



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

Projet de Fin d'Etudes

Licence Sciences & Techniques

Sciences Biologiques Appliquées et Santé

(LST- SBAS)

Etude génétique du gène XPA chez des patients XERODERMA PIGMENTOSUM

Présenté par : FARGANI Chadia

Encadré par : Pr GUISSI Sanae.....FST FES

Dr ABBASSI MeriameCHU Hassan II Fès

Soutenu le : 06-07-2021

Devant le jury composé de :

- Pr GUISSI Sanae
- Pr BENCHEIKH Rachid
- Dr ABBASSI Meriame

Stage effectué au CHU Hassan II Fès

Année universitaire 2020-2021

Dédicace

À mes parents

Itadhom et Athmed, les mots me manquent pour exprimer toute la reconnaissance, la fierté et le profond amour que je vous porte pour les sacrifices que vous aviez consentis pour ma réussite. Vous trouverez ici le témoignage de mon attachement, ma reconnaissance, ma gratitude et mon respect. Puisse Dieu vous accueillir dans son infinie miséricorde et son éternel paradis.

À ma sœur et mes frères

Aticha Mohamed et Saïd ; je vous remercie pour le soutien moral et l'encouragement que vous m'avez accordés. Je vous souhaite tout le bonheur que vous méritez.

À tous mes amis

Bouchra, Fayza, Rania ... et mes collègues de classes ; pour tous les bons moments qu'on a passés ensemble avec mes souhaits d'un avenir plein de joie et de succès.

À mes enseignants,

Sans exception, pour leurs efforts déployés afin de m'assurer une excellente formation ;

Et à toutes les personnes qui m'ont soutenu tout au long de mon stage ;

À tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin.

Chadia

Remerciements

A notre encadrante

Madame GUISSI Sanae, professeur de Biologie Moléculaire à la faculté des sciences et techniques de Fès

Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance pour l'honneur que vous m'avez fait en acceptant de m'encadrer.

Vous m'avez consacré votre temps précieux et votre aimable sollicitude sans réserve.

Que votre compétence, votre sérieux, votre rigueur au travail, votre professionnalisme, et votre sens critique soient pour nous le meilleur exemple à suivre.

Vous êtes le professeur qui a réussi à m'inspirer, à me donner confiance en moi et en l'avenir, mais aussi qui a réussi à me donner l'envie d'apprendre.

Un grand Merci pour tout ce que vous avez fait !

A notre encadrante

Docteur ABBASSI Meriame, Docteur scientifique dans le laboratoire de génétique médicale au CHU Hassan II Fès

Je saisis cette occasion pour exprimer ma profonde reconnaissance et mes vifs remerciements à mon encadrante Dr Meriame pour le suivi qu'elle a apporté à mon stage.

Vous avez manifesté à notre égard une grande disponibilité et vous m'avez accueillie avec bienveillance et sympathie.

Votre culture, votre compétence professionnelle incontestable ainsi que vos qualités humaines vous valent l'admiration et le respect de tous.

Vos conseils et vos orientations m'ont été très précieux, j'espère être digne de votre confiance.

A notre juge de mémoire

Monsieur BENCHEIKH Rachid Professeur à la faculté des sciences et techniques de Fès

Je vous remercie vivement de l'honneur que vous me faites en siégeant dans ce jury.

Votre jugement sera d'une grande valeur dans l'appréciation de ce travail.

Je remercie également ...

Toute l'équipe du laboratoire du **CHU Hassan II Fès** qui m'a beaucoup soutenue à l'élaboration de ce rapport, j'ai aussi apprécié leur disponibilité et leur patience. Un grand merci à toute l'équipe pour tout l'aide qui m'ont généreusement prodiguée dans l'élaboration de ce travail.

Table des matières

Avant-propos	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	1
Objectifs.....	2

Revue Bibliographique

A. Aspect Clinique.....	4
I. Xeroderma Pigmentosum.....	4
1. Définition	4
2. Caractéristique.....	4
3. Symptômes.....	5
✓ Signes cutanées.....	5
✓ Signes oculaires.....	6
✓ Signes neurologiques.....	6
II. Incidence de Xeroderma Pigmentosum.....	6
III. Diagnostic.....	7
✓ Diagnostic clinique.....	6
✓ Diagnostic moléculaire.....	7
○ Mesure de la synthèse d'ADN non programmée.....	7
○ PCR-Séquençage	8
IV. Prise en charge.....	8
✓ Prise en charge cutanée.....	8
✓ Prise en charge ophtalmologique.....	8
✓ Prise en charge neurologique.....	8

B. Aspect Moléculaire.....	9
I. Système de réparation par excision resynthèse (Nucleotide Excision Repair).....	9
II. Gènes impliqués dans la maladie du Xeroderma Pigmentosum.....	11
III. Groupes de complémentation du Xeroderma Pigmentosum.....	13
1. Groupe de complémentation C.....	13
o Caractéristiques générales	13
o Gène <i>XPC</i>	13
o Mutations.....	14
2. Groupe de complémentation A.....	14
o Caractéristiques générales.....	14
o Gène <i>XPA</i>	14
o Mutations.....	15

PARTIE PRATIQUE

CHAPITRE 1. MATERIEL ET METHODES	17
A/ DESCRIPTION DE L'ETUDE.....	17
1. Echantillonnage	17
2. Déroulement du travail.....	17
B/ METHODES.....	17
1. Prélèvements	17
2. Techniques d'extraction et de purification des acides nucléiques.....	17
2-1) Par Kit.....	18
2-2) Dosage de l'ADN.....	19
3. Amplification des séquences nucléotidiques par PCR.....	19
4. Séquençage d'ADN.....	21
5. Les outils bio-informatiques.....	24

CHAPITRE 2. RESULTATS ET DISCUSSION	25
I. Caractéristiques épidémiologiques des patients	25
1. Nombre.....	25
2. Répartition des patients selon l'âge.....	25
3. Répartition des patients selon le sexe	25
II. Résultat de l'étude moléculaire.....	26
1-Résultat de PCR et de migration sur gel d'agarose.....	26
2-Résultat de séquençage de l'exon 6.....	27
Discussion.....	29
Conclusion.....	30
Références Bibliographiques.....	31

Avant-propos

Ce projet de fin d'études est réalisé dans le cadre de l'obtention de la Licence sciences biologiques appliquées et santé (SBAS) de la FST FES. Le stage s'est déroulé du 26 avril 2021 au 18 Juin 2021, au sein du service d'analyse médicale du centre hospitalier Hassan II
Sous l'encadrement du **Dr ABBASSI Meriame** et **Pr GUISSI Sanae**.

Le sujet porte sur : « Etude génétique du gène *XPA* chez des patients Xeroderma Pigmentosum ».

Etablissement du stage :

Le Laboratoire Central d'Analyses Médicales est situé au bâtiment J et conçu comme un pôle d'activité hospitalière comportant plusieurs spécialités d'analyses médicales :

- Anatomie pathologique ;
- Bactériologie-Immunoanalyses;
- Parasitologie;
- Biochimie et pharmaco-toxicologie;
- Hématologie;
- Génétique médicale et biologie moléculaire.

Composé de :

- Salle de réception ; Salle de prélèvements ;
- Laboratoire de biochimie/Pharmacotoxicologie ;
- Laboratoire d'hématologie ;
- Laboratoire de bactériologie /Immunologie ;
- Laboratoire de parasitologie ;
- Laboratoire de génétique ; Laboratoire d'anatomie pathologique

L'unité de génétique médicale et d'oncogénétique UGMO, représente une première expérience dans un CHU au MAROC, elle est activement mise en place depuis sa création en Mars 2009. Elle est subdivisée en trois disciplines qui assurent des activités variées :

Génétique clinique (activité clinique)

- ❖ Consultation de génétique (au centre du diagnostic)
- ❖ Conseil génétique (au centre du diagnostic)
- ❖ Consultation d'oncogénétique (au centre du diagnostic)
- ❖ Avis du médecin généticien dans les services cliniques
- ❖ Hôpital de jour (en coordination avec les services cliniques)

Génétique chromosomique (analyse des chromosomes)

- ❖ Cytogénétique classique (caryotype)
- ❖ Cytogénétique moléculaire (FISH : Hybridation In Situ en Fluorescence)

Génétique moléculaire (analyse des gènes)

- ❖ Réaction de polymérisation en chaîne (PCR), séquençage...Etc.

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

XPA : Xeroderma Pigmentosum groupe de complémentation A (et de même pour XPB, XPC, XPD, XPE, XPF, XPG et XPV)

ARN : Acide ribonucléique

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool

UVB : ultraviolet de type B

CPD : Dimères de cyclobutane pyrimidines

UVC : ultraviolet de type C

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétracétique

GG-NER : Global Genom-Nucleotide Excision Repair

HHR23B : Human rad23 Homolog

NER : Nucleotide excision repair

PCR : Polymerase Chain Reaction

PCNA : Proliferating cell nuclear antigen

6-4PP : les pyrimidines (6-4) pyrimidone

RPA : Protéine de réplication A

RFC : Replication factor C

SLB : solution de lyse des Globules blancs

TC-NER : Transcription Coupled-NER, NER couplée à la transcription

TFIIH : Facteur de transcription IIIH

UV : ultraviolet

UDS : Unshedduled DNA Synthesis

XP : Xeroderma pigmentosum

Liste des figures

Figure 1 : Illustration de la transmission autosomique récessive de Xeroderma Pigmentosum....	4
Figure 2 : Patient présentant la maladie de Xeroderma Pigmentosum.....	5
Figure 3 : Les différents signes cliniques du Xeroderma pigmentosum.....	6
Figure 4 : Résultats du test UDS.....	7
Figure 5 : Exemple d'une photoprotection contre les rayons UV.....	8
Figure 6 : Schéma du système de réparation NER.....	11
Figure 7 : Synthèse translésionnelle de l'ADN polymérase	12
Figure 8 : Structure du gène <i>XPC</i>	13
Figure 9 : Structure du gène <i>XPA</i>	14
Figure 10 : Spectre relatif à un dosage d'acide nucléique.....	19
Figure 11 : Programme PCR dans le thermocycleur (Applied Biosystème).....	21
Figure 12 : Mécanisme de la fluorescence par la technique du transfert d'énergie par résonance.....	22
Figure 13 : Répartition des patients en fonction de l'âge	25
Figure 14 : Répartition des patients en fonction du sexe	26
Figure 15 : Profil d'électrophorèse de l'exon 6 du gène <i>XPA</i> amplifié avec les amorces XPA-a.....	26
Figure 16 : Profil d'électrophorèse de l'exon du gène <i>XPA</i> amplifié avec les amorces XPA-b.....	27
Figure 17 : Electrophérogramme de l'exon 6 présentant la mutation.....	27
Figure 18 : Electrophérogramme de l'exon 6 sans mutation	28
Figure 19 : Alignement de la séquence étudiée à une séquence de la base donnée BLAST.....	28

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les différents types des gènes impliqués dans le système NER.....	12
Tableau 2 : Amorces utilisées pour la réaction de PCR.....	20
Tableau 3 : Cycle du fonctionnement d' <i>ExoSAP</i> -.....	22
Tableau 4 : Réactifs utilisés dans la réaction de séquençage.....	23

INRODUCTION

Le génome humain est exposé en permanence à des menaces endogènes et exogènes affectant l'intégrité de l'acide désoxyribonucléique (ADN), et le rayonnement UV (rayons invisibles émis par le soleil, mais également par certaines lumières artificielles) est l'une des causes les plus fréquentes des lésions d'ADN [1]. Ces rayons UV (surtout l'UVB et l'UVC) provoquent la formation des photo-produits, principalement des dimères de cyclobutane pyrimidine (CPD) ou les dimères TT ; qui créent des distorsions dans l'ADN et peuvent donc inhiber la réplication de l'ADN ainsi que la transcription [2].

