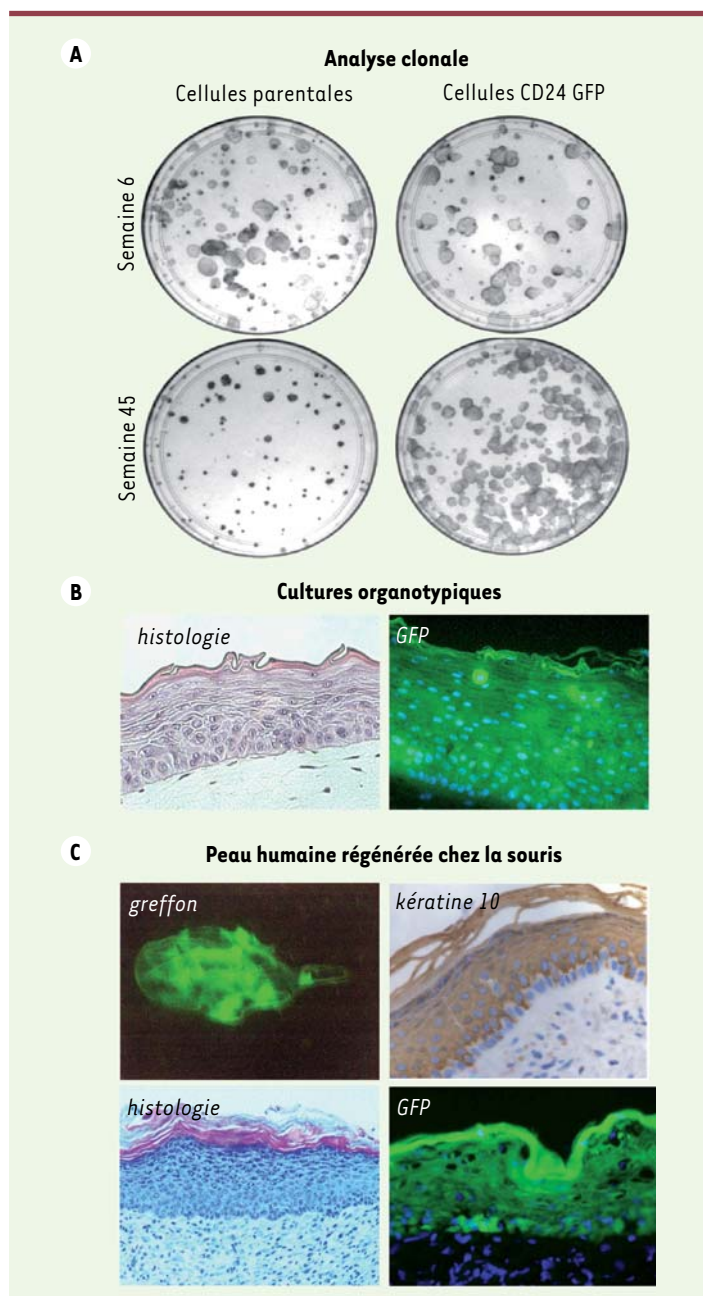


Figure 3. Régénération à long terme d'une peau normale après greffe chez la souris immunodéficiente. **A.** Résultats de l'analyse clonale (analyse clonale) obtenue soit avant la transduction rétrovirale (cellules parentales), soit après transduction rétrovirale et tri cellulaire sur le critère « expression du CD24 » (cellules CD24 GFP). Quarante-cinq semaines après la sélection, il est clair que les cellules transduites par le vecteur CD24 GFP présentent un potentiel clonogénique supérieur et génèrent des clones de taille supérieure (semaine 45, cellules CD24 GFP) par comparaison avec les cellules parentales au même passage (semaine 45, cellules parentales). **B.** Les cultures organotypiques (cultures organotypiques) montrent que l'histologie est correcte (histologie) et que toutes les cellules épidermiques expriment le gène traceur codant la GFP (GFP). **C.** L'expression du gène traceur *GFP* persiste à long terme dans la peau qui est produite après greffe sur la souris athymique *Nude* (22 semaines après greffe). L'histologie (histologie) et la différenciation épidermique (kératine 10) sont normales.

Par ailleurs, nos expériences décrites ci-dessus [15] ont montré que l'expression ectopique de CD24 dans les cellules souches épidermiques n'affecte pas leur devenir. Compte tenu de son expression naturelle dans l'épiderme, l'utilisation du marqueur CD24 pour sélectionner les cellules basales génétiquement manipulées pourrait être immunologiquement compatible avec la greffe chez les patients atteints de génodermatoses prédisposant aux cancers cutanés comme le XP ou certaines épidermolyses bulleuses. Il faut espérer que l'optimisation des techniques de greffes, aujourd'hui encore limitées à des feuilletts épithéliaux dépourvus d'annexes, contribuera à un meilleur confort chez le patient.

Au-delà de ces perspectives appliquées à la thérapie génique cutanée, le système mis en place permettra aussi d'examiner à très long terme le devenir de cellules humaines primaires génétiquement manipulées. Par exemple, il sera possible d'examiner l'impact de l'extinction stable de gènes dont les produits participent au contrôle de la prolifération cellulaire (par exemple, *P53*, *PATCHED*, ou à la réparation de l'ADN par excision de nucléotides comme *XPC* ou *XPD*, et dont les mutations peuvent être associées au cancer ou à une prédisposition au cancer. Le système de sélection mis en place pourrait également permettre de développer des modèles pathologiques par greffe sur la souris des cellules primaires humaines génétiquement manipulées pour l'extinction de gènes spécifiques ou la surexpression de mutations spécifiques [23].

Les retombées fondamentales et appliquées pourraient profiter non seulement aux patients atteints de maladies rares, et notamment les patients XP, mais aussi à la population générale. La possibilité de régénérer à long terme de la peau humaine pathologique chez la souris permettra d'une part, un meilleur décryptage des événements moléculaires associés au développement des carcinomes cutanés, et, d'autre part, d'étudier l'efficacité de traitements pharmacologiques des carcinomes cutanés. Il faut ici rappeler que le cancer de la peau non mélanocytaire est au premier rang de toutes les tumeurs chez l'homme et continue de progresser de façon constante [37]. ♦

REMERCIEMENTS

Je remercie le Dr Françoise Bernerd pour ses encouragements et sa lecture critique. La recherche a été soutenue par l'Association pour la Recherche sur le Cancer, la Fondation de l'Avenir, la Société Française de Dermatologie, l'Association Française contre les Myopathies. Ces associations sont vivement remerciées pour leur aide.

SUMMARY

Cutaneous gene therapy: the graft takes

Prospects of *ex vivo* cutaneous gene therapy rely on stable corrective gene transfer in epidermal stem cells followed by engraftment of corrected cells in patients. In the case of cancer prone genodermatoses, such as xeroderma pigmentosum, cells that received the corrective gene must be selected. However, this step is potentially harmful and can increase risks of immune rejection of grafts. These obstacles have recently been overcome thanks to the labeling of genetically

modified stem cells using a small epidermal protein naturally absent in stem cells. This approach was shown to be respectful of the fate of epidermal stem cells that retained full growth and differentiation capacities, as well as their potential to regenerate normal human skin when grafted in a mouse model in the long term. These progresses now open realistic avenues towards *ex vivo* cutaneous gene therapy of cancer prone genodermatoses such as xeroderma pigmentosum. However, major technical improvements are still necessary to preserve skin appendages which would contribute aesthetic features and comfort of patients. ♦

RÉFÉRENCES

1. Choate KA, Medalie DA, Morgan JR, Khavari PA. Corrective gene transfer in the human skin disorder lamellar ichthyosis. *Nat Med* 1996; 2: 1263-7.
2. Ghazizadeh S, Harrington R, Garfield J, Taichman LB. Retrovirus-mediated transduction of porcine keratinocytes in organ culture. *J Invest Dermatol* 1998; 111: 492-6.
3. Dellambra E, Vailly J, Pellegrini G, et al. Corrective transduction of human epidermal stem cells in laminin-5-dependent junctional epidermolysis bullosa. *Hum Gene Ther* 1998; 9: 1359-70.
4. Vailly J, Gagnoux-Palacios L, Dell'Ambrà E, et al. Corrective gene transfer of keratinocytes from patients with junctional epidermolysis bullosa restores assembly of hemidesmosomes in reconstructed epithelia. *Gene Ther* 1998; 5: 1322-32.
5. Khavari PA. Genetic correction of inherited epidermal disorders. *Hum Gene Ther* 2000; 11: 2277-82.
6. Robbins PB, Lin Q, Goodnough JB, et al. *In vivo* restoration of laminin 5 beta 3 expression and function in junctional epidermolysis bullosa. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 5193-8.
7. Larcher F, Dellambra E, Rico L, et al. Long-term engraftment of single genetically modified human epidermal holoclones enables safety pre-assessment of cutaneous gene therapy. *Mol Ther* 2007; 15: 1670-6.
8. Magaldi T, Sarasin A. Genetic reversion of inherited skin disorders. *Mutat Res* 2002; 509: 211-20.
9. Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 1975; 6: 331-43.
10. Gallico GG 3rd, O'Connor NE, Compton CC, et al. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N Engl J Med* 1984; 311: 448-51.
11. Ronfard V, Rives JM, Neveux Y, et al. Long-term regeneration of human epidermis on third degree burns transplanted with autologous cultured epithelium grown on a fibrin matrix. *Transplantation* 2000; 70: 1588-98.
12. Barrandon Y. Genetic manipulation of skin stem cells: success, hope, and challenges ahead. *Mol Ther* 2007; 15: 443-4.
13. Morgan JR, Barrandon Y, Green H, Mulligan RC. Expression of an exogenous growth hormone gene by transplantable human epidermal cells. *Science* 1987; 237: 1476-9.
14. Mavilio F, Pellegrini G, Ferrari S, et al. Correction of junctional epidermolysis bullosa by transplantation of genetically modified epidermal stem cells. *Nat Med* 2006; 12: 1397-402.
15. Bergoglio V, Larcher F, Chevallier-Lagente O, et al. Safe selection of genetically manipulated human primary keratinocytes with very high growth potential using CD24. *Mol Ther* 2007; 15: 2186-93.
16. Blanpain C, Horsley V, Fuchs E. Epithelial stem cells: turning over new leaves. *Cell* 2007; 128: 445-58.
17. Guasch G. [Epithelial stem cells in the skin]. *Med Sci (Paris)* 2006; 22: 710-2.
18. Lajtha LG. Stem cell concepts. *Diff Res Biol Div* 1979; 14: 23-34.
19. Kobayashi K, Rochat A, Barrandon Y. Segregation of keratinocyte colony-forming cells in the bulge of the rat vibrissa. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 7391-5.