D'une manière générale, les cellules eucaryotes supérieures possèdent différents systèmes de réparation d'ADN, qui sont bien conservés au cours de l'évolution. Ainsi plusieurs stratégies ont été développées pour faire face aux diverses lésions d'ADN causées par les agressions d'agents internes et externes, afin d'assurer l'intégrité du matériel génétique et limiter les conséquences mutagènes.

En revanche, lorsqu'un de ces systèmes n'existe pas ou présente un dysfonctionnement dans ses composants, les cellules ne peuvent plus lutter contre les dommages induits au niveau du patrimoine génétique ce qui aboutit à l'apparition d'une multitude de pathologies.

Parmi ces maladies, Le **Xeroderma Pigmentosum (XP)**, est l'une des maladies génétiques les plus graves causées par des mutations au niveau de certains chromosomes et qui touche une bonne partie de la population. La fréquence du XP varie suivant les régions du monde ; les pays du Maghreb et de l'Afrique, où les mariages consanguins sont plus fréquents, sont les plus touchés [3].

En effet, cette maladie met en jeu plusieurs mutations génétiques, leur identification est facilitée par les techniques de diagnostic (PCR, Séquençage..) de la génétique médicale qui permet d'identifier, d'analyser et de prévoir la transmission des caractères héréditaires afin de guérir, prévenir ou limiter la gravité des symptômes ; tout en recherchant les principales mutations et mettant au point des traitements pour soigner cette maladie.

L'objectif de ce travail est de décrire l'aspect génétique de la mutation *c.682C > T (p.Arg 228 Ter)* du gène *XPA*, étant donné que cette mutation est parmi les mutations les plus fréquentes du XERODERMA PIGMENTOSUM chez la population marocaine.

La recherche de cette mutation à l'aide des techniques de biologie moléculaire sera ainsi réalisée chez des patients XP recrutés dans le service de dermatologie au sein du Centre Hospitalier Hassan II, Ceci à l'aide des techniques de la biologie moléculaires tel que la PCR, séquençage... etc.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

A.ASPECT CLINIQUE :

I. Xeroderma Pigmentosum

1. Définition

Xeroderma pigmentosum (peau sèche pigmentée), est une génophotodermatose (maladie génétique rare (1 personne sur 1 000 000)); transmise selon un mode autosomique récessif (Figure 1); et elle est définie par une extrême sensibilité à la lumière du soleil; plus précisément aux rayons UV entraînant des coups de soleil, de pigments dans la peau avec une incidence très élevée de cancers cutanés [5] ; il s'agit d'une pathologie grave et invalidante liée à un défaut de réparation de l'ADN dans les cellules exposées aux rayons UV[6].

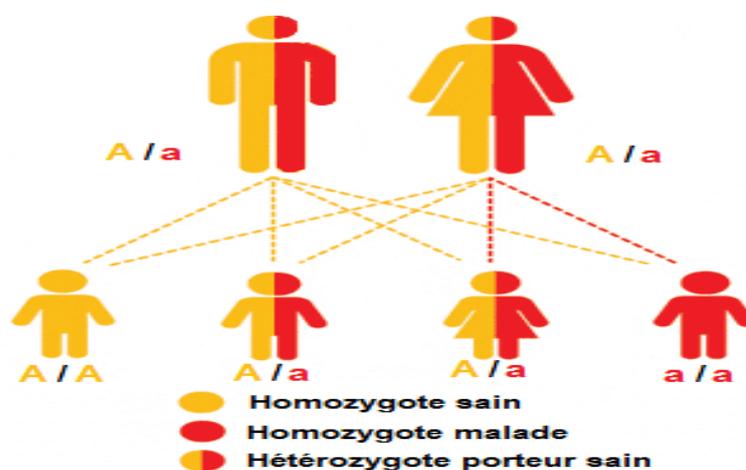


Figure 1 : Illustration de la transmission autosomique récessive de Xeroderma Pigmentosum [1']

2. Caractéristiques du Xeroderma Pigmentosum

Xeroderma Pigmentosum est caractérisé par un système de réparation par excision des nucléotides (NER) défaillant incapable de réparer les lésions induites par les UV. Cela conduit à des altérations génétiques avec un risque fortement élevé de cancer cutanés et ophtalmologiques [6 ; 7], chez certains et des troubles neurologiques chez d'autres [8].

Elle se manifeste dès l'enfance par une hyper-photosensibilité, une pigmentation ressemblant à des taches de rousseur sur la peau exposée et une atteinte cutanée et oculaire(Figure2) [7]. Les modifications cutanées apparaissent selon 3 stades :

Premier stade : des érythèmes et des brûlures persistantes avec une photophobie, xérose et une chéilite.

Deuxième stade : des troubles pigmentaires se développent progressivement (macules pigmentées lenticulaires ; atrophie cutanée, télangiectasies....)

Troisième stade : des tumeurs cutanéomuqueuses ainsi que des anomalies neurologiques chez les groupes A B D et G [9].



Figure 2 : Patient présentant la maladie XP [2']

3. Symptômes :

Les formes classiques du XP commencent dès les premiers mois et se manifestent par divers signes (Figure3) :

❖ Signes cutanées :

- Une extrême sensibilité à la lumière du soleil (photophobie) (avec des cloques ; érythème persistant ;...) [8]
- Présence de lentiginosae (pigmentation ressemblant à des taches de rousseur) dans les zones exposées au soleil (nez, front, côtés du cou et zone sous le menton...).
- Peau vieille, sèche, rugueuse et atrophique.
- Macules hypopigmentées
- Télangiectasie (peut être une caractéristique tardive).
- Zones d'hyper et d'hypo-pigmentation
- Néoplasmes et Tumeurs malignes in situ des mélanocytes et des kératinocytes, et éventuellement de multiples carcinomes basocellulaires et carcinomes épidermoïdes invasifs et des mélanomes [9, 10, 11,12].

❖ Signes oculaires :

- Altération de l'ADN des cellules épithéliales de la conjonctive, de la cornée, du cristallin et des paupières
- Kératite (inflammation de la cornée) sévère, entraînant une opacification et une vascularisation de la cornée [12, 13]

❖ Signes neurologiques :

- 20 à 30% des patients ont des problèmes neurologiques et une déficience intellectuelle ; dus à une dégénérescence neuronale progressive entraînant une surdité neurosensorielle, une ataxie, une microcéphalie, des troubles de la parole et de la démarche, et une altération de la vue. [1, 14,15]



Figure 3 : Les différents symptômes cliniques du XERODERMA PIGMENTOSUM [3']

II. Incidence du Xeroderma Pigmentosum :

La prévalence du xeroderma pigmentosum varie de 1 à 4 cas pour 1 000 000 en Europe et aux Etats-Unis. Le Japon et les pays du Maghreb sont les plus touchés avec près d'1 cas pour 100 000 personnes. En Tunisie la prévalence est estimée à 1/10 000 [49], tandis qu'au Maroc, elle est d'environ 1/80 504 [4].

Elle touche les filles et les garçons avec la même fréquence. Il s'agit d'une maladie génétique grave et sévère affectant profondément la qualité et l'espérance de vie humaine. Lorsqu'un enfant ne dispose d'aucun moyen de protection contre le soleil, l'espérance de vie est en moyenne de 20 ans [48].

III. Diagnostique :

Diagnostic clinique :

Le diagnostic clinique se base sur l'étude des signes cliniques que présente le patient atteint de cette maladie et qui apparaissent dans trois zones principales de l'organisme ; la peau (par exemple : coup de soleil, pigmentation anormale, brulures...) ; les yeux (inflammation de la cornée ...) et le système nerveux, ainsi que les cancers dont la fréquence est fortement accrue chez ces patients [16].

Diagnostic Moléculaire :

○ Test UDS :

Le diagnostic peut être confirmé définitivement par l'utilisation des tests cellulaires robustes pour la réparation défectueuse de l'ADN qui sont disponibles dans plusieurs pays. Le test le plus couramment utilisé est **la mesure de la synthèse d'ADN non programmée UDS** (unscheduled DNA synthesis) dans les fibroblastes cutanés en culture. Le test UDS, ou encore la synthèse d'ADN non programmée mesure la resynthèse d'ADN qui a lieu lors de la NER et non lors de la phase S. Le principe de cette méthode a été décrit pour la première fois, en 1964, par R.E Rasmussen et R.B Painter [15]. Ce test peut être utilisé aussi sur les cellules amniocytaires pour le diagnostic prénatal [18]. Les cultures de fibroblastes cutanés sont établies à partir d'une biopsie prélevée sur une zone non exposée de la peau, telle que la partie supérieure, l'intérieur du bras ou les fesses. Les fibroblastes sont irradiés aux UV dans une boîte de Pétri, et l'UDS peut être mesuré comme l'incorporation de nucléotides dans l'ADN des cellules irradiées soit par autoradiographie ou par fluorescence... [17]. Un niveau réduit d'UDS confirme le diagnostic de XP (Figure 4).

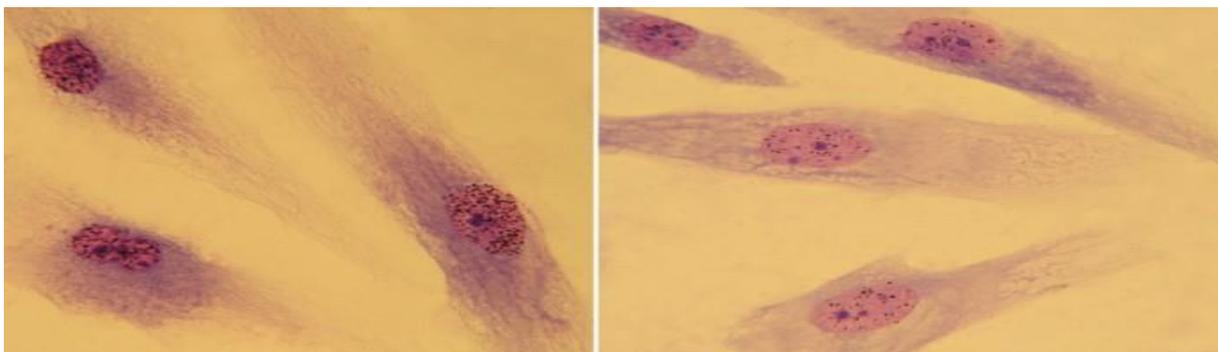


Figure 4 : Cellules normales (à gauche), cellules d'un patient XP (à droite) [51]

○ **PCR et Séquençage :**

Ce test est basé sur l'amplification du gène d'intérêt par la technique de Réaction de Polymérisation en Chaîne puis son séquençage pour déterminer la succession des nucléotides au niveau du gène, tout en recherchant la présence ou l'absence des mutations. (Détails dans la partie Matériels et méthodes)

IV. Prise en charge et conseil génétique :

Jusqu'aujourd'hui, il n'existe aucun traitement curatif pour cette pathologie. Tandis que, la prise en charge des manifestations cliniques du XP est le seul moyen pour prévenir des complications de cette maladie ; elle doit se faire à vie devant les risques majeurs de cancers de la peau et elle repose sur une éviction solaire préventive précoce. Les mesures de protection comprennent : [14]

✓ **Prise en charge Cutanée :**

- La personne doit éviter toute source de lumière ultra violette les lumières d'hôpital, les lampes halogènes, les lampes aux halogénures métalliques et certaines lampes fluorescentes ; Toutes les fenêtres de la maison, de la voiture et de l'école doivent être recouvertes d'un film résistant aux UV.
- La peau exposée au soleil à l'extérieur doit être recouverte d'un écran solaire et d'un baume à lèvres ; les pantalons longs, les manches longues et les gants ; un masque facial résistant aux UV et des lunettes de soleil enveloppantes doivent être portées (Figure5).
- Des visites régulières doivent être effectuées chez le dermatologue, afin que toute lésion précancéreuse puisse être enlevée le plus tôt possible.