20. Cotsarelis G. Epithelial stem cells: a folliculocentric view. *J Invest Dermatol* 2006 ; 126 : 1459-68.
21. Rochat A, Kobayashi K, Barrandon Y. Location of stem cells of human hair follicles by clonal analysis. *Cell* 1994 ; 76 : 1063-73.
22. Fuchs E, Byrne C. The epidermis: rising to the surface. *Curr Opin Genet Dev* 1994 ; 4 : 725-36.
23. Del Rio M, Larcher F, Serrano F, et al. A preclinical model for the analysis of genetically modified human skin *in vivo*. *Hum Gene Ther* 2002 ; 13 : 959-68.
24. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 2000 ; 288 : 669-72.
25. Choate KA, Khavari PA. Sustainability of keratinocyte gene transfer and cell survival *in vivo*. *Hum Gene Ther* 1997 ; 8 : 895-901.
26. Bestor TH. Gene silencing as a threat to the success of gene therapy. *J Clin Invest* 2000 ; 105 : 409-11.
27. Gache Y, Baldeschi C, Del Rio M, et al. Construction of skin equivalents for gene therapy of recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Hum Gene Ther* 2004 ; 15 : 921-33.
28. Deng H, Choate KA, Lin Q, Khavari PA. High-efficiency gene transfer and pharmacologic selection of genetically engineered human keratinocytes. *BioTechniques* 1998 ; 25 : 274-80.
29. Magnaldo T. La « guerre » du NER (nucleotide excision repair). *Med Sci (Paris)* 2004 ; 20 : 268-70.
30. Bergoglio V, Magnaldo T. Nucleotide excision repair and related human diseases. In : Volff JN, ed. *Genome and disease*, vol. 1. Basel : Karger, 2006 ; ??? : 35-52.
31. Arnaudeau-Begard C, Brellier F, Chevallier-Lagente O, et al. Genetic correction of DNA repair-deficient/cancer-prone xeroderma pigmentosum group C keratinocytes. *Hum Gene Ther* 2003 ; 14 : 983-96.
32. Magnaldo T. Xeroderma pigmentosum: from genetics to hopes and realities of cutaneous gene therapy. *Exp Opin Biol Ther* 2004 ; 4 : 169-79.
33. Magnaldo T, Barrandon Y. CD24 (heat stable antigen, nectadrin), a novel keratinocyte differentiation marker, is preferentially expressed in areas of the hair follicle containing the colony-forming cells. *J Cell Sci* 1996 ; 109 : 3035-45.
34. Magnaldo T, Sarasin A. Utilisation du gène marqueur CD24 pour la sélection des kératinocytes souches transformés par des séquences exogènes. *International Patent* 2003 ; WO 03004655.
35. Kaur P. Interfollicular epidermal stem cells: identification, challenges, potential. *J Invest Dermatol* 2006 ; 126 : 1450-8.
36. Bernerd F, Asselineau D, Vioux C, et al. Clues to epidermal cancer proneness revealed by reconstruction of DNA repair-deficient xeroderma pigmentosum skin *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 ; 98 : 7817-22.
37. DePinho RA. The age of cancer. *Nature* 2000 ; 408 : 248-54.
38. Kahn A. Thérapie génique d'une épidermolyse bulleuse jonctionnelle. *Med Sci (Paris)* 2007 ; 23 : 109-10.