✓ **La prise en charge ophtalmologique :**

- Des examens oculaires fréquents par un ophtalmologiste sont recommandés.

✓ **La prise en charge neurologique :**

- La prise en charge des patients présentant une atteinte neurologique peut inclure l'utilisation de prothèses auditives, la physiothérapie, l'ergothérapie et l'orthophonie.



Figure 5 : Exemple d'une photoprotection (Contre les rayons UV) [4']

Comme pour tous les troubles génétiques, le conseil génétique et le soutien psychologique sont appropriés pour les familles, pour discuter de l'étiologie, de la probabilité d'occurrence lors des futures grossesses, de la probabilité accrue d'occurrence dans les communautés où les mariages consanguins sont courants.

B.ASPECT MOLECULAIRE

I. Le système de réparation par excision de nucléotides :

La réparation par excision nucléotidique (NER) est une voie de réparation polyvalente de l'ADN qui élimine diverses lésions de base déformant l'hélice telles que les photolésions induites par les ultraviolets (UV) [19] y compris les dimères de cyclobutane pyrimidine de thymines adjacentes (T), cytosines (C) ou mixtes T et C ou le 6,4 pyrimidone. Le NER se compose de deux sous-voies distinctes : le NER génomique global (GG-NER), qui fonctionne dans tout le génome, et le NER couplé à la transcription (TC-NER), qui intervient dans la réparation des lésions bloquant la transcription par l'ARN polymérase II [20].

Le processus de NER (GG-NER ou TC-NER) se divise en trois étapes principales :

- Reconnaissance des dommages
- Double incision à l'extrémité de la lésion
- Synthèse de l'ADN et remplissage de lacunes [21,22].

Notre intérêt va porter sur la voie GG-NER qui est affectée dans la maladie de XP. Il existe plusieurs gènes (par exemple, XPA, XPB, XPC, XPD, XPE, XPF et XPG) qui codent pour des protéines indispensables dans GG-NER [20] ; ces protéines participent à la réparation de la manière suivante :

Premièrement le complexe XPC-HHR23B et XPA(DDB2) se lie à l'ADN avec une forte affinité et permet la détection de dommage [23, 24]. Cette liaison permet au complexe XPC de servir de plate-forme pour le recrutement de TFIIH et de XPA qui vérifie l'existence de lésion. Ensuite le complexe TFIIH est chargé en 5' sur le site de la lésion et utilise ses composants XPB et XPD pour transloquer le long des deux brins d'ADN et dérouler l'ADN vers la lésion [25]. XPB(ERCC3) et XPD(ERCC2) présentent des fonctions ATPase et hélicase ADN-dépendantes ; XPB peut dérouler l'ADN dans une direction 3' → 5' et XPD dans la direction opposée [26]. Enfin XPA et RPA stabilisent l'ADN ; XPA se lie aux nucléotides endommagés et RPA à l'ADN simple brin intact ; jouant un rôle important dans la formation d'un complexe entièrement ouvert pour le recrutement des nucléases XPF-ERCC1 et XPG (ERCC5) qui vont réaliser la double incision afin de permettre l'élimination de ~ 24–32 oligonucléotides contenant la lésion d'ADN [27–28]. L'incision côté 5' est réalisée par l'hétérodimère XPF-ERCC1, suivie de l'incision côté 3' par XPG [29]. L'oligonucléotide contenant la lésion reste associé à TFIIH jusqu'à ce qu'il soit finalement libéré et traité par la ou les nucléases. La synthèse ultérieure d'ADN remplissant les lacunes est réalisée par l'action concertée de Pol δ qui est aidée par les cofacteurs PCNA (proliferating cell nuclear antigen), RFC (Replication factor C) et RPA (Replication protein) [30]. Et les entailles sont finalement scellées par des ADN ligases spécifiques pour compléter la réparation (Figure 6) [31, 32]

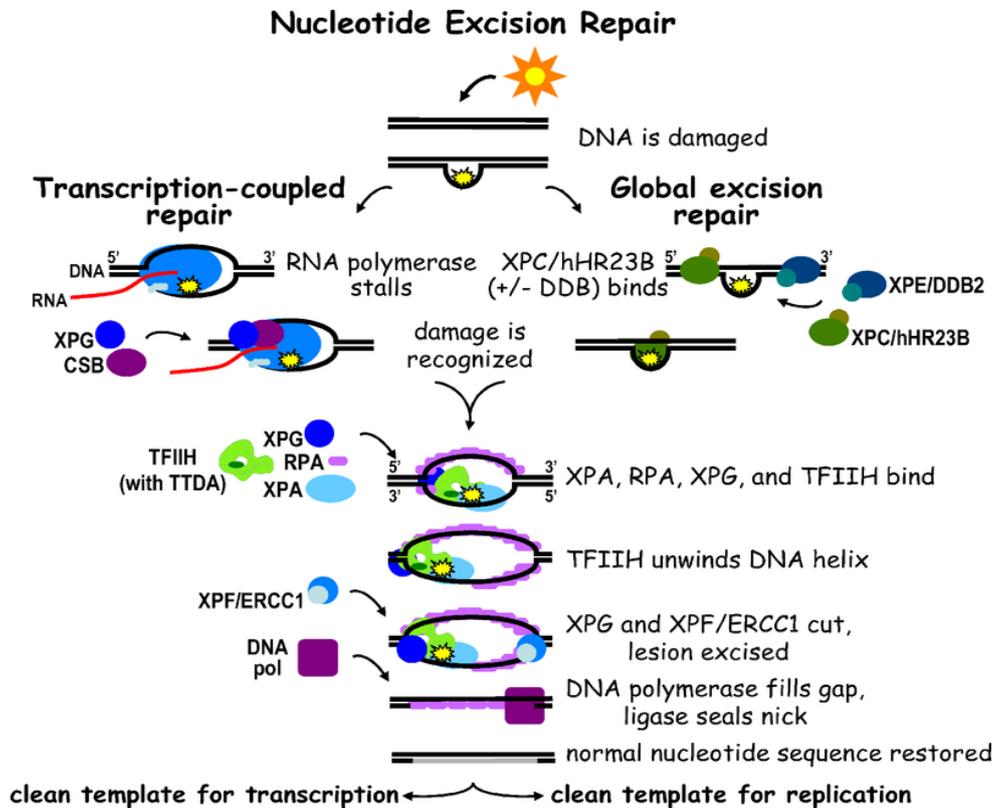


Figure 6 : Schéma du système NER [1']

II. Les gènes impliqués dans la maladie du xeroderma pigmentosum :

Il existe huit groupes de complémentation génétique dans XP. Sept de ces groupes, XP-A à XP-G, sont associés à une réparation par excision de nucléotides défectueuse (NER), tandis que le groupe restant, une forme variante de XP (XP-V), est compétent en NER mais manque d'un ADN spécialisé. XPV est caractérisé par une mutation au niveau du gène POLH qui code pour un ADN polymérase translésionnel, qui s'appelle L'ADN polymérase (η) ; une polymérase de synthèse de Translésion qui peut répliquer des modèles d'ADN contenant des dommages induits par la lumière ultraviolette [33]; c'est-à-dire elle est nécessaire pour répliquer l'ADN contenant des dommages non réparés.(Figure 7).

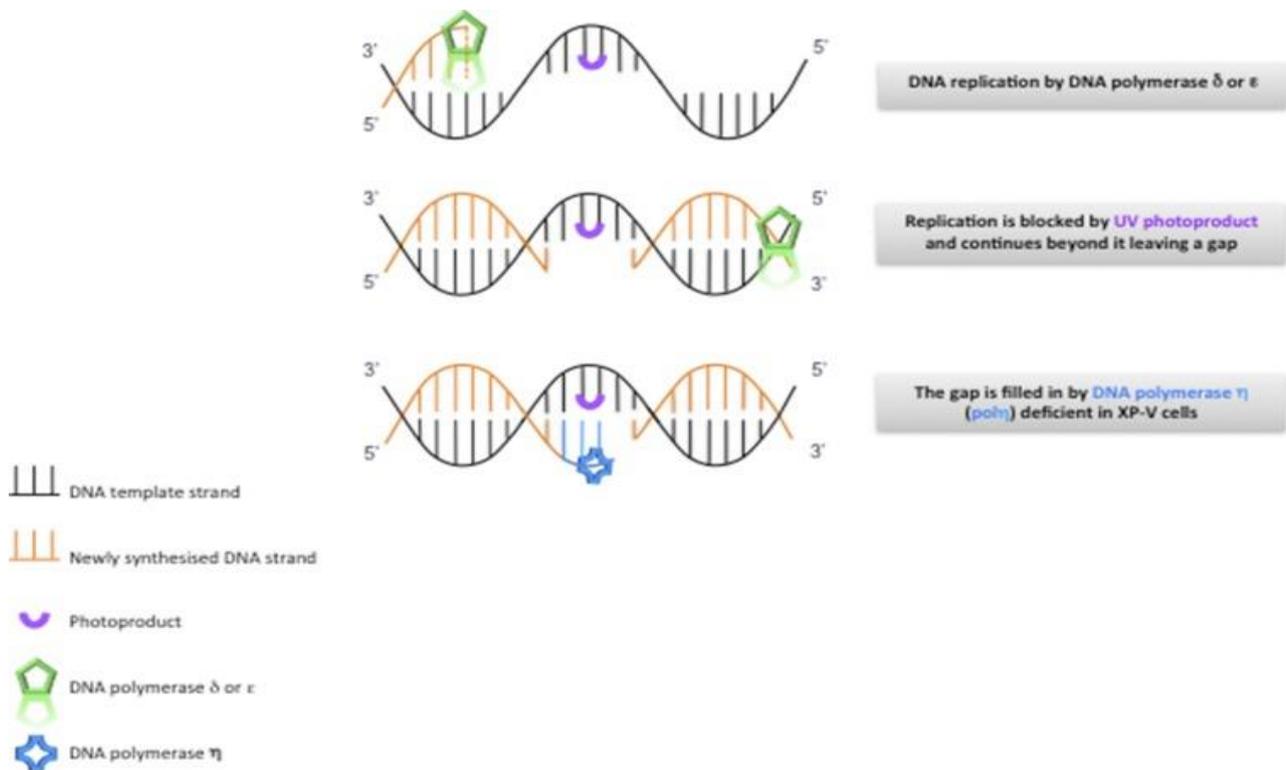


Figure 7 : Synthèse Translésionnelle de l'ADN polymérase η [52]

Huit gènes impliqués dans les différents groupes génétiques du XP ont été identifiés [34], sachant que la mutation de type *XPC* et *XPA* sont les plus fréquentes :

Tableau 1 : Les différents types des gènes du système NER impliqués dans la réparation des dimères de thymines [53]

GENE	NOMBRE DES EXONS	LOCALISATION	FONCTION DE PROTEINE
<i>XPA</i>	6	9q22.33	Vérification du dommage
<i>XPB/ERCC3</i>	15	2q14.3	Hélicase
<i>XPC</i>	16	3p25.1	Reconnaissance du dommage
<i>XPB/ERCC3</i>	23	19q13.32	Hélicase
<i>XPE/DDB2</i>	10	11p11.2	Reconnaissance du dommage
<i>XPF/ERCC4</i>	11	16p13.12	Nucléase
<i>XPG/ERCC5</i>	15	13q33.1	Nucléase
<i>XPV/POLH</i>	11	6p21.1	Polymérase

III. Les groupes de complémentation les plus fréquents du Xeroderma Pigmentosum :

1. Groupe de complémentation C :

○ Caractéristiques générales :

Le groupe le plus fréquent ; il représente 25-40% de tous les cas de XP et sa prévalence prédomine dans les pays méditerranéens et dans le Nord de l'Afrique [6'].

Les patients atteints de *XPC* présentent des lésions de la peau typiques du XP (taches de rousseur progressives, sécheresse de la peau, cancers de la peau, tumeurs malignes oculaires...), mais en général ils ne présentent aucune réaction aiguë au soleil (types coup de soleil). Les patients XP-C ont très rarement des problèmes neurologiques, mais ils ont un risque très accru de développer des cancers non seulement cutanés mais également colorectaux, du poumon ou du sein [42].

○ Gène *XPC* :

XPC est Situé sur le chromosome 3p25 et s'étend sur 33 kb et contient 16 exons (82-882 Pb) et 15 introns (Figure 8), et code pour une protéine XPC de 940 acides aminés, dont la fonction est de détecter les dommages de l'ADN lors de la première étape de GG-NER pour « Global Genome Nucleotide Excision Repair ». La protéine codée est importante pour la détection des dommages et la liaison de l'ADN, pour le recrutement du complexe de transcription générale IIIH (TFIIH) et ses sous unités XPD et XPB [43].

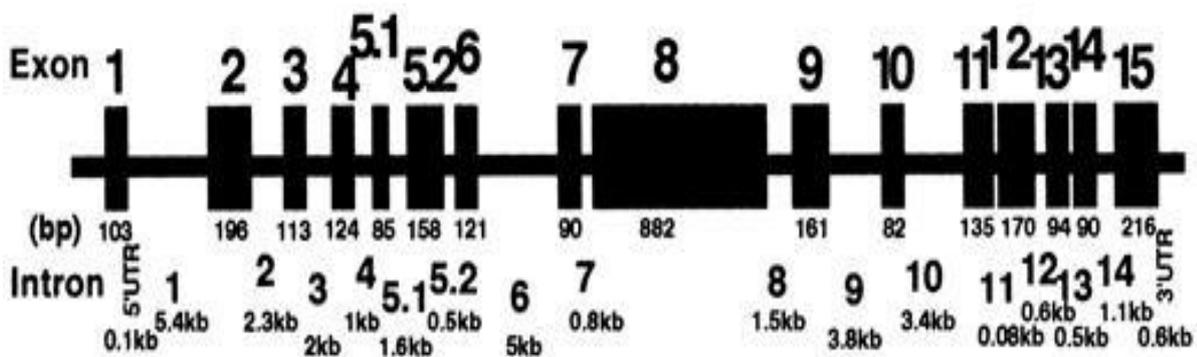


Figure 8 : structure du gène *XPC* [7']

○ Mutations :

Les patients XP-C ont un GG-NER déficient qui corrèle très souvent avec un niveau d'expression très bas d'ARNm codant pour *XPC* (5 à 10% de la normale) [42]. De nos jours, plus de 36 variantes pathogènes ont été signalés dans le gène *XPC* et la mutation *c.1643_1644delTG(Exon9)* est connue pour être la plus commune chez les patients XP méditerranéens. Cette mutation de décalage du cadre de lecture provoque l'absence de protéine *XPC*. Il a été constaté que le niveau de réparation de l'ADN induit par cette mutation a été réduit à 10-20% de celle de compétence cellules normales [44].

2. Groupe de complémentation A :

○ Caractéristiques générales :

C'est une forme sévère du XP, elle Représente 24 % des cas de XP. Les patients XPA souffrent d'une sensibilité dermatologique élevée à la lumière du soleil (sensation de brûlures, taches de rousseur, cancer de la peau...) ; associée souvent à une déficience neurologique et d'un de vieillissement précoce [35]. Des retards de croissance et du développement sexuel peuvent également être observés chez ces patients [36]

○ Gène *XPA* :

Le gène *XPA* est situé sur le chromosome 9q22.33 et contient 6 exons et 5 introns [37] (Figure 9), il code pour une protéine *XPA* de 31 kDa, 273 acides aminés (aa). *XPA* est la protéine clé du NER ; elle joue un rôle très important dans la vérification des dommages d'ADN et le recrutement d'autres protéines NER telles que *RPA* et *ERCC1*...[38]. En plus de la reconnaissance et la vérification des dommages d'ADN, *XPA* peut se lier indépendamment à des jonctions ds-ssDNA (ADN simple brin et l'ADN double brin) et les stabiliser pendant le processus NER et / ou pendant d'autres types de métabolisme de l'ADN [39]

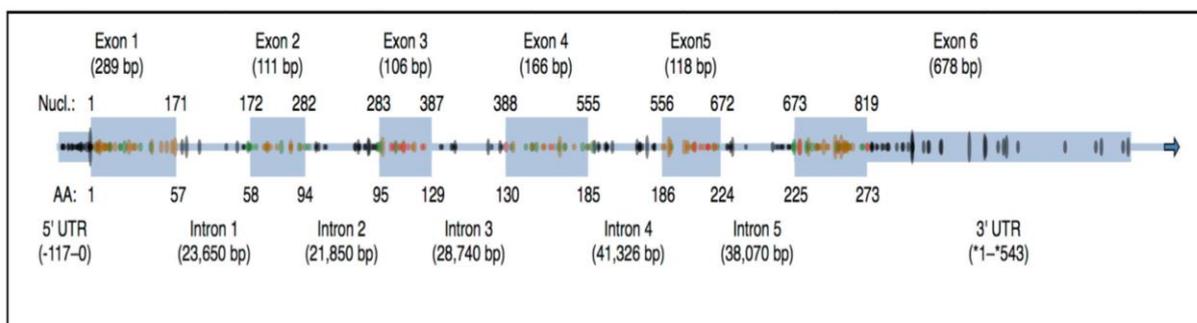


Figure 9 : Structure du gène *XPA*

○ Mutations :

Plusieurs mutations peuvent être détectées dans le gène *XPA*, chaque mutation se traduit par un phénotype plus ou moins sévère. Cependant, la sévérité des symptômes varie considérablement en fonction de la position et le type de mutation. Les patients *XPA* les plus sévèrement atteints (cancer de la peau ; complications neurologiques...) présentent des mutations homozygotes (sur les deux allèles) dans **la région du gène qui permet la fixation de la protéine XPA à l'ADN** (domaine central : exons III, IV et V) [40]. Tandis que les **mutations dans l'extrémité C terminale** de la protéine, qui **interagit avec le facteur de transcription TFIIH**, provenaient de patients avec maladie de la peau uniquement [4].

La mutation récurrente du gène *XPA* chez la population marocaine est une *substitution dans l'exon 6 du gène XPA, c.682C > T (p.Arg 228 Ter)* [8].

PARTIE PRATIQUE

CHAPITRE 1. MATERIEL ET METHODES

A/ Description de l'étude

1. Echantillonnage

Il s'agit d'une étude rétrospective sur une période allant de «juin 2017 » à « Juin, 2021 », portée sur une série de 52 patients diagnostiqués dans le service de dermatologie et adressés au laboratoire de génétique au Centre Hospitalier Universitaire Hassan II de Fès pour une confirmation génétique.

La première étape de cette étude est d'explorer la mutation du gène *XPC* siégeant au niveau de l'exon 9 (c.1643_1644delTG ou p.Val548Ala fsX25) chez tous les patients, puis celle du gène *XPA* siégeant au niveau de l'exon 6 (c.682C> T, p.Arg228X) chez ceux, dont la mutation *XPC* était négative (21 patients).

2. Déroulement de travail

L'analyse génétique repose sur une analyse de l'ADN génomique à partir du sang total. Pour cela, une extraction de l'ADN est d'abord réalisée à partir d'un échantillon sanguin des différents patients, suivie de sa quantification par dosage spectrophotométrique. L'ADN ainsi extrait, est amplifié par la suite, en ciblant la région responsable de la maladie, grâce à une technique de PCR "polymérase Chain réaction". Après purification du produit PCR, un séquençage est réalisé pour l'identification de la mutation recherchée et qui est **une substitution de C par T au niveau de l'exon 6 (c.682C > T (p.Arg 228 Ter) du gène XPA.**

B. Méthodes

1. Prélèvements

Le prélèvement de sang se fait dans deux tubes EDTA (Éthylènediaminetétraacétique) de 5 ml chacun dans le but d'une extraction d'ADN par kit ou par sel. Les tubes peuvent être conservés à +4°C ou à -20°C pour une utilisation ultérieure.

2. Techniques d'extraction et de purification d'ADN

L'extraction de l'ADN est une étape primordiale avant de commencer toute étude. C'est une technique d'isolement de l'ADN à partir de cellules en quantité et en qualité suffisante pour ensuite être utilisé et analysé par les techniques de biologie moléculaire. Il existe différents protocoles pour extraire l'ADN, qui suivent approximativement le même schéma de principe :

- ❖ Lyse cellulaire
- ❖ Elimination des protéines
- ❖ Elimination des autres acides nucléiques (ARN, etc.)
- ❖ Concentration de l'ADN par précipitation à l'alcool

Parmi les méthodes les plus utilisées, le laboratoire de Génétique médicale et d'oncogénétique effectue l'extraction selon deux méthodes : soit par SEL ou par KIT commercialisé (**invitrogène**).

Concernant notre travail, l'extraction d'ADN par Kit est celle utilisée.

2-1) Extraction d'ADN par Kit

2-1-1) Principe

L'extraction d'ADN par Kit sur suspension cellulaire est une technique qui permet d'isoler l'ADN à partir d'une suspension cellulaire grâce à un kit muni d'une colonne. Après lyse cellulaire l'ADN dispersé dans la solution est collecté sur une membrane permettant ainsi de le purifier avec un rendement maximal, ce qui rend cette technique avantageuse lorsque le volume de sang est faible.

2-1-2) Protocole expérimental

Dans un tube Eppendorf de 1,5 ml, 200 µl de sang + 20µl de protéinase K (20 mg/ml) + 20µl de RNase A (20 mg/ml) sont ajoutés. L'ensemble est Vortexé environ 15 secondes puis incubé 2 minutes à température ambiante. 200 µl de Pure Link TM Genomic Lysis Binding Buffer (fourni par le Kit) sont ensuite ajoutés et l'ensemble est vortexé environ 15 secondes. Le mélange est incubé 10 minutes à 55°C. 200µl d'éthanol absolu sont additionnés et l'ensemble est vortexé environ 5 secondes. Le mélange est ensuite placé dans la colonne Pure Link TM et centrifugé 1 minute à 8000rpm.