TIRÉS À PART
T. Magnaldo



ANNEXE 5 : Amorces Taqman® utilisées pour la validation du crible génomique

Symbole	Nom du gène	Référence TaqMan® Gene Expression Assay
ADRA1B	Adrenergic, alpha-1B-, receptor	Hs00171263_m1
ALDH1A1	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1	Hs00946916_m1
BAMBI	BMP and activin membrane-bound inhibitor homolog (Xenopus laevis)	Hs00180818_m1
BMP6	Bone morphogenetic protein 6	Hs00233470_m1
B2M	Beta-2-microglobulin	Hs99999907_m1
CEBPA	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha	Hs00269972_s1
CXCL1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)	Hs00236937_m1
CXCL12	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (stromal cell-derived factor 1)	Hs00171022_m1
CXCR7	Chemokine (C-X-C motif) receptor 7	Hs00604567_m1
EDN1	Endothelin 1	Hs00174961_m1
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Hs99999905_m1
GDF15	Growth differentiation factor 15	Hs00171132_m1
HOXB4	Homeobox B4	Hs00256884_m1
PPIA	Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	Hs99999904_m1
RPLP0	Ribosomal protein, large, P0	Hs99999902_m1
S100A8	S100 calcium binding protein A8	Hs00374264_g1
TBP	TATA box binding protein	Hs99999910_m1
WISP2	WNT1 inducible signaling pathway protein 2	Hs00180242_m1
WNT4	Wingless-type MMTV integration site family, member 4	Hs00229142_m1
WNT5A	Wingless-type MMTV integration site family, member 5A	Hs00180103_m1
XPC	Xeroderma pigmentosum, complementation group C	Hs01104212_m1

Caractérisation et correction génétique des cellules cutanées de patients atteints de xeroderma pigmentosum de groupe C : un rôle pour XPC au-delà de la NER ?

Le xeroderma pigmentosum (XP) est une maladie génétique rare caractérisée par une sévère prédisposition aux carcinomes cutanés (CC). Les cellules des patients XP sont incapables d'éliminer les lésions introduites dans l'ADN par les ultraviolets (UV) en raison d'une altération de la réparation par excision de nucléotides (NER). Dans les peaux reconstruites *in vitro*, la présence de fibroblastes XP-C induit l'invasion des kératinocytes dans les équivalents de derme. Nos résultats révèlent que les fibroblastes XP-C surexpriment constitutivement la métalloprotéinase matricielle 1 (MMP1), ce qui pourrait contribuer au développement de CC invasifs chez les patients XP-C.

Nous avons également mis en place de nouveaux outils pour rendre la correction génétique des kératinocytes XP-C compatible avec des perspectives de greffe cutanée chez les patients. La réexpression d'une protéine XPC fonctionnelle dans les kératinocytes XP-C permet de restaurer l'activité de la NER et la survie cellulaire après une exposition UV. L'efficacité de réparation des lésions induites par les UV a été validée *in vitro* dans des peaux reconstruites à partir des kératinocytes XP-C corrigés et *in vivo* après greffe sur la souris immunodéficiente. Nos résultats constituent une nouvelle étape vers la thérapie génique cutanée *ex vivo* des patients XP-C.

L'analyse du transcriptome des kératinocytes XP-C avant et après correction génétique révèle toutefois que la plupart des dérégulations observées dans les cellules XP-C ne sont pas normalisées à court terme par la réexpression stable de la protéine XPC. Nos observations suggèrent une implication de la protéine XPC dans le maintien de l'équilibre cellulaire.

Characterization and genetic correction of skin cells from xeroderma pigmentosum group C patients: a role for XPC beyond NER ?

Xeroderma pigmentosum (XP) is a rare genetic disorder characterized by a severe predisposition to skin cancers following minimal ultraviolet (UV) exposure. Cells from XP patients are deficient in nucleotide excision repair (NER) of UV-induced DNA lesions. *In vitro* reconstructed XP-C skins display epidermal invasions into dermal equivalents which are specifically induced by XP-C fibroblasts. Our results revealed a significant overexpression of matrix metalloproteinase 1 (MMP1) in XP-C fibroblasts. In XP-C patients, MMP1 overexpression could be a worsening actor toward exacerbated tumor susceptibility.

In order to meet the requirements of skin grafting in XP patients, we have set up a strategy allowing the safe selection of genetically modified clonogenic keratinocytes. Re-expression of a functional XPC protein in XP-C keratinocytes enabled recovery of full DNA repair capacity and cell survival properties after UVB irradiation. Furthermore, both *in vitro* and *in vivo* skins regenerated from corrected XP-C keratinocytes recovered normal repair capacity of UV-induced DNA lesions. Our results represent a supplementary step toward *ex vivo* cutaneous gene therapy of the XP-C disease.

Comparative gene expression profile analysis showed that many genes are deregulated in non-photoexposed XP-C keratinocytes and that most of these defects are not normalized in the short term in genetically corrected cells. These results suggest the involvement of XPC in the maintenance of cellular homeostasis.