La colonne est placée dans un tube collecteur de 2ml (fourni dans le kit) et le tube contenant le filtrat est jeté. 500µl de tampon Wash Buffer 1 (Premier lavage) sont ajoutés et l'ensemble est centrifugé 1 minute à 8000rpm.

La colonne est placée dans un tube collecteur de 2ml (fourni dans le kit) et le tube contenant le filtrat est jeté. 500µl de tampon Wash Buffer 2 sont ajoutés (2^{ème} lavage) et l'ensemble est centrifugé 3 minutes à 14000 rpm.

La colonne est placée dans un tube Eppendorf de 1,5ml; entre 50 et 100 µl de tampon Pure Link TM Genomic Elution buffer sont ainsi ajoutés suivis d'une incubation 1 à 5 minutes à température ambiante, après centrifugation 1 minute à 8000rpm. Une deuxième élution est réalisée : les 50µl sont mis dans la colonne et centrifugés 1 minute à 8000rpm.

L'ADN extrait est conservé à +4°C ou -20°C.

2-2) Dosage de l'ADN

Le dosage d'acides nucléiques consiste à déterminer la concentration d'acides nucléiques ; en utilisant un spectrophotomètre Nano Drop, ...

Une fois l'ADN extrait, il sera dosé pour déterminer sa concentration. En effet, les acides nucléiques présentent un pic d'absorption dans l'ultra-violet, dont le maximum se situe à 260 nm (Figure10). Un ADN est considéré pur lorsqu'il présente un rapport DO_{260} / DO_{280} compris entre 1.8 et 2.

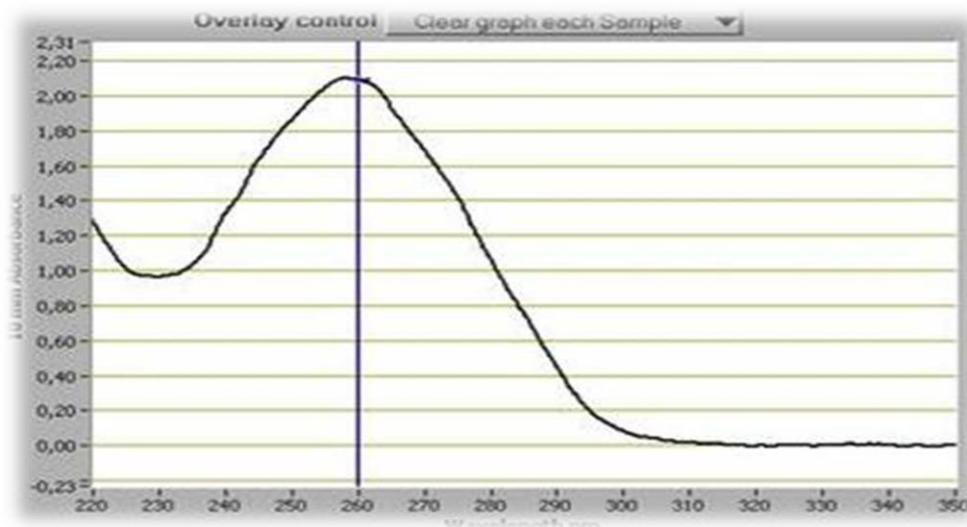


Figure 10 : Spectre relatif à un dosage d'acide nucléique [5']

3. Amplification des séquences nucléotidiques par PCR

3-1) Principe

La Réaction de Polymérisation en Chaînes PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique primordiale de la biologie moléculaire qui permet d'amplifier *in-vitro* une région spécifique d'un gène afin d'obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier. Cette réaction est réalisée en une succession de cycles. Les produits obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant. L'amplification est donc exponentielle. Cette technique a révolutionné le diagnostic moléculaire de plusieurs maladies génétiques d'une manière rapide et efficace.

3 -2) Protocole expérimental de la PCR

Le KIT « DreamTaq Green PCR Master Mix » est celui utilisé. C'est une solution prête à l'emploi contenant DreamTaq DNA Polymerase, DreamTaq Green buffer optimisé, MgCl₂ et dNTP et l'Eau (Water nuclease free).

La PCR a été effectuée et optimisée sur l'ADN génomique préalablement dilué à 100 ng/μl en utilisant les amorces sens et antisens spécifiques pour chaque région de l'exon 6 du gène *XPA*. Etant donné que l'exon 6 est très long et contient plus de 1138 pb, il sera donc difficile à amplifier. Pour cette raison, il est divisé en deux parties a et b. Chaque partie a deux couples d'amorces bien spécifiques (Tableau 2) : Le couple d'amorces *XPA-a* permettra l'amplification d'un fragment d'ADN de 594pb.

Le couple d'amorces *XPA-b* permettra l'amplification d'un fragment d'ADN de 544pb.

Tableau 2 : Séquences d'amorces utilisées pour l'amplification de l'exon 6 du gène *XPA*.

Amorces XPA-a		Amorces XPA-b	
Amorce sens	Amorce antisens	Amorce sens	Amorce antisens
5'GTGAGGTAAGAAAG TAAGTTTGCCAAG3'	5'TCTAGCACTCAG CTCCCATCTCTG3'	5'GTTTCAGTGAA GGTCACCTGGC3'	5'GGTTGGTAAATGCT CAGTAAATGTTAGC3'

Dans un tube Eppendorf, un mélange de 12μl d'H₂O+10μl de Tampon+1μl d'amorce F+1μl d'amorce R +1μl d'ADN est réalisé. Après centrifugation pendant 1 min, l'ensemble est placé dans un thermocycleur (*Applied Biosysteme*) : un appareil qui permet d'amplifier l'ADN pendant 35 cycles et chaque cycle se fait en trois étapes selon un programme déterminé.

- La dénaturation de l'ADN en simples brins à 95°C pendant 30 secondes.
- L'hybridation des amorces F et R à 64°C : la température d'hybridation est calculée à partir de la formule suivante : $T_a = T_m - 5^\circ\text{C}$, avec $T_m = [2(A+T) + 4(C+G)]$:
- L'élongation à 72°C.

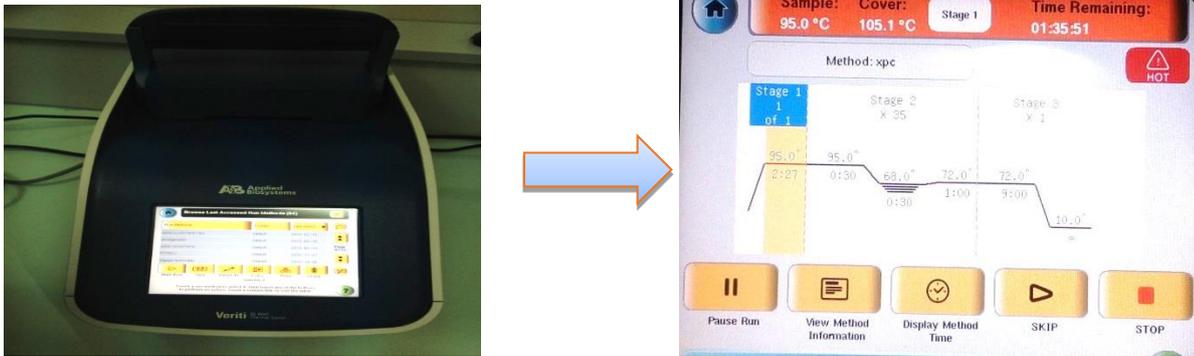


Figure 11 : Programme PCR dans le thermocycleur (Applied Biosysteme)

3-3) Témoins de la réaction PCR

Les témoins inclus pour chaque réaction PCR comprennent :

- Témoin positif a pour fonction de s'assurer des bonnes conditions de la PCR, ce témoin est représenté par l'ADN d'un sujet normal sain.
- Témoin négatif assure l'absence de contamination, auquel il n'y a pas d'ADN.

Dans notre cas, le témoin négatif qui va nous confirmer s'il y'a une contamination ou pas est celui réalisé.

3-4) Contrôle des produits PCR

Le contrôle du produit PCR se fait par électrophorèse, pour évaluer la quantité et la qualité d'ADN. La migration de l'ADN sous l'effet du champ électrique est réalisée dans un gel d'agarose à 2 %.

Préparation du Gel d'agarose : dans une fiole jaugée, 2g d'agarose pure et 100ml de TBE (1X)[Tris Borate EDTA] sont mélangés et placés dans un four micro-onde pour fondre l'agarose et homogénéiser le gel. Après homogénéisation du gel et élimination totale de la mousse, 4 µl de BET (Bromure d'éthidium (10mg/ml)) est ajouté puis le mélange est versé dans une cuve jusqu'à ce qu'il se solidifie. La cuve est ensuite placée dans le tampon de migration. La migration est lancée pendant 10 min à 80 Volts et la visualisation des fragments d'ADN se fait après exposition à la lumière ultra-violette.

4. Séquençage d'ADN

Le séquençage est la dernière étape qui permet de connaître la succession nucléotidique du gène étudié et de détecter les différentes mutations du gène *XPA*.

4-1) Purification par Exo SAP-IT®

ExoSAP sert à la purification rapide et efficace des produits de PCR. Il comporte deux enzymes hydrolytiques, l'exonucléase I(Exo) qui dégrade les ADN simples brins et la phosphatase alcaline de crevette (SAP) qui hydrolyse les dNTP libres. L'enzyme est active à 37°C et inactive à 80°C. Les fragments simples brins inférieurs à 100 pb sont ainsi dégradés. 2,5µl de l'enzyme ExoSAP-IT sont ajoutés à 5,5µl du produit PCR, et une centrifugation à 8000 pendant une minute est réalisée, le tube est placé dans le thermocycleur et soumis au cycle suivant :

Tableau 3 : Cycle du fonctionnement d'*ExoSAP-IT*®

Température	Durée
37°C	5 min
80 °C	1 min
10°C	∞

4-2) Réaction de séquence par BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing

La réaction de Sanger repose sur l'incorporation aléatoire de didéoxynucléotides interrupteurs de chaîne (ddNTP) présents dans le milieu réactionnel dont chacun est marqué par un fluorophore spécifique et dont le spectre d'émission est spécifique (Figure12). Une analyse spectrale va différencier les différents fluorochromes, associer la base correspondante et donc définir la séquence nucléotidique du brin d'ADN initial. Les fragments d'ADN synthétisés portent ce fluorophore terminal. On les appelle des terminateurs d'élongation ou "*BigDye Terminators*" ou "*Dye-labeled terminator*".

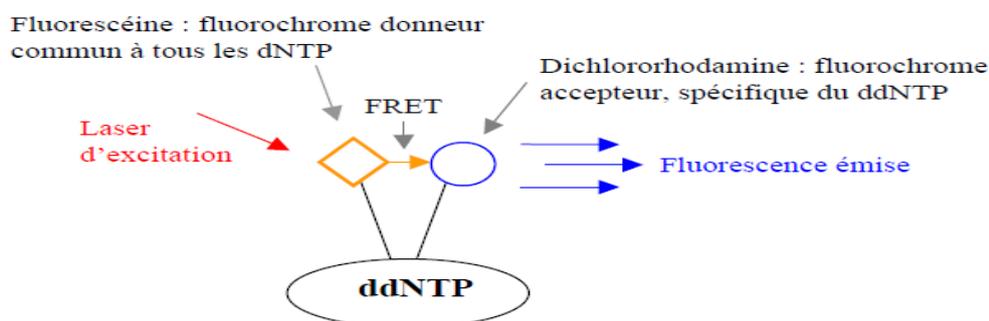


Figure 12 : Mécanisme de la fluorescence par la technique du transfert d'énergie par résonance.

Dans chacun des 2 tubes, les réactifs suivants sont ajoutés pour avoir un volume final de 10µl :

Tableau 4 : Réactifs utilisés dans la réaction de séquençage

4µl du produit PCR exosapé	4µl du produit PCR exosapé
4µl de l'eau pure	4µl de l'eau pure
1µl d'amorce F	1µl d'amorce R
1µl de Big Dye	1µl de Big Dye

Ensuite, après centrifugation, les deux tubes sont placés dans le Thermocycleur pour effectuer une amplification en 25 cycles selon un programme qui contient des conditions spécifiques à la réaction de séquence.

Un cycle correspond à :

Une étape de dénaturation de l'ADN à 96°C pendant 10 seconde pour obtenir l'ADN sous forme simple brin.

Une étape d'hybridation à 50°C pendant 5 seconds (température moyenne d'hybridation pour la majorité des amorces utilisées).

Une étape d'élongation de l'ADN par la taq polymérase à 60°C pendant 2 min. Cette température faible ralentit la Taq et va déplacer l'équilibre pour permettre une meilleure incorporation des ddNTP.

4-3) Purification de la réaction de séquence avec le Kit BigDye-XTerminator :

Le kit BigDye® XTerminator™ permet la purification des produits de réaction de séquence en capturant les nucléotides non incorporés dans la réaction, les sels et autres molécules chargées qui pourraient interférer lors de la détection des bases par le séquenceur.

Le kit contient :

- un flacon "SAM Solution" (stockage à T° ambiante)
- un flacon : « XTerminator Solution (stockage à 4°C, ne pas congeler)

Un mix contenant 45 µl de solution SAM et 10 µl de XTerminator Solution est préparé par puits, le mélange de 55µl est ensuite vortexé puis déposé dans chaque puits, et 10µl de produits de réaction de séquence sont ajoutés dans la plaque (la plaque doit être scellée correctement avec un film adhésif). La plaque est placée sur l'agitateur à 8000 rpm pendant 30 minutes.

(Les plaques peuvent être conservées 7 jours à 4°C (pas congelées) avant d'être analysées avec le séquenceur).

4-4) Détermination de la séquence :

La plaque est placée dans le séquenceur qui est un automate d'électrophorèse capillaire. Ce dernier lance un flux électrique d'ions à travers un capillaire, ce qui entraîne la migration des fragments d'ADN. Une fois arrivés au site de détection, les quatre fluorochromes des ddNTP terminaux seront excités. Suite à cette excitation, chaque fluorochrome émettra une lumière à une longueur d'onde différente qui sera détectée puis convertie en séquence par le logiciel d'analyse des séquences. Les séquences d'ADN sont déterminées par séquençage automatique (séquenceur à 8 capillaires appliedbiosystem 3500 DX).

5. Les outils bio-informatiques :

5-1) Logiciel BLAST (nucléotide BLAST) :

Le logiciel blast permet de comparer la séquence nucléique étudiée à une banque de séquences nucléiques sur les 2 brins. (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov)

5-2) Logiciel NCBI (CCDS database) :

Ce logiciel permet de localiser la mutation au niveau de la partie codante du gène étudié et éventuellement de connaître l'acide aminé touché par la mutation sur la séquence protéique correspondante.

5-3) Logiciel NCBI (Clin Var) :

Le logiciel permet d'évaluer l'impact clinique de la mutation (pathogénique ou pas), son origine (germinale ou somatique), son positionnement sur le génome entier et si elle a déjà été rapportée par autres auteurs.

CHAPITRE 2. RESULTATS ET DISCUSSION

I. Caractéristiques épidémiologiques des patients :

1. Nombre :

Il s'agit d'une étude rétrospective, réalisée sur une série de 21 patients marocains, présentant les symptômes cliniques de la maladie du Xeroderma Pigmentosum et dont le diagnostic moléculaire de la mutation du gène *XPC* était négatif.

2. Répartition des patients selon l'âge :

L'âge moyen des patients était de 16 ans avec des extrêmes allant de 2 à 39 ans.

La majorité des patients (42,85%) avait un âge entre 10 et 20 ans (Figure 13).

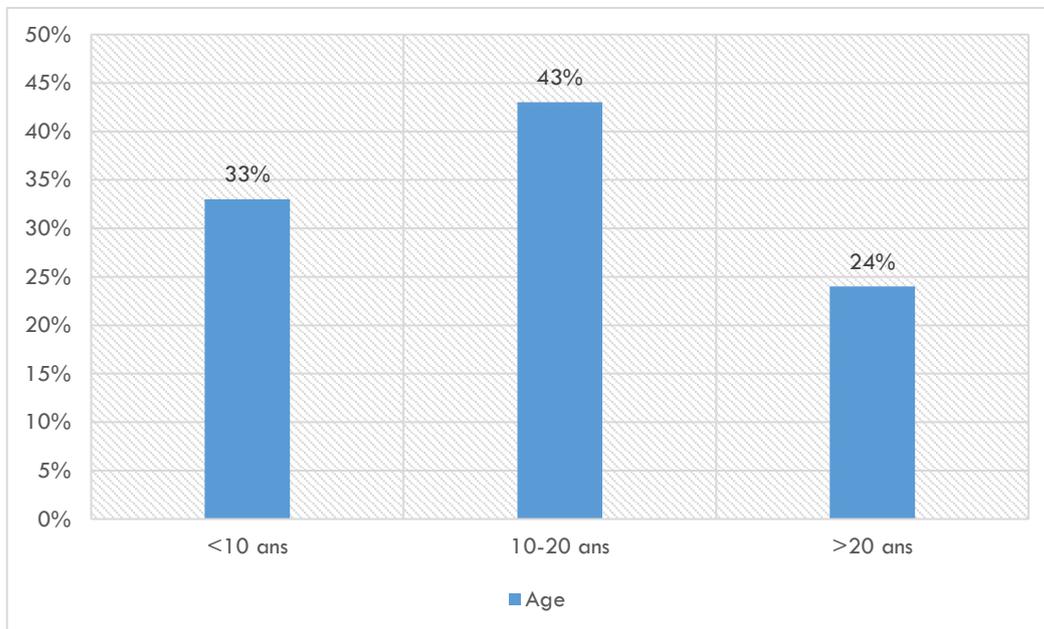


Figure 13 : Répartition des patients en fonction de l'âge

3. Répartition des patients selon le sexe :

Les patients étudiés présentent un sexe ratio (H/F) de 0,61 avec 8 hommes (38,09%) pour 13 femmes (61,90%). (Figure 14)

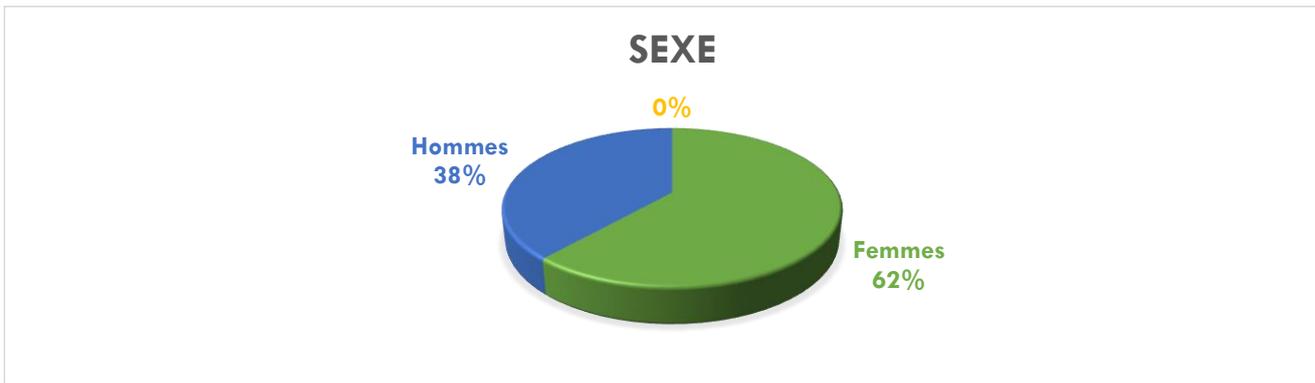


Figure 14 : Répartition des patients en fonction de sexe

II. Résultats de l'étude moléculaire :

1. Résultats de PCR et de migration sur gel d'agarose :

Dans le cadre de la recherche de la mutation du gène *XPA*, une amplification de l'exon 6 du gène (*XPA a* et *XPA b*) a été réalisée par la technique de PCR après l'extraction d'ADN par le KIT commercialisé « DreamTaq Green PCR Master Mix ».

Ensuite, la qualité du produit PCR a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose en présence d'un témoin négatif. La visualisation des fragments d'ADN est réalisée après exposition du gel à la lumière ultra-violette (Figure15 et 16) :

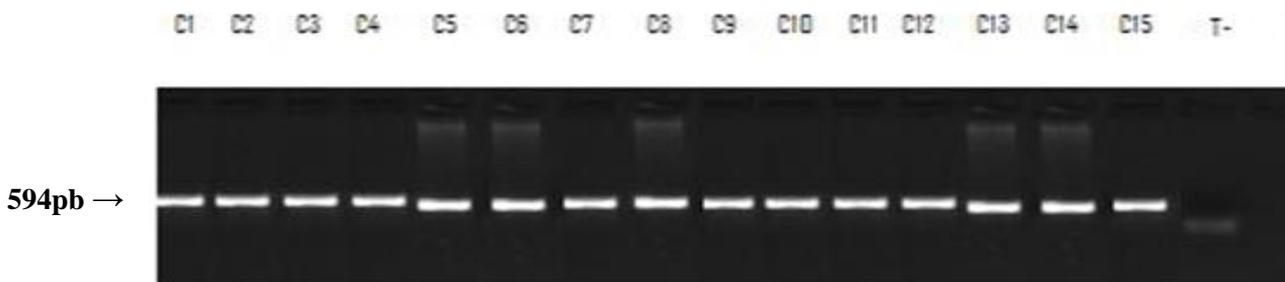


Figure 15 : Electrophorèse en gel d'agarose 2% des produits d'amplification par PCR avec les amorces **Amorces XPA-a** chez 15 patients XP.

De C1 à C15 : Patients XP

T- : témoin négatif

Taille du fragment a (XPA-a) : 594 pb



Figure 16 : Electrophorèse en gel d'agarose 2% des produits d'amplification par PCR avec les amorces **Amorces XPA-b** chez 15 patients XP.

De C1 à C15 : Patients XP

T- : témoin négatif

Taille du fragment b (XPA-b) : 544pb

Le résultat du profil du gel d'électrophorèse de l'exon 6 du gène *XPA* montre que les produits PCR amplifiés ne présentent pas de contamination. Cette observation est confirmée par le témoin négatif qui ne montre aucune bande au niveau du gel (Figure 15 et 16).

2. Résultats du séquençage de l'exon 6

La réaction de séquençage des 21 patients a montré que 9 patients présentant la mutation *XPA* qui est une substitution de nucléotide Cytosine situé dans la position 682 par la thymine (mutation non-sens (c.682C>T, p.Arg228X)). Pour les 13 autres sont non mutés dans le gène *XPA*.

Un exemple de l'électrophérogramme d'un patient présentant la mutation *XPA* est montré ci-dessous (Figure 17)

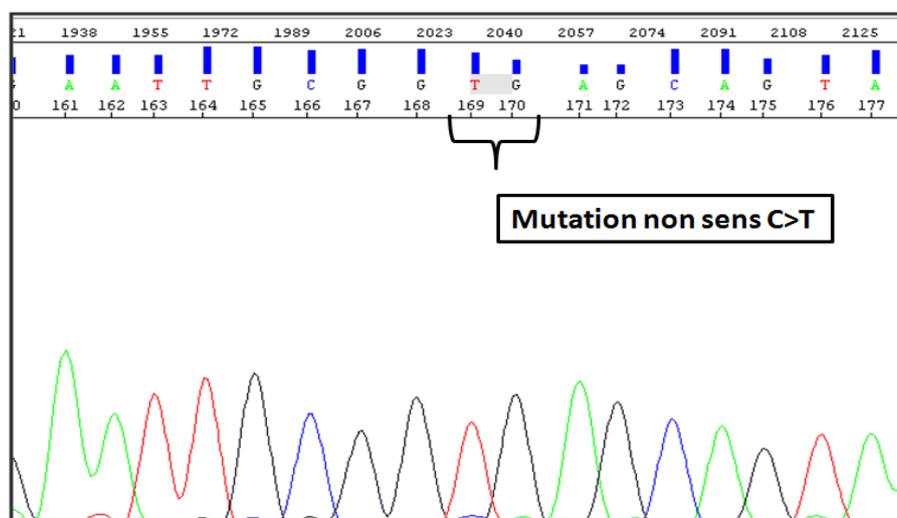


Figure 17 : Electrophérogramme de l'exon 6(Région XPA-a) présentant la mutation.

Un exemple de l'électrophérogramme d'un patient ne présentant pas la mutation XPA est montré ci-dessous (Figure 18) :

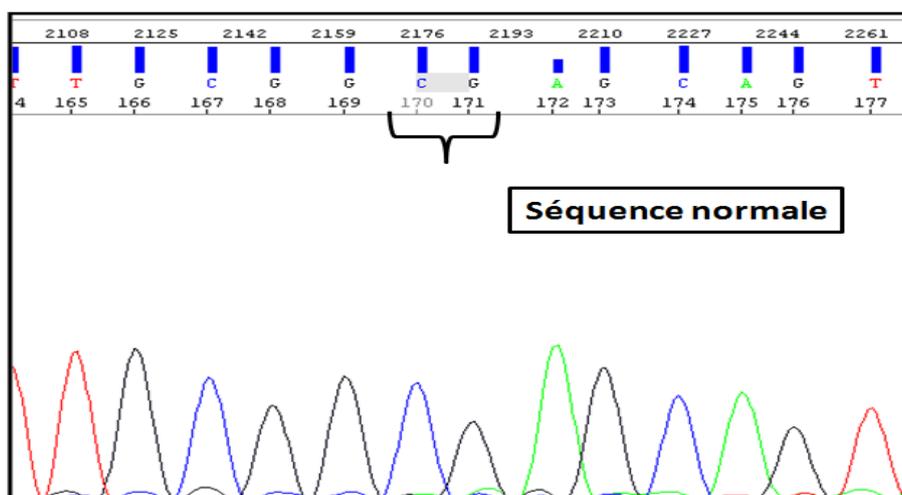


Figure 18 : Electrophérogramme de l'exon 6(région XPAa) non muté.

L'alignement avec une séquence de base de données BLAST a confirmé le résultat obtenu (Figure 19) :

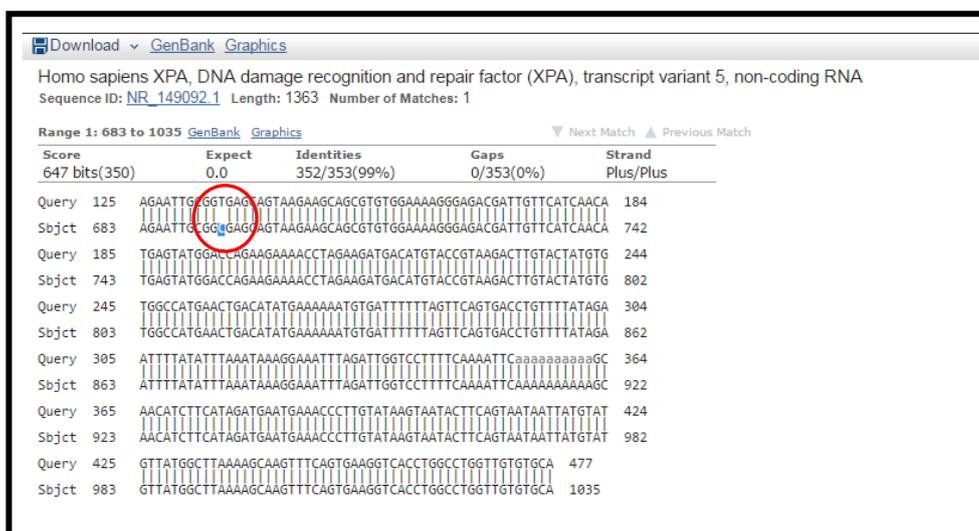


Figure 19 : Alignement de la zone séquencée complète du gène XPA avec une séquence de la base de données Blast.

Comme résumé, l'analyse des mutations a révélé que 9 patients sur 21 étaient homozygotes pour la mutation XPA et 13 patients ont été négatifs pour cette mutation.

De ce fait, la fréquence d'altération du gène XPA est estimée à 42,85% (9/21) chez nos patients marocains étudiés.

DISCUSSION

Le résultat obtenu dans cette étude rétrospective a montré que le taux de confirmation de la mutation du gène XPA est de **42,85%**. Pour d'autres études moléculaires ; par exemple en Tunisie, six des sept patients XP du groupe A présentaient cette mutation non-sens avec une fréquence de **86 %** [54]. Une étude menée par Soufir et al. incluant 66 familles XP non apparentées d'Afrique du Nord, a montré que la mutation c.682C>T (p.Arg228X) était présente chez 12% patients analysés avec une fréquence de **87,%** [46]. Une étude génétique des gènes *XPC* et *XPA* sur une population marocaine constituée de 24 cas appartenant à 22 familles non apparentées a révélé 14 cas de patients *XPC* et 6 cas *XPA* avec un pourcentage de **25%** [50]. Une autre étude génétique du gène XPA menée par Zineb et al., a montré que 7 des 9 patients étaient homozygotes pour la mutation c.682C>T, p.Arg228X, sachant que leur famille étudiés étaient hétérozygotes. La fréquence de cette mutation a été estimée à 83,33 % (5/6 familles). Cela suggère que cette mutation peut avoir un effet fondateur commun dans la région d'Afrique du Nord [55].

La comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature montre une discordance dans les pourcentages de la mutation XPA. Notre résultat peut éventuellement être lié au nombre des patients étudiés qui est un peu faible.

Les patients de notre série présentent un âge moyen de 15,95 ans avec des extrêmes allant de 5 à 39ans. En Tunisie l'âge moyen des patients était de 23,85 avec des extrêmes allant de 9 à 35 ans [45]. Pour l'étude moléculaire menée par Zineb Kindil et al, sur une population marocaine, le moyen d'âge des patients était de 16,42[55]

Notre résultat s'approche de celui des études réalisées par Zineb Kindil et al, et dont l'étude a porté également sur une population marocaine.

Conclusion et perspectives

Le XP est une maladie très hétérogène par sa présentation clinique et cellulaire du fait d'une hétérogénéité génétique (sept groupes de complémentation en plus du XP-V), ce qui rend le diagnostic un peu difficile. Il regroupe des manifestations dermatologiques et oculaires avec un risque élevé aux néoplasies cutanéomuqueuses, l'atteinte neurologique est parfois rapportée.

Notre travail qui s'intéresse à la recherche de la mutation du gène *XPA* chez les patients XP marocains constitue la première étude réalisée dans notre région.

Notre but était de définir le profil mutationnel des patients XP non apparentés du Nord-est du Maroc. La connaissance de ces mutations est importante pour le conseil génétique. Cela va grandement simplifier le diagnostic moléculaire permettant ainsi la recherche ciblée et rapide des mutations les plus fréquentes dans notre contexte. Ainsi, cela offrirait la possibilité d'effectuer un conseil génétique pour les proches de XP dans notre pays, pour instaurer une prise en charge précoce et réduire la morbidité et la mortalité liée à cette maladie.

La comparaison de nos résultats avec ceux rapportés dans différentes études des populations voisines, montre qu'il est intéressant d'élargir l'effectif de la population étudiée pour appuyer nos résultats concernant la fréquence des mutations et le taux de consanguinité évoqués dans ce travail.

De plus, la découverte de ces anomalies moléculaires permet de proposer un test génétique aux individus issus de familles à risque. Ceci afin de mettre en place une stratégie de prévention à travers le conseil génétique pour l'identification des hétérozygotes et le diagnostic prénatal dans un premier temps, et pourquoi pas offrir une perspective de recherche et de développement de nouvelles thérapeutiques plus ciblées. A titre d'exemple, le remplacement du gène défectueux par thérapie génique.

Références bibliographiques:

- 1) Lichon V, Khachemoune A. Xeroderma pigmentosum: beyond skin cancer. *J Drugs Dermatol.* (2007); 6(3):281-8.
- 2) Sinha R.P., Häder D.-P. UV-induced DNA damage and repair: A review. *Photochem. Photobiol. Sci.* (2002); 1:225–236.
- 3) Soufir N, Ged C, Bourillon A, Austerlitz F, Chemin C et al A prevalent mutation with founder effect in xeroderma pigmentosum group C from North Africa. *J Invest Dermatol,* (2010) 130:1537–1542
- 4) *Asmae RASSO* Étude génétique XPC et XPA des patients atteints de xeroderma pigmentosum d'une population marocaine, (2019), Volume 146, Issue 12.
- 5) Lehmann, A.R., McGibbon, D. & Stefanini, M. Xeroderma pigmentosum. *Orphanet J Rare Dis* (2011). 6, 70.
- 6) M. Zghal, B. Fazaa, S. Abdelhak, M. Mokni Xeroderma pigmentosum *Ann. Dermatol.Venereol,* (2018), 145 (11) pp. 706-722
- 7) Kraemer KH, Lee MM, Scotto J. Xeroderma pigmentosum. Cutaneous, ocular, and neurologic abnormalities in 830 published cases. *Arch Dermatol.* (1987) ; 123:241–250.
- 8) B.Karrakchou, I. Ratbi, A. Sefiani. Diagnostic moléculaire des mutations récurrentes des gènes *XPC* et *XPA* chez les patients marocains atteints de xeroderma pigmentosum. *annder.*(2019).09.387 (<https://doi.org/10.1016/j>).
- 10)Bradford PT, Goldstein AM, Tamura D, Khan SG, Ueda T, Boyle J, Oh KS, Imoto K, Inui H, Moriwaki SI, Emmert S, Pike KM, Raziuddin A, Plona TM, Digiovanna JJ, Tucker MA, Kraemer KH: Cancer and neurologic degeneration in xeroderma pigmentosum: long term follow-up characterises the role of DNA repair. *J Med Genet.* (2011), 48: 168-176. 10.1136/jmg. (2010).083022.
- 11) Robbins JH, Kraemer KH, Lutzner MA, Festoff BW, Coon HG: Xeroderma pigmentosum: an inherited disease with sun-sensitivity, multiple cutaneous neoplasms, and abnormal DNA repair. *Annals Internal Med.* (1974), 80: 221-248.
- 12) Stefanini M, Kraemer KHK: Xeroderma pigmentosum. *Neurocutaneous Diseases.* Edited by: Ruggieri M, Pascual-Castroviejo I, Di Rocco C. Chapter. (2008), 51: 771-792.
- 13) Ramkumar HL, Brooks BP, Cao X, Tamura D, Digiovanna JJ, Kraemer KH, Chan CC: Ophthalmic manifestations and histopathology of xeroderma pigmentosum: two clinicopathological cases and a review of the literature. *Surv Ophthalmol.* (2011), 56: 348-361.

- 14) Zghal M, et al. Xeroderma pigmentosum : Manifestations cutanées, oculaires et neurologiques à partir de 49 patients tunisiens. *Tunis Med.* (2005); 83(12):760–763.
- 15) Andrews AD, Barrett SF, Robbins JH: Xeroderma pigmentosum neurological abnormalities,(1984) doi: 10.1073/pnas.75.4.
- 16) Dr Hiva FASSIHI - Xeroderma pigmentosum Dernière mise à jour: Mai (2011).
- 17) Limsirichaikul S, Niimi A, Fawcett H, Lehmann A, Yamashita S, Ogi T: A rapid non-radioactive technique for measurement of repair synthesis in primary human fibroblasts by incorporation of ethynyl deoxyuridine (EdU). *Nucleic Acids Res.* (2009), 37: e31.
- 18) Cleaver JE, Volpe JPG, Charles WC, et al. Prenatal diagnosis of xeroderma pigmentosum and Cockayne syndrome. *Prenatal Diagnosis.* (1994) ; 14:921–8.
- 19) Kaoru Sugasawa: Mechanism and regulation of DNA damage recognition in mammalian nucleotide excision repair (2019).
- 20) Ford JM, Hanawalt PC. Role of DNA excision repair gene defects in the etiology of cancer. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1997; 221:47–70.
- 21) Aboussekhra A, Biggerstaff M, Shivji MKK, Vilpo JA, Moncollin V, Podust VN, Protic M, Hubscher U, Egly J-M, Wood RD. Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components. *Cell.* (1995); 80:859–868.
- 22) Petit C, Sancar A. Nucleotide excision repair: from E. coli to man. *Biochimie.* (1999); 81:15–25.
- 23) Sugasawa K, Ng JMY, Masutani C, Iwai S, Van der Spek P, Eker A, Hanoaka F, Bootsma D, Hoeijmakers JHJ. Xeroderma pigmentosum group C complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Mol Cell.* (1998); 2:223–232.
- 24) Araki M, Masutani C, Takemura M, Uchida A, Sugasawa K, Kondoh J, Ohkuma Y, Hanaoka F. 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.* (2001); 276:18665–18672.
- 25) Coin F, Oksenysh V, Egly JM. Distinct roles for the XPB/p52 and XPD/p44 subcomplexes of TFIIH in damaged DNA opening during nucleotide excision repair. *Mol Cell.* (2007); 26:245–256.
- 26) Schaeffer et al. The General Transcription-Repair Factor TFIIH Is Recruited to the Excision Repair Complex by the XPA Protein Independent of the TFIIIE Transcription Factor.(1993, 1994, 3 March 1995); Roy et al. 1994b. Volume 270, Pages 4896-4902.

- 27) Evans E, Fellows J, Coffey A, Wood RD. Open complex formation around a lesion during nucleotide excision repair provides a structure for cleavage by human XPG protein. *EMBO J.* (1997); 16:625–638.
- 28) Tsodikov OV, Ivanov D, Orelli B, Staresinic L, Shoshani I, Oberman R, Scharer OD, Wagner G, Ellenberger T. Structural basis for the recruitment of ERCC1-XPF to nucleotide excision repair complexes by XPA. *EMBO J.* (2007); 26:4768–4776.
- 29) Staresinic L, Fagbemi AF, Enzlin JH, Gourdin AM, Wijgers N, Dunand-Sauthier I, Giglia-Mari G, Clarkson SG, Vermeulen W, Scharer OD. Coordination of dual incision and repair synthesis in human nucleotide excision repair. *EMBO J.* (2009); 28:1111–1120.
- 30) Ogi T, Limsirichaikul S, Overmeer RM, Volker M, Takenaka K, Cloney R, Nakazawa Y, Niimi A, Miki Y, Jaspers NG, Mullenders LH, Yamashita S, Foustier MI, Lehmann AR. Three DNA polymerases, recruited by different mechanisms, carry out NER repair synthesis in human cells. *Mol Cell.* (2010); 37:714–727
- 31) Araujo SJ, Tirode F, Coin F, Pospiech H, Syvaaja JE, Stucki M, Hubscher U, Egly JM, Wood RD. 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.* (2000); 14:349–359.
- 32) Moser J, Kool H, Giakzidis I, Caldecott K, Mullenders LH, Foustier MI. Sealing of chromosomal DNA nicks during nucleotide excision repair requires XRCC1 and DNA ligase III alpha in a cell-cycle-specific manner. *Mol Cell.* (2007); 27:311–323.
- 33) F. Hanaoka, in *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)*, (2013).
- 34) N. El Fékih et al Neurological abnormalities in xeroderma pigmentosum. (2009) *Revue neurologique* 165 ; 967–970.
- 35) Masaharu Hayashi, Tatsuyuki Ohto, Kei Shioda, Ryo Fukatsu. *Brain and Development*, (April 2012), Volume 34, Issue 4, Pages 287-292.
- 36) Lehmann, A. R., Bootsma, D., Clarkson, S. G., Cleaver, J. E., McAlpine, P. J., Tanaka, K., Thompson, L. H., Wood, R. D. Nomenclature of human DNA repair genes. *Mutat. Res.* 315: 41-42, 1994. Sancar A; Mechanisms of DNA repair by photolyase and excision nuclease (Nobel lecture), (2016) *Angewandte Chemie* 55, 8502–8527
- 37) Layher, S. K. and Cleaver, J. E. "Quantification of XPA gene expression levels in human and mouse cell lines by competitive RT-PCR" *Mutat Res.* (1997). 383, 9-19.
- 38) Yang Z.G., Liu Y., Mao L.Y., Zhang J.T., Zou Y. Dimerization of human XPA and formation of XPA(2)-RPA protein complex. *Biochemistry.* (2002); 41:13012–13020. (Doi: 10.1021/bi026064z).

- 39) Hilton B, Shkriabai N, Musich PR, Kvaratskhelia M, Shell S, and Zou Y A New Structural Insight into XPA-DNA Interaction, (2014) *Biosci Rep* 34, 831–840.
- 40) Bartels, C. L. and Lambert, M. W. (2007). "Domains in the XPA protein important in its role as a processivity factor" *Biochem Biophys Res Commun*, (2007) 356, 219-25
- 41) States, J. C., McDuffie, E. R., Myrand, S. P., McDowell, M., Cleaver, J. E. Distribution of mutations in the human xeroderma pigmentosum group A gene and their relationships to the functional regions of the DNA damage recognition protein. *Hum. Mutat.* (1998) 12: 103-113.
- 42) Maryssa Semer, Le facteur de réparation XPC est un cofacteur de l'ARNpolymérase II régulant les modifications post-traductionnelles des histones lors de la transcription (2018).
- 43) Kurz EU, Lees-Miller, Bolderson E et al.,(2009)
- 44) M. Senhaji et al (2012) c.1643_1644delTG XPC mutation is more frequent in Moroccan patients with xeroderma pigmentosum *Arch Dermatol Res*, (2013) 305:53–57.
- 45) Bensenouci S, Louhibi L, De Verneuil H, Mahmoudi K, Saidi-Mehtar N. Diagnosis of xeroderma pigmentosum Groups A and C by detection of two prevalent mutations in West Algerian population: a rapid genotyping tool for the frequent XPC mutation c.1643_1644delTG. *BioMed Res Int.* (2016). Disponible sur : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4931069/>. Accessed (18 Jul 2017).
- 46) Soufir N, Ged C, Bourillon A, Austerlitz F, Chemin C, Sary A, et al. A prevalent mutation with founder effect in xeroderma pigmentosum group C from North Africa. *J Invest Dermatol.* (2010); 130(6):1537–42.
- 47) B.Karrakchou I.Ratbi A.Sefiani Diagnostic moléculaire des mutations récurrentes des gènes *XPC* et *XPA* chez les patients marocains atteints de xeroderma pigmentosum ;(Décembre 2019).
- 48) Xeroderma Pigmentosum (4 août 2017)/ par L'équipe Santé sur le Net.
- 49) M. Jones A. Rourou, N. Litaïem, I. Nakouri, M. Zghal, F, F. Zeglaoui .Profil épidémio-clinique des patients atteints de xeroderma pigmentosum en Tunisie : à propos de 82 cas - Dermatologie, hôpital Charles-Nicolle, Tunisie, Faculté de médecine de Tunis (25/11/2017).
- 50) Sikandar G. Khan, Vanessa Muniz-Medina, Tala Shahlavi, Carl C. Baker, Hiroki Inui, Takahiro Ueda, Steffen Emmert, Thomas D. Schneider, Kenneth H. Kraemer. 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 , (1 August 2002), *Nucleic Acids Research*, Volume 30, Issue 16, Pages 3624–3631.
- 51) Lehmann AR, Stevens S: A rapid procedure for measurement of DNA repair in human fibroblasts and for complementation analysis of xeroderma pigmentosum cells. *Mutation Research.* (1980), 69: 177-190.

- 52) Lehmann AR, et al. Xeroderma pigmentosum cells with normal levels of excision repair have a defect in DNA synthesis after UV-irradiation. (1975) *Proc Natl Acad Sci USA* 72(1):219–223.
- 53) Hilton B, Shkriabai N, Musich PR, Kvaratskhelia M, Shell S, and Zou Y A New Structural Insight into XPA-DNA Interaction, 2014 *Biosci Rep* 34, 831–840.
- 54) Nishigori C, Zghal M, Yagi T, Imamura S, Komoun MR, Takebe H. High prevalence of the point mutation in exon 6 of the xeroderma pigmentosum group A-complementing (XPAC) gene in xeroderma pigmentosum group A patients in Tunisia. *Am J Hum Genet.* (1993); 53 (5):1001–6.
- 55) Kindil, Z., Senhaji, M.A., Bakhchane, A. *et al.* Genetic investigation of XPA gene: high frequency of the c.682C>T mutation in Moroccan XP patients with moderate clinical profile.(2017) *BMC Res Notes* 10, 704. (<https://doi.org/10.1186/s13104-017-3042-6>).

Sites web :

- 1') https://fr.wikipedia.org/wiki/Xeroderma_pigmentosum.consulté le 5 Mai 2021.
- 2') <http://dermatomaroc.com/xeroderma-pigmentosum-2/>. Consulté le 11 Mai2021.
- 3') <http://dermatomaroc.com/xeroderma-pigmentosum/>.consulté le 20 Mai 2021
- 4')https://www.francetvinfo.fr/monde/afrique/maroc/au-maroc-les-enfants-de-la-lune-doivent-se-cacher-du-soleil_3575427.html. Consulté le 25 Mai 2021.
- 5') <https://www.biorigami.com/?p=2726>.Consulté le 10 Juin 2021.
- 6') <http://www.orpha.net>
- 7')https://www.researchgate.net/figure/Structural-map-of-the-human-XPC-gene-The-16-exons-and-15-introns-of-the-33-kb-XPC-gene_fig1_11210569
- <https://ojrd.biomedcentral.com/>.